

**Resistencia sistémica inducida para el control
de *Pestalotia* sp. y *Colletotrichum* sp. en fresa
(*Fragaria x ananassa* Duch.) por medio de
tres agentes de control biológico**

María Fernanda Godoy Sosa

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2018

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRÓNOMICA

**Resistencia sistémica inducida para el control
de *Pestalotia* sp. y *Colletotrichum* sp. en fresa
(*Fragaria x ananassa* Duch.) por medio de
tres agentes de control biológico**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera Agrónoma en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

María Fernanda Godoy Sosa

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2018

Resistencia sistémica inducida para el control de *Pestalotia* sp. y *Colletotrichum* sp. en fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) por medio de tres agentes de control biológico

María Fernanda Godoy Sosa

Resumen. La fresa es un fruto de exportación y de alto valor nutricional, pero es altamente susceptible al ataque de patógenos requiriendo un uso intensivo de pesticidas en su producción; más aún, este control químico es altamente costoso y perjudicial para los usuarios y el ambiente. En los países en desarrollo este problema se magnifica como ocurrió en plantaciones de fresa en La Tigra, Francisco Morazán, Honduras en el 2016 donde hubo una gran devastación causada por *Pestalotia* sp.; y los productores de la zona tuvieron que sustituir este cultivo por el de zanahoria. El objetivo del estudio fue evaluar el uso de explantes foliares *in vitro* para el análisis de patologías en fresa, mediante la resistencia sistémica inducida por medio de agentes de control biológico (ACB): *Bacillus subtilis* (Serenade®1,34 SC), *Fallopia sachalinensis* (Regalia Maxx®) y *Trichoderma* sp. para el control de los hongos *Pestalotia* sp. y *Colletotrichum* sp. Los resultados demostraron que los explantes foliares de fresa son viables por 40 días en condiciones *in vitro*. Además, fueron susceptibles a infecciones de *Pestalotia* sp. y *Colletotrichum* sp. mostrando síntomas al primer y quinto día, respectivamente. Las combinaciones de los tres ACB presentaron los mejores resultados en el control de los dos patógenos. Los resultados del estudio mostraron que el uso de sub-dosis en las aplicaciones combinadas de ACB fueron eficaces para la prevención de enfermedades en explantes *in vitro* de fresa.

Palabras clave: *Bacillus subtilis*, *Fallopia sachalinensis*, patógeno, *Trichoderma* sp.

Abstract. Strawberry is an export fruit with a high nutritional value, but it is highly susceptible to pathogens, and requires an intense use of pesticides in production; even more, the chemical control is very expensive and harmful to users and the environment. In developing countries, this problem is magnified, as happen in La Tigra, Francisco Morazán, Honduras in 2016 where there was a large devastation caused by *Pestalotia* sp., and the producers decided to replace the strawberry crop for carrot production. The objective of this study was to evaluate the use of *in vitro* foliar explants for the analysis of pathologies in strawberry, throughout the induction of systemic resistance by the biological control agents (BCA): *Bacillus subtilis* (Serenade® 1,34 SC), *Fallopia sachalinensis* (Regalia Maxx®) and *Trichoderma* sp. for the control of *Pestalotia* sp. and *Colletotrichum* sp. The results showed that the strawberry leaf explants could survive for 40 days on *in vitro* conditions. Also, they were susceptible to *Pestalotia* sp. and *Colletotrichum* sp. infections, showing the first symptoms at the first and fifth days, respectively. The combinations of the three BCA's resulted in the control for the two pathogens. These results showed that the use of low doses for the combination of BCA's applications are successful in preventing foliar diseases on strawberry explants.

Key words: *Bacillus subtilis*, *Fallopia sachalinensis*, pathogen, *Trichoderma* sp.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. METODOLOGÍA.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
4. CONCLUSIONES	18
5. RECOMENDACIONES.....	19
6. LITERATURA CITADA.....	20
7. ANEXOS	22

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Descripción y dosificación de fertilizantes utilizados en el ensayo de inducción de resistencia sistémica en fresa <i>in vitro</i> . Zamorano, Honduras 2018	3
2. Descripción de los tratamientos y dosificaciones utilizadas en el experimento inducción de resistencia sistémica <i>in vitro</i> en fresa. Zamorano, Honduras 2018..	6
3. Comparación de dosis utilizadas con las recomendadas por la casa comercial de los agentes biológicos utilizados en el ensayo de inducción de resistencia sistémica en fresa <i>in vitro</i> . Zamorano, Honduras 2018.....	6
4. Información sobre las cepas de hongos utilizadas en el experimento inducción de resistencia sistémica <i>in vitro</i> en fresa. Zamorano, Honduras 2018.....	7
5. Resultados del análisis estadístico para el control de <i>Pestalotia</i> sp. con los agentes de control biológico a diferentes concentraciones; en el en el ensayo de inducción de resistencia sistémica inducida en fresa <i>in vitro</i> . Zamorano, Honduras 2018	11
6. Porcentaje del área infectada de <i>Pestalotia</i> sp. con los tratamientos de agentes de control biológico en el ensayo de inducción de resistencia sistémica inducida en fresa <i>in vitro</i> . Zamorano, Honduras 2018.....	12
7. Resultados del análisis estadístico de <i>Colletotrichum</i> sp. en el ensayo de inducción de resistencia sistémica inducida en fresa <i>in vitro</i> . Zamorano, Honduras 2018.....	15
8. Porcentaje del área infectada de <i>Colletotrichum</i> sp. con los tratamientos de agentes de control biológico en el ensayo de inducción de resistencia sistémica inducida en fresa <i>in vitro</i> . Zamorano, Honduras 2018.....	15

Figuras	Página
1. Respuesta a estrés por siembra en medio de cultivo agar agua semisólido de los explantes foliares obtenidos de la planta madre y del estolón de fresa, utilizados en el ensayo de inducción de resistencia sistémica inducida en fresa <i>in vitro</i> . Zamorano, Honduras 2018	9
2. Línea de tiempo que muestra el desarrollo infeccioso de <i>Pestalotia</i> sp. en el ensayo de inducción de resistencia sistémica inducida en fresa <i>in vitro</i> . Zamorano, Honduras 2018	10

3. Porcentaje de severidad en explantes foliares con los tratamientos con agentes de control biológico para el hongo <i>Pestalotia</i> sp. en el ensayo de inducción de resistencia sistémica inducida en fresa <i>in vitro</i> . Zamorano, Honduras 2018	12
4. Severidad de daño de <i>Pestalotia</i> sp. después de la aplicación de tratamientos con agentes de control biológico. Fotografías tomadas 15 días después de la inoculación con el patógeno en el ensayo de inducción de resistencia sistémica inducida en fresa <i>in vitro</i> . Zamorano, Honduras 2018	13
5. Porcentaje de severidad en explantes foliares con los tratamientos con agentes de control biológico para el hongo <i>Colletotrichum</i> sp. en el ensayo de inducción de resistencia sistémica inducida en fresa <i>in vitro</i> . Zamorano, Honduras 2018	16
6. Severidad de daño de <i>Colletotrichum</i> sp. después de la aplicación de tratamientos con agentes de control biológico. Fotografías tomadas 20 días después de la inoculación con el patógeno; en el ensayo de inducción de resistencia sistémica inducida en fresa <i>in vitro</i> . Zamorano, Honduras 2018.	17

Anexos

Página

1. Protocolo para la elaboración de agar agua semisólido para siembra de explantes foliares de fresa (AA).....	22
2. Protocolo de siembra de explantes foliares de fresa para estudios <i>in vitro</i>	23
3. Protocolo para el uso del software IMAGEJ para el análisis de severidad del tejido foliar	24
4. Protocolo para siembra de hongos.	28
5. Protocolo para recolección y conteo de esporas de hongos	29
6. Protocolo para la inoculación de <i>Pestalotia</i> sp. en explantes foliares <i>in vitro</i> de fresa.	30
7. Protocolo para el conteo de células con el hemocitómetro (cámara de Neubauer)	31
8. Sintaxis de SAS 9.4 para análisis estadístico de bloques completos al azar multifactorial.	32

1. INTRODUCCIÓN

La demanda de alimentos crecerá en 70-100% para el año 2050, y el problema se ahonda debido al crecimiento en la urbanización que reduce anualmente el área arable, por lo que es necesario evaluar nuevos métodos para disminuir pérdidas y aumentar la productividad, y así poder contrarrestar los retos de la seguridad alimentaria (Ning *et al.* 2017). La desnutrición ha sido uno de los mayores problemas relacionados a nivel mundial, y se atribuyen 25,000 muertes diarias por hambre (Schumann y D'Arcy 2012); lo que hace imperativo que los países en desarrollo mejoren las tecnologías para reducir al máximo las pérdidas en campo, y así producir mayor cantidad y calidad de alimentos. El uso de resistencia inducida podría ser un método económico y ambientalmente seguro para el control de enfermedades en plantas (Ning *et al.* 2017).

La fresa [*Fragaria x ananassa* (Duchesne ex Weston) Duchesne ex Rozier] es un cultivo perteneciente a la familia Rosácea (Amil *et al.* 2011), y cuenta con importantes propiedades nutritivas por su alto contenido de vitaminas C y E, ácido fólico y minerales como potasio, magnesio y calcio. Al ser rica en potasio y baja en sodio, ayuda a regular la presión arterial en humanos mediante la bomba de sodio y potasio (Eroski Consumers 2018). La fresa es un producto de exportación siendo Estados Unidos el principal productor a nivel mundial, y Guatemala a nivel centroamericano (FAO 2010). El cultivo requiere de constantes aplicaciones de pesticidas para su producción; y al menos 23 pesticidas son utilizados en la producción intensiva de fresa, de los cuales tres son residuales y se detectan en el fruto para consumo en supermercados (USDA 2018).

Con el fin de reducir el uso de pesticidas para producción de fresa en campo se evaluaron los tratamientos Regalia Maxx® (*Fallopia sachalinensis*), *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* (Serenade® 1,34 SC). *Fallopia sachalinensis* (Regalia Maxx®) es un compuesto biológico que activa el sistema inmunológico de las plantas y crea un sistema natural de defensas ante el ataque de enfermedades, e induce la producción de fitoalexinas, fortalece la pared celular, produce antioxidantes y compuestos fenólicos que actúan como inhibidores de patógenos (Marrone Bio Innovations 2014). La colonización de la raíz y la comunicación química por cepas de *Trichoderma* influye positivamente en la fisiología de la planta al modificar su expresión génica; estos cambios generalmente mejoran su rendimiento. Los protectores químicos proporcionan un control de los agentes patógenos relativamente corto, pero muy eficaz, así también *Trichoderma* spp. coloniza las raíces y proporciona beneficios a las plantas durante toda la producción (Harman 2011). La bacteria *Bacillus subtilis* activa reguladores de transcripción de ADN permitiendo que las células de la planta alcancen respuestas ultrasensibles a patógenos. *B. subtilis* posee endosporas (esporas metabólicamente inertes) que son resistentes al estrés por lo que perduran en ambientes hostiles (Narula *et al.* 2016; Tasaki *et al.* 2017).

En el año 2016 en La Tigra, Honduras, se reportaron pérdidas en la producción de fresa de hasta el 80% que fueron atribuidas al patógeno *Pestalotia* sp. que causa la enfermedad conocida como Pestalotiopsis. Esta enfermedad ha reportado pérdidas de hasta el 100% del cultivo en zonas productoras de California (Van Hemelrijck *et al.* 2017). En Honduras varios factores facilitaron el desarrollo de la enfermedad y la devastación del cultivo, incluyendo la falta de rotación de cultivos, el uso recurrente del mismo material vegetal por más de una década, y, las fuertes y frecuentes lluvias del 2016. El problema fue tan grave en la zona que se optó por sustituir el cultivo de fresa por el de zanahoria.

Pestalotia sp. provoca la necrosis del tejido en el eje de las hojas, partes de la corona superior y podredumbre de corona basal en fresa que produce a su vez el colapso de la planta (Van Hemelrijck *et al.* 2017). Otra enfermedad importante en fresa es causada por *Colletotrichum* sp. que puede sobrevivir en el suelo durante varios meses sin la presencia de plantas hospederas; el patógeno cuenta con distintos hospederos secundarios que van desde plantas silvestres hasta algunas malezas. Específicamente en fresa, *Colletotrichum* sp. produce la enfermedad conocida como antracnosis que provoca pudrición, marchitez, manchas pequeñas y hundimiento en frutos, lesiones en la corona y muerte de la planta. Normalmente las infecciones ocurren en plantas en etapa de vivero (Pruski *et al.* 2000; Zolda *et al.* 2005).

Los objetivos de este estudio fueron:

- Establecer protocolos para el cultivo *in vitro* de explantes foliares de fresa.
- Caracterizar hongos fitopatógenos en explantes foliares *in vitro* de fresa.
- Evaluar las aplicaciones de *Fallopia sachalinensis* (Regalia Maxx[®]), *Bacillus subtilis* (Serenade[®] 1,34 SC) y *Trichoderma* sp. en la inducción de resistencia sistémica en explantes foliares de fresa *in vitro* para el control de *Pestalotia* sp. y *Colletotrichum* sp.

2. METODOLOGÍA

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología, Diagnóstico e Investigación Molecular de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, ubicada en el Valle del Yegüare a 32 km al sureste de Tegucigalpa, Honduras; con una temperatura promedio de 24 °C, una precipitación anual de 1,100 mm y a una altura de 800 msnm. Las plantas madres de fresa fueron establecidas dentro de una casa malla de la Unidad de Control Biológico de la misma institución. Se usaron 28 plantas madre de fresa de dos años de edad, pertenecientes a la variedad Selva. Cada planta madre se fertilizó con una dosis compuesta de fertilizante para lo cual se elaboró una dosis semanal (solución madre). Se aplicó 100 mL de la solución madre a cada una de las plantas dos veces por semana. En el cuadro 1 se detalla la dosificación de fertilizantes utilizada

Cuadro 1. Descripción y dosificación de fertilizantes utilizados en el ensayo de inducción de resistencia sistémica en fresa *in vitro*. Zamorano, Honduras 2018.

Fertilizante	Dosis (g/L)
Nitrato de calcio	3.1
Sulfato de magnesio	2.4
Fosfato mono potásico	0.8
Nitrato de potasio	1.8
Nitrato de amonio	0.5

1. Elaboración de protocolo para siembra de explantes foliares *in vitro* de fresa.

Preparación de medio para siembra de explantes. Se usó agar agua semisólido, a razón de 4 g de bacto-agar/L de agua destilada, usando platos Petri de vidrio para acomodar el material vegetal.

Selección de explantes. Se colectaron hojas sanas, libres de contaminantes y lesiones provenientes de las plantas madre y estolones.

Lavado y desinfección de explantes. Se procedió a realizar la desinfección de las hojas dentro de la cámara de flujo laminar, con cloro al 3% en agua filtrada estéril, para proceder a la desinfección del material vegetal por tres minutos. Después se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril por dos minutos por enjuague. Finalmente se secaron las hojas en papel filtro estéril y se procedió a la siembra en el medio semisólido.

Siembra de explantes en medio de cultivo. Con ayuda de una pinza estéril se tomaron las hojas secas para ser colocadas en el plato, diferenciando las hojas de acuerdo a su procedencia (estolón y planta madre). Es importante asegurarse que el envés esté en contacto con el medio.

Evaluación de material foliar *in vitro*. Se realizó a los días 3, 5 y 7 después de la siembra con el fin de observar la respuesta a estrés.

Clasificación por tamaño. Con ayuda del programa ImageJ se realizó la clasificación por tamaño de tejido foliar de acuerdo con su procedencia.

Observación de duración de explantes. Se realizó nuevamente el proceso de selección, desinfección y siembras de explantes extraídos de la planta madre y se dejaron reposar a temperatura ambiente por un mes con el fin de observar la durabilidad del tejido *in vitro*.

2. Elaboración de protocolo para caracterización de hongos fitopatógenos en explantes foliares *in vitro* de fresa.

Siembra de hongos fitopatógenos en medio de cultivo. Se realizó la siembra de los hongos fitopatógenos *Pestalotia* sp. en agar avena y *Colletotrichum* sp. en medio V8 acidificado. Cada medio fue seleccionado de acuerdo al patrón de esporulación del patógeno.

Colección de esporas de hongo fitopatógeno *Colletotrichum* sp. La colección se realizó a partir del día 3 después de la siembra. Para ello se colocaron 2 mL de agua destilada estéril sobre el plato Petri y con un portaobjetos esterilizado con alcohol se recolectaron las esporas haciendo un raspado sobre la superficie del plato. Con ayuda de una micro-pipeta se extrajo el sobrenadante, el cual fue filtrado a través de malla de cheesecloth grado 90 estéril para evitar la presencia de hifas.

Producción de esporas de *Pestalotia* sp. en hoja de fresa *in vitro*. Se realizó el proceso de lavado, desinfección y siembra de hojas de fresa descrito anteriormente. Con ayuda de un palillo de dientes estéril, se colectaron directamente de las conidias presentes en el plato Petri con cultivo puro de *Pestalotia* sp., de al menos 5 días de edad, y se esparcieron en distintos puntos de la hoja, evitando provocar algún tipo de lesión. Las hojas infectadas se dejan reposar 10 días a temperatura ambiente para después proceder a la colección de esporas.

Colección de esporas de hongo fitopatógeno *Pestalotia* sp. de explantes foliares. Se realizó a los 10 días después de la inoculación y se procedió a la extracción de esporas. Se añadió agua destilada estéril directamente en la zona donde se observaron síntomas de la enfermedad y con ayuda de una micro-pipeta se colectaron las esporas. Después se realizó un filtrado con una malla cheesecloth grado 90 estéril para evitar la presencia de hifas. Finalmente, cuando fue necesario se realizó el proceso de centrifugación a 1,500 rpm por dos minutos para concentrar las esporas.

Conteo de esporas de hongos. se realizó con el microscopio colocando 10 µL de la muestra en la cámara de Neubauer. Luego se procedió a realizar el conteo de 25 cuadrillos, por 2 ocasiones para obtener un promedio. El resultado de la concentración de esporas se obtiene mediante el cálculo del promedio de los cuadrillos contados multiplicado por el factor de dilución utilizado, dividido para la constante 0.000004 obteniendo así la concentración de esporas/mL.

Inoculación de hongos fitopatógenos en explantes de fresa *in vitro*. Se realizó la siembra de explantes foliares descritos en la parte 1. Se realizaron varios ensayos con distintas concentraciones de esporas por hoja (0-100-1,000-2,000-5,000-10,000-25,000-50,000); realizando el mismo proceso para ambos hongos.

Caracterización de sintomatología de hongos fitopatógenos. Se observó el desarrollo del patógeno desde el día 1 hasta el día 20 después de la inoculación; el proceso consistió en observar la presencia de sintomatología de acuerdo al periodo y concentración del inóculo.

3. Aplicación de tratamientos orgánicos y biológicos para el control de hongos fitopatógenos:

Siembra de hongo antagonista en medio de cultivo. Se realizó la siembra del hongo: *Trichoderma* sp. en agar avena.

Colección de esporas de hongo antagonista *Trichoderma* sp. La colección se realizó a partir del día 9 después de la siembra. Para ello se colocaron 2 mL de agua destilada estéril sobre el plato Petri y con un portaobjetos esterilizado con alcohol se recolectaron las esporas haciendo un raspado sobre la superficie del plato. Con ayuda de una micro-pipeta se extrajo el sobrenadante que fue filtrado a través de una malla de cheesecloth grado 90 estéril para evitar la presencia de hifas. Se procedió a realizar el conteo de esporas previamente descrito.

Preparación y aplicación de los tratamientos. Se procedió a la preparación de nueve tratamientos con las concentraciones y combinaciones detalladas y disueltas en 200 mL de agua destilada estéril (Cuadro 2). Para la aplicación, cada hoja fue sumergida en el tratamiento correspondiente y luego puestas a secar en papel filtro estéril por 5 minutos.

Siembra de explantes tratados en medio de cultivo. Después de la aplicación de los tratamientos las hojas fueron sembradas en el medio, asegurándose de que el envés esté en contacto con el medio; colocando dos hojas por plato.

Inoculación de hongos fitopatógenos en explantes de fresa *in vitro*. La inoculación se realizó después de cuatro días de la aplicación de los tratamientos. Colocando una concentración de 50,000 y 5,000 esporas en la base de la hoja derecha e izquierda respectivamente, aprovechando así ambas hojas del plato. Para luego sellar los platos con parafina, dejándolos reposar a temperatura ambiente. El proceso es el mismo para los dos patógenos.

Cuadro 2. Descripción de los tratamientos y dosificaciones utilizadas en el experimento inducción de resistencia sistémica *in vitro* en fresa. Zamorano, Honduras 2018.

Tratamientos	Agente de control biológico	Dosificación en 200 mL
1	Control sin inóculo	
2	<i>Serenade</i> ®1,34 SC (<i>Bacillus subtilis</i>)	40 µ (1x10 ¹⁰ UFC)
3	<i>Regalia Maxx</i> ® (<i>Fallopia Sachalinensis</i>)	200 µL
4	<i>Trichoderma</i> sp.	2x10 ⁶ esporas/mL
5	<i>Regalia Maxx</i> ® (<i>Fallopia Sachalinensis</i>)	200 µL
	<i>Serenade</i> ®1,34 SC (<i>Bacillus subtilis</i>)	40 µ (1x10 ¹⁰ UFC)
6	<i>Trichoderma</i> sp.	2x10 ⁶ esporas/mL
	<i>Serenade</i> ® 1,34 SC (<i>Bacillus subtilis</i>)	40 µ (1x10 ¹⁰ UFC)
7	<i>Trichoderma</i> sp.	2x10 ⁶ esporas/mL
	<i>Regalia Maxx</i> ® (<i>Fallopia Sachalinensis</i>)	200 µL
8	<i>Trichoderma</i> sp.	2x10 ⁶ esporas/mL
	<i>Regalia Maxx</i> ® (<i>Fallopia Sachalinensis</i>)	200 µL
	<i>Serenade</i> ® 1,34 SC (<i>Bacillus subtilis</i>)	40 µ (1x10 ¹⁰ UFC)
9	Control con inóculo	

Las dosis utilizadas de los agentes biológicos fueron más bajas a las recomendadas por las etiquetas ya que el objetivo del experimento era la inducción de mecanismos de defensa y no probar el efecto fúngico de los tratamientos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Comparación de dosis utilizadas con las recomendadas por la casa comercial de los agentes biológicos utilizados en el ensayo de inducción de resistencia sistémica en fresa *in vitro*. Zamorano, Honduras 2018.

Producto	Dosis recomendada	Dosis utilizada
<i>Bacillus subtilis</i> (<i>Serenade</i> ®1,34 SC)	2 L/ha	40 mL/ha
<i>Fallopia sachalinensis</i> (<i>Regalia Maxx</i> ®)	2 L/ha	200 mL/ha
<i>Trichoderma</i> sp.	6x10 ¹¹ esporas/ha	2x10 ⁹ esporas/ha

Nota: El cálculo se realizó asumiendo aplicaciones de 200 L/ha.

Las cepas de hongos utilizadas fueron extraídas del cepario del Laboratorio de Fitopatología, Diagnóstico e Investigación Molecular de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano (Cuadro 3).

Cuadro 4. Información sobre las cepas de hongos utilizadas en el experimento inducción de resistencia sistémica *in vitro* en fresa. Zamorano, Honduras 2018.

Cepa	Fecha de colección	Hongo identificado	Procedencia
17TR003	18/9/2017	<i>Trichoderma</i> sp.	Donación DISAGRO
17Cfr#1	23/6/2017	<i>Colletotrichum</i> sp.	Casa malla, Zamorano, Honduras
17PIFr#2	31/5/2017	<i>Pestalotia</i> sp.	Güinope , Honduras

Datos de severidad. Para *Pestalotia* sp. se realizaron en el día 15 después de inoculación y para *Colletotrichum* sp. en el día 20 después de la inoculación. Para ello todos los platos fueron fotografiados en la cámara de flujo laminar. El análisis de las fotografías se realizó con ayuda del programa ImageJ. Se analizó cada una de las hojas con el fin de obtener datos del área infectada en relación con el área total de la hoja, para así conocer el porcentaje de infección. Esto se logró haciendo uso de los límites de color (matiz, saturación y brillo) presentes en cada una de las hojas.

Los datos obtenidos de cada unidad observacional fueron agrupados según la concentración de esporas y el tratamiento, teniendo un total de cuatro unidades observacionales (hojas) por agrupación. Cada agrupación fue sumada para obtener el área total de las hojas y la sumatoria del área infectada, para la obtención del porcentaje de área infectada se utilizó la siguiente formula 1:

$$[1] \quad \frac{\text{área infectada}}{\text{área total}} * 100$$

Diseño experimental. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar multifactorial con tres repeticiones para *Colletotrichum* sp. y con dos repeticiones para *Pestalotia* sp., Cada una de las repeticiones contó con nueve tratamientos, con cuatro unidades observacionales por tratamiento; y dos concentraciones de inoculación del patógeno. Para el análisis estadístico en el programa SAS versión 9.4 se realizó la transformación de los datos por medio del método de raíz cuadrada.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Elaboración de protocolo para siembra de explantes foliares *in vitro* en fresa.

Existen protocolos para propagación masiva de plantas de fresa haciendo uso de métodos como embriogénesis somática y el cultivo de meristemas; también se utiliza la variación somaclonal para el análisis de material genético (Kessel 2012). Estas técnicas no se utilizaron en el experimento ya que se esperaba simular las condiciones a las que la planta se enfrenta en campo; por lo que se estableció un protocolo que brinda la facilidad de realizar análisis con patologías foliares de fresa.

Se realizó una prueba en explantes provenientes directamente de la planta madre y otros provenientes de estolones, para evaluar los explantes de mejor respuesta *in vitro*. Se observó que las hojas provenientes de estolón son más propensas a la necrosis del tejido, ya que alrededor del 100% de las hojas sembradas presentaron necrosis, en comparación con las hojas provenientes de las plantas madre, que presentaron sólo el 10% de necrosis en hojas (Figura 1).

El principal problema de la producción *in vitro* de plantas de fresa es que los tejidos se tornan necróticos, llegando a cambiar el explante en su totalidad. Las soluciones que se plantean a esta problemática son mediante el uso de antioxidantes, como el calcio; y sub-cultivar con frecuencia. Esta solución es aplicable en micro-propagación pero en este proyecto se necesitó alterar lo menos posible al explante para simular las condiciones a las que las plantas están expuestas en el campo (Kessel 2012).

La respuesta a estrés de las hojas maduras se atribuye al tejido epidérmico que cubre la superficie de la hoja, en hojas maduras se cuenta con una cutícula (capa cerosa secretada por las células epidérmicas) más desarrollada, esta impide la pérdida de agua (Raisman y Gonzalez 2007). Por lo que se decidió realizar el resto del proceso con explantes provenientes de las plantas madre. Se observó que la duración de los explantes en el medio es de al menos 30 días sin presentar ningún tipo de variación en el tejido y este periodo se extiende hasta 40 días al hacer uso de los tratamientos con los agentes de control biológico. Este incremento en la viabilidad de los explantes se atribuye a que los agentes de control biológico, en ausencia de actividad patógena inducen el crecimiento de las plantas, por medio de distintos mecanismos como: solubilización de nutrientes y liberación de fitohormonas (Walters 2009).

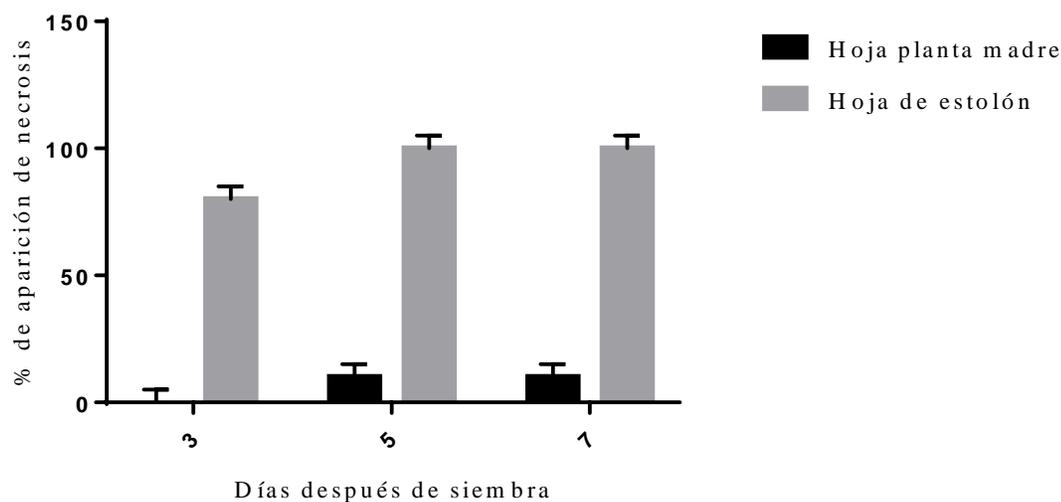


Figura 1. Respuesta a estrés por siembra en medio de cultivo agar agua semisólido de los explantes foliares obtenidos de la planta madre y del estolón de fresa, utilizados en el ensayo de inducción de resistencia sistémica inducida en fresa *in vitro*. Zamorano, Honduras 2018.

Elaboración de protocolo para caracterización de hongos fitopatógenos en explantes foliares *in vitro* de fresa.

Se realizó la inoculación de explantes a concentraciones de 0-100-500-1,000 y 2,000 esporas; sin embargo, a estas concentraciones no se observó sintomatología. Por lo que se aumentó a 5,000-10,000-25,000 y 50,000 esporas por hoja. Se observó que ambos patógenos se desarrollan a partir de las 5,000 esporas. El protocolo se desarrolló con el patógeno *Pestalotia* sp. por su rápida patogenicidad y fue ajustado para la observación de sintomatología de *Colletotrichum* sp.

El desarrollo de *Pestalotia* sp. *in vitro* tiene un proceso infeccioso rápido usualmente comienza con un pequeño punto necrótico en el primer día después de la inoculación y se desarrolla hasta presentar esporulación en la hoja en el día 10 (Figura 2). En el caso de *Colletotrichum* sp. comienza a desarrollar sintomatología en el día 5 después de inoculación observándose el inicio de clorosis en el borde de la hoja; en el día 10 se desarrollan síntomas necróticos entre la clorosis. Los explantes foliares de fresa provenientes de la planta madre fueron susceptibles a las inoculaciones con los dos patógenos a partir de las 5,000 esporas por hoja, aunque los patógenos presentaron un patrón infeccioso diferente ambos comienzan su desarrollo en el ápice de la hoja.

Días después de la inoculación con *Pestalotia* sp.

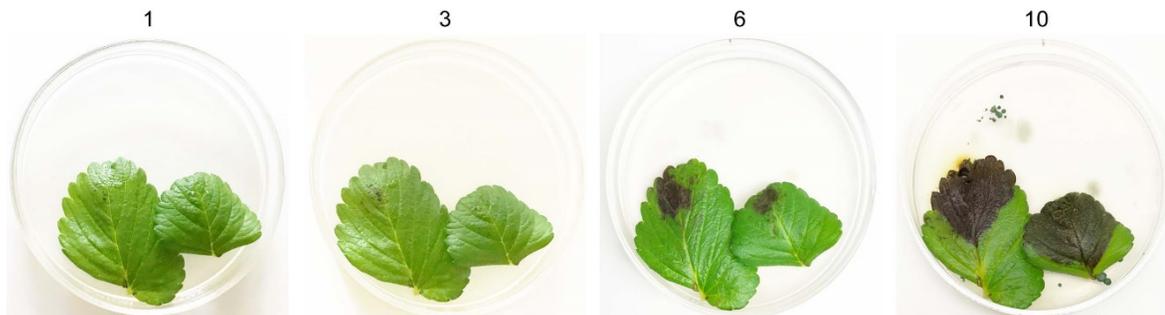


Figura 2. Línea de tiempo que muestra el desarrollo infeccioso de *Pestalotia* sp. en el ensayo de inducción de resistencia sistémica inducida en fresa *in vitro*. Zamorano, Honduras 2018.

Aplicación de tratamientos orgánicos y biológicos en el control de hongos fitopatógenos.

La aplicación de tratamientos orgánicos y biológicos se realizó como un método preventivo ya que estos fueron aplicados a los explantes cuatro días antes de la inoculación con los hongos fitopatógenos. Se realizó la aplicación de los tratamientos para conocer su efecto en los explantes y así evitar atribuirle este al patógeno, pero no se observó ningún tipo de alteración salvo por una extensión en la viabilidad de los mismos. Se realizó la aplicación conjunta de agentes de control biológico; con el fin de obtener rangos más amplios de protección, reducir variabilidad y a la vez aumentar el rango de patógenos suprimidos (Walters 2009).

Resultados relacionados con *Pestalotia* sp.

Pestalotia sp. es un hongo que pertenece al orden Deuteromicota, y que posee comportamiento saprófito (Espejo y López 2012). Se desarrolla a temperaturas menores a 25 °C, humedad relativa mayor a 80% y con alta intensidad de lluvias, pudiendo ocasionar pérdidas en productividad del 80-100% (Rodrigues *et al.* 2014; Van Hemelrijck *et al.* 2017). La sintomatología en el ensayo varía según el tratamiento, de ser un hongo altamente agresivo que inicia la infección un día después de la inoculación, con puntos necróticos que se expanden rápidamente por toda la hoja. Se observó un retraso en la presencia de sintomatología además de cambios como la presencia de clorosis en lugar de necrosis, lo que varía dependiendo del tratamiento. Los tratamientos que respondieron a este cambio fueron *Trichoderma* sp. (T) y *Trichoderma* sp.- *Bacillus subtilis* (TB); sin embargo, esto de acuerdo con el análisis estadístico no se encontró diferencia significativa ya que la variable utilizada fue el área infectada sin importar la sintomatología presentada (Figura 4).

En el control de *Pestalotia* sp. debido al uso de los tratamientos con agentes de control biológico, se observó un retraso en el ciclo del patógeno no se observó esporulación en los 15 días de toma de datos, mientras que en el control positivo se observó esporulación en el día 10 después de haber sido inoculado el patógeno. En el experimento de *Pestalotia* sp. no se observó diferencia significativa entre bloques ($P=0.13$). Se utilizaron dos concentraciones de esporas para observar el desarrollo del patógeno a una concentración 10 veces mayor, los resultados mostraron que no hubo diferencia significativa entre las concentraciones de

esporas utilizadas como inóculo del patógeno (P= 0.75). No hubo diferencia significativa de los tratamientos por las concentraciones utilizadas(P=0.24); sin embargo, la diferencia entre los tratamientos es altamente significativa P=0.001 (Cuadro 5).

Los tratamientos que tuvieron un mejor control de *Pestalotia* sp. fueron los combinados de *Trichoderma* sp.- Regalia Maxx®- *Bacillus subtilis* (TRB), *Trichoderma* sp.- Regalia Maxx (TR) y Regalia Maxx®- *Bacillus subtilis* (RB). El tratamiento con *Bacillus subtilis* (B) no presentó diferencia significativa en comparación con el control con inóculo (C+) (Cuadro 6; Figura 3).

Cuadro 5. Resultados del análisis estadístico para el control de *Pestalotia* sp. con los agentes de control biológico a diferentes concentraciones; en el en el ensayo de inducción de resistencia sistémica inducida en fresa *in vitro*. Zamorano, Honduras 2018.

Parámetros	Valor	Valor p
Bloque	1 2	0.1317 ns
Concentración	5,000 50,000 esporas	0.7546 ns
Tratamiento	C+, T, R, B, TR, TRB, RB, TB, C-	0.0001 *
TRT*Concentración		0.2431 ns

*, ns Diferencia significativa al P<0.001 (r2= 0.88) y no significativa.

C+=control con inóculo, T= *Trichoderma*, R= Regalia Maxx® B=*Bacillus subtilis*,

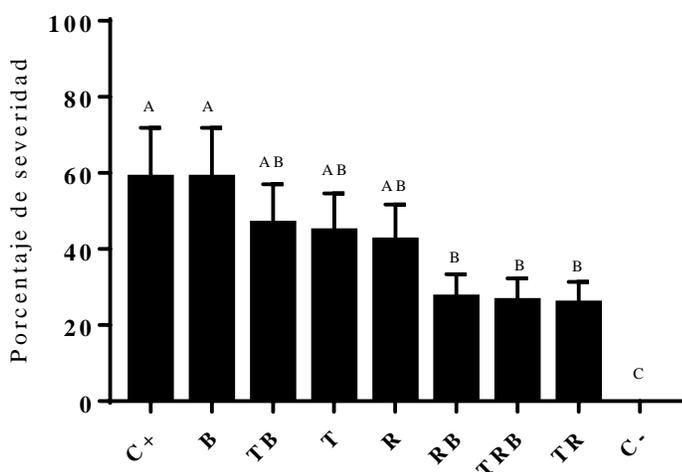
C-=control sin inóculo

Cuadro 6. Porcentaje del área infectada de *Pestalotia* sp. con los tratamientos de agentes de control biológico en el ensayo de inducción de resistencia sistémica inducida en fresa *in vitro*. Zamorano, Honduras 2018.

Tratamiento	Porcentaje de área infectada
Control con inóculo	51.3 ^a
<i>Bacillus subtilis</i>	58.8 ^a
<i>Trichoderma</i> + <i>Bacillus subtilis</i>	46.7 ^{ab}
<i>Trichoderma</i>	44.7 ^{ab}
Regalia	42.3 ^{ab}
Regalia+ <i>Bacillus subtilis</i>	27.3 ^b
<i>Trichoderma</i> + Regalia+ <i>Bacillus subtilis</i>	27.3 ^b
<i>Trichoderma</i> + Regalia	26.4 ^b
Control sin inóculo	0.0 ^c

Significancia estadística del experimento P=0.0001 (r²= 0.88).

^{abc}= las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



Tratamientos con agentes de control biológico

Figura 3. Porcentaje de severidad en explantes foliares con los tratamientos con agentes de control biológico para el hongo *Pestalotia* sp. en el ensayo de inducción de resistencia sistémica inducida en fresa *in vitro*. Zamorano, Honduras 2018.

Significancia estadística p=0.0001 (r²= 0.88).

C+=control con inóculo, T= *Trichoderma*, R= Regalia Maxx® B=*Bacillus subtilis*,

C-=control sin inóculo.

^{abc}= las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

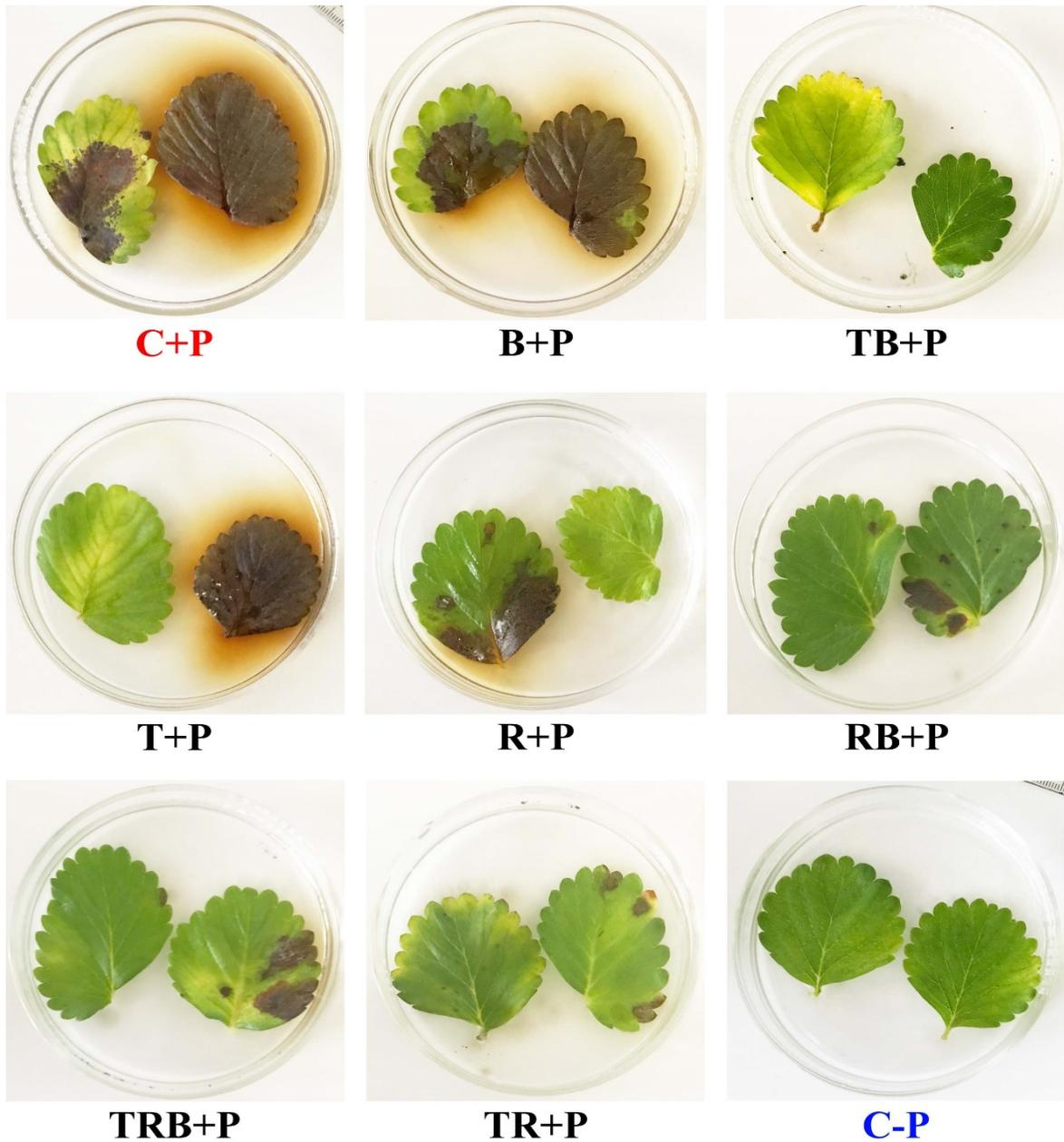


Figura 4. Severidad de daño de *Pestalotia* sp. después de la aplicación de tratamientos con agentes de control biológico. Fotografías tomadas 15 días después de la inoculación con el patógeno en el ensayo de inducción de resistencia sistémica inducida en fresa *in vitro*. Zamorano, Honduras 2018.

Significancia estadística del experimento $p=0.0001$ ($r^2= 0.88$).

C+=control con inóculo, T= *Trichoderma*, R= Regalia Maxx® B=*Bacillus subtilis*, C-=control sin inóculo

Resultados relacionados con *Colletotrichum* sp.

Este hongo pertenece al orden Ascomycota y su comportamiento es hemibiótrofo, es decir, durante la fase biótrofa comienza con una larga hifa intracelular, durante esta fase la membrana plasmática se expande e invagina alrededor de la hifa primaria presentando una capa matricial que se deposita entre la pared celular del hongo y la membrana plasmática del hospedero. Esta última pierde su integridad funcional por lo que las células del hospedero se empiezan a degradar y mueren; esta fase dura de 24-72 horas, durante esta etapa la planta no activa sus defensas. Luego comienza la fase necrótica que se asocia a una hifa secundaria que se expande a lo largo del tejido del hospedero; en esta etapa la planta comienza la activación de defensas, pero la célula muere rápidamente y no logra acumular suficientes defensas para inhibir el desarrollo del hongo. La hifa intracelular se expande a otras células y ocurre nuevamente el proceso biótrofo y necrótrofo simultáneamente en distintas zonas, y las células mueren rápidamente por acción enzimática (Pruski *et al.* 2000).

En el control de *Colletotrichum* sp. se observó un retraso en la presencia de sintomatología (síntomas aparecen a partir del día 10) y una reducción en la aparición de puntos necróticos, es decir, una extensión en el periodo de la fase biótrofa. Este comportamiento se observó en todos los tratamientos excepto en el tratamiento con *Trichoderma* sp. quien no presento diferencia significativa con el control. Mientras que en los tratamientos *Trichoderma* sp.-Regalia Maxx® (TR), *Trichoderma* sp.-*Bacillus subtilis* (TB) y *Bacillus subtilis* (B) se observó la presencia de la fase necrótica, pero de forma reducida. (Figura 6). En el experimento de *Colletotrichum* sp. los resultados muestran que existió diferencia significativa entre bloques (P=0.04). Al analizar las dos concentraciones de esporas utilizadas se observó que no hubo diferencia significativa (P=0.39), a pesar de que una de las concentraciones fue 10 veces mayor. No se observó diferencia significativa de los tratamientos por las concentraciones utilizadas (P=0.24); sin embargo, la diferencia entre los tratamientos es altamente significativa (P=0.001) (Cuadro 7).

Los tratamientos que brindan la mejor respuesta al control de *Colletotrichum* sp. fueron el tratamiento combinado de *Trichoderma* sp.- Regalia Maxx®- *Bacillus subtilis* (TRB) y los tratamientos individuales de Regalia Maxx® (R), y *Bacillus subtilis* (B). El resto de tratamientos no presentaron diferencia significativa con el control con inóculo (C+); (Cuadro 8; Figura 5)

Cuadro 7. Resultados del análisis estadístico de *Colletotrichum* sp. en el ensayo de inducción de resistencia sistémica inducida en fresa *in vitro*. Zamorano, Honduras 2018.

Parámetros	Valor	Valor p
Bloque	1 2 3	0.0405 ns
Concentración	5,000 50,000 esporas	0.3907 ns
Tratamiento	C+, T, R, B, TR, TRB, RB, TB, C-	0.0001*
Trat. x Concentración		0.2431 ns

*, ns Diferencia significativa al $P < 0.001$ ($r^2 = 0.89$) y no significativa.

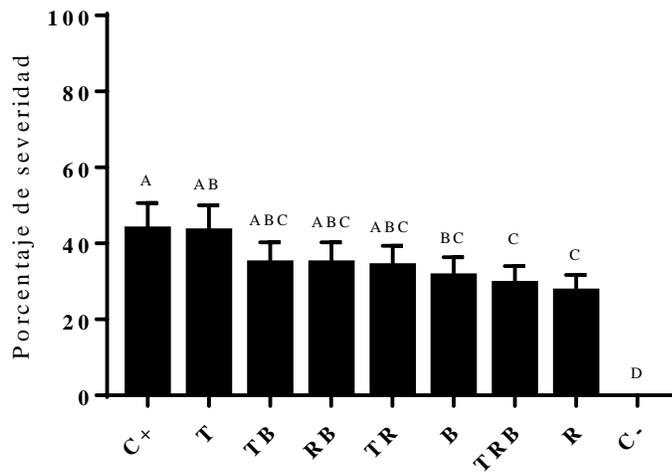
C+=control con inóculo, T= *Trichoderma*, R= Regalia Maxx® B=*Bacillus subtilis*, C-=control sin inóculo

Cuadro 8. Porcentaje del área infectada de *Colletotrichum* sp. con los tratamientos de agentes de control biológico en el ensayo de inducción de resistencia sistémica inducida en fresa *in vitro*. Zamorano, Honduras 2018.

Tratamiento	Porcentaje de área infectada
Control con inóculo	43.7 ^a
<i>Trichoderma</i>	43.2 ^{ab}
<i>Trichoderma</i> + <i>Bacillus subtilis</i>	34.8 ^{abc}
Regalia+ <i>Bacillus subtilis</i>	34.8 ^{abc}
<i>Trichoderma</i> +Regalia	34.0 ^{abc}
<i>Bacillus subtilis</i>	31.4 ^{bc}
<i>Trichoderma</i> + Regalia+ <i>Bacillus subtilis</i>	29.4 ^c
Regalia	27.4 ^c
Control sin inóculo	0.0 ^d

Significancia estadística del experimento $P = 0.0001$ ($r^2 = 0.88$).

^{abcd}= las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



Tratamientos con agentes de control biológico

Figura 5. Porcentaje de severidad en explantes foliares con los tratamientos con agentes de control biológico para el hongo *Colletotrichum* sp. en el ensayo de inducción de resistencia sistémica inducida en fresa *in vitro*. Zamorano, Honduras 2018.

Significancia estadística del experimento $p=0.0001$ ($r^2= 0.89$).

C+=control con inóculo, T= *Trichoderma*, R= Regalia Maxx® B=*Bacillus subtilis*,

C-=control sin inóculo

abcd= las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

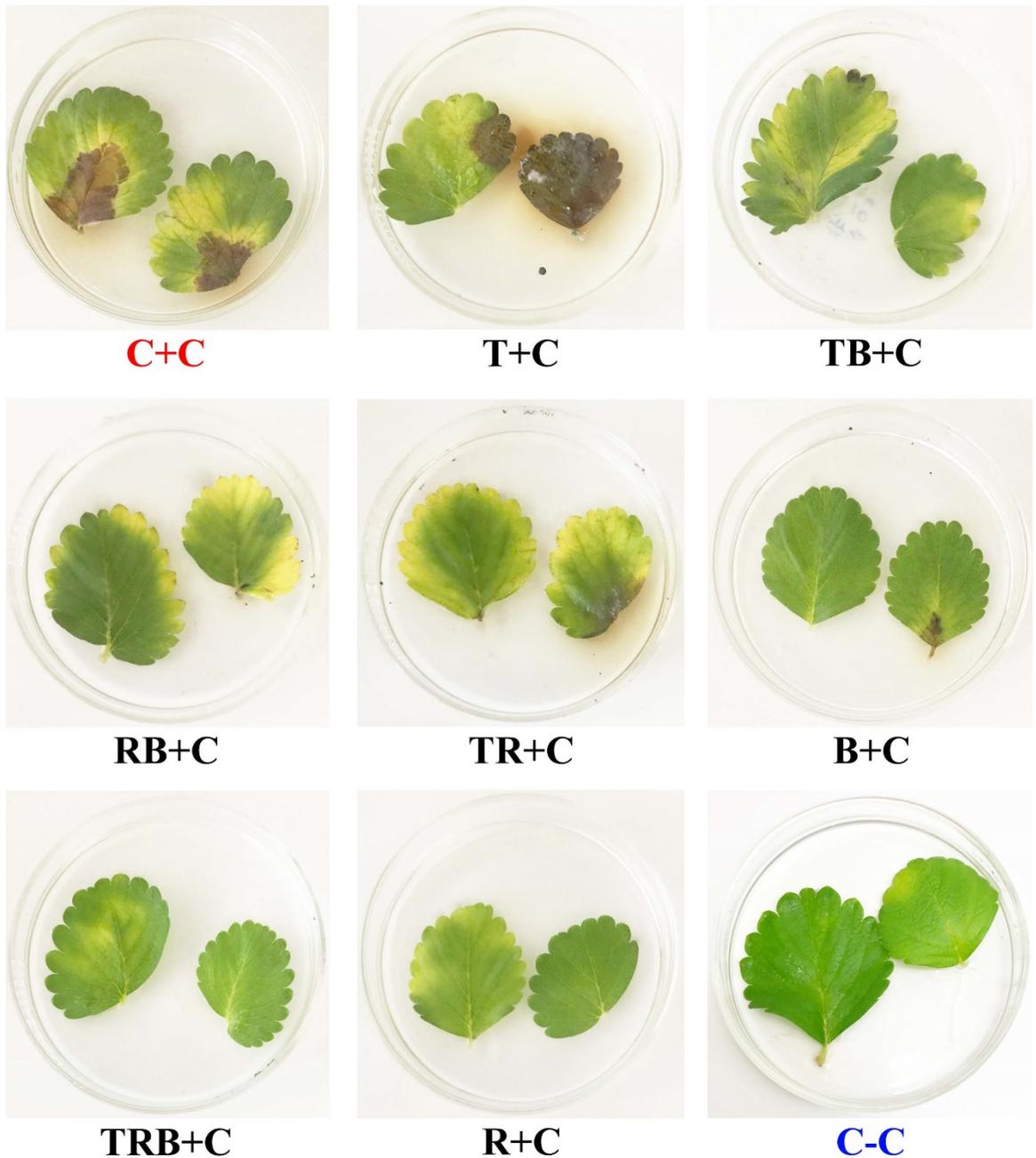


Figura 6. Severidad de daño de *Colletotrichum* sp. después de la aplicación de tratamientos con agentes de control biológico. Fotografías tomadas 20 días después de la inoculación con el patógeno; en el ensayo de inducción de resistencia sistémica inducida en fresa *in vitro*. Zamorano, Honduras 2018.

Significancia estadística del experimento $p=0.0001$ ($r^2= 0.89$).

C+=control con inóculo, T= *Trichoderma*, R= Regalia Maxx® B=*Bacillus subtilis*, C-=control sin inóculo

4. CONCLUSIONES

- Los explantes foliares obtenidos de la planta madre poseen mejor respuesta a la manipulación *in vitro* que los estolones; estos fueron susceptibles a infecciones de *Pestalotia* sp. y *Colletotrichum* sp. *in vitro* a partir de las 5,000 esporas por hoja.
- Los patógenos utilizados poseen un comportamiento diferente, siendo *Pestalotia* sp. un patógeno saprófito que inicia su desarrollo produciendo necrosis del tejido a partir del primer día; mientras que *Colletotrichum* sp. es un hongo hemibiótrofo de más lento desarrollo que produce clorosis a partir del quinto día y necrosis al décimo día.
- El uso combinado de agentes de control biológico permite controlar un rango más amplio de hospederos, siendo la combinación de *Trichoderma* sp., Regalia Maxx® y *Bacillus subtilis* la de mejor control para ambos patógenos; los agentes utilizados redujeron el desarrollo y severidad del ataque de los patógenos, pero en las concentraciones utilizadas no erradicaron la enfermedad.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar aplicaciones de agentes de control biológico como método preventivo y no curativo para el control de *Pestalotia* sp. y *Colletotrichum* sp. en fresa.
- Ampliar el estudio con experimentos en campo y con otros cultivos de importancia económica para corroborar los resultados obtenidos *in vitro* y realizar análisis costo-beneficio.
- Realizar evaluaciones con inoculaciones conjuntas de patógenos (Ejemplo: *Pestalotia* sp. + *Colletotrichum* sp.) para evaluar la eficiencia de los tratamientos en condiciones de mayor presión de enfermedades.
- Evaluar el uso de cepas autóctonas de *Trichoderma* sp. que poseen mayor capacidad para adaptarse a las condiciones climáticas de la zona y que podrían ser más eficaces en el control de enfermedades.
- Determinar si existe efecto fungicida de los agentes de control biológico utilizados para evaluar los posibles mecanismos de acción que ocurrieron durante el ensayo para el control de los patógenos.

6. LITERATURA CITADA

- Amil F, Blanco R, Muñoz J, Caballero J. 2011. The strawberry plant defense mechanism: a molecular review. *Plant Cell Physiol.* [consultado 2018 jul 18] 52(11):1873–1903. <https://academic.oup.com/pcp/article/52/11/1873/1832591>
- Espejo L, López A. 2012. Caracterización cultural del hongo fitopatógeno “*Pestalotia* sp.” [Tesis]. Ucayali-Perú: Universidad Nacional de Ucayali. 4p.
- Eroski Consumers. 2018. Frutas: Guía práctica de frutas [Internet]. España: Fundación Eroski. [consultado 2018 sep 28]. <http://frutas.consumer.es/fresa/propiedades>.
- FAO (Food and Agriculture Organization, US). 2010. Estados Unidos. Base de datos: FAOStat (en línea). [consultado 2018 jul 18] Disponible en <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>
- Harman G. 2011. *Trichoderma*—not just for biocontrol anymore. *Phytoparasitica.* 39(2):103–108. doi:10.1007/s12600-011-0151-y.
- Kessel A. Mejora genética de la fresa (*Fragaria ananassa* Duch.), a través de métodos biotecnológicos. [consultado 2018 may 18]. 33(3):34–41. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362012000300005.
- Marrone Bio Innovations. 2014. Regalia: Biofungicide: A Powerful Fungicide for Disease Control on Strawberries. Estados Unidos: Marrone Bio Innovations; [consultado 2017 jul 18]. https://marronebioinnovations.com/wp-content/uploads/delightful-downloads/2016/12/Regalia_Strawberry_2014_01_web.pdf.
- Narula J, Fujita M, Igoshin A. 2016. Functional requirements of cellular differentiation: lessons from *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol.* 34:38–46. doi:10.1016/j.mib.2016.07.011.
- Ning Y, Liu W, Wang G. 2017. Balancing Immunity and Yield in Crop Plants. *Trends Plant Sci.* 22(12):1069–1079. doi:10.1016/j.tplants.2017.09.010.
- Prusky D, Freeman S, Dickman MB. 2000. *ba*: Host specificity, pathology, and host-pathogen interaction. Ed. St. Paul, Minnesota (E.E.U.U.). The American Phytopathological Society. ISBN: 0-89054-258-9.

- Raisman J, Gonzalez A. 2007. Tejidos vegetales: Meristemas y sistema fundamental. Argentina: Universidad Nacional del Nordeste. [consultado 2018 sep 18]. <http://www.biologia.edu.ar/plantas/tejidos.htm>
- Rodrigues F, Silva I, Antunes M, Carré V. 2014. The Infection Process of *Pestalotiopsis Longisetula* Leaf Spot on Strawberry Leaves. J Phytopathol. 162(10):690–692. doi:10.1111/jph.12226.
- Schumann G, D'Arcy C. 2012. Hungry planet: Stories of plant diseases. 1st ed. St. Paul, Minnesota (E.E.U.U.): The American Phytopathological Society. ISBN: 978-0-89054-399-3.
- Shatha A. 2016. Mycological plant pathology. 1st ed. Lexington (E.E.U.U) International scientific journals. ISBN: 978-1-50856-781-3.
- Tasaki S, Nakayama M, Shoji W. 2017. Morphologies of *Bacillus subtilis* communities responding to environmental variation. Dev Growth Differ. 59(5):369–378. doi:10.1111/dgd.12383.
- [USDA] United States Department of Agriculture. 2018. Pesticide Data Program: Annual Summary, Calendar Year 2016. Estados Unidos: Agricultural Marketing Service. [consultado 2018 jul 18]. www.ams.usda.gov/datasets/pdp.
- Van Hemelrijck W, Ceustermans A, Van Campenhout J, Lieten P, Bylemans D. 2017. Crown rot in strawberry caused by *Pestalotiopsis*. Acta Hort; (1156):781–786. doi:10.17660/ActaHortic.2017.1156.115.
- Walters D. 2009. Disease control in crops: Biological and environmentally friendly approaches. 1st ed. Willey-Blackwell: Ltd: Ames (E.E.U.U.) ISBN: 978-1-4051-6947-9
- Zolda F, Phillips P, Ventura N, Bolda N, Gubler WD, Browne GT. Guía para el manejo de las plagas: Fresas. 2005. California, Estados Unidos: Universidad de California, Davis. [consultado 2018 sep 18]. <https://docplayer.es/3086791-Fresas-guia-para-el-manejo-de-las-plagas-contents-universidad-de-california-manejo-integrado-de-plagas-junio-2005.html>

7. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo para la elaboración de agar agua semisólido para siembra de explantes foliares de fresa (AA).

El protocolo está diseñado para elaborar un litro de medio de cultivo.

1. Pesar 4 g de bacto-agar
2. Añadir ~996 mL de agua destilada
3. Autoclavar

Anexo 2. Protocolo de siembra de explantes foliares de fresa para estudios *in vitro*.

En casa malla:

1. Seleccionar y recolectar hojas jóvenes y sanas de plantas madre.
2. Realizar corte con bisturí del explante seleccionado.
3. Rotular los explantes y llevarlos al laboratorio.
4. Lavar cuidadosamente los explantes con agua filtrada asegurándose de remover cualquier material contaminante del explante, pero evitando lesionar el tejido (hacer uso de guantes).

En la cámara de flujo laminar:

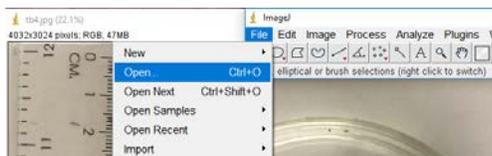
5. Apagar el aire acondicionado.
6. Encender y preparar la cámara de flujo laminar: limpieza y desinfección con alcohol al 70% (Revisar guía de uso situada al lado de la cámara).
7. Preparar los materiales a utilizar: pinzas, mechero, fósforos, beaker, agua filtrada estéril, agua destilada estéril, hipoclorito de sodio al 100%, probeta, contenedor para sostener pinzas (desinfectar con alcohol al 70%), contenedor para desinfectar con alcohol al 95%.
8. Desinfección de pinzas:
 - a. Someter a la flama del mechero realizando movimientos sutiles.
 - b. Desinfección con alcohol al 95%.
 - c. Repetir procedimiento a y b.
 - d. Colocar el instrumento en el sostenedor para pinzas y dejarlo reposar.

Observación: hacer uso del instrumento una vez que este frío para evitar ocasionar lesiones en el tejido.

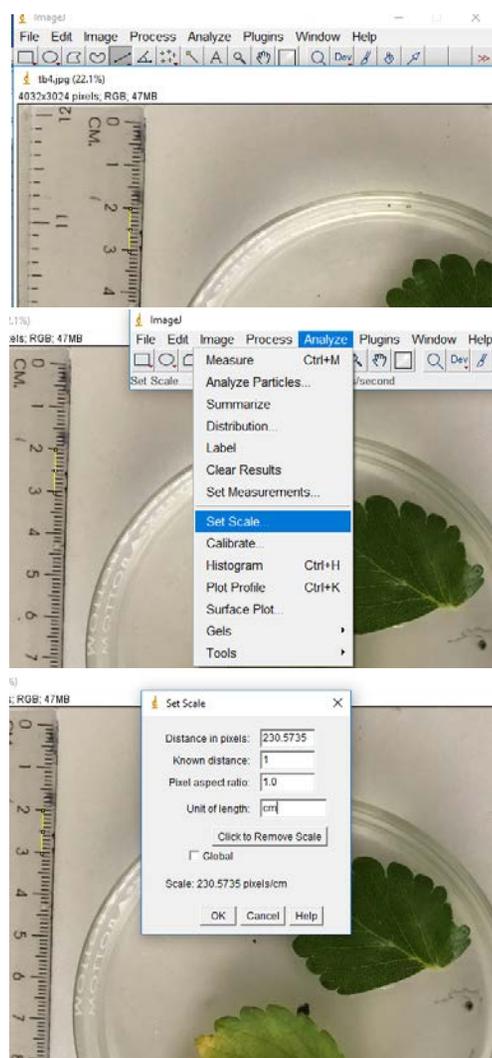
9. Preparar una solución de hipoclorito de sodio al 3% diluido en agua filtrada estéril.
10. Lavar nuevamente las hojas con agua filtrada estéril.
11. Desinfectar las hojas con una solución de hipoclorito de sodio al 3% por 3 minutos (mantener hojas en movimiento para mejorar superficie de contacto).
12. Lavar las hojas con agua destilada estéril (repetir el procedimiento 3 veces).
13. Secar hojas en papel filtro estéril.
14. Realizar la siembra de las hojas con las pinzas cuidadosamente y sembrarlas en el plato Petri asegurándose de que el envés este tocando el medio de cultivo.
15. Sellar con parafina el plato Petri.
16. Limpiar, desinfectar y depositar los materiales utilizados en su lugar.
17. Limpiar y apagar la cámara de flujo laminar.

Anexo 3. Protocolo para el uso del software IMAGEJ para el análisis de severidad del tejido foliar.

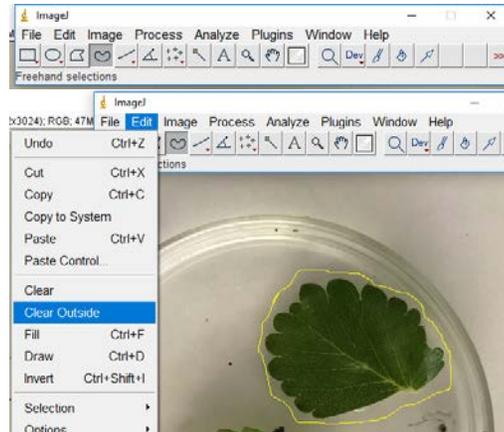
1. Abrir el programa IMAGEJ
2. Para seleccionar la fotografía a utilizar ir a la pestaña “File” – “Open”.



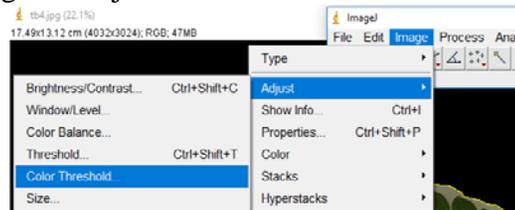
3. Establecer la escala a utilizar, para ello seleccionar la pestaña “Straight”, con la ayuda de la regla que se observa en la fotografía, medir un centímetro. Ir a la pestaña “Analyse”- “set scale” y añadir el número 1 en “known distance” y cm en “unit of length”.



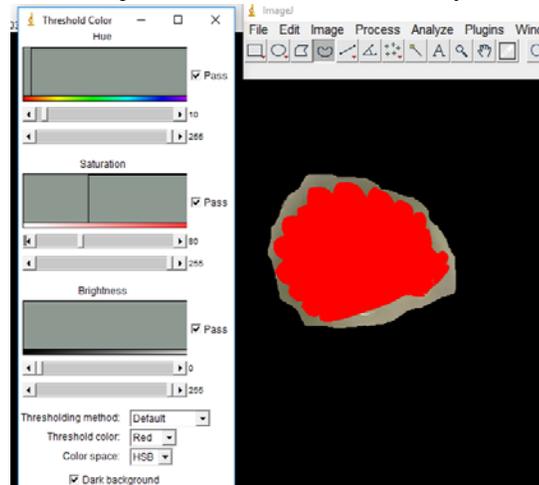
4. Seleccionar el área de trabajo y eliminar el resto de la imagen, para ello: seleccionar la pestaña “Frehand selections”, y seleccionar el área de una de las hojas, una vez seleccionada ir a la pestaña “Edit”- “clear outside”



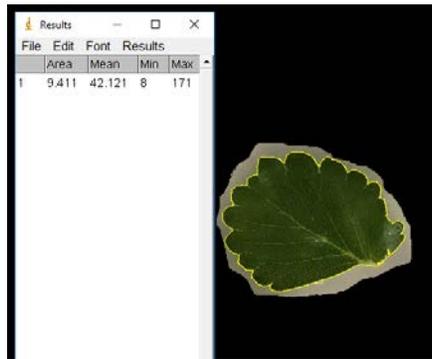
5. Ir a la pestaña “Image” –“adjust”- “color threshold”.



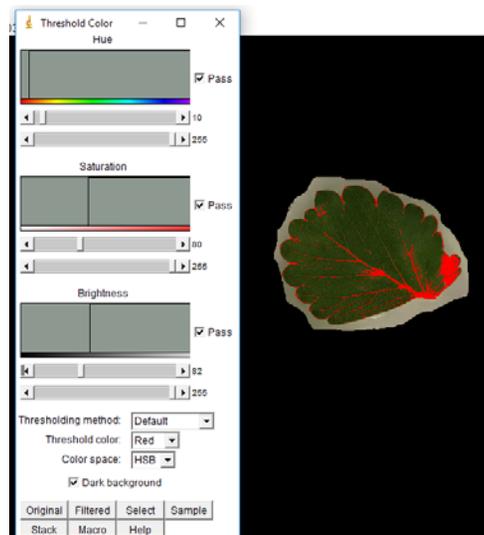
6. Delimitar el área total de hoja haciendo uso del matiz y la saturación.



7. Presionar “select” y luego ctrl+m para obtener resultados.



8. Delimitar área infectada con el uso del matiz para necrosis y con el uso de brillo para clorosis.



9. Repetir paso 7.

The image shows two screenshots of an image processing application. The top screenshot displays the 'Thresholding' dialog box with the following settings:

- Saturation: Pass, slider at 80
- Brightness: Pass, slider at 05
- Thresholding method: Default
- Threshold color: Red
- Color space: HSB
- Dark background

Buttons at the bottom include: Original, Filtered, Select, Sample, Stack, Macro, Help. To the right is a preview of a leaf image with a red threshold mask.

The bottom screenshot shows a 'Results' window with the following table:

File	Edit	Font	Results
Area	Mean	Min	Max
1	9.411	42.121	0 171
2	0.760	61.049	55 171

To the right of the table is a preview of the same leaf image with a red threshold mask.

Anexo 4. Protocolo para siembra de hongos.

Es importante trabajar con orden y realizando el menor movimiento posible dentro de la cámara de flujo laminar (movimientos sutiles). Evitar objetos que obstruyan el flujo del aire en el área donde se está trabajando, así como el uso de joyas o cualquier otro accesorio que interfiera con la inocuidad y el movimiento sutil de las manos.

1. Apagar el aire acondicionado para evitar la turbulencia en la cámara de flujo laminar.
2. Seleccionar el hongo para la siembra.
3. Encender y preparar la cámara de flujo laminar: limpiar y desinfectar con alcohol al 70% (para mayor información encontrar la guía al lado derecho de la cámara).
4. Seleccionar los medios de cultivos que se utilizarán y colocarlos en la cámara de flujo laminar. Dejarlos reposar alrededor 10 min antes de la siembra y quitar el agua que se condensó en la tapa de los platos.
5. Preparar los materiales: bisturí, mechero, fósforos, parafina, contenedor para sostener el bisturí desinfectado y contenedor con alcohol para desinfectar al 95%.
6. Desinfectar el bisturí con alcohol al 95%.
 - a) Llevar el bisturí sobre la llama del mechero para flamearlo.
 - b) Desinfectarlo con alcohol al 95%.
 - c) Repetir a y b.
 - d) Dejarlo reposar para que se seque y enfríe.
7. Para la siembra es importante seleccionar el borde del hongo con hifas jóvenes. Realizar un corte pequeño cuadrícula y sembrarlo en el centro del plato con la parte de las hifas en contacto con el medio.
8. **Observación:** hacer movimientos sutiles porque se puede crear contaminaciones por migración de esporas.
9. Sellar con parafina los platos, rotularlos y colocarlos en los contenedores de crecimiento.
10. Limpiar (quitando los residuos de medios de cultivo u hongos del bisturí), desinfectar y depositar los materiales utilizados en su lugar.
11. Apagar la cámara de flujo laminar.

Anexo 5. Protocolo para recolección y conteo de esporas de hongos.

1. Colocar 2 mL de agua destilada estéril sobre el hongo en el plato Petri.
2. Hacer un raspado con un portaobjetos hasta coleccionar todas las esporas.
3. Tamizar el líquido obtenido usando una tela (cheescloth grado 90) estéril sobre un tubo Falcon de 50 mL para separar el micelio y las esporas.
4. Realizar el conteo usando el hematocitómetro (ver protocolo para conteo de esporas usando el hematocitómetro). Transferir 10 μ L de la suspensión de células a los 2 espacios entre el cubreobjetos y el hemocitómetro (la muestra subirá a la cámara por capilaridad). Se deben observar al menos de 40-50 esporas por cuadro para que el conteo sea significativo.

Nota: si la concentración de las esporas es muy alta, se recomienda hacer una dilución de 1:100 (1 mL de agua destilada estéril con 10 μ L de muestra) y proceder con el conteo nuevamente.

Anexo 6. Protocolo para la inoculación de *Pestalotia* sp. en explantes foliares *in vitro* de fresa.

1. Realizar siembra de *Pestalotia* sp. en agar avena, coleccionar esporas a partir del día cinco después de siembra.
2. Realizar lavado, desinfección de los explantes foliares de fresa.
3. Con ayuda de un palillo de dientes extraer las esporas del plato y colocarlas sobre la hoja evitando ocasionar lesiones. Esperar 10 días hasta que el patógeno esporule.
4. Añadir agua destilada estéril directamente a la zona donde se encuentren las esporas y con una micropipeta coleccionar las esporas.
5. Filtrar la solución con esporas con ayuda de una malla cheescloth grado 90 estéril.
6. Centrifugar las esporas a 1,500 rpm por dos minutos.
7. Realizar conteo de esporas.

Anexo 7. Protocolo para el conteo de células con el hemocitómetro (cámara de Neubauer).

1. Preparar los materiales: microscopio, cubreobjetos, pipetas, tips, muestras de la suspensión del cultivo.
2. Tomar el hemocitómetro y colocar un cubreobjetos en la parte superior.
3. Colocar 10 μL de la suspensión de células en los 2 espacios entre el cubreobjetos y el hemocitómetro (la muestra subirá a la cámara por capilaridad).
4. Observar en el microscopio. Identificar el primer cuadrado grande en 10x y orientarse hacia los pequeños del centro en 40x.
5. Elegir qué celdas se van a contar dependiendo del tamaño de las células.
6. Observar: número de células vivas, número de células muertas (en el caso de la mayoría de células, la cantidad de células muertas es 0), número de cuadrados contados, volumen inicial (mL), factor de dilución y verificar si los cuadros contados fueron grandes o pequeños.
7. Si desea realizar el cálculo manual use la siguiente fórmula para determinar la densidad de células.
 - Cuadrados del centro

$$\text{Densidad de células} = \frac{\text{Promedio de células de los 25 cuadros contados} \times \text{factor de dilución}}{0.000004 \text{ mL}} = \text{células/ mL}$$

8. Retirar el cubreobjetos y limpiar con alcohol el hemocitómetro.

Anexo 8. Sintaxis de SAS 9.4 para análisis estadístico de bloques completos al azar multifactorial.

```
DATA SAS;  
INPUT FA FB BQ PINF  
DATALINES;  
Insertar datos aquí  
;  
PROC SORT; BY FA; RUN;  
PROC_GLM;  
CLASS_BLOQUE_FA_FB;  
MODEL PINF=BLOQUE_FA_FB_FA*FB;  
MEANS_BLOQUE_FA_FB/LSD;  
LSMEANS_BLOQUE_FA_FB/PINF_STDERR;  
LSMEANS_FA*FB/PINF_STDERR;  
RUN;
```

Nota: FA= concentraciones, FB=tratamientos, Bloque= repetición PINF=severidad.
Los datos fueron transformados haciendo uso de raíz cuadrada para la realización del análisis.