

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTAGÓNICO DE HONGOS  
SILVESTRES DEL CULTIVO DE FRESA SOBRE EL AGENTE PATÓGENO  
*Fusarium spp.***



Universidad  
del Cauca

**ANA MARIA SILVA BENAVIDES  
MARTHA ISABEL VIVAS SANDOVAL**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL  
POPAYÁN, 2023**

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTAGÓNICO DE HONGOS  
SILVESTRES DEL CULTIVO DE FRESA SOBRE EL AGENTE PATÓGENO  
*Fusarium spp.***

**ANA MARIA SILVA BENAVIDES  
MARTHA ISABEL VIVAS SANDOVAL**

**Trabajo de grado en modalidad de investigación para optar al título de  
Ingenieras Agroindustriales**

**DIRECTORES  
Mag. IVAN DARIO OTERO RAMIREZ  
Ph.D. JOSE LUIS HOYOS CONCHA**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL  
POPAYÁN, 2023**

Nota de aceptación

Los directores y los jurados han leído el presente documento, escucharon la sustentación del proyecto por sus autores y lo encuentran satisfactorio.

---

JOSE LUIS HOYOS CONCHA Ph. D  
Director

---

IVAN DARIO OTERO RAMIREZ Mag.  
Director

---

SANDRA MAGALLY SANCHEZ TRUJILLO Mag.  
Jurado

---

RICARDO CAMACHO MUÑOZ Mag.  
Jurado

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios fuente de sabiduría y fortaleza, por ser la guía en esta etapa académica.

A la Universidad del Cauca, por la formación académica brindada.

A nuestros directores de tesis, Mag. Iván Darío Otero Ramirez y Ph.D. José Luis Hoyos Concha por el compromiso, apoyo, enseñanzas y acompañamiento en el desarrollo de este logro.

A nuestros padres que siempre estuvieron de nuestro lado y fueron una guía en toda la carrera universitaria ya que, con sus consejos y su apoyo incondicional han logrado que hoy seamos unas profesionales íntegras y útiles a la sociedad.

A nuestros amigos tanto de la Universidad como del común y a todos los docentes de la Facultad de Ciencias Agrarias, ya que ellos han sido y serán nuestro segundo hogar.

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN .....	10
1 MARCO REFERENCIAL .....	12
1.1 LOCALIZACIÓN .....	12
1.2 MARCO TEÓRICO .....	12
1.2.1 Generalidades del cultivo de fresa. ....	12
1.2.2 Enfermedades del cultivo de fresa .....	13
1.2.3 <i>Fusarium spp.</i> como agente causal de enfermedades en el cultivo de fresa.....	13
1.2.3.1 Sintomatología de plántulas afectadas por <i>Fusarium spp.</i> .	14
1.2.3.2 Ciclo del desarrollo de la enfermedad por <i>Fusarium spp.</i> ....	14
1.2.4 Manejo de enfermedades fúngicas en el cultivo de fresa.....	14
1.2.4.1 Control químico.....	14
1.2.4.2 Prácticas culturales.....	15
1.2.4.3 Control Biológico.....	15
1.2.5 Control biológico de enfermedades fúngicas en el cultivo de la fresa.....	15
1.2.5.1 Hongos antagonistas .....	16
1.2.6 <i>Trichoderma spp.</i> como agente de control biológico .....	16
1.3 ESTADO DEL ARTE.....	17
2 METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN .....	20
2.1 CARACTERIZACIÓN DE HONGOS CULTIVABLES PRESENTES EN SUELO Y RAÍZ DE LAS PLANTAS DE FRESA CON ENFERMEDADES FÚNGICAS ASOCIADAS A LA RAÍZ. ....	20
2.1.1 Muestreo .....	20
2.1.2 Aislamiento de los hongos a partir del suelo de cultivo de fresa.....	20
2.1.3 Aislamiento de los hongos a partir de raíces de cultivo de fresa.....	21
2.1.4 Purificación.....	21
2.1.5 Descripción macroscópica y microscópica de hongos purificados.....	21
2.1.6 Conservación de hongos obtenidos .....	21
2.1.7 Identificación molecular de <i>Fusarium spp.</i> .....	22
2.1.7.1 Extracción de ADN .....	22

2.1.7.2	Cuantificación del ADN obtenido .....	23
2.1.7.3	Amplificación de gen ribosomal 28S.....	23
2.1.7.4	Cuantificación del amplificado obtenido.....	23
2.1.7.5	Secuenciación y análisis de secuencias .....	23
2.2	DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTAGÓNICO DE HONGOS OBTENIDOS DE SUELO Y RAÍZ DE CULTIVO DE FRESA SOBRE <i>Fusarium spp.</i> .....	23
2.2.1	Antagonismo por cultivo dual .....	24
2.2.2	Inhibición por compuestos volátiles.....	24
2.2.3	Antagonismo a pH 4,0.....	25
2.2.4	Antagonismo a temperatura de 20 °C y 10 °C .....	25
2.2.5	Caracterización molecular de agentes biocontroladores.....	26
2.2.6	Diseño experimental.....	26
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
3.1	Caracterización de los hongos cultivables presentes en suelo y raíz de las plantas de fresa con enfermedades fúngicas asociadas a la raíz. ....	27
3.1.1	Aislamiento de los hongos a partir del suelo y raíz de cultivo de fresa.....	27
3.1.2	Descripción macroscópica y microscópica de hongos purificados.....	28
3.1.2.1	Descripción macroscópica.....	28
3.1.2.2	Identificación microscópica.....	30
3.1.3	Identificación de <i>Fusarium spp.</i> .....	38
3.1.3.1	Identificación molecular de <i>Fusarium spp.</i> .....	41
3.2	Determinación del efecto antagónico de hongos obtenidos de suelo y raíz de cultivo de fresa sobre el patógeno <i>Fusarium Spp.</i> .....	42
3.2.1	Antagonismo dual.....	42
3.2.2	Metabolitos volátiles (COVs) .....	47
3.2.3	Antagonismo a pH 4,0.....	49
3.2.4	Antagonismo a temperatura de 20 °C y 10°C .....	51
3.2.5	Caracterización molecular de agentes biocontroladores.....	54
4	CONCLUSIONES.....	56
5	RECOMENDACIONES .....	57
6	ANEXOS .....	58
7	BIBLIOGRAFÍA .....	78

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Número de aislados fúngicos obtenidos.....	27
Tabla 2. Número de aislados por género en suelo y raíz. ....	30
Tabla 3. Características macroscópicas de las colonias de aislados de <i>Fusarium</i> spp. .....	39
Tabla 4. Identificación molecular de muestras de <i>Fusarium</i> spp. ....	42
Tabla 5. Análisis ANOVA, porcentaje inhibición <i>F. incarnatum</i> SH3.....	44
Tabla 6. Análisis ANOVA, porcentaje inhibición <i>F. equiseti</i> SH26.....	45
Tabla 7. Análisis ANOVA, porcentaje inhibición <i>F. oxysporum</i> SH33.....	46
Tabla 8 .Porcentaje de inhibición producido por COV's de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>F.</i> <i>incarnatum</i> SH3. ....	48
Tabla 9. Porcentaje de inhibición producido por COV's de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>F.</i> <i>equiseti</i> SH26 .....	48
Tabla 10. Porcentaje de inhibición producido por COV's de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>F. oxysporum</i> SH33 .....	48
Tabla 11. Porcentaje de inhibición de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>Fusarium</i> SH3 a pH 4,0 .....	49
Tabla 12. Porcentaje de inhibición de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>Fusarium</i> SH26 a pH 4,0 .....	50
Tabla 13. Porcentaje de inhibición de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>Fusarium</i> SH33 a pH 4,0 .....	50
Tabla 14. Porcentaje de inhibición de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>Fusarium</i> spp a pH 6 y pH4.....	51
Tabla 15. Porcentaje de inhibición a temperatura 20 °C para SH3 .....	52
Tabla 16. Porcentaje de inhibición a temperatura 20 °C para SH26 .....	52
Tabla 17. Porcentaje de inhibición a temperatura 20 °C para SH33 .....	52
Tabla 18. Crecimiento micelial de cepas antagonistas y patógenos a temperatura 10 °C .....	53
Tabla 19. Identificación molecular de muestras de <i>Trichoderma</i> spp. ....	54

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Coloración observada en los aislados cultivados en YGC (6 días a 28°C).....	28
Figura 2. Topografía de los aislados cultivados en YGC (6 días a 28 °C). .....	29
Figura 3. Textura de los aislados cultivados en YGC (6 días a 28 °C). .....	29
Figura 4. Identificación macroscópica y microscópica de <i>Aspergillus</i> spp. ....	31
Figura 5. Identificación macroscópica y microscópica de <i>Penicillium</i> spp. ....	32
Figura 6. Identificación macroscópica y microscópica <i>Mucor</i> spp. ....	33
Figura 7. Identificación macroscópica y microscópica <i>Pythium</i> spp. ....	34
Figura 8. Identificación macroscópica y microscópica <i>Rhizopus</i> spp. ....	35
Figura 9. Identificación macroscópica y microscópica <i>Rhizoctonia</i> spp.....	36
Figura 10. Identificación macroscópica y microscópica <i>Trichoderma</i> spp. ....	37
Figura 11. Identificación macroscópica y microscópica <i>Metarhizium</i> spp.....	38
Figura 12. Microscopia de <i>Fusarium</i> spp. SH3. ....	40
Figura 13. Microscopia de <i>Fusarium</i> spp. SH26. ....	40
Figura 14. Microscopia de <i>Fusarium</i> spp. SH33. ....	41
Figura 15. Productos de PCR obtenidos del ADN genómico de los aislamientos de <i>Fusarium</i> spp.....	41
Figura 16. Antagonismo dual de cepas de <i>Metarhizium</i> spp. y <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>Fusarium</i> spp.....	43
Figura 17. Actividad antagónica por compuestos orgánicos volátiles (COVs) .....	47
Figura 18. Actividad antagónica a pH de 4,0.....	49
Figura 19. Actividad antagónica a temperatura de 20 °C .....	51
Figura 20. Actividad antagónica a temperatura de 10 °C. ....	53
Figura 21. Productos de PCR obtenidos del ADN genómico de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp.....	54



## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Identificación y descripción de los aislados obtenidos.....	58
Anexo 2. Imágenes microscópicas y macroscópicas de cepas antagonistas obtenidas en este estudio. ....	61
Anexo 3. Imágenes microscópicas y macroscópicas de cepas patógenas obtenidas en este estudio. ....	67

## RESUMEN

El hongo patógeno *Fusarium spp.* causa la enfermedad conocida como marchitez de raíz, una de las más limitantes para el cultivo de fresa al generar grandes pérdidas económicas. El control químico es el método más utilizado por los agricultores para controlar esta enfermedad, sin embargo, este patógeno ha creado una resistencia frente a estos agroquímicos. El control biológico es una opción viable en respuesta a la disminución de este patógeno y al uso de agroquímicos. Por tal motivo, el estudio tuvo como objetivo evaluar el potencial antagonico de hongos silvestres del cultivo de fresa sobre *Fusarium spp.* Para el desarrollo, se aislaron 71 hongos en los cultivos de fresa a partir de muestras de suelo y raíces. De este grupo, se seleccionaron 23 cepas pertenecientes a *Trichoderma spp.* y *Metarhizium spp.* las cuales fueron evaluadas de forma *In vitro* por su capacidad antagonica sobre *Fusarium incarnatum*, *Fusarium. equiseti* y *Fusarium oxysporum*. Mediante la confrontación por cultivos duales se determinó las cepas que presentaron los mayores porcentajes de inhibición que corresponden a cuatro aislados de *Trichoderma* (SH4, RH21, RH26, RH35) que presentaron una inhibición superior al 74,0%, y fueron seleccionados para ser evaluados en las pruebas de compuestos volátiles, pH y temperatura. En cuanto a la inhibición por compuestos volátiles se realizó mediante placas superpuestas; las cepas RH21 y RH26 mostraron mejor respuesta antagonica frente a *F. incarnatum* y *F. oxysporum* con el 55,5% y 40,8%, respectivamente. En la prueba de pH a 4,0, la cepa de *F. equiseti* fue inhibida en mayor proporción por las cepas RH35 (77,9%) y SH4 (74,1%). Con respecto a la temperatura de 20°C, la cepa SH4 logró inhibir en más del 80% a las tres cepas de *Fusarium*, mientras que, a una temperatura de 10°C no se registró inhibición alguna.

*Palabras Claves: Control biológico, Antagonismo, Trichoderma, Marchitez por Fusarium, Fresa.*

## ABSTRACT

The pathogenic fungus *Fusarium spp.* It causes the disease known as root wilt, one of the most limiting diseases for strawberry cultivation as it generates great economic losses. Chemical control is the method most used by farmers to control this disease, however, this pathogen has created resistance to these agrochemicals. Biological control is a viable option in response to the decrease of this pathogen and the use of agrochemicals. For this reason, the objective of the study was to evaluate the antagonistic potential of wild fungi from strawberry cultivation on *Fusarium spp.* For development, 71 fungi were isolated in strawberry crops from soil and root samples. From this group, 23 strains belonging to *Trichoderma spp.* were selected. and *Metarhizium spp.* which were evaluated in vitro for their antagonistic capacity against *Fusarium incarnatum*, *Fusarium. equiseti* and *Fusarium oxysporum*. Through confrontation by dual cultures, the strains that presented the highest percentages of inhibition were determined, corresponding to four isolates of *Trichoderma* (SH4, RH21, RH26, RH35) that presented an inhibition greater than 74,0%, and were selected to be evaluated. in tests of volatile compounds, pH and temperature. Regarding the inhibition by volatile compounds, it was carried out using overlapping plates; strains RH21 and RH26 showed the best antagonistic response against *F. incarnatum* and *F. oxysporum* with 55.5% and 40.8%, respectively. In the pH test at 4,0, the *F. equiseti* strain was inhibited to a greater extent by the RH35 (77.9%) and SH4 (74.1%) strains. With respect to the temperature of 20°C, the SH4 strain managed to inhibit the three *Fusarium* strains by more than 80%, while at a temperature of 10°C no inhibition was recorded.

*Keywords: Biological control, Antagonism, Trichoderma, Fusarium wilt, Strawberry.*

## INTRODUCCIÓN

El fruto de la fresa pertenece al género *fragaria* el cual se encuentra disperso en todo el mundo, originaria de las praderas centrales de Norteamérica. En la actualidad las variedades más cultivadas se derivan de *Fragaria x ananassa* que resulta de la hibridación de las dos especies americanas hacia inicios del siglo XXVIII (Calderon Gomez, 2017).

Los primeros reportes de fresa en Colombia fueron a comienzos de la colonia, el libro de la historia y dispersión de frutales nativos del Neotrópico, reporta el cultivo de la frutilla de Chile en Tunja hacia el año de 1610 y hacia el 1808 con variedades chilenas y europeas en la sabana de Bogotá, san Antonio, al occidente de Cali y en diferentes zonas frías y templadas (Calderon Gomez, 2017).

El cultivo de fresa (*Fragaria x ananassa*) en la actualidad presenta un nivel de desarrollo importante, pues la producción asciende a los 4,8 millones de toneladas, siendo los principales productores China, Estados Unidos, y Turquía. El crecimiento de la actividad es notable por los aumentos de producción que van dirigidos tanto al mercado nacional como a la agroindustria proporcionando un valor agregado como materia de exportación (Agricultura, 2021).

En distintas zonas de Colombia se presentan condiciones óptimas para la producción de fresa, representando una tendencia de crecimiento del 52% destinada al consumo en fresco, los mercados de pulpas y deshidratados y el mercado de mermeladas y procesados (Agricultura, 2021). Sin embargo, este crecimiento se ve afectado por distintos factores que producen enfermedades en los cultivos ya sea por sí solos o en combinación, lo cual hace imposible el desarrollo de las fresas tanto en cosecha como en postcosecha, por lo que resulta importante protegerlas de diversos microorganismos.

Dentro de los microorganismos que afectan el suelo, los hongos son el grupo que más enfermedades ocasionan produciendo marchitamiento y muerte gradual de la planta. La enfermedad se ha asociado con nueve organismos, de los cuales sobresalen cuatro especies: *Fusarium spp.*, *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora spp.* y otros hongos que afectan el sistema radical o zona cortical del cuello como *Rhizopus spp.*, *Pythium spp.*, *Cladosporium spp.*, *Alternaria spp.* y *Penicillium spp.* (Pérez-Rodríguez et al., 2019).

*Fusarium spp.* se destaca como uno de los hongos patógenos más prevalentes y perjudiciales en el cultivo de fresa. Su capacidad para reducir de manera significativa, hasta en un 50%, la producción de fresas por sí solo genera considerables pérdidas económicas para los agricultores. Este hongo emerge en las etapas tempranas del cultivo, dando lugar a la enfermedad conocida como marchitez de raíz, que se distingue como la más devastadora debido a su alta

incidencia, amplia distribución y la complejidad asociada a su control. La marchitez de raíz provoca una decadencia gradual de la planta al interferir con su sistema de raíces. Agregando así un desafío adicional para los agricultores en la preservación de sus cosechas.

El método más usado para erradicar o limitar a microorganismos patógenos como *Fusarium spp.* se basa en el uso de compuestos químicos, lo que contribuye a la crisis de la agricultura incidiendo en la emergencia de patógenos resistentes a fungicidas, dificulta la preservación de los ecosistemas, los recursos naturales, y afecta la salud de las comunidades rurales y de los consumidores urbanos (Pérez-Rodríguez et al., 2019).

Las opciones para el manejo de las enfermedades frente al uso de los químicos actualmente son múltiples, variadas y factibles. Escoger cuál alternativa se va a utilizar dependerá de la rentabilidad del cultivo, enfermedades a controlar, disponibilidad de recursos económicos, grado de tecnificación y condiciones ambientales (Rajani et al., 2021).

Es por ello que el empleo de agentes de control biológico ha promovido la búsqueda de alternativas sostenibles para la producción de fresa logrando reducir el uso indiscriminado de agroquímicos como medio de supresión y erradicación de enfermedades; haciendo necesario la incorporación de tratamientos biológicos que sean rentables y amigables con el medio ambiente.

De lo anterior derivan diferentes investigaciones, que resaltan la acción de hongos antagonistas entre los que sobresalen *Trichoderma spp.*, *Cladosporium spp.*, *Metarhizium spp.*, y *Gliocladium spp.* que han sido reconocidos por su potencial como biocontrolador frente a bacterias y patógenos del suelo, esto los posiciona como controladores naturales del ecosistema ya que son habitantes naturales del mismo. Ahora bien, aislar cepas con potenciales antagónicos de cultivos enfermos puede ser relevante debido a que permite evaluar la diversidad genética en un contexto específico. La variabilidad genética puede influir en la eficacia de las cepas para controlar patógenos o promover el crecimiento de las plantas ya que aislar cepas locales permite identificar aquellas que están mejor adaptadas a las condiciones específicas del cultivo y del entorno (Saldaña Jaramillo, 2021).

Basándonos en lo mencionado anteriormente, el principal objetivo de este trabajo es evaluar el potencial antagónico de hongos silvestres del cultivo de fresa sobre el agente patógeno *Fusarium spp.* Además, se buscó caracterizar morfológicamente los hongos cultivables presentes en el suelo y raíz de plantas de fresa con enfermedades fúngicas asociadas a la raíz, así como determinar el efecto antagónico de hongos obtenidos del suelo y raíz del cultivo de fresa sobre el patógeno *Fusarium spp.*

# 1 MARCO REFERENCIAL

## 1.1 LOCALIZACIÓN

Las muestras de suelo y raíces fueron obtenidas en dos fincas ubicadas en las veredas Manzanas y Delicias, pertenecientes al municipio de Silvia. El municipio de Silvia se encuentra ubicado en la región centro oriental del departamento del Cauca, sobre el flanco occidental de la cordillera central, a una altura de 2.527 m.s.n.m.; tiene una temperatura de 10 °C, clima frío y seco, la humedad varía entre el 85% y el 92% en diferentes momentos del día. Silvia limita por el norte con los municipios de Caldon y Jámbalo, por el oriente con los municipios de Páez e Inzá, por el sur con el municipio de Totoró y por el occidente con los municipios de Totoró, Piendamó y Caldon (Santamaría Giraldo, 2019).

## 1.2 MARCO TEÓRICO

### 1.2.1 Generalidades del cultivo de fresa.

La palabra fresa proviene del latín “*Fragans*” que significa fragante. Pertenece al reino Plantae, división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, familia Rosaceae, género *Fragaria* y especie *Fragaria ananassa* (Matute Calle, 2019). Es una planta de tipo herbáceo y perenne de porte pequeño, se reproduce de forma sexual y asexual mediante la formación de inflorescencias generalmente hermafroditas pequeñas de pétalos blancos y receptáculo amarillo, los cuales terminan desarrollando poliaquenos “eterios” que contienen los verdaderos frutos (aquenos) en su superficie, cuenta con un sistema radicular fasciculado formado por raíces y raicillas. El tallo está constituido en una roseta basal o también denominada corona, de la que surgen las hojas en muy estrechos intervalos, trifoliadas. En las hojas axiales se desarrollan yemas que pueden evolucionar como ramas o escapos florales (Calderon Gomez, 2017).

Para el cultivo de fresa la preparación del suelo inicialmente se realiza con 50 cm de profundidad teniendo en cuenta que sean suelos livianos, arenosos y con buen drenaje. El pH debe estar entre 5,5 a 6,5 y el suelo debe tener buena fertilidad para favorecer el desarrollo del cultivo (Calderon Gomez, 2017). Para la plantación se dispone de épocas variadas de acuerdo a la zona y variedad a sembrar, las plantas son sembradas con una distancia aproximada de entre 25-30 cm entre plantas. Finalmente, está la fertilización con niveles óptimos de 20g/m<sup>2</sup> nitrógeno, 10 g/m<sup>2</sup> fósforo y 15 g/m<sup>2</sup> de óxido de potasio K<sub>2</sub>O de manera fraccionada (Matute Calle, 2019).

Las plantas tienen una vida corta entre 24 a 30 meses, su vida comercial útil es de 12 a 18 meses; a partir de este tiempo se vuelve susceptible a

enfermedades y baja su calidad de frutos y rendimiento. Finalmente, el peso de la fresa varía según la variedad entre 6,53 y 6,65 g (Calderon Gomez, 2017).

### **1.2.2 Enfermedades del cultivo de fresa**

La fresa está expuesta a diversas enfermedades causadas por bacterias, hongos y virus que ocasionan pérdidas económicas por sus efectos negativos en la producción y calidad. Actualmente, patógenos transmitidos por el suelo como *Phytophthora spp.*, *Fusarium spp.*, *Botrytis cinérea*, *Rhizoctonia spp.*, *Colletotrichum spp.* y *Verticillium sp* se están identificando como causantes de las enfermedades más limitantes en cultivos de fresa (Pastrana et al., 2023).

Entre las enfermedades más comunes y graves que ocurren durante el cultivo de fresas y son difíciles de controlar debido a su amplia gama de huéspedes, su rápida propagación y su largo tiempo de supervivencia en el suelo se destacan las que atacan la raíz y el cuello de la planta tales como: pudrición de la raíz (*Rhizoctonia solani*) produce un desplome total de la planta en época de cosecha, las hojas bajas se van tornando de color morado, el cuello de la planta muere y por último las raíces se pudren y toman un color café. En el caso de la pudrición por *Verticillium albo-atrum* las hojas externas de la planta se tornan de café oscuro en los márgenes. Las hojas internas conservan el color verde así la planta esté muerta. Finalmente, la pudrición causada por *Fusarium spp.* produce podredumbre de raíz, marchitamiento, podredumbre del fruto, amarillamiento y caída de las hojas (Gutierrez Cano, 2015).

### **1.2.3 *Fusarium spp.* como agente causal de enfermedades en el cultivo de fresa**

*Fusarium*, proviene del latín *fuscus* que significa huso. Pertenece al reino Fungi, filo Ascomycota, clase sordariomycetes, orden Hypocreales, familia Nectriaceae, género *Fusarium* y especies: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium verticilloides*, *Fusarium dimerum*, *Fusarium chlamydosporum* (Cruz Coronel, 2022).

Es un hongo saprofito y hospedero que produce tres tipos de esporas asexuales: macroconidias, microconidias y clamidosporas. Además, tiene la capacidad de producir enzimas como las pectinasas, celulasas, proteasas y queratinasas, entre otras, que le permiten penetrar diferentes tejidos. Yace en el suelo en forma de micelio, pero en las regiones templadas frías generalmente aparece en forma de clamidosporas (Dobronski Arcos & Pullupaxi Toapanta, 2016).

Hasta el momento la literatura reporta tres especies de *Fusarium* que causan pudrición de la raíz en fresa: *Fusarium solani*, *Fusarium moniliforme* y siendo la más frecuente *Fusarium oxysporum*, (Mariscal Amaro et al., 2016).

### **1.2.3.1 Sintomatología de plántulas afectadas por *Fusarium spp.***

Las plantas de fresa dañadas por *Fusarium spp.*, van muriendo de forma gradual y presentan manchas de color amarillo en las hojas basales, entorchamiento de las hojas, fenómenos de enanismo, disminución del crecimiento y marchitez progresiva debido a que los tubos germinales de las esporas o el micelio del patógeno penetran directamente en las puntas de las raíces o entran a través de las heridas o a nivel de la zona donde se forman las raíces laterales (Dobronski Arcos & Pullupaxi Toapanta, 2016). El micelio del hongo se propaga intercelularmente a través de la corteza de la raíz y como consecuencia las raíces laterales más pequeñas se pudren, mientras las raíces principales y la base del tallo presentan necrosis vascular, así como el deterioro, pudrición y ennegrecimiento de todo el sistema radicular (Lastra Alcalde, 2021).

### **1.2.3.2 Ciclo del desarrollo de la enfermedad por *Fusarium spp.***

El ciclo de las enfermedades producidas por *Fusarium spp.* se divide en tres etapas: durmiente, parasítica y saprófita. En la fase durmiente se inicia la formación de estructuras de resistencia en el suelo ya sea en forma de micelio, esporas tipo macroconidias o microconidias, o clamidosporas. Durante la fase parasítica el hongo se propaga en los tejidos de la planta a través de alguna abertura en la epidermis. Una vez el hongo ha penetrado inicia a proliferar y las hifas invaden toda la planta produciendo los síntomas característicos. Además, en esta etapa se producen esporas y clamidosporas que pueden liberarse al suelo a través de los restos de la planta infectada que se descomponen. Finalmente, en los tejidos de la planta muerta se produce la fase saprófita (Lastra Alcalde, 2021).

## **1.2.4 Manejo de enfermedades fúngicas en el cultivo de fresa**

Los productores de fresa emplean diferentes manejos para el control de enfermedades en el cultivo que son causadas en su mayoría por hongos y aunque en la actualidad exista el manejo integrado de plagas, los campesinos siguen optando por el control químico. Como consecuencia de esto, no solo se ve afectado el medio ambiente, sino que también se ha registrado el aumento de las cepas de hongos resistentes a los agentes químicos (Saldaña Jaramillo, 2021).

### **1.2.4.1 Control químico**

Los usos de fungicidas para controlar la muerte regresiva por diferentes patógenos son muy frecuentes causando altas dosis de toxicidad en humanos y en el medio ambiente un claro ejemplo de esto es el bromuro de metilo el cual es uno de los químicos más utilizados para el control de patógenos en el suelo de los cultivos de fresa, pero fue prohibido por la Agencia de Protección



del Ambiente (EPA) debido a la contaminación de fuentes hídricas por su alta toxicidad. Hasta el momento no existe reporte de un químico que no genere efectos negativos ya sea en la salud o en el medio ambiente (Arturo & Lorena, 2015). Según el Instituto Colombiano Agropecuario & Ministerio de Agricultura (2022), otros fungicidas utilizados en el cultivo de fresa son: Carbendazim, Evozim, Fordazim, Canciller, Benopoint, los cuales son aplicados en su mayoría de forma líquida en los riegos de dos a tres veces en el mes.

#### **1.2.4.2 Prácticas culturales**

Dentro de las prácticas culturales creadas por el hombre se encuentra la eliminación de rastrojos y residuos de cosecha, limpieza de rondas y alrededores, destrucción de fruta dañada y caída, manejo de plántulas y rotación de cultivos. Aunque, la rotación es una forma de eliminar los patógenos no es efectiva ya que esta práctica disminuye el inóculo inicial haciendo que la enfermedad aparezca más tardíamente, pero con una mayor tasa de desarrollo. (Giménez et al., 2015)

#### **1.2.4.3 Control Biológico**

Una alternativa para el manejo integrado de enfermedades que es amigable con el medio ambiente se basa en el control biológico. Este enfoque es una alternativa más segura y sostenible al control químico de plagas y enfermedades, ya que utiliza organismos vivos como depredadores, parasitoides, patógenos y feromonas para controlar la proliferación de enfermedades de las plantas

#### **1.2.5 Control biológico de enfermedades fúngicas en el cultivo de la fresa**

Durante varios años, el estudio del uso de microorganismos vivos para el control de enfermedades en plantas hace parte del concepto de control biológico. Muchos microorganismos han sido ampliamente probados en múltiples cultivos, con el objetivo de alcanzar una regulación biológica de los diversos patógenos. Regularmente los criterios de selección de estos microorganismos están basados en su efectividad contra microorganismos patógenos y a su fácil reproducción. Los mecanismos de acción de estos microorganismos se basan en tres vías: inicialmente, están aquellos microorganismos que afectan directamente al patógeno, tales como la antibiosis, parasitismo, competencia por espacio y nutrientes. Después la producción de metabolitos antibióticos, ya sean de naturaleza volátil o no volátil y finalmente, los mecanismos que modifican la interacción patógeno-planta a través de estimular la resistencia de la planta (Saldaña Jaramillo, 2021).

### 1.2.5.1 Hongos antagonistas

Diferentes investigaciones reportan que en la rizósfera crecen diferentes grupos de hongos filamentosos los cuales tienen efectos antagonísticos y que son utilizados para el control biológico para los patógenos de frutas y vegetales. Según P. Matute Calle (2019), los hongos considerados como los más usados para antagonismo son: *Gliocladium* y *Trichoderma*, donde este último ha sido ampliamente utilizado para controlar los patógenos del género *Rhizoctonia*, *Botrytis*, *Fusarium* en cultivos de papa, fresa, alfalfa, uva y tomate.

### 1.2.6 *Trichoderma spp.* como agente de control biológico

*Trichoderma spp.* es un hongo que exhibe una notable versatilidad al adaptarse a una variedad de entornos, que incluyen la corteza de árboles, el suelo, las esponjas marinas y las plantas, donde puede actuar como endófito (Dobronski Arcos & Pullupaxi Toapanta, 2016). Los hongos pertenecientes a este género han sido ampliamente utilizados como antagonistas contra una diversidad de patógenos, gracias a su eficaz mecanismo de biocontrol y su capacidad para inducir mecanismos de defensa en las plantas (Saldaña Jaramillo, 2021).

En la acción biocontroladora de *Trichoderma sp.*, se han identificado varios mecanismos que regulan el desarrollo de los hongos fitopatógenos. Entre estos, destacan la competencia por espacio y nutrientes, el microparasitismo y la antibiosis, que ejercen una acción directa sobre los hongos fitopatógenos y la producción de compuestos inhibidores. Aunque la capacidad competitiva puede variar según la especie (Zin & Badaluddin, 2020), *Trichoderma spp.* muestra una adaptación biológica que promueve una colonización agresiva y una supervivencia en condiciones adversas. Esto se logra mediante la producción de clamidosporas, un rápido crecimiento y una esporulación abundante. (Morales Mora et al., 2020)

Entre las especies con propiedades antagonísticas más comúnmente citadas se encuentran: *T. virens*, *T. viride*, *T. harzianum* y *T. hamatum*. hasta el momento *T. harzianum* es el hongo antagonista más utilizado para el control de enfermedades de las plantas producidas por *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*, *Fusarium roseum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* Sacc, *Sclerotinia spp*, *Pythium spp*, *Phytophthora spp*, *Alternaria spp.* y *Phytophthora capsici*.

### 1.3 ESTADO DEL ARTE

Morales Mora et al., (2020), llevaron a cabo una investigación avanzada en fitopatología para identificar y caracterizar morfológicamente hongos asociados a enfermedades en cultivos de fresa en México, mediante técnicas de muestreo y análisis morfológico, identificaron diversos hongos en distintas partes de la planta, y evaluaron la capacidad antagónica de *Trichoderma harzianum* (cepa T-H4). En los frutos, se identificaron *A. niger*, *Colletotrichum sp.* y *R. stolonifer*. En hojas y tallos, se encontraron *Pestalotiopsis sp.*, *Curvularia sp.* y *Alternaria sp.* Mientras que, en las raíces se hallaron *Rhizoctonia sp.* y *Fusarium sp.* La prueba de antagonismo dual reveló variabilidad en el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (28,0% a 87,6%), donde *Fusarium sp.* tuvo un porcentaje de inhibición del 63,65% y destacando las cepas *Colletotrichum sp.* (87,56%) y *Pestalotiopsis sp.* (71,11%) por presentar la mayor inhibición.

Cruz Coronel, (2022), llevó a cabo su estudio de investigación en México, que tuvo como objetivo la evaluación de la resistencia *In vitro* del antagonismo de cepas del género *Trichoderma spp.* (*T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. konigiopsis*) contra el patógeno *Fusarium solani* en el cultivo de fresa. La aplicación de la técnica de cultivo dual, en combinación con fungicidas como Captan, Mancozeb, Clorotalonil y Benomil, permitió evaluar de manera precisa las respuestas a diferentes concentraciones. De manera destacada, el tratamiento más eficaz exhibió un 54,91% de inhibición de crecimiento radial, involucrando la cepa *T. konigiopsis* y la adición de 450 mg L<sup>-1</sup> de Clorotalonil. Este resultado resalta la aplicación de metodologías avanzadas, reflejando la intersección entre la tecnología de investigación y la innovación internacional.

Abd-El-Kareem et al., (2019), desarrollaron una investigación que destaca la avanzada aplicación tecnológica y la conexión con investigaciones internacionales en el campo de la fitopatología. Su estudio se centró en evaluar las especies de *T. harzianum*, *T. viride*, *T. virinis* y *T. koningii* como agentes de biocontrol contra la pudrición negra de la raíz de la fresa, causada por *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* y *Pythium sp.* En pruebas *In vitro*, los enfrentamientos demostraron porcentajes de inhibición que superaron el 80%, evidenciando la eficacia de los agentes biocontroladores. En condiciones de campo, la combinación de los antagonistas logró reducir la incidencia y gravedad de la enfermedad en un impresionante 83,3% y 88,5%, respectivamente. En tratamientos individuales, *T. harzianum*, *T. viride* y *T. koningii* también mostraron una significativa reducción de la incidencia y gravedad, superando el 70,8% y 74%, respectivamente.

L. Á. Morales Mora, (2022), desarrolló una investigación en México sobre hongos asociados al cultivo de fresa y sus respuestas a la inoculación del bio-gel fúngico a base de *Trichoderma sp.*, en condiciones *In vitro*. Mediante técnicas moleculares, se identificaron las especies *F. solani* y *F. oxysporum*.

La aplicación de la prueba de antagonismo dual reveló el 94,2% de inhibición para *F. solani* por parte del antagonista *T. asperellum* y una inhibición del 92,15% de *T. harzianum* para *F. oxysporum*.

Picardal et al., (2019), desarrollaron una investigación en Filipinas con el objetivo de comparar la capacidad de dos hongos antagonistas, *T. viride* y *M. anisopliae*, para combatir *F. oxysporum*, causante de la Marchitez del Banano, mediante la aplicación de tecnologías avanzadas. Se empleó el método de cultivo dual, ambos hongos demostraron actividad antagonista contra *F. oxysporum*, destacando *T. viride* como más efectivo, logrando un porcentaje de inhibición del 72,37%, en contraste con *M. anisopliae* que alcanzó un 31,27% de inhibición. Esta eficacia se atribuye a la aplicación de enzimas hidrolíticas, marcando un avance en tecnología biológica para la inhibición del patógeno.

Wang et al., (2023), llevaron a cabo un estudio en China, centrado en el hongo biocontrolador *Trichoderma asperellum* (FJ035) destacando avances significativos en la aplicación de tecnologías para el control biológico. Este hongo demostró su potencial antagónico contra *Fusarium oxysporum f. sp. cucumerinum* Owen (FOC). Utilizando ensayos de confrontación en placas y evaluaciones de metabolitos secundarios, tanto volátiles como no volátiles, se identificó que *T. asperellum* FJ035 exhibe la capacidad de inhibir la germinación de las esporas de FOC y mejorar el potencial de germinación de las semillas de pepino. Al aplicarlo 24 horas antes que FOC, se logró un control significativo de la enfermedad, con eficiencias del 69,79% en condiciones hidropónicas y 75,96% en macetas.

Hao et al., (2021), desarrollaron una investigación con el objetivo de evaluar la capacidad del biocontrolador *M. anisopliae* para combatir el *F. graminearum* en el cultivo de trigo. Este hongo demostró una destacada inhibición del crecimiento micelial del patógeno, alcanzando un 73,0% en pruebas de cultivo dual, e induciendo deformaciones en las hifas que evidencian su impacto directo. La aplicación de filtrados de caldo de *M. anisopliae* al 1% reveló reducciones significativas, con una disminución del 70,0% en el crecimiento micelial de *F. graminearum* y un impacto del 65,0% en la germinación de sus conidios. Además, en condiciones de campo, el tratamiento de semillas de trigo con *M. anisopliae* logró un control efectivo del 38,6%, y la pulverización de espigas de trigo con una suspensión de conidios de *M. anisopliae* alcanzó un control del 40,1% durante el período de floración temprana del trigo.

(Fernández Barbosa & Suárez Mesa, 2009), desarrollaron un estudio de investigación en Colombia, para determinar la capacidad antagónica de seis aislamientos de *Trichoderma harzianum* frente *Fusarium oxysporum Schlechtf. sp. passiflorae*, agente causal de la marchitez en el cultivo de maracuyá. Los seis aislamientos evaluados incluyen tres comerciales (TCC-001, TCC-005 y TCC-006) y tres aislamientos nativos provenientes de suelos (TCN-009, TCN-

010 y TCN -014). Se realizaron pruebas in vitro utilizando la técnica de cultivo dual y un diseño experimental completamente aleatorio, con 13 tratamientos y tres repeticiones. Los aislamientos TCN-009 y TCC-006 destacaron al crecer cuatro veces más rápido que *F. oxysporum* y reducir tres veces menos el crecimiento radial del patógeno, estos dos aislamientos lograron el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) a los 10 días, con valores de 64,61% y 65,91%, respectivamente.

Intana et al., (2021), realizaron un estudio en Tailandia con el objetivo de estudiar los mecanismos de acción involucrados en el biocontrol de la pudrición poscosecha del fruto en melón por siete cepas de *Trichoderma spp.* Se seleccionaron aislados para pruebas in vitro contra *F. incarnatum* mediante el método de placa sellada, los compuestos orgánicos volátiles (COV) emitidos por *T. asperellum* T76-14 demostraron ser eficaces para inhibir el crecimiento de *F. incarnatum* en un 62,5 %. Adicionalmente, se probó compuestos volátiles comerciales (PEA) para inhibir el crecimiento del patógeno; el resultado mostró que la PEA a una concentración de 1,5 mg ml<sup>-1</sup> suprimió el crecimiento fúngico con un 56 % de inhibición.

## 2 METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

### 2.1 CARACTERIZACIÓN DE HONGOS CULTIVABLES PRESENTES EN SUELO Y RAÍZ DE LAS PLANTAS DE FRESA CON ENFERMEDADES FÚNGICAS ASOCIADAS A LA RAÍZ.

Esta etapa del estudio comenzó con la recopilación de muestras en el municipio de Silvia, Cauca. Luego, se procedió al aislamiento de hongos a partir de muestras de suelo y raíces del cultivo de fresa. Estos aislados fueron purificados y sometidos a un análisis detallado tanto a nivel microscópico como macroscópico. Posteriormente, se conservaron mediante glicerol y agar inclinado. Por último, se llevó a cabo la identificación molecular de las cepas de *Fusarium spp.* obtenidas en el proceso.

#### 2.1.1 Muestreo

Para la obtención de hongos silvestres, se visitaron 2 fincas productoras de fresa ubicadas en el municipio de Silvia, Cauca. Los sitios de muestreo en cada finca fueron seleccionados mediante la observación de plantas enfermas que presentaron características típicas de la infección causada por *Fusarium spp.*: enanismo, hojas amarillas, marchitas y con manchas necróticas, crecimiento lento, deformaciones en las raíces, los tallos, frutos con pudriciones y manchas oscuras.

Las muestras de suelo fueron recolectadas mediante un muestreo compuesto obteniendo 500 gramos de suelo por finca. La toma de muestras se realizó aproximadamente a 10 cm de profundidad, utilizando un palín previamente desinfectado, teniendo en cuenta las partes circundantes de la zona radicular de las plantas. Para la obtención de las raíces, se utilizó un muestreo simple y se extrajo de manera manual la planta (Sánchez Leon & Bustos, 2019). Las muestras se guardaron en una nevera de icopor en bolsas de cierre hermético, tipo Ziploc, debidamente marcadas. Se transportaron al Centro Internacional Biotecnológico Agroindustrial (CBA) de la Universidad del Cauca, y se procesaron inmediatamente.

#### 2.1.2 Aislamiento de los hongos a partir del suelo de cultivo de fresa

Los aislamientos fueron obtenidos mediante la adición de 10 g de suelo en 90 mL de agua, los cuales se homogenizaron y se llevaron a agitación por 30 minutos a 120 rpm. Posteriormente, se realizaron diluciones sucesivas hasta  $10^{-6}$  y se hizo la siembra por superficie en placas de Petri con Agar extracto de levadura-glucosa-cloranfenicol (YGC) (Pérez & García Godos, 2019). Las placas se colocaron en una Incubadora marca Binder GmbH, Alemania (Bd 115) a 28 °C por 5 días.

### **2.1.3 Aislamiento de los hongos a partir de raíces de cultivo de fresa**

Las raíces recolectadas fueron lavadas con agua estéril, y se fragmentaron en pequeñas partes, los fragmentos se enjuagaron con agua destilada para eliminar los residuos que pudieran interferir con el desarrollo normal del patógeno (Pérez & García Godos, 2019). Posteriormente, los fragmentos de tejido se sembraron en cajas de Petri con YGC, seguido de incubación por 5 días a 28 °C.

### **2.1.4 Purificación**

Para realizar la purificación, se realizó una preselección visual de los hongos, basada en características morfológicas. Los aislados seleccionados fueron replicados mediante la técnica de punción en el medio de cultivo YGC. Las cajas de Petri fueron colocadas en incubación durante 5 días a 28 °C.

### **2.1.5 Descripción macroscópica y microscópica de hongos purificados**

Para la descripción macroscópica de los hongos purificados, se tuvieron en cuenta características como color, topografía y textura. Para la descripción microscópica, se realizaron tinciones con azul de lacto fenol y se observaron con un microscopio de 40x y 100x en busca de estructuras tales como hifas, esporas y conidióforos (Marulanda Medina, 2017).

Para la descripción macroscópica y microscópica se tuvo en cuenta referentes de literatura y tres manuales: "Identification of Pathogenic Fungi. Second Edition"; "Molecular Identification of Fungi"; "Pictorial Atlas of Soil Y Seed Fungi Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species. Second Edition". (Tedersoo & Nilsson, 2016),(Burbano Rosero et al., 2017).

### **2.1.6 Conservación de hongos obtenidos**

Para la conservación de los hongos purificados, se utilizaron dos métodos: conservación con glicerol y conservación en tubo con agar inclinado.

En el caso de la conservación con glicerol, se hizo una resiembra de los hongos purificados en 50 mL de agua peptonada al 1%. Los cultivos fueron llevados a incubación a 28 °C durante 5 días. Posteriormente, se transfirieron a tubos Falcón y se centrifugaron durante 20 minutos a 3800 rpm. Se procedió a recuperar la biomasa, que se suspendió en una solución de glicerol al 60% y agua peptonada al 1%. Las suspensiones se almacenaron en viales en Congelador marca Freezer Thermo Scientific a -20 °C para su conservación a largo plazo (Sánchez Soto, 2018).

En cuanto a la conservación en tubo con agar inclinado, se emplearon tubos de vidrio de 10 mL con medio YGC en un plano inclinado. La conservación se

realizó mediante la técnica de punción, donde se introdujo una aguja o punzón en el agar para depositar una pequeña cantidad del hongo purificado. Los tubos se incubaron durante 5 días a 28°C para permitir el crecimiento y desarrollo del hongo. Finalmente, los tubos se conservaron en el Refrigerador marca Samsung, China (RI38FEAKDSL) a 4 °C para su almacenamiento a corto plazo

### **2.1.7 Identificación molecular de *Fusarium spp.***

Se realizó la identificación molecular de los hongos pertenecientes al género *Fusarium* de acuerdo a sus características morfológicas. Para ello, se llevó a cabo una extracción de ADN, seguida de la amplificación por PCR de la región ITS, y finalmente se procedió a la secuenciación y análisis de los datos obtenidos.

#### **2.1.7.1 Extracción de ADN**

Los hongos conservados fueron activados en agar YGC, luego de 5 días de crecimiento a 25 °C se hizo un raspado de micelio y se procedió al proceso de extracción de ADN por solventes orgánicos. Para ello, el micelio obtenido se centrifugó a 4.500 rpm por 20 minutos y se eliminó el sobrenadante. Luego, se adicionó 1 mL de Tampón SET (Tris 20 Mm, EDTA 25 Mm, NaCl 75 Mm, pH 8,0), se aplicó Vortex marca Maxi Mix II, USA (M37615) y se agregó 1 mL de Lisozima (10mg/mL), manteniéndolo en incubación en un termostato marca Memmert, Alemania (WNB 7) por 2 horas a 37 °C. Después, se agregaron 5 µL de RNAsa (10 mg/mL) y se incubó nuevamente a 37 °C por 1 hora. Posteriormente, se añadió 300 µL de SDS (10%), 50 µL de Proteinasa K (10mg/mL) y se incubó por 1 hora a 37 °C. Luego, se añadió 150 µL de acetato de sodio 2 M, se aplicó vortex por 30 segundos y se mantuvo en baño de hielo por 10 minutos. A continuación, se añadió 500 µL de Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico (25:24:1) y se agitó por 30 segundos.

Posteriormente, se centrifugó a 4.500 rpm por 20 minutos a temperatura ambiente. Luego, se transfirió el sobrenadante a un vial de 1,5 mL y se añadió 500 µL de Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1). Además, en igual volumen se añadió Isopropanol almacenado a -20°C, observando la precipitación de ADN. A continuación, se centrifugó a 10.000 rpm por 20 minutos y se descartó el sobrenadante. Se añadieron 500 µL de Etanol al 70% y se centrifugó a 10.000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y el tubo se dejó secar a temperatura ambiente por 12 horas. Después de este tiempo, se aplicaron 300 µL de Tampón TE 1X (Tris 0,01 Mm, EDTA 1 Mm, pH 7,5) y se conservó a -20 °C (Burbano Rosero et al., 2017).



### **2.1.7.2 Cuantificación del ADN obtenido**

La integridad del ADN extraído se verificó mediante geles de agarosa al 1% en una Cámara de Electroforesis Labnet International Inc, USA (E0160). Las condiciones de corrida fueron de 1 hora a 70 voltios, y se utilizó lambda Hind III como marcador de tamaño molecular. Después de la corrida electroforética, el gel fue visualizado en un foto-documentador marca Benchtop UV Transiluminator, USA (CPQ-8838) a una longitud de onda de 302 nm.

### **2.1.7.3 Amplificación de gen ribosomal 28S**

Para la amplificación del gen 28S rRna se utilizó un termociclado marca Labnet, USA (TC9610), con primers: NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAG-3') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). El mix de PCR estuvo compuesto de la siguiente manera: 2 µL de primer NL1 (20 µM), 2 µL de primer NL4 (20 µM), 3 µL de ADN, 25 µL de safe Green 2x PCR taq master mix y 18 µL de agua grado molecular. Las condiciones de termociclado fueron las siguientes: 94 °C por 2 minutos, 40 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 15 segundos y 72 °C por 90 segundos, con una extensión final a 72 °C por 10 minutos.

### **2.1.7.4 Cuantificación del amplificado obtenido**

La calidad de los amplificados obtenidos se verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%. El tiempo de corrida fue de 40 minutos a 70 voltios, y se utilizó 1 Kb opti-DNA como marcador de tamaño molecular.

### **2.1.7.5 Secuenciación y análisis de secuencias**

Los amplificados obtenidos se enviaron a un laboratorio externo para su secuenciación. Una vez que se obtuvieron las secuencias, se visualizaron en el programa BioEdit versión 7.0.4 de Estados Unidos. Se verificó la calidad, se cortaron los extremos que no presentaban picos definidos, y se compararon con la base de datos Estadounidense National Center of Biotechnology Information (NCBI) (Burbano Rosero et al., 2017).

## **2.2 DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTAGÓNICO DE HONGOS OBTENIDOS DE SUELO Y RAÍZ DE CULTIVO DE FRESA SOBRE *Fusarium spp.***

De acuerdo a la caracterización de los hongos obtenida en el numeral 2.1.5, se realizó una revisión bibliográfica con el fin de descartar aquellos hongos reportados como patógenos en el cultivo de fresa y seleccionar aquellos con potencial biocontrolador. A continuación, se procedió a realizar las pruebas de antagonismo dual, pruebas de inhibición de compuestos volátiles, así como pruebas de antagonismo a pH de 4 y diferentes temperaturas. Estas pruebas

permitieron evaluar la capacidad de los hongos seleccionados para inhibir el crecimiento y desarrollo de *Fusarium spp* y determinar su potencial como agentes de control biológico.

### 2.2.1 Antagonismo por cultivo dual

Inicialmente, cada microorganismo fue activado en cajas de Petri con Agar YGC por punción y se llevó a incubación a 28 °C durante 5 días. Posteriormente, fueron activados por discos bajo las mismas condiciones que la activación. Después, en una caja Petri con agar YGC, se colocó un disco de micelio del hongo *Fusarium spp.* con un diámetro de 0,5 mm. Además, en la misma placa, a una distancia de 6 cm se sembró un disco de 0,5 mm del micelio del antagonista fúngico. Las placas se incubaron a 28 °C durante 5 días (Sánchez Leon & Bustos, 2019). Se estableció un control del experimento en placas diferentes con medio YGC, donde se dejó crecer el hongo patógeno y el hongo antagonista en las mismas condiciones durante 5 días a 28 °C, hasta que la colonia alcanzó el borde opuesto de la placa.

Al sexto día de incubación, se midió el radio de crecimiento de los microorganismos enfrentados y se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento, mediante la siguiente fórmula (Sánchez Leon & Bustos, 2019).

$$\text{PICR} = ((R1 - R2) / R1) \times 100\%$$

Donde, R1 corresponde al crecimiento radial del patógeno y R2 corresponde al crecimiento radial del testigo en cada tratamiento.

### 2.2.2 Inhibición por compuestos volátiles

En el ensayo de inhibición por compuestos volátiles, se seleccionaron las cepas que presentaron un porcentaje de inhibición mayor frente al patógeno *Fusarium spp.* en la prueba de enfrentamiento dual en el numeral 2.2.1.

Primero, los hongos que presentaron mayor actividad antagónica y *Fusarium spp.* fueron activados previamente en cajas de Petri con medio de cultivo YGC por discos y se incubaron a una temperatura de 28 °C durante cinco días.

Para determinar la producción de metabolitos volátiles, se empleó el método de placas superpuestas. Inicialmente, se procedió a colocar en una caja de Petri con medio de cultivo YGC un disco de 0,5 mm de diámetro del hongo *Fusarium spp.* y en otra caja de Petri con el mismo medio de cultivo se colocó un disco de 0,5 mm de diámetro del antagonista. Luego, se les retiró la tapa a ambas cajas y se unieron colocando la base que contenía el disco de *Fusarium spp.* encima de la caja que contenía el disco del antagonista. Posteriormente, las cajas de Petri fueron selladas con papel encerado e incubadas a 28 °C durante 5 días

(González Martínez, 2020). Se utilizó como testigo la colonia del fitopatógeno y el antagonista creciendo en cajas con YGC libre de inhibidores.

Finalmente, al sexto día se calculó el porcentaje de inhibición con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = [(D1-D2) / D1] \times 100\%$$

Donde, D1= Diámetro de la colonia del fitopatógeno creciendo en cajas con YGC-agar libre de inhibidores.

D2= Diámetro de la colonia del fitopatógeno creciendo en cajas con YGC-agar confrontada con los metabolitos volátiles producidos por el antagonista.

### **2.2.3 Antagonismo a pH 4,0**

Inicialmente, las cepas antagonistas seleccionadas y *Fusarium spp.* fueron previamente activadas en cajas de Petri con medio YGC. Luego, se incubaron a una temperatura de 28 °C durante cinco días. Después, el medio de cultivo YGC fue ajustado a pH 4,0 utilizando HCl 0,1 N y NaOH al 5%, con la ayuda de un pH-metro. Una vez que los medios de cada tratamiento estuvieron preparados, se sometieron a esterilización en autoclave marca All American, USA (75X) a 121 °C durante 20 minutos.

En una misma caja se sembró un disco de micelio de la colonia del hongo antagonista y otro del *Fusarium spp.* a una distancia de 6 cm. Luego, se sellaron las cajas y se conservaron a una temperatura de 28 °C. Se realizaron tres réplicas por cada tratamiento y, como controles, se dejaron cajas sembradas con el hongo antagonista y *Fusarium spp.* de manera independiente (Ronnie Gakegne & Martínez Coca, 2018).

Las evaluaciones del crecimiento de los hongos se realizaron al octavo día y se determinó el porcentaje de inhibición, siguiendo lo descrito en el numeral 2.2.1.

### **2.2.4 Antagonismo a temperatura de 20 °C y 10 °C**

Inicialmente, las cepas antagonistas seleccionadas y *Fusarium spp.* fueron previamente activadas en cajas de Petri con medio YGC. Luego, se incubaron a una temperatura de 28 °C durante cinco días. Posteriormente, se tomó un disco con micelio del hongo antagonista y se sembró en un borde de la caja Petri, opuesto a 6 cm de distancia se ubicó un disco con micelio de *Fusarium spp.* (Ronnie Gakegne & Martínez Coca, 2018). Las cajas se incubaron a temperatura de 10 °C y 20 °C.

Para la prueba de antagonismo realizada a 10 °C fue necesario realizar el seguimiento durante 12 días, mientras que para la prueba a 20 °C se realizó

el seguimiento hasta el sexto día. Se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial, utilizando la fórmula descrita en el numeral 2.2.1.

### **2.2.5 Caracterización molecular de agentes biocontroladores**

Las actividades correspondientes para la caracterización molecular de los agentes biocontroladores se realizaron conforme a lo descrito en el numeral 2.1.7.

### **2.2.6 Diseño experimental**

Para la prueba de enfrentamiento dual, se aplicó un diseño unifactorial completamente al azar, teniendo como factor los hongos antagonistas (23), y como variable de respuesta el porcentaje de inhibición. Se realizó un análisis de varianza con el fin de identificar si existían diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos con un nivel de confianza del 95%. A aquellos tratamientos que presentaron diferencias estadísticas, se les realizó un agrupamiento mediante el análisis de Tukey.

Para la prueba de compuestos volátiles, se aplicó un diseño unifactorial completamente al azar, teniendo como factor los hongos antagonistas seleccionados (2) y como variable de respuesta el porcentaje de inhibición.

Para la prueba de antagonismo a pH 4,0, se aplicó un diseño experimental completamente al azar, teniendo dos factores los cuales corresponden a los hongos antagonistas seleccionados (2) y el pH a evaluar, y como variable de respuesta el porcentaje de inhibición

Para la prueba de antagonismo a 20 °C, se aplicó un diseño experimental completamente al azar, teniendo dos factores los cuales corresponden a los hongos antagonistas seleccionados (2) y la temperatura a evaluar (20 °C), y como variable de respuesta el porcentaje de inhibición. De igual manera, se emplea el mismo diseño para la prueba de antagonismo a 10 °C.

Para pruebas de compuestos volátiles, pH y temperatura, se aplicó la prueba t de Student para confirmar diferencias estadísticas entre los tratamientos con un p valor de 0,05.

### 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS HONGOS CULTIVABLES PRESENTES EN SUELO Y RAÍZ DE LAS PLANTAS DE FRESA CON ENFERMEDADES FÚNGICAS ASOCIADAS A LA RAÍZ.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en el aislamiento e identificación morfológica de los hongos obtenidos en el municipio de Silvia, Cauca. Además, la identificación molecular de los hongos seleccionados.

##### 3.1.1 Aislamiento de los hongos a partir del suelo y raíz de cultivo de fresa

Se aislaron un total de 71 hongos asociados al cultivo de la fresa de las muestras recolectadas. La finca 1 mostró el mayor número de hongos aislados (60,56%), mientras que en la finca 2 se obtuvo una cantidad menor (39,44%). Es relevante mencionar que los aislados obtenidos del suelo fueron mayores (59,15%) que los obtenidos de las raíces (40,85%) en ambas fincas (Tabla 1). A cada aislado se le dio la denominación de SH para aquellos provenientes del suelo y RH para los provenientes de las raíces.

Tabla 1. Número de aislados fúngicos obtenidos

Finca	Aislados		Total
	Suelo	Raíz	
1	24	19	43
2	18	10	28
Total	42	29	71

De acuerdo a la tabla 1, se puede analizar que la obtención de un mayor número de aislamientos de hongos del suelo en comparación con las raíces puede atribuirse a varias razones: los tejidos internos de las raíces no ofrecen tantos nichos ecológicos y recursos disponibles como el suelo, ya que la rizosfera es un ambiente particularmente rico en microorganismos debido a la influencia directa de las raíces de las plantas en la liberación de nutrientes y compuestos orgánicos que favorecen su crecimiento (Osorio, 2009). Por otro lado, el espacio dentro de las raíces es limitado, lo que puede dar lugar a una competencia intensa entre los microorganismos por los recursos limitados, así mismo, existen microorganismos que viven en simbiosis con las plantas, conocidos como endófitos, a menudo han evolucionado para establecer relaciones mutuamente beneficiosas con sus hospedadores. Estos endófitos pueden ser más abundantes en el interior de las raíces, pero su número puede seguir siendo menor en comparación con la diversa comunidad microbiana del suelo (Lisseth et al., 2013). Otra razón atribuida a encontrar más aislados en la Finca 1 que en la Finca 2, son las prácticas de manejo del suelo, como la

aplicación de fertilizantes y pesticidas, pueden introducir cambios sustanciales en la dinámica de estos microorganismos (Descalzo Garrido, 2022) .

### 3.1.2 Descripción macroscópica y microscópica de hongos purificados

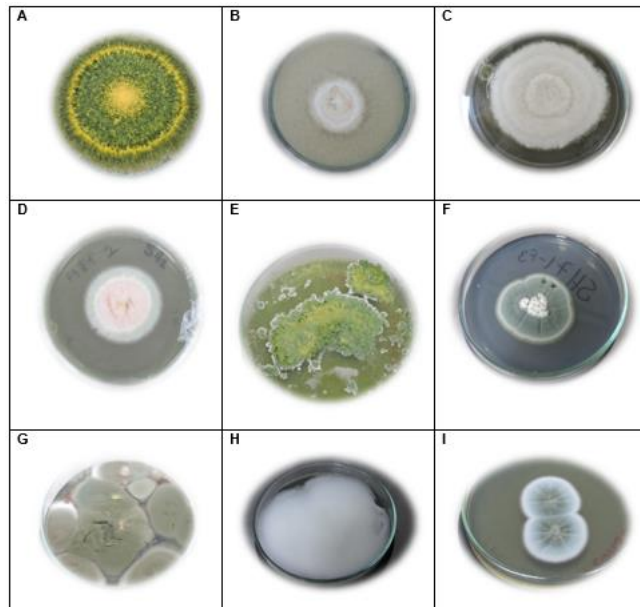
#### 3.1.2.1 Descripción macroscópica

En el Anexo 1, se encuentran los resultados de las características macroscópicas de los hongos aislados, se consideraron tres aspectos principales: color, topografía y textura.

Durante esta fase se pudo observar una gran variedad de colores, donde la predominancia fue de blanco y verde, mientras que los de menor frecuencia correspondieron a café y amarillo (Figura 1).

Figura 1. Coloración observada en los aislados cultivados en YGC (6 días a 28°C)

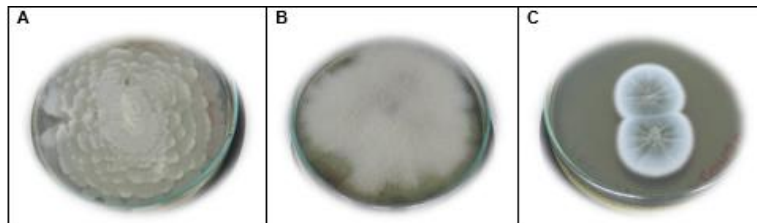
**A.** verde con pigmentos amarillos, **B.** blanco opaco, **C.** blanco con pigmentos rosáceos, **D.** rosado claro, **E.** verde claro y verde oscuro



En cuanto a topografía, de los 42 aislados recolectados a partir de muestras de suelo se identificaron 3 tipos principales: topografía plana el 65,21%, seguida por umbonada con un 28,26%, y finalmente rugosa con solo un 6,52%. En cambio, los hongos aislados de la raíz mostraron dos tipos de topografía: plana representando el 80,55% y umbonada el 19,44% (Figura 2).

Figura 2. Topografía de los aislados cultivados en YGC (6 días a 28 °C).

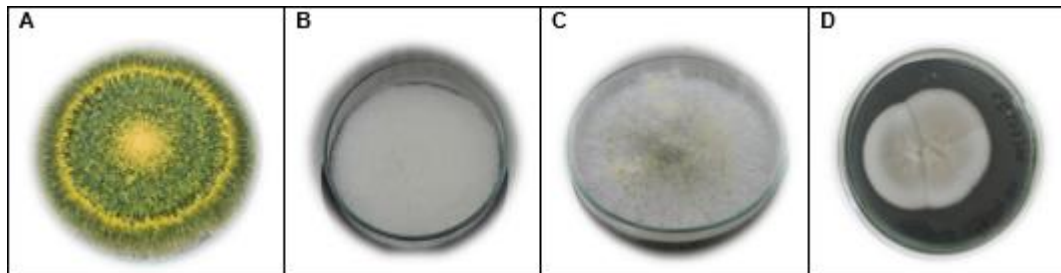
A. Plana, B. Algodonosa y C. Umbonada.



Las texturas de los aislados se dividieron en 4 categorías: polvorienta, algodonosa, granular y aterciopelada. Al analizar los aislados del suelo, se observó que las texturas polvorienta y algodonosa representaron cada una el 32,60%, aterciopelada con 26,08%, y granular con 8,69%. En contraste, los aislados de raíces presentaron: algodonosa con un 50%, granular el 22,22%, polvorienta el 19,44% y aterciopelada el 8,33% (Figura 3)

Figura 3. Textura de los aislados cultivados en YGC (6 días a 28 °C).

A. Polvorienta, B. Algodonosa, C Granular y D. Aterciopelada.



La identificación macroscópica desempeña un papel fundamental, ya que proporciona una comprensión visual detallada que abarca características más precisas en cuanto a color, textura y topografía permitiendo una identificación más precisa. En el caso de hongos biocontroladores como *Trichoderma spp.*, Zin & Badaluddin, (2020) reportan que observaron un micelio blanco, con un aspecto algodonoso. Con el paso del tiempo, este micelio experimenta un desarrollo de esporulación de tonalidad verde, presentando una textura aterciopelada. Esto coincide con las características reportadas para los aislados SH4, RH26 y RH35 obtenidos en este estudio. Mientras que, Henao-Henao et al.,(2018), afirma que *Fusarium spp.* tiene una apariencia algodonosa y de color blanquecino y rosado, en los primeros días de crecimiento características que concuerdan con lo encontrado para los aislado SH3 y SH26. Además, (Andrade Hoyos et al., 2019) afirma que algunos géneros de *Fusarium spp.* pueden tener una coloración levemente púrpura, en el centro del mismo. Esto coincide con lo reportado en este estudio para el aislado SH33.

### 3.1.2.2 Identificación microscópica.

De acuerdo a las características microscópicas los 71 aislados encontrados, se clasificaron en 9 géneros distintos, entre los cuales están hongos fitopatógenos de los géneros: *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Mucor spp.*, *Alternaria spp.*, *Pythium spp.*, *Rhizopus spp.*, *Rhizoctonia spp.* y *Fusarium spp.* De igual manera, se aislaron hongos con potencial antagonico de los géneros *Trichoderma spp.* y *Metarhizium spp.* (Tabla 2).

Tabla 2. Número de aislados por género en suelo y raíz.

Género	Suelo	Raíz	Total
<i>Aspergillus spp.</i>	7	1	8
<i>Penicillium spp.</i>	9	1	10
<i>Mucor spp.</i>	5	9	14
<i>Pythium spp.</i>	3	3	6
<i>Rhizopus spp.</i>	2	2	4
<i>Rhizoctonia spp.</i>	3	0	3
<i>Fusarium spp.</i>	3	0	3
<i>Trichoderma spp.</i>	4	8	12
<i>Metarhizium spp.</i>	5	6	11
Total	42	29	71

La tabla 2 revela una marcada predominancia de patógenos en comparación con los posibles agentes biocontroladores. Inicialmente, la predominancia podría atribuirse al hecho de que los patógenos fueron detectados en las plantas de fresa enfermas, lo que naturalmente resultó en una mayor proporción. No obstante, los géneros que predominaron en este estudio fueron *Mucor spp.*, *Aspergillus spp.* y *Penicillium spp.* los cuales se clasifican como hongos saprofitos por lo que pueden permanecer en el suelo, en comparación con las otras especies de hongos que sólo se desarrollan en ciertas épocas, principalmente cuando el suelo presenta humedad. Además, autores como Yinmei Liu et al., (2022) identificaron en muestras de suelo a *Alternaria spp.* y *Mucor spp.* y en raíces *Rhizoctonia spp.* Mientras que Morales et al., (2020), identifico dos hongos asociados a la raíz *Rhizoctonia sp.* y *Fusarium spp.*

A continuación, se proporciona una descripción de las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos en el cultivo de fresa, junto con su caracterización macroscópica y microscópica correspondiente.



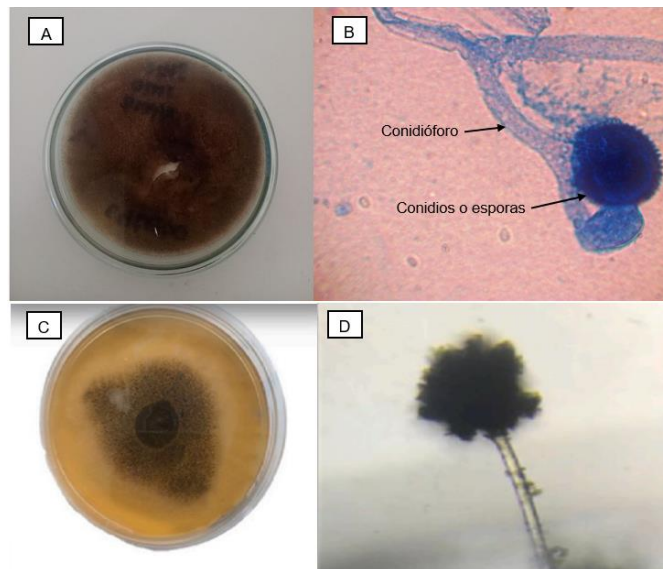
### *Aspergillus spp.*

De acuerdo a la tabla 2, se encontraron 8 cepas de este género. A nivel macroscópico se observaron dos tipos de texturas: granular y aterciopelada con topografía plana, umbonada y rugosa. Los colores que se encontraron fueron bordes blancos, cafés y azules con centro gris, blanco o café. En el análisis microscópico, se lograron ver conidióforos no ramificados y lisos y sobre ellos se encontraron esporas o conidios, esta descripción coincide con lo identificado por Shalaby et al., (2023), de acuerdo a la Figura 4.

Según lo reportado por Cano M.A, (2013), este patógeno es frecuente en la etapa poscosecha y son responsables de causar la enfermedad conocida como podredumbre negra en el fruto de fresa. Ciertas especies dentro de este género tienen la capacidad de generar micotoxinas, tales como la aflatoxina, la ocratoxina y la patulina, estas sustancias pueden representar un riesgo para la salud si se consumen frutos contaminados.

Figura 4. Identificación macroscópica y microscópica de *Aspergillus spp.*

- A.** Colonia en medio YGC (6 días) observada en este estudio; **B** Conidióforo con esporas 100X observado en este estudio; **C y D:** Morfología macroscópica y microscópica (Shalaby et al., (2023)).



### *Penicillium spp.*

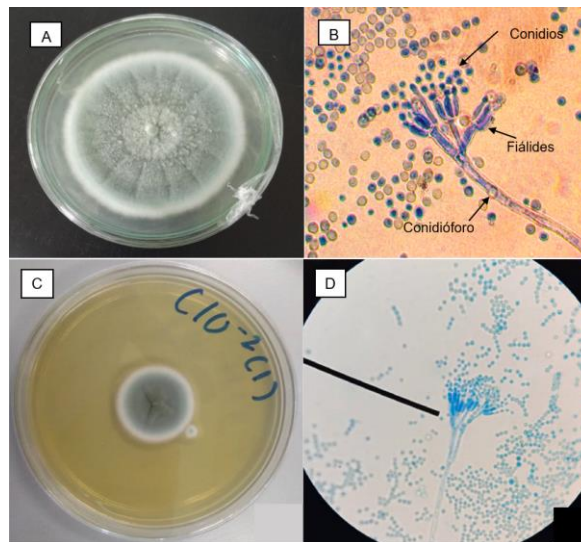
Según lo indicado en la Tabla 2, se identificaron un total de 10 cepas pertenecientes a este género. En la identificación macroscópica, se describió la textura de estas colonias como granular y algodonosa, con una topografía que varió entre plana, umbonada y rugosa. Este género se distinguió por la diversidad de colores, que iban desde tonalidades azules con destellos verdes

hasta tonos grises. En el análisis microscópico, se pudo observar la presencia de conidios con una estructura ramificada, destacando la identificación de ramas y conidiósporas con características particulares, similares a las observadas en estudios previos, como el realizado por Arias Cifuentes & Piñeros Espinosa, (2008) (Figura 5).

De acuerdo con Hernandez Medina, (2016), este hongo provoca la aparición de condiciones de podredumbre y debilitamiento de las plantas y es común encontrar su presencia durante la fase de poscosecha.

Figura 5. Identificación macroscópica y microscópica de *Penicillium spp.*

- A.** Colonia madura en medio YGC (6 días) observada en este estudio; **B.** Conidióforo, conidios y fiálides 100X observadas en este estudio; **C y D:** Morfología macroscópica y microscópica (Zakariya et al., 2022).



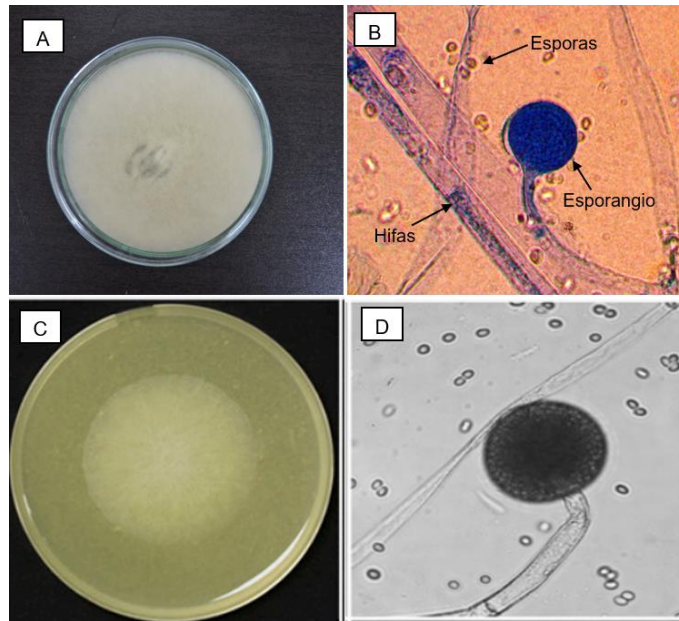
### *Mucor spp.*

Conforme a la tabla 2, se encontraron 14 cepas de este género. A nivel macroscópico las colonias comenzaron con un color blanco, pero con el tiempo cambiaron a tonos marrones. Las texturas fueron algodonosas con topografía plana. En la morfología microscópica, se pudo observar esporangios con endosporas en su interior. Los esporangios tienen una forma esférica o redonda, y también se presentan hifas aseptadas y gruesas. Estas características concuerdan con Morin-Sardin et al., (2017) (Figura 6).

Basado en Cruz-Lachica et al., (2017), las especies de este género de manera general, son saprófitos y pueden descomponer materia orgánica muerta. Otros autores como, Guédez Clemencia et al., (2009), reportan que *Mucor spp.* se caracteriza por ocasionar la enfermedad de podredumbre negra durante la cosecha o almacenamiento de las fresas.

Figura 6. Identificación macroscópica y microscópica *Mucor spp.*

- A.** Colonia en medio YGC (6 días), observada en este estudio; **B** Esporangios con endosporas. Microscópicamente 100X observadas en este estudio. **C y D:** Morfología macroscópica y microscópica (Saito et al., 2016)



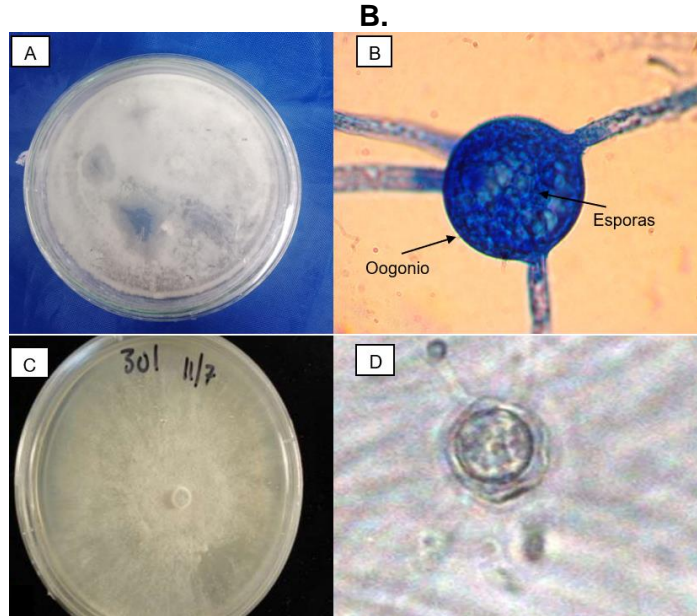
### *Pythium spp.*

Conforme a la tabla 2, se encontraron 6 cepas de este género. En la identificación macroscópica se observó el aspecto algodonoso y topografía plana, las colonias presentaron color blanco. Mientras que en la morfología microscópica se observó oogonio con esporas, aspectos descritos coinciden por lo reportado por Zitnick-Anderson, (2013) (Figura 7).

Cano M.A, (2013), reporta que este género ocasiona la podredumbre negra en la etapa poscosecha en el cultivo de fresa, lo que puede resultar en la pérdida de calidad y deterioro de las frutas. Así mismo, Zitnick-Anderson, (2013), afirma que especies de este género pueden encontrarse en el suelo infectando principalmente las raíces de las plantas.

Figura 7. Identificación macroscópica y microscópica *Pythium spp.*

- A.** Colonia en medio YGC (6 días), observada en este estudio; **B** Oogonio con esporas. Microscópicamente 100X observadas en este estudio. **C y D:** Morfología macroscópica y microscópica (Zitnick-Anderson, 2013).



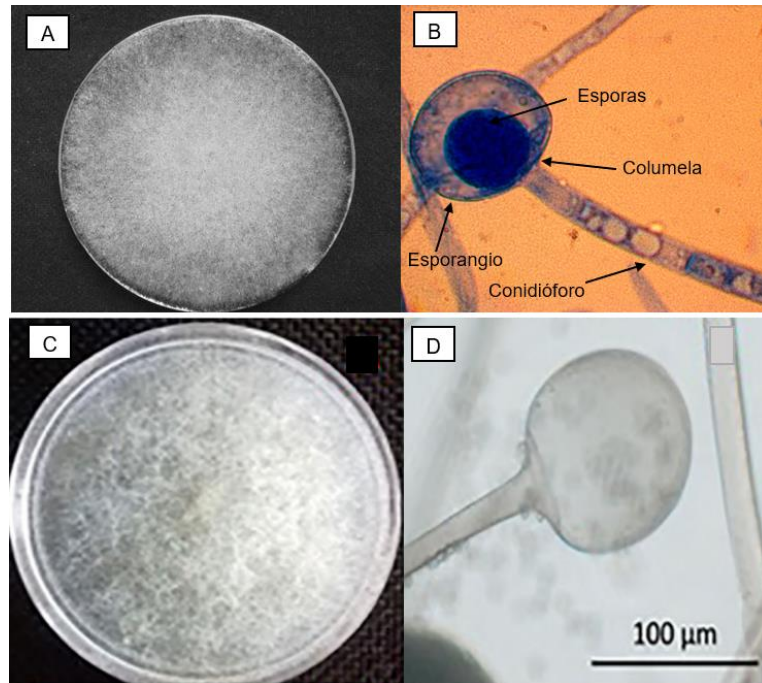
### *Rhizopus spp.*

Tal como se muestra en la tabla 2, se encontraron 2 cepas de este género. Se observó macroscópicamente una textura algodonosa con topografía plana, inicialmente, la colonia creció de color blanco después se tornó de un color gris oscuro o marrón. A nivel microscópico, se observó esporangióforos, columelas y esporangios con esporangiosporas, toda la descripción coincide con lo investigado por (Cruz-Lachica et al., 2017) (Figura 8).

De acuerdo con Gerardo Velázquez-Del Valle et al., (2007), este hongo es responsable de la pudrición blanda que afecta la superficie de las fresas, caracterizada por la presencia de un micelio algodonoso visible en la fruta. Además, *Rhizopus spp.* es considerado un hongo saprófito, ya que se encarga de descomponer la materia orgánica.

Figura 8. Identificación macroscópica y microscópica *Rhizopus spp.*

- A.** Colonia en medio YGC (6 días), observada en este estudio; **B** Esporangio con esporangiosporas, columela y conidióforo 100X observados en este estudio.; **C y D:** Morfología macroscópica y microscópica (Cruz-Lachica et al., 2017).



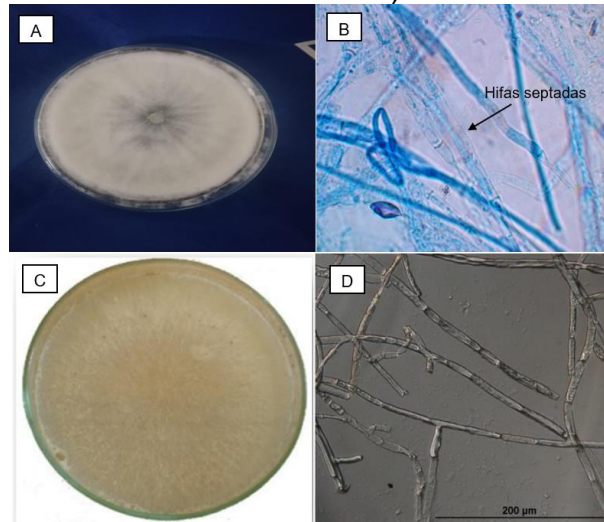
*Rhizoctonia spp.*

De acuerdo a la tabla 2, se encontraron 3 cepas de este género. Se identificó macroscópicamente un color inicial blanco, luego se presentó una tonalidad crema amarillenta y textura algodonosa con topografía plana. Mientras que, a nivel microscópico se caracterizó por tener hifas septadas que pueden ser hialinas, estos aspectos coinciden con lo reportado por (L. A. Morales Mora et al., (2020) (Figura 9).

De acuerdo a la literatura reportada, este hongo produce síntomas de marchitez y pudrición de raíz en el cultivo de fresa (L. A. Morales Mora et al., 2020). Los síntomas en la planta se manifiestan a través de un notable decaimiento y deshidratación en el follaje (Arias Tauta & Jerez Ramirez, 2008).

Figura 9. Identificación macroscópica y microscópica *Rhizoctonia spp.*

- A.** Colonia madura en medio YGC (6 días), observada en este estudio; **B.** Hifas septadas microscópicamente 100X observadas en este estudio; **C y D:** Morfología macroscópica y microscópica (Arias Tauta & Jerez Ramirez, 2008)



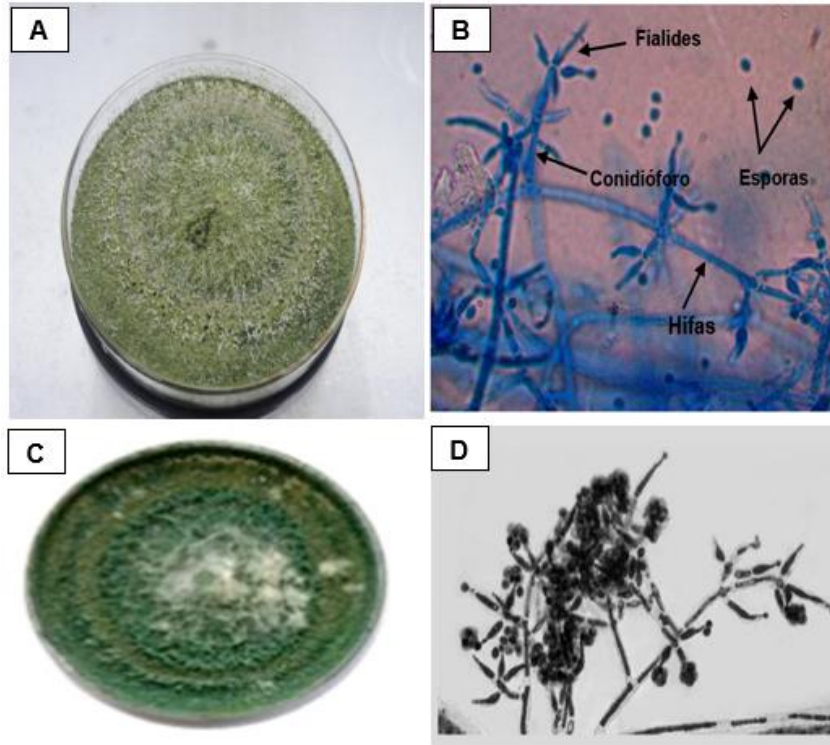
Finalmente, se describe macroscópicamente y microscópicamente hongos con posible potencial biocontrolador.

#### *Trichoderma spp.*

Se identificaron 12 cepas del género *Trichoderma spp.* (Tabla 2). A nivel morfológico este género presentó colonias radiales de textura algodonosa, cubiertas por un micelio inicialmente blanco, pero con el paso de los días se torna totalmente verde. En cuanto a la identificación microscópica, se identificaron hifas ramificadas, con conidióforos ramificados de los cuales se desprenden fiálides en verticilos cruzados que produjeron conidios ovoides, además de la presencia de clamidosporas características (Figura 10), los resultados concuerdan con lo expuesto por Zin & Badaluddin, (2020).

Figura 10. Identificación macroscópica y microscópica *Trichoderma spp.*

**A.** Colonia madura en medio YGC (6 días) observada en este estudio, **B.** Conidióforos con ramificaciones microscópicamente 100X observados en este estudio. **C y D.** Morfología macroscópica y microscópica (Zin & Badaluddin, 2020)

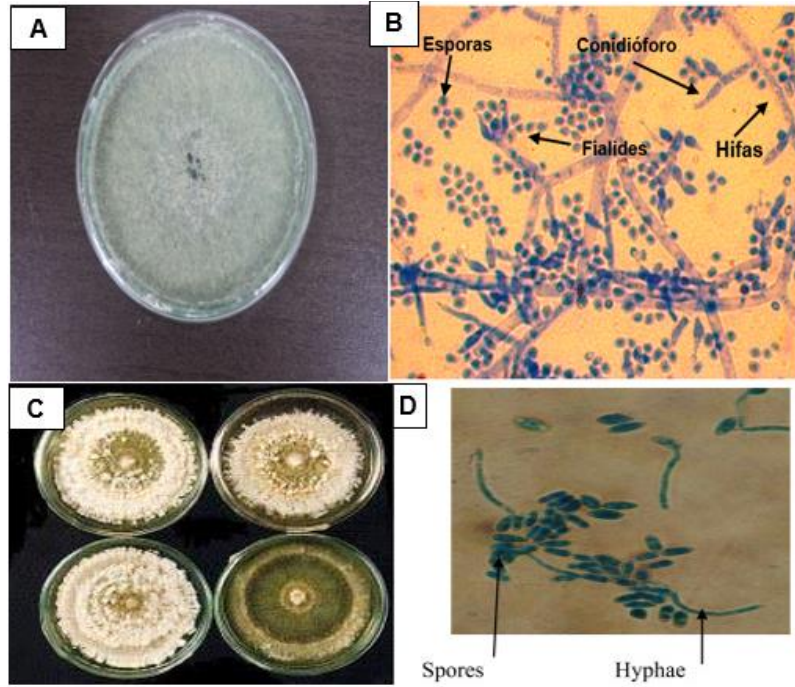


### *Metarhizium spp.*

Se encontraron 11 cepas del género *Metarhizium spp.* (Tabla 2). Las colonias presentaron una apariencia radial de borde definido y aspecto polvoriento. Inicialmente, el micelio es de color verde intenso. Sin embargo, con el paso de los días se tornó verde oscuro. Bajo el microscopio, se observaron conidióforos ramificados e irregulares, que se extienden desde las hifas del micelio. Las fiálides se mostraron gruesas en sus extremos y los conidios, por su parte, se presentaron en forma cilíndrica y dispuestos en cadenas a lo largo de los conidióforos (Figura 11). Características similares se encuentran en lo reportado por (Gebremariam et al., 2021). Además, afirman que pese a que *Metarhizium spp.* sea considerado como un hongo entomopatógeno tiene la habilidad de competir por espacio y nutrientes contra algunos hongos patógenos.

Figura 11. Identificación macroscópica y microscópica *Metarhizium spp.*

**A.** Colonia madura en medio YGC (6 días) observada en este estudio, **B.** Conidióforos con ramificaciones microscópicamente 100X observados en este estudio. **C y D.** Morfología macroscópica y microscópica (Gebremariam et al., 2021)



En total se identificaron 9 géneros, de los cuales siete se clasificaron como patógenos y dos como posibles antagonistas, lo cual es similar a lo encontrado en diferentes estudios sobre hongos del cultivo de fresa reportados por, (Morales Mora et al., 2020), (Cano M.A, 2013), (Pérez-Rodríguez et al., 2019) y (Pastrana León, 2014).





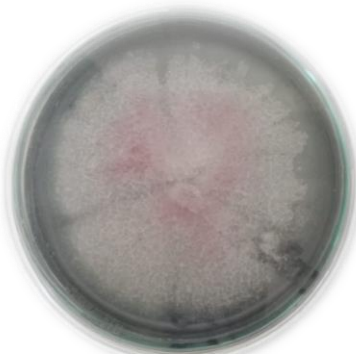
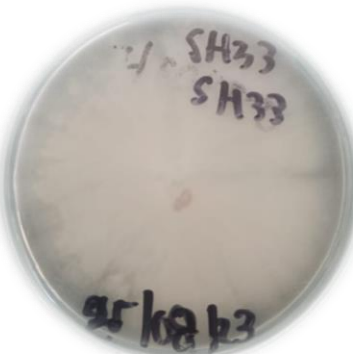
Las muestras de suelo presentaron una mayor diversidad de géneros en comparación con las muestras de raíces. Sin embargo, de manera general existió una marcada predominancia de *Penicillium spp.*, *Mucor spp.*, *Trichoderma spp.* y *Metarhizium spp.* en comparación con los otros géneros (Tabla 2).

### 3.1.3 Identificación de *Fusarium spp.*

De los aislamientos realizados se obtuvieron tres cepas con características morfológicas y microscópicas similares a las del género *Fusarium spp.*, las cuales fueron denominadas como SH3, SH26 y SH33 (Tabla 3).



Tabla 3. Características macroscópicas de las colonias de aislados de *Fusarium spp.*

Aislado	Imagen De La Colonia Vista Superior	Imagen De La Colonia Vista Inferior	Descripción
SH3			Color superior blanco. Color inferior blanco con destellos naranja. Topografía umbonada. Textura algodonosa.
SH26			Color inferior y superior blanco. Topografía umbonada. Textura algodonosa.
SH33			Color superior blanco con destellos morados, e inferior blanco con pigmentos rosados. Topografía umbonada. Textura aterciopelada.

En la observación microscópica, se identificaron fiálides cortas, macroconidias en forma de medialuna y septadas. Las microconidias observadas mostraban una morfología ovalada, también se lograron visualizar clamidosporas (Figura 12,13 y 14); esta descripción coincide con lo reportado por Hafizi et al., (2013), quienes encontraron características similares tales como, macroconidias, clamidosporas y monofiálides en *F. oxysporum* y *F. solani*.

Figura 12. Microscopia de *Fusarium spp.* SH3.

- A.** Macroconidias (100X) observadas en este estudio. **B.** Macroconidias (100X) (Kikot Gabriel, 2012). **C.** Clamidosporas de *Fusarium spp.* SH3 (100X), observadas en este estudio. **D.** Clamidosporas de *Fusarium oxysporum* (100X) (Rentería-Martínez et al., 2018).

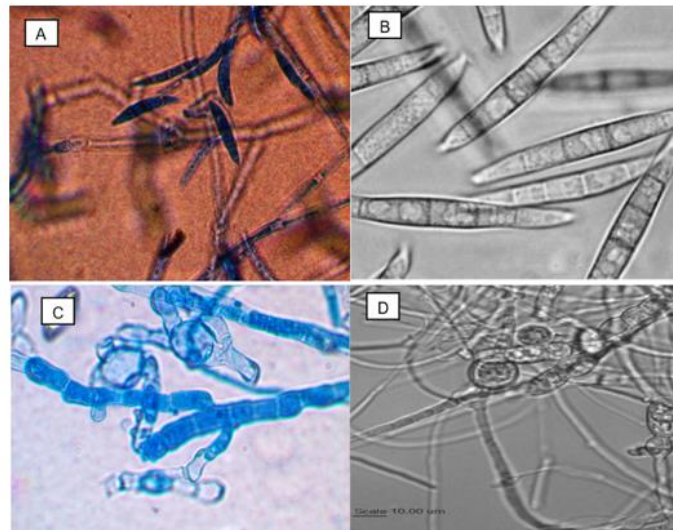


Figura 13. Microscopia de *Fusarium spp.* SH26.

- A.** Clamidosporas de *Fusarium spp.* SH26 (40X), observadas en este estudio, **B.** Clamidosporas de *Fusarium oxysporum* (40X) (Retana et al., 2017). **C.** Macroconidias y microconidias de *Fusarium spp.* SH26 (100X) observadas en este estudio. **D.** Macroconidias de *F. brachygibbosum* (100X); **E.** Microconidias de *F. brachygibbosum* (100X) (Rentería-Martínez et al., 2018).

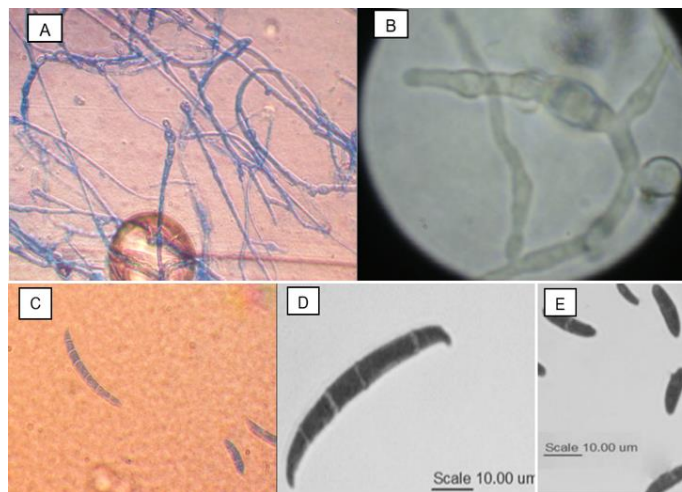
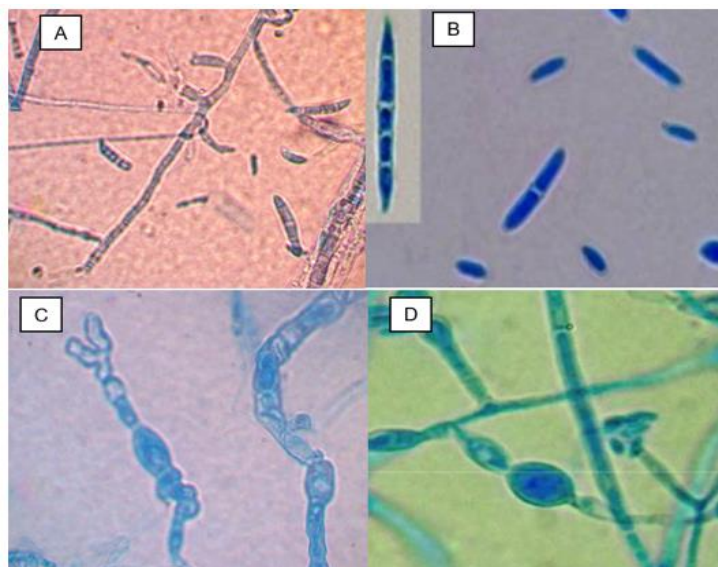


Figura 14. Microscopia de *Fusarium spp.* SH33.

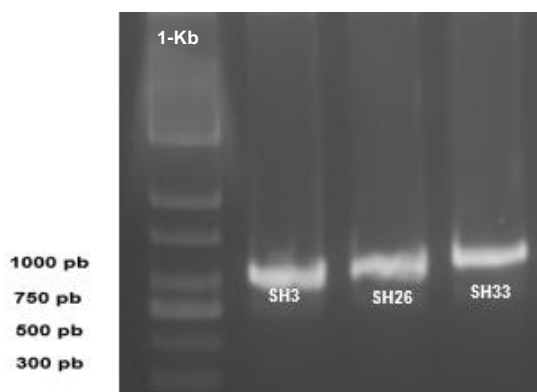
- A.** Macroconidias y microconidias de *Fusarium spp.* SH33 (100X), observadas en este estudio; **B.** Macroconidias y microconidias de *Fusarium oxysporum* (100X) (Márquez-Fernández et al., (2020)). **C.** Clamidosporas y fiálides de *Fusarium spp.* SH33 (100X), observadas en este estudio. **D.** Clamidosporas y fiálides de *Fusarium oxysporum* (100X) (Márquez-Fernández et al., 2020).



### 3.1.3.1 Identificación molecular de *Fusarium spp.*

En la Figura 15 se muestran los productos de PCR obtenidos a partir del ADN genómico de los aislamientos de *Fusarium spp.* (SH3, SH26, y SH33), los cuales presentaron pesos cercanos a 750 pares de bases (pb).

Figura 15. Productos de PCR obtenidos del ADN genómico de los aislamientos de *Fusarium spp.*



De acuerdo a las secuencias depositadas en la base de datos NCBI, se identificaron molecularmente tres especies las cuales corresponden a: *F. incarnatum*, *F. equiseti* y *F. Oxysporum* (Tabla 4).

Tabla 4. Identificación molecular de muestras de *Fusarium spp.*

Código de muestra	Especie identificada	Porcentaje de similitud (%)
SH3	<i>F. Incarnatum</i>	99,24
SH26	<i>F. equiseti</i>	99,82
SH33	<i>F. Oxysporum</i>	96,52

Según los informes de Pérez-Ortega et al., (2023), *Fusarium oxysporum* es la especie más común (60%) en afectar el cultivo de fresa, manifestándose en etapas tempranas. Aunque *F. oxysporum* es predominante, también se han registrado casos de *F. incarnatum* y *F. equiseti* afectando este cultivo. (Hernandez Carlos Alberto, 2016) Estos últimos suelen ser aislados con mayor frecuencia a partir de hojas, frutos y tallos que de las raíces; sin embargo, los tres tienen la capacidad de existir como saprófitos y de degradar la lignina y los complejos de carbohidratos asociados con restos orgánicos del suelo (Andrade Hoyos et al., 2019). Además de compartir la misma sintomatología al invadir los tejidos epidermales de la raíz y extenderse a los haces vasculares lo que resulta en la producción de micelio y esporas en los vasos, provocando el taponamiento de estos, lo que a su vez conduce a la marchitez degradativa de la planta.

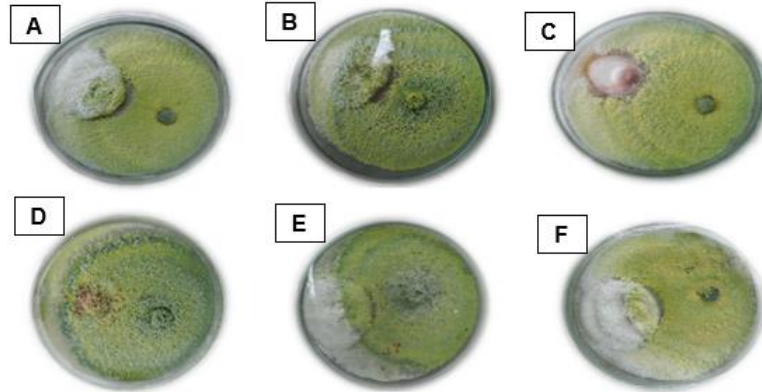
### 3.2 DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTAGÓNICO DE HONGOS OBTENIDOS DE SUELO Y RAÍZ DE CULTIVO DE FRESA SOBRE EL PATÓGENO *Fusarium Spp*

#### 3.2.1 Antagonismo dual

De acuerdo a los aislamientos obtenidos, se identificaron 23 cepas (11 de *Metarhizium* y 12 de *Trichoderma*) como posibles antagonistas. En la Figura 17 se muestra el comportamiento de algunos antagonismos donde se aprecia una disminución significativa en el crecimiento micelial de *F. incarnatum* SH3, *F. equiseti* SH26 y *F. oxysporum* SH33 lo que indica una alta competencia de las cepas de *Trichoderma spp.* y *Metarhizium spp.*

Figura 16. Antagonismo dual de cepas de *Metarhizium spp.* y *Trichoderma spp.* contra *Fusarium spp.*

- A.** *Metarhizium*.SH7 vs *F. Incarnatum* SH3, **B.** *Trichoderma* SH4 vs *F. Oxysporum* SH33 y **C.** *Metarhizium* RH17 vs *F. equiseti* SH26, **D.** *Trichoderma* SH4 vs *F. Oxysporum* SH33, **E.** *Metarhizium* SH10 vs **F.** *Incarnatum* SH3 y *Trichoderma* RH3 vs *F. equiseti* SH26



El análisis de varianza para el PICR de los antagonistas evaluados contra *F. incarnatum* SH3 reportó que existen diferencias estadísticas significativas entre tratamientos con un  $p < 0,05$ . Mediante la prueba de Tukey se observó la formación de 14 grupos donde el aislado *Trichoderma* SH4 tuvo el mayor impacto en el crecimiento, alcanzando una inhibición del 79,30% seguida de *Trichoderma* RH21 que logró una inhibición del 76,23%. En tanto que, RH14 presentó los valores más bajos, con una inhibición del 32,93% (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis ANOVA, porcentaje inhibición *F. incarnatum* SH3

Hongo	% Inhibición
Metarhizium RH14	32,9±3,5 <sup>A</sup>
Metarhizium SH35	40,7±3,4 <sup>AB</sup>
Metarhizium SH7	45,7±0,0 <sup>BC</sup>
Metarhizium SH17	47,8±5,2 <sup>BC</sup>
Metarhizium RH15	48,8±1,7 <sup>CD</sup>
Trichoderma RH35	49,4±1,7 <sup>CD</sup>
Metarhizium SH12	50,4±2,6 <sup>CDE</sup>
Metarhizium SH10	53,0±0,0 <sup>CDE</sup>
Trichoderma RH37	56,4±1,7 <sup>DEF</sup>
Metarhizium RH12	57,6±3,5 <sup>EF</sup>
Trichoderma SH46	61,6±3,5 <sup>FG</sup>
Trichoderma RH26	66,2±2,0 <sup>GH</sup>
Trichoderma SH18	67,1±5,5 <sup>GH</sup>
Trichoderma SH14	68,0±3,1 <sup>GH</sup>
Trichoderma RH8	68,0±1,4 <sup>GHI</sup>
Metarhizium RH11	69,9±0,0 <sup>HI</sup>
Metarhizium RH17	70,0±1,8 <sup>HI</sup>
Trichoderma RH20	70,8±1,5 <sup>HI</sup>
Metarhizium RH1	71,7±1,5 <sup>HIJ</sup>
Trichoderma RH3	72,6±0,0 <sup>HIJ</sup>
Trichoderma RH16	72,6±0,0 <sup>HIJ</sup>
Trichoderma RH21	76,2±1,6 <sup>IJ</sup>
Trichoderma SH4	79,3±1,6 <sup>J</sup>

Por otra parte, el análisis de varianza para el PICR de los antagonistas evaluados contra *F. equiseti* SH26 reportó que existen diferencias estadísticas significativas entre tratamientos con un  $p < 0,05$ . El análisis de Tukey permitió la formación de 14 grupos donde se destaca Trichoderma RH35 con el 77,03% de inhibición, seguido de Trichoderma SH4 con 74,4%. Mientras que, Metarhizium SH35 generó un porcentaje de inhibición de 15,27% siendo el más bajo para el patógeno en mención (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis ANOVA, porcentaje inhibición *F. equiseti* SH26

Hongo	% Inhibición
Metarhizium SH35	15,2±1,6 <sup>A</sup>
Metarhizium RH14	44,4±0,0 <sup>B</sup>
Trichoderma RH3	47,4±4,6 <sup>BC</sup>
Trichoderma RH26	55,5±2,7 <sup>CD</sup>
Metarhizium RH11	60,6±3,0 <sup>DE</sup>
Metarhizium SH7	60,8±1,7 <sup>DE</sup>
Trichoderma RH37	61,1±2,8 <sup>DEF</sup>
Trichoderma RH16	61,6±3,4 <sup>DEFG</sup>
Metarhizium RH12	62,5±1,4 <sup>DEFG</sup>
Trichoderma SH46	65,2±4,1 <sup>EFGH</sup>
Metarhizium SH17	67,0±1,9 <sup>EFGHI</sup>
Trichoderma SH14	67,4±2,2 <sup>EFGHI</sup>
Trichoderma RH1	67,7±1,7 <sup>EFGHI</sup>
Trichoderma SH18	68,7±1,7 <sup>EFGHIJ</sup>
Trichoderma RH8	68,7±1,7 <sup>EFGHIJ</sup>
Metarhizium RH17	68,6±2,2 <sup>EFGHIJ</sup>
Trichoderma RH21	69,7±0,0 <sup>FGHIJ</sup>
Trichoderma RH20	69,7±3,0 <sup>FGHIJ</sup>
Metarhizium RH15	70,0±1,1 <sup>GHIJ</sup>
Metarhizium SH12	71,5±1,9 <sup>GHIJ</sup>
Metarhizium SH10	72,7±3,4 <sup>GHIJ</sup>
Trichoderma SH4	74,4±5,1 <sup>IJ</sup>
Trichoderma RH35	77,0±3,4 <sup>J</sup>

Finalmente, el análisis de varianza para el PICR de los antagonistas evaluados contra *F. oxysporum* SH33 reportó que existen diferencias estadísticas significativas entre tratamientos con un  $p < 0,05$ . Mediante la prueba de Tukey se logró la formación de 13 grupos, Trichoderma SH4 demuestra el mayor porcentaje de inhibición (90,32%). Asimismo, Trichoderma RH26 logra el segundo mayor índice de inhibición (85,48%). En contraste, RH14 presenta el menor porcentaje de inhibición (21,07%) (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis ANOVA, porcentaje inhibición *F. oxysporum* SH33

Hongo	% Inhibición
Metarhizium RH14	21,0±7,1 <sup>A</sup>
Metarhizium SH7	40,9±3,3 <sup>B</sup>
Metarhizium SH35	43,0±1,8 <sup>BC</sup>
Trichoderma RH21	44,0±1,8 <sup>BC</sup>
Trichoderma RH3	45,3±2,9 <sup>BC</sup>
Metarhizium RH17	51,6±0,0 <sup>CD</sup>
Metarhizium SH17	53,2±1,6 <sup>CDE</sup>
Trichoderma RH16	59,8±2,8 <sup>DEF</sup>
Trichoderma SH46	62,9±1,6 <sup>EFG</sup>
Metarhizium RH1	63,6±1,6 <sup>FG</sup>
Metarhizium RH11	64,1±1,4 <sup>FG</sup>
Trichoderma RH37	64,2±1,4 <sup>FG</sup>
Metarhizium RH15	66,5±3,9 <sup>FG</sup>
Metarhizium SH12	67,5 ±3,2 <sup>FG</sup>
Metarhizium SH10	68,4±0,0 <sup>FG</sup>
Metarhizium RH12	68,4±2,8 <sup>FG</sup>
Trichoderma SH18	69,3±4,8 <sup>FGH</sup>
Trichoderma SH14	70,0±1,4 <sup>GH</sup>
Trichoderma RH20	71,3±1,5 <sup>GH</sup>
Trichoderma RH8	72,9±1,2 <sup>GH</sup>
Trichoderma RH35	79,0±8,0 <sup>HI</sup>
Trichoderma RH26	85,4±4,8 <sup>J</sup>
Trichoderma SH4	90,3±0,0 <sup>J</sup>

La actividad antagonista encontrada en este trabajo exhibe una inhibición que oscila entre el 15,2% y 71,7% para el género *Metarhizium spp.* y desde el 29,20% hasta el 90,32% para *Trichoderma spp.* valores cercanos a lo reportado por Reyes et al. (2012) quien reporta porcentajes de inhibición de *Fusarium sp* entre un 20,0 y 87,0%. En particular se observó que en esta prueba el crecimiento micelial en la mayoría de cepas de *Trichoderma spp.* fue más rápida que la de *Fusarium spp.* y algunas cepas de *Metarhizium* pueden continuar creciendo sobre el micelio de *Fusarium spp.*

En general, las cepas que presentaron mayor inhibición sobre *F. incarnatum* SH3 fueron *Trichoderma* SH4 y RH21, para *F. equiseti* SH26 se encontró *Trichoderma* SH4 y RH35 y para *F. oxysporum* SH33 se destacó *Trichoderma* RH26 y SH4. Para las tres cepas de *Fusarium* encontradas en este estudio, SH4 se consideró como un potencial antagonista ya que mostró un rango de inhibición del 74% al 91%, logrando mayor eficiencia contra *F.oxysporum* SH33. Según Harman (2005) se necesita por lo menos un 60% de inhibición en pruebas de antagonismo *In vitro* para que un biocontrolador pueda considerarse como efectivo.



Por otra parte, las cepas SH4 y RH26 encontradas en este estudio alcanzan un máximo de inhibición de 90,32% y 85,48%, valores que son superiores a lo reportado por diferentes estudios como es el caso de Kang et al., (1996) quien determinó el efecto antagonico de *M. anisopliae* al inhibir la germinación conidial de *F. oxysporum* en un 53,0%. De la misma manera es superior a lo reportado por Picardal et al., (2019), quien evaluó la actividad antagonica de *T. viride* y *M. anisopliae* frente a *F. oxysporum* alcanzando inhibiciones de 72,37% y 31,27% respectivamente.

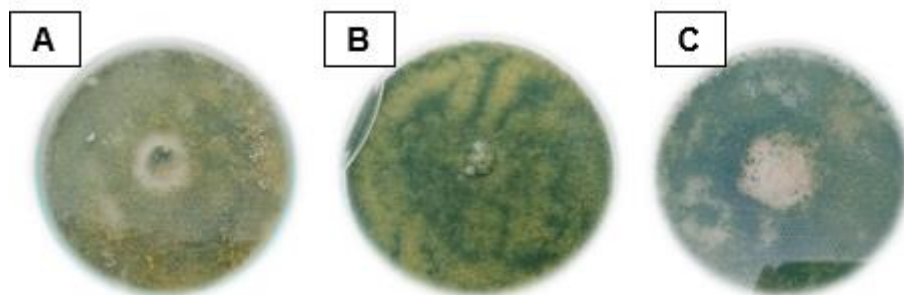
Según estos resultados, se eligieron dos antagonistas con la mayor capacidad de inhibición para cada patógeno, con el propósito de llevar a cabo las demás pruebas. En consecuencia, se establecieron las siguientes combinaciones: *Trichoderma* RH21 y SH4 contra *F. incarnatum* SH3, *Trichoderma* RH35 y SH4 frente a *F. equiseti* SH26 y, por último, *Trichoderma* RH26 y RH4. Contra *F. oxysporum* SH33.

### 3.2.2 Metabolitos volátiles (COVs)

En la evaluación de la actividad antagonica mediada por los COVs emitidos por las cepas de *Trichoderma spp.* frente a *F. incarnatum* SH3, *F. equiseti* SH26 y *F. oxysporum* SH33. se observó una reducción del diámetro micelial de los tres *Fusarium* en comparación con el control (Figura 17).

Figura 17. Actividad antagonica por compuestos orgánicos volátiles (COVs)

- A. *Trichoderma* SH4 vs *F. Incarnatum* SH3, B. *Trichoderma* RH35 vs *F. equiseti* SH26 y C. *Trichoderma* RH26 vs *F. Oxysporum* SH33



En las tablas 8,9 y 10 se presentan los resultados del porcentaje de inhibición del crecimiento radial para los patógenos, donde la prueba t de Student reveló que existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos RH21 y SH4 frente a *F. incarnatum* ( $p < 0,05$ ). Mientras que, para *F. equiseti* SH26 y *F. oxysporum* SH33 no se encontró alguna diferencia estadística significativas entre los tratamientos ( $p > 0,05$ ).

Tabla 8 . Porcentaje de inhibición producido por COV's de *Trichoderma* spp. contra *F. incarnatum* SH3.

Hongo	% Inhibición
Trichoderma RH21	56,2± 0,3
Trichoderma SH4	30,8± 0,1

Tabla 9. Porcentaje de inhibición producido por COV's de *Trichoderma* spp. contra *F. equiseti* SH26

Trichoderma RH35	33,1± 4,2
Trichoderma SH4	31,0± 4,0

Tabla 10. Porcentaje de inhibición producido por COV's de *Trichoderma* spp. contra *F. oxysporum* SH33

Trichoderma RH26	40,1± 1,8
Trichoderma SH4	35,2± 3,1

Los anteriores resultados demuestran una inhibición que osciló entre 30,8% y un 56,2%. Siendo los tratamientos RH21 y RH26 los que mostraron mayores porcentajes de inhibición frente a *F. incarnatum* SH3 y *F. oxysporum* SH33 respectivamente. Por otro lado, el tratamiento SH4 exhibió la menor capacidad inhibitoria en los tres *Fusarium*, siendo significativamente más bajo frente a *F. incarnatum* SH3.

La inhibición alcanzada en este trabajo por *Trichoderma* RH21 y RH26 es similar a lo reportado por Rajani et al., (2021), quienes encontraron un porcentaje de inhibición entre el 46,70% y el 53,96% para *F. oxysporum*. Por otro lado, Sánchez Leon & Bustos, (2019) reportó un valor del 56,0% sobre el patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en cultivos de tomate, resultado similar al obtenido en el presente estudio.

Aunque en este estudio no se determinó que tipo de compuestos volátiles generan la inhibición por parte de *Trichoderma* spp. es importante destacar que Sánchez Leon & Bustos, (2019) y Rajani et al., (2021) realizaron un análisis de perfil de compuestos volátiles de *Trichoderma* spp y encontraron alcohol isobutílico, alcohol isopentílico y el 3-metilbutanal. Es probable que uno o más de estos grupos de COV sean los responsables de causar la inhibición del crecimiento micelial de *F. incarnatum* SH3, *F. equiseti* SH26 y *F. oxysporum* SH33 en este estudio.

Teniendo en cuenta los resultados de la prueba de antagonismo dual, se pudo observar que hubo una disminución en la respuesta antagónica por metabolitos volátiles, especialmente en el caso de *Trichoderma* SH4 contra *F. incarnatum* SH3. Dicha disminución se puede atribuir a que los compuestos

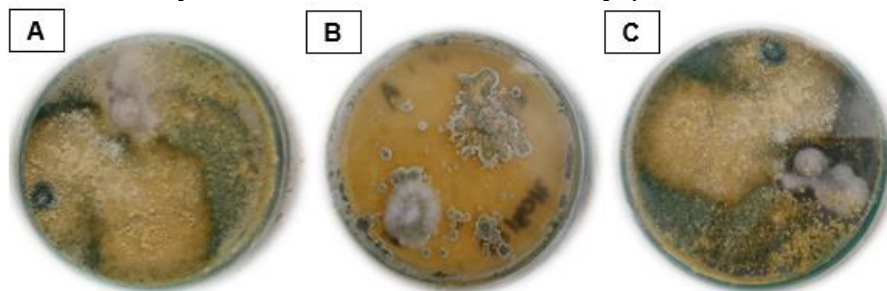
volátiles producidos por las cepas de *Trichoderma spp* no son suficientes para inhibir completamente el crecimiento de *F. equiseti*, *F. incarnatum* y *F. Oxysporum* ya que algunas especies de *Fusarium* pueden ser más resistentes a los compuestos volátiles que otras (Rajani et al., 2021). Ahora bien, es importante mencionar que, en los estudios por antagonismo dual, se ha demostrado que *Trichoderma* puede competir directamente con *Fusarium* por los nutrientes y espacio, lo que puede limitar el crecimiento y la propagación de *Fusarium spp*. Asimismo, *Trichoderma spp* puede producir enzimas y metabolitos antifúngicos que inhiben el crecimiento de *Fusarium* (Ronnie Gakegne & Martínez Coca, 2018). Sin embargo, en nuestro estudio se pudo observar que la inhibición por antagonismo dual fue un mecanismo de acción más efectivo que la prueba por COVs

### 3.2.3 Antagonismo a pH 4,0

En la figura 19 se muestran los resultados de las pruebas de antagonismo a pH 4,0, donde se aprecia que existió un efecto antagónico de las cepas de *Trichoderma spp*. sobre *F. incarnatum*, *F. equiseti* y *F. oxysporum*.

Figura 18. Actividad antagónica a pH de 4,0

A. *Trichoderma* SH4 vs *F. Incarnatum* SH3, B. *Trichoderma* RH35 vs *F. equiseti* SH26 y C. *Trichoderma* RH26 vs *F. Oxysporum* SH33



Según la prueba t student, reportó que existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos con un  $p < 0,05$ . Respecto a los resultados obtenidos, se observó que las cepas de *Trichoderma* RH35 y SH4 causaron la mayor inhibición de *F. equiseti* SH26. Mientras que *Trichoderma* SH4 demostró menor porcentaje de inhibición al competir contra *F. incarnatum* SH3 y *F. oxysporum* SH33 (Tabla 11, 12 y 13).

Tabla 11. Porcentaje de inhibición de *Trichoderma spp*. contra *Fusarium* SH3 a pH 4,0

Hongo	% Inhibición
<i>Trichoderma</i> RH21	59,0± 1,0
<i>Trichoderma</i> SH4	67,0± 1,0

Tabla 12. Porcentaje de inhibición de *Trichoderma spp.* contra *Fusarium* SH26 a pH 4,0

Trichoderma RH35	77,9± 0,7
Trichoderma SH4	74,1± 0,8

Tabla 13. Porcentaje de inhibición de *Trichoderma spp.* contra *Fusarium* SH33 a pH 4,0

Trichoderma RH26	61,9± 1,8
Trichoderma SH4	68,7± 0,3

Los rangos de inhibición de *Trichoderma spp.* oscilaron entre 59,0% y 77,9%, Estos valores superan los porcentajes reportados por Abeyratne & Deshappriya, (2018), en su investigación sobre el antagonismo *In vitro* de *Trichoderma sp.* frente a *Fusarium sp.*, donde obtuvo un porcentaje de inhibición del 34,0% bajo las mismas condiciones de pH.

De manera general, todas las cepas de *Trichoderma spp.*, presentaron actividad antagónica a pH de 4,0. El desarrollo de *Fusarium* no se vio afectado por el pH, ya que *Fusarium spp.*, tiene la capacidad de crecer a pH ácidos y alcalinos, según lo expuesto por Bohórquez Parra & Díaz Torres, (2010). Se observó que la inhibición a pH 4,0 fue menor en comparación con pH 6,6, evidenciándose un descenso cercano al 25% para los tratamientos de *Trichoderma* RH21, RH26 y SH4 (Tabla 11). En el caso de las cepas *Trichoderma* RH35 y SH4 frente a *F. equiseti* SH26, el porcentaje de inhibición se mantuvo estable; esto coincide con el estudio realizado por Abeyratne & Deshappriya, (2018), quienes reportaron una diferencia del 22,79% en el porcentaje de inhibición entre pH 6 y 4. De lo anterior, se observa que al bajar el pH se puede afectar el metabolismo y el crecimiento de los hongos, ya que el microorganismos puede entrar en un estrés metabólico y crea mecanismos de defensa y estructuras de resistencia, por ende la actividad antimicrobiana cambia (Pérez-Ortega et al., 2023). Además, autores como Marín et al., (2012) y Vásquez Cárdenas, (2010) mencionan que este antagonista puede desarrollarse en un rango de pH entre 2 y 9, pero su desarrollo óptimo ocurre entre 4 y 7, lo cual se concuerda con los valores de inhibición obtenidos en este estudio.

Tabla 14. Porcentaje de inhibición de *Trichoderma spp.* contra *Fusarium spp* a pH 6,6 y pH 4,0

Hongos	pH 6,6	pH 4,0
SH4 vs SH3	79,3%	67,0%
RH21 vs SH3	76,3%	59,0%
SH4 vs SH26	74,4%	74,1%
RH35 vs SH26	77,0%	77,9%
SH4 vs SH33	90,3%	68,7%
RH26 vs SH33	85,5%	61,9%

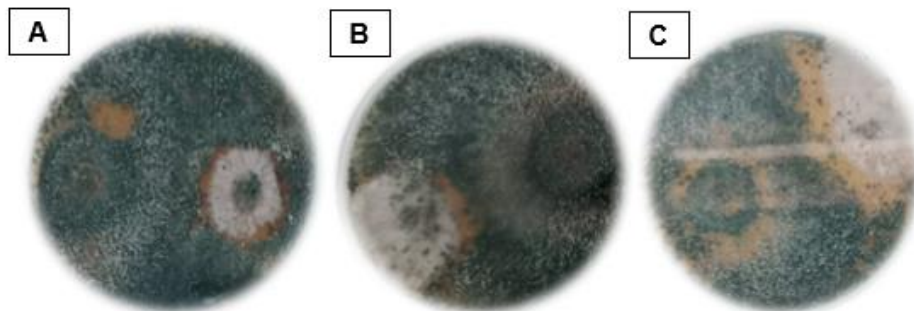
### 3.2.4 Antagonismo a temperatura de 20 °C y 10°C

Antagonismo a temperatura de 20 °C

Los resultados demuestran el efecto antagónico de las cepas de *Trichoderma spp.* sobre *F. incarnatum*, *F. equiseti* y *F. oxysporum* a una temperatura de 20 °C (Figura 20).

Figura 19. Actividad antagónica a temperatura de 20 °C

**A.** *Trichoderma* SH4 vs *F. Incarnatum* SH3, **B.** *Trichoderma* RH35 vs *F. equiseti* SH26 y **C.** *Trichoderma* RH26 vs *F. Oxysporum* SH33



De acuerdo a la prueba t student, se reportó que existe diferencias estadísticas significativas entre tratamientos con un  $p < 0,05$ , destacándose la cepa *Trichoderma* SH4 con porcentajes mayores para *F. incarnatum* SH3, *F. equiseti* SH26 y *F. oxysporum* SH33, por el contrario, la cepa *Trichoderma* RH21 fue la de menor inhibición para *F. incarnatum* SH3 (Tabla 15,16 y 17).

Tabla 15. Porcentaje de inhibición a temperatura 20 °C para SH3

Hongo	% Inhibición
Trichoderma RH21	69,4%± 2,7
Trichoderma SH4	85,6%± 0,0

Tabla 16. Porcentaje de inhibición a temperatura 20 °C para SH26

Trichoderma RH35	78,6%± 2,4
Trichoderma SH4	85,7%± 2,4

Tabla 17. Porcentaje de inhibición a temperatura 20 °C para SH33

Trichoderma RH26	76,0%± 0,0
Trichoderma SH4	82,0%± 1,2

El rango de inhibición de *Trichoderma spp.* sobre las tres cepas de *Fusarium* a 20 °C varió entre el 69,4% y el 85,7%, estos valores se encuentran en proximidad a lo reportado por Arbito MP (2017), quien registró porcentajes de inhibición del 48,81% al 69,16% de *Trichoderma spp.* frente a *Fusarium spp.*

La variabilidad en los resultados de inhibición podría atribuirse a la relación compleja entre la temperatura y el desarrollo de los hongos. Por ejemplo, B. Martínez et al., (2013) señalaron que la especie *T. harzianum* puede desarrollarse en un rango de temperatura entre 20 °C y 38 °C, mientras que *T. asperellum* puede crecer en un intervalo de 20 °C a 28 °C. Ciertos estudios han indicado que *Trichoderma spp.* alcanza su máxima competencia por espacio y nutrientes a una temperatura de 28 °C, como lo demuestran Martínez S.J et al. (2021), quienes llevaron a cabo una evaluación *In vitro* a esta temperatura para analizar la interacción con *F. incarnatum-equiseti*. En el estudio mencionado, se observó una inhibición del 76,24% por parte de *T. harzianum*. De manera similar, Martínez O.J et al. (2021) evaluaron a *T. asperellum* como antagonista frente a este fitopatógeno y descubrieron una capacidad de inhibición micelial de hasta el 84,5%. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en esta prueba, por lo cual la temperatura a 20 °C puede considerarse óptima para la inhibición de *Trichoderma spp.* frente a *F. incarnatum*, *F. equiseti* y *F. oxysporum*.

#### Antagonismo a temperatura de 10°C

En esta prueba, las cepas de *Trichoderma spp.* no exhibieron un crecimiento óptimo, lo que llevó a una falta de inhibición efectiva del patógeno (Figura 21). Mientras que las tres cepas de *Fusarium* crecieron por debajo de los 4 cm como se muestra en la tabla 18.

Figura 20. Actividad antagónica a temperatura de 10 °C.

**A.** *Trichoderma* SH4 vs *F. Incarnatum* SH3, **B.** *Trichoderma* RH35 vs *F. equiseti* SH26 y **C.** *Trichoderma* RH26 vs *F. Oxysporum* SH33

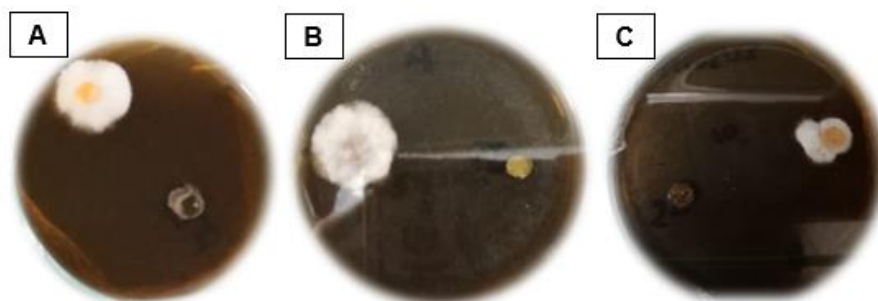


Tabla 18. Crecimiento micelial de cepas antagonistas y patógenos a temperatura 10 °C

Hongo	Crecimiento micelial		Hongo	Crecimiento micelial	
	6 días (cm)	12 días (cm)		6 días (cm)	12 días (cm)
SH4	0,8	0,9	<i>F. incarnatum</i> SH3	2,2	2,6
RH21	0,8	0,9			
SH4	0,8	0,9	<i>F. equiseti</i> SH26	2,8	3,2
RH35	0,8	0,9			
SH4	0,8	0,9	<i>F. oxysporum</i> SH33	2,7	3,1
RH26	0,8	0,9			

De acuerdo a la Tabla 18, se evidencia que las cepas de *Trichoderma spp.* no tuvieron un crecimiento superior a 0,9 cm debido a la influencia de la temperatura en su desarrollo ya que esta puede ser un factor limitante, por ejemplo, Ruano D et al., (2003) reportó valores inferiores de 0,07 cm a 0,36 cm al cuarto día de siembra. Además, la mayoría de especies del género *Trichoderma spp.* se consideran mesófilas, por ende, la baja temperatura puede llegar a influir negativamente en su actividad, como se demostró con los resultados de esta prueba

En cuanto al crecimiento de *F. oxysporum*, nuestros resultados concuerdan con lo investigado por Flores WD (2016), quien evaluó el diámetro de este hongo a 10 °C y encontró que a los 6 días alcanzaba 2,6 cm. Es importante señalar que no se encontraron estudios que reporten el crecimiento de *F. incarnatum* y *F. equiseti* a esta temperatura. Sin embargo, en nuestro estudio, observamos que ambos hongos lograron un crecimiento similar al de *F. oxysporum* bajo estas condiciones.

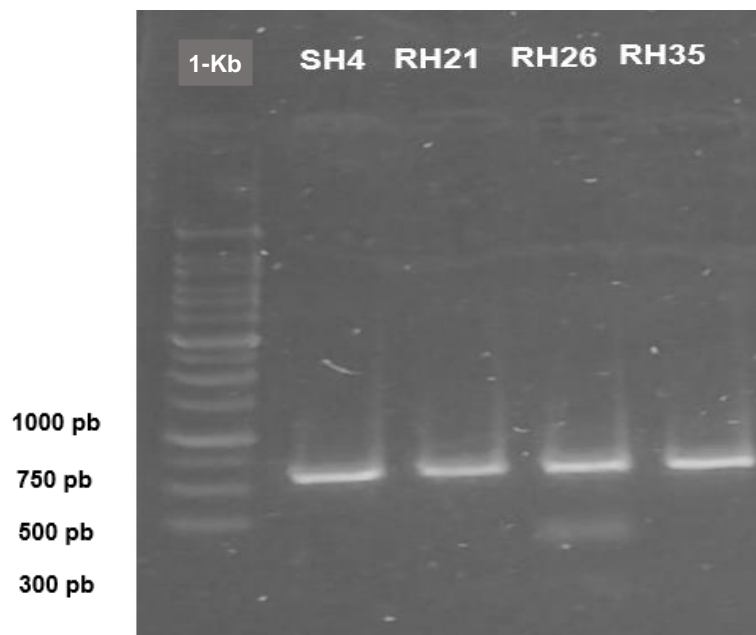
Según Zak y Wildman (2004), se consideran condiciones desfavorables cuando los hongos se someten a situaciones que difieren de las denominadas

ideales como el impacto significativo de la temperatura en la fisiología del crecimiento de los hongos, que se manifiesta a través de la inhibición en la elongación de las hifas y la reducción en la germinación de las conidias. Por esta razón, la temperatura se ha reconocido como un factor limitante en el desarrollo de los microorganismos.

### 3.2.5 Caracterización molecular de agentes biocontroladores

En la figura 22, se muestran los productos de la PCR obtenidos a partir del ADN genómico de los aislamientos de los hongos antagonistas *Trichoderma spp.* (SH4, RH21, RH26 y RH35), los cuales presentaron pesos en un rango de 500 y 750 pares de bases (pb).

Figura 21. Productos de PCR obtenidos del ADN genómico de los aislamientos de *Trichoderma spp.*



De acuerdo a las secuencias depositadas en la base de datos NCBI, se identificó molecularmente tres especies correspondiente a *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma aethiopicum* (Tabla 19).

Tabla 19. Identificación molecular de muestras de *Trichoderma spp.*

Código de muestra	Especie identificada	Porcentaje de similitud (%)
SH4	<i>T. asperellum</i>	99,48
RH21	<i>T. aethiopicum</i>	93,04
RH26	<i>T. viride</i>	99,64
RH35	<i>T. asperellum</i>	100



*T. asperellum* ha sido estudiado por su potencial uso en el cultivo de fresas. Por un lado, se ha utilizado como un hongo promotor del crecimiento de plantas capaz de inducir tolerancia a los estreses bióticos y abiótico (Scudeletti et al., 2021) . Estudios *In vitro* como el de Pastrana et al., (2016), afirman que este hongo puede controlar al patógeno *Fusarium solani*, transmitido por el suelo en plantas de fresa, otros estudios como el realizado por Parraguirre Lezama et al., (2023), mencionan en su investigación que *T. asperellum* presenta alta compatibilidad con los fungicidas Captan y Mancozeb para el biocontrol del *F. solani* en plantas de fresa. Finalmente, otros estudios afirman su potencial antagonico en otros cultivos como lo es el caso de, Pradhan et al., (2023), quienes reportan la capacidad inhibitoria de este hongo frente a la marchitez de *Fusarium oxysporum* a través de respuestas moleculares y bioquímicas en plantas de ricino.

*T. viride* es una especie de hongo que ha sido estudiada por su uso potencial en aplicaciones agrícolas (Zin & Badaluddin, 2020b). En la investigación realizada por Abd-El-Kareem et al., (2019), se descubrió que este hongo es eficaz para reducir el área de crecimiento de los hongos patógenos que causan la compleja enfermedad de la pudrición negra de la raíz causada por *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* y *Pythium sp.* en plantas de fresa, también encontraron que la mezcla de especies de Trichoderma, incluida *T. viride*, aumentaba el peso fresco y seco de las plantas de fresa y el rendimiento de las fresas. Complementando lo anterior, otros estudios afirman su capacidad antagonica en otros cultivos como lo es el caso de, (Jamil, 2021), el cual evaluó la actividad antifúngica frente a la marchitez ocasionada por *F. oxysporum* f. sp. en plantas de tomate.

*T. aethiopicum* es una de las especies con potencial biocontrolador menos estudiadas, ya que se encuentra información limitada sobre la eficacia de este específicamente contra *Fusarium spp.* en cultivo de fresa, sin embargo, el estudio reportado por Mulatu et al., (2023) afirman la eficacia de *T. aethiopicum* como biofungicida en condiciones de invernadero contra *Fusarium xylaroides* utilizando plántulas de café Geisha.

## 4 CONCLUSIONES

La investigación revela un total de 71 hongos, distribuidos en 9 géneros. De estos, 7 géneros fueron identificados como patógenos, destacando en mayor presencia *Mucor spp*, *Penicillium spp* y *Aspergillus spp*. Este hallazgo sugiere una presencia significativa de organismos que posiblemente estén contribuyendo a la enfermedad en el cultivo de fresa. Además, se observaron géneros como *Trichoderma spp* y *Metarhizium spp*, que actúan como antagonistas, indicando la presencia de organismos beneficiosos con un efecto supresor sobre los patógenos.

A partir del aislamiento realizado en la presente investigación se logró la identificación de 3 especies del género *Fusarium spp*. que corresponden a *F. incarnatum*, *F. equiseti* y *F. oxysporum* y tres especies del género *Trichoderma spp* identificadas como: *T. asperellum*, *T. aethiopicum* y *T. viride*

El aislamiento de hongos silvestres a partir de suelo y raíces enfermas de cultivos de fresa en el municipio de Silvia, permitió la identificación de 23 hongos con potencial antagonístico pertenecientes a los géneros *Metarhizium spp.* y *Trichoderma spp.*, entre estas 4 cepas del género *Trichoderma spp.* que corresponden a *T. asperellum*, *T. aethiopicum* y *T. viride* exhibieron porcentajes de inhibición superiores al 70% posicionándolos como eficientes biocontroladores frente los patógenos *F. incarnatum*, *F. equiseti* y *F. oxysporum*.

Los resultados de la prueba de compuestos volátiles (COVs) indicaron la capacidad de los cuatro antagonistas estudiados para inhibir el crecimiento de los patógenos. Particularmente, las cepas *T. aethiopicum* RH21 y *T. viride* RH26 destacaron al exhibir una inhibición significativa de *F. incarnatum* y *F. oxysporum*, superior al 35%.

## 5 RECOMENDACIONES

- Realizar pruebas a nivel de invernadero y campo para evaluar el potencial antagonista de las cepas *Trichoderma* obtenidas sobre los patógenos *F. incarnatum*, *F. equiseti* y *F. oxysporum*. La transición a pruebas en condiciones de invernadero y campo permitirá validar la efectividad de estos hongos en un entorno más cercano a la realidad de las plantaciones de fresas.
- Desarrollar un bioformulado a partir de la mezcla de *T. asperellum*, *T. viride* y *T. aethiopicum* y evaluar su viabilidad.
- Utilizar técnicas de microscopía avanzada para lograr una observación precisa de los mecanismos de acción tales como el micoparasitismo, que representa interacciones fundamentales entre el antagonista y el patógeno.
- Identificar los compuestos volátiles emitidos por las cepas con potencial antagonico para el control de *Fusarium spp.* por medio de cromatografía de gases.
- Confirmar la identidad de los hongos mediante nuevos Primer's y la amplificación de otros genes fúngicos.

## 6 ANEXOS

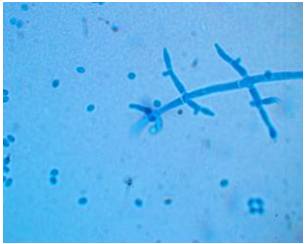

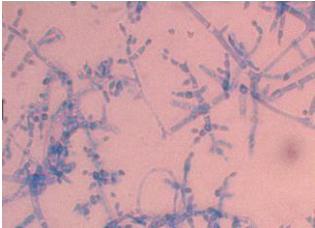
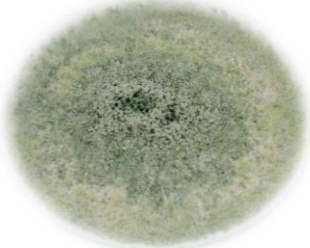
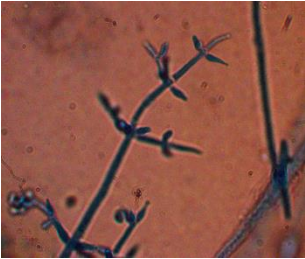
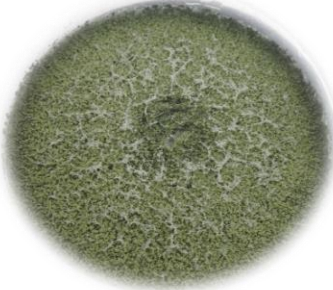

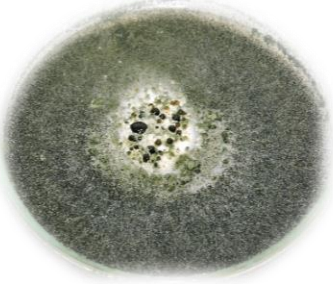
### Anexo 1. Identificación y descripción de los aislados obtenidos.

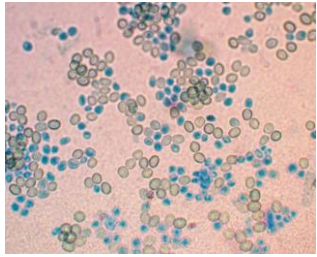

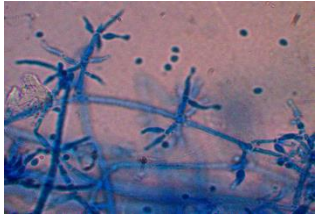


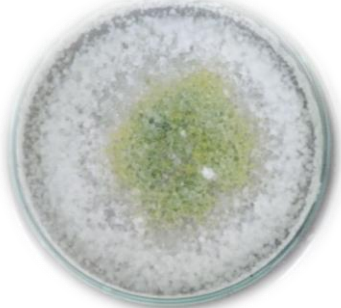
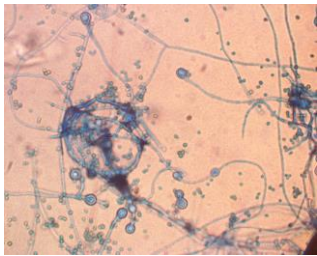
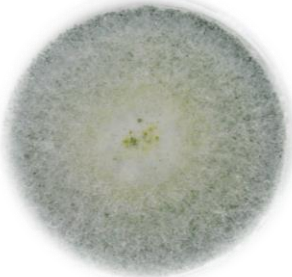


AISLADO	MUESTRA	ROTULO	FINCA	VARIEDAD	COLOR SUPERIOR	COLOR INFERIOR	TOPOGRAFIA	TEXTUTURA	GENERO
SH1	SUELO	FIZ1 -1	1	Monterrey	Blanco	Amarilla	Plana	Algodonosa	<i>Aspergillus</i>
SH2	SUELO	FIZ1 -2	1	Monterrey	Verde	Roja	Plana	Algodonosa	<i>Penicillium</i>
SH3	SUELO	FIZ1 -3	1	Monterrey	Blanco	Blanco	Umbonada	Algodonosa	<i>Fusarium</i>
SH4	SUELO	FIZ1 -4	1	Monterrey	Verde	Verde	Plana	Granular	<i>Trichoderma</i>
SH5	SUELO	FIZ1 -5	1	Monterrey	Blanco	Blanco	Rugosa	Aterciopelada	<i>Penicillium</i>
SH6	SUELO	FIZ1 -6	1	Monterrey	Negro	Verde opaco	Aplanada	Algodonosa	<i>Aspergillus</i>
SH7	SUELO	FIZ1 -7	1	Monterrey	Verde	Amarillo	Aplanada	Granular	<i>Metarhizium</i>
SH9	SUELO	FIZ1 -9	1	Monterrey	Blanco	Blanco	Aplanada	Algodonosa	<i>Mucor</i>
SH10	SUELO	FIZ1 -10	1	Monterrey	Verde	Blanco con verde	Plana	Granular	<i>Metarhizium</i>
SH11	SUELO	FIZ1 -11	1	Monterrey	Blanco	Blanco	Plana	Algodonosa	<i>Pythium</i>
SH12	SUELO	F1Z2-1	1	Monterrey	Verde	Verde	Plana	Polvorienta	<i>Metarhizium</i>
SH13	SUELO	F1Z2-2	1	Monterrey	Blanco	Blanco	Umbonada	Aterciopelada	<i>Rhizopus</i>
SH14	SUELO	F1Z2-3	1	Monterrey	Blanco con pigmentos verdes	Blanco	Rugosa	Algodonosa	<i>Trichoderma</i>
SH15	SUELO	F1Z2-4	1	Monterrey	Blanco	Blanco	Plana	Aterciopelada	<i>Rhizoctonia</i>
SH16	SUELO	F1Z2-5	1	Monterrey	Negro	Blanco	Plana	Aterciopelada	<i>Aspergillus</i>
SH17	SUELO	F1Z2-6	1	Monterrey	Verde	Verde	Plana	Polvorienta	<i>Metarhizium</i>
SH18	SUELO	F1Z2-7	1	Monterrey	Verde	Blanco	Plano	Polvorienta	<i>Trichoderma</i>
SH19	SUELO	F1Z2-8	1	Monterrey	Blanco	Blanco	Rugosa	Aterciopelada	<i>Penicillium</i>
SH20	SUELO	F1Z3-1	1	Sabrina	Café	Verde	Aplanada	Polvorienta	<i>Aspergillus</i>
SH22	SUELO	F1Z3-3	1	Sabrina	Café	Verde	Aplanada	Polvorienta	<i>Aspergillus</i>
SH23	SUELO	F1Z3-4	1	Sabrina	Verde	Blanco	Aplanada	Polvorienta	<i>Penicillium</i>
SH24	SUELO	F1Z3-5	1	Sabrina	Gris	Blanco	Aplanada	Polvorienta	<i>Alternaria</i>
SH25	SUELO	F1Z3-6	1	Sabrina	Verde	Blanco	Aplanada	Polvorienta	<i>Penicillium</i>
SH26	SUELO	F1Z3-7	1	Sabrina	Blanco	Blanco	Umbonada	Algodonosa	<i>Fusarium</i>
SH27	SUELO	F2Z SH	2	Sabrina	Blanco	Blanco	Aplanada	Aterciopelada	<i>Pythium</i>
SH31	SUELO	F2Z SH	2	Sabrina	Blanco	Blanco	Aplanada	Aterciopelada	<i>Pythium</i>
SH32	SUELO	F2Z SH	2	Sabrina	Gris	Blanco	Aplanada	Algodonosa	<i>Aspergillus</i>
SH33	SUELO	F2Z SH	2	Sabrina	Blanco	Blanco	Umbonada	Aterciopelada	<i>Fusarium</i>
SH34	SUELO	F2Z SH	2	Sabrina	Blanco	Blanco	Aplanada	Aterciopelada	<i>Rhizoctonia</i>
SH35	SUELO	F2Z SH	2	Sabrina	Blanco	Gris	Umbonada	Granular	<i>Metarhizium</i>

SH36	SUELO	F2Z SH	2	Sabrina	Gris	Blanco	Aplanada	Algodonosa	<i>Aspergillus</i>
SH37	SUELO	F2Z SH	2	Sabrina	Blanco	Blanco	Umbonada	Algodonosa	<i>Penicillium</i>
SH38	SUELO	F2Z SH	2	Sabrina	Amarillo	Amarillo	Aplanada	Algodonosa	<i>Mucor</i>
SH39	SUELO	F2Z SH	2	Sabrina	Blanco	Blanco	Aplanada	Aterciopelada	<i>Mucor</i>
SH40	SUELO	F2Z SH	2	Sabrina	Blanco	Blanco	Aplanada	Algodonosa	<i>Mucor</i>
SH41	SUELO	F2Z SH	2	Sabrina	Blanco y negro	Blanco	Umbonada	Polvorienta	<i>Rhizoctonia</i>
SH42	SUELO	F2Z SH	2	Sabrina	Verde	Blanco	Umbonada	Polvorienta	<i>Penicillium</i>
SH43	SUELO	F2Z SH	2	Sabrina	Blanco	Blanco	Aplanada	Algodonosa	<i>Colletotricum</i>
SH44	SUELO	F2Z SH	2	Sabrina	Blanco	Blanco	Umbonada	Polvorienta	<i>Penicillium</i>
SH45	SUELO	F2Z SH	2	Sabrina	Blanco	Blanco	Umbonada	Polvorienta	<i>Alternaria</i>
SH46	SUELO	F2Z SH	2	Sabrina	Verde	Blanco	Umbonada	Polvorienta	<i>Trichoderma</i>
SH47	SUELO	F2Z SH	2	Sabrina	Blanco	Blanco	Aplanada	Polvorienta	<i>Penicillium</i>
RH1	RAÍZ	F1Z1RP-1	1	Monterrey	Verde	Verdeo	Aplanada	Aterciopelada	<i>Metarhizium</i>
RH2	RAÍZ	F1Z1RP-2	1	Monterrey	Café claro	Amarillo	Umbonada	Polvorienta	<i>Mucor</i>
RH3	RAÍZ	F1Z1RP-3	1	Monterrey	Verde	Amarillo	Aplanada	Granular	<i>Trichoderma</i>
RH4	RAÍZ	F1Z1RP-4	1	Monterrey	Blanco	Blanco	Umbonada	Polvorienta	<i>Pythium</i>
RH7	RAÍZ	F1Z1RS-2	1	Monterrey	Blanco	Blanco	Umbonada	Polvorienta	<i>Penicillium</i>
RH8	RAÍZ	F1Z1RS-3	1	Monterrey	Verde	Blanco con centro verde	Aplanada	Granular	<i>Trichoderma</i>
RH9	RAÍZ	F1Z1RS-4	1	Monterrey	Blanco, centro verdoso	Blanco	Aplanada	Algodonosa	<i>Aspergillus</i>
RH11	RAÍZ	F1Z2 RP	1	Monterrey	Verde con pigmentos blanco	Verde	Aplanada	Granular	<i>Metarhizium</i>
RH12	RAÍZ	F1Z2 RP	1	Monterrey	Borde blanco, centro verde	Verde	Aplanada	Granular	<i>Metarhizium</i>
RH14	RAÍZ	F1Z2 RP	1	Monterrey	Verde	Verde	Aplanada	Granular	<i>Metarhizium</i>
RH15	RAÍZ	F1Z2 RP	1	Monterrey	Verde	Verde	Aplanada	Polvorienta	<i>Metarhizium</i>
RH16	RAÍZ	F1Z2 RP	1	Monterrey	Verde con pigmentos blancos	Blanco	Aplanada	Granular	<i>Trichoderma</i>
RH17	RAÍZ	F1Z2 RP	1	Monterrey	Verde	Verde	Aplanada	Granular	<i>Metarhizium</i>
RH18	RAÍZ	F1Z3 RP	1	Sabrina	Blanco	Blanco	Aplanada	Algonodosa	<i>Pythium</i>
RH19	RAÍZ	F1Z3 RP	1	Sabrina	Blanco	Blanco	Aplanada	Algonodosa	<i>Mucor</i>
RH20	RAÍZ	F1Z3 RP	1	Sabrina	Blanco con pigmentos verdes	Blanco	Umbonada	Algonodosa	<i>Trichoderma</i>
RH21	RAÍZ	F1Z3 RS	1	Sabrina	Verde con pigmentos amarillos	Amarillo	Umbonada	Aterciopelada	<i>Trichoderma</i>
RH22	RAÍZ	F1Z3 RS	1	Sabrina	Blanco	Blanco	Aplanada	Algonodosa	<i>Mucor</i>

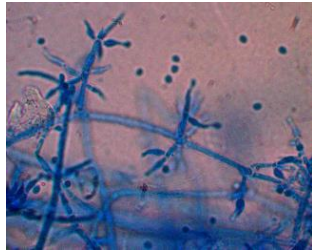
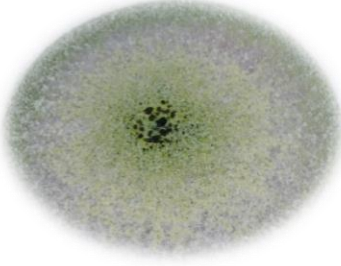
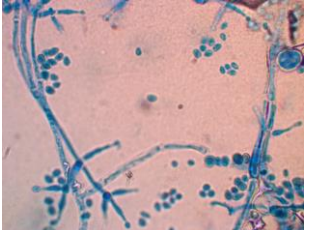
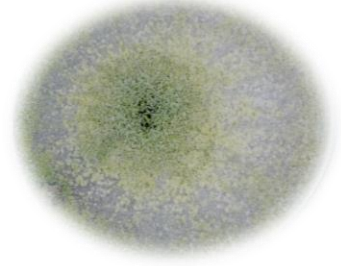
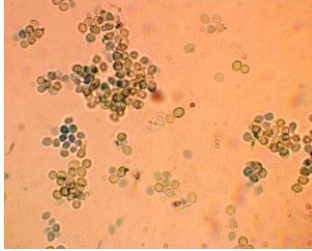
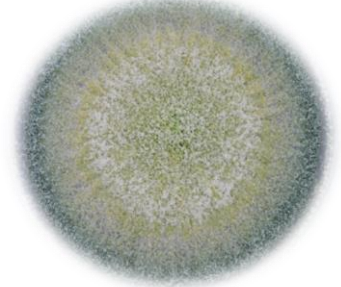
RH23	RAÍZ	F1Z3 RS	1	Sabrina	Blanco	Blanco	Umbonada	Algonodosa	<i>Mucor</i>
RH26	RAÍZ	F2Z RS	2	Sabrina	Verde con blanco	Verde	Aplanada	Algonodosa	<i>Trichoderma</i>
RH27	RAÍZ	F2Z RS	2	Sabrina	Café oscuro	Blanco oscuro	Aplanada	Algonodosa	<i>Mucor</i>
RH28	RAÍZ	F2Z RS	2	Sabrina	Blanco	Blanco	Aplanada	Algonodosa	<i>Pythium</i>
RH29	RAÍZ	F2Z RS	2	Sabrina	Café oscuro	Blanco oscuro	Aplanada	Algonodosa	<i>Rhizopus</i>
RH30	RAÍZ	F2Z RS	2	Sabrina	Café oscuro	Blanco oscuro	Aplanada	Algonodosa	<i>Mucor</i>
RH33	RAÍZ	F2Z RS	2	Sabrina	Café oscuro	Blanco oscuro	Aplanada	Algonodosa	<i>Mucor</i>
RH34	RAÍZ	F2Z RS	2	Sabrina	Blanco con pigmentos verdes	Blanco con pigmento verde	Aplanada	Polvorienta	<i>Mucor</i>
RH35	RAÍZ	F2Z RS	2	Sabrina	Blanco con pigmentos verdes	Blanco con pigmento verde	Aplanada	Polvorienta	<i>Trichoderma</i>
RH36	RAÍZ	F2Z RS	2	Sabrina	Blanco con centro gris	Amarillo	Aplanada	Algonodosa	<i>Mucor</i>
RH37	RAÍZ	F2Z RS	2	Sabrina	Blanco con centro verde	Blanco	Aplanada	Algonodosa	<i>Trichoderma</i>

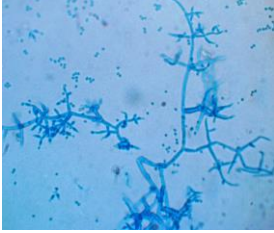
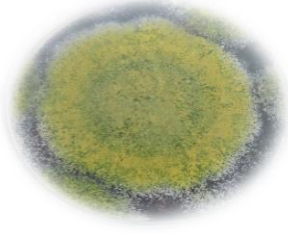
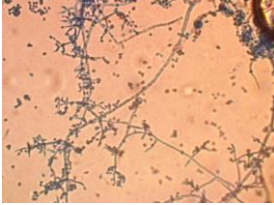
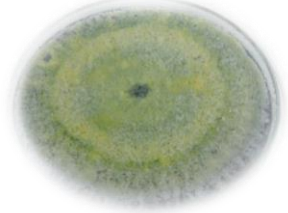


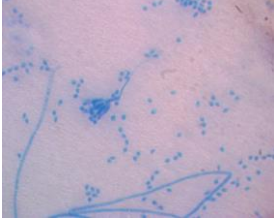
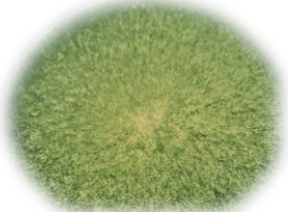
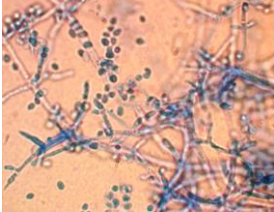
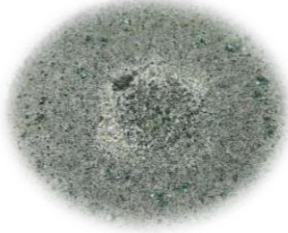
Anexo 2. Imágenes microscópicas y macroscópicas de cepas antagonistas obtenidas en este estudio.

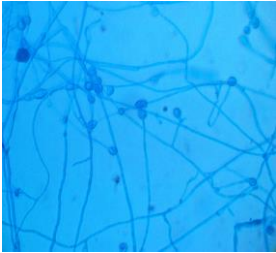
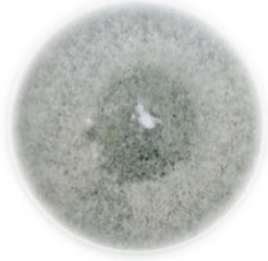
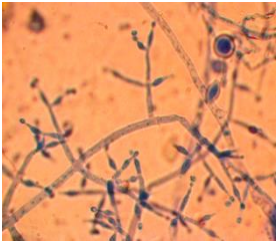

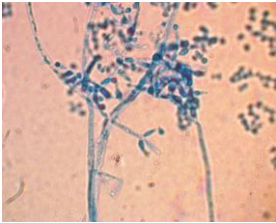
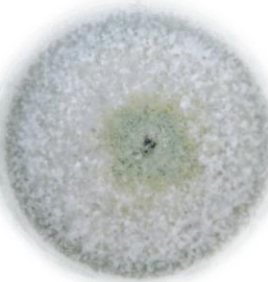
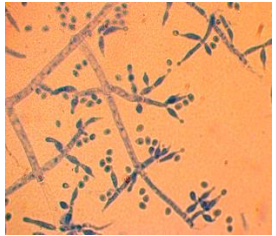

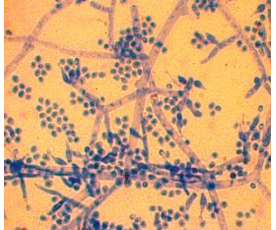
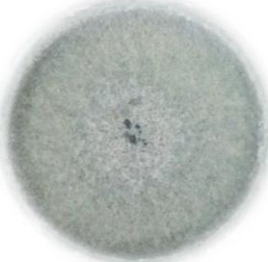
Cepas de <i>Trichoderma</i> spp.	Descripción Microscópica	Imagen
SH4		
SH14		
SH18		
SH46		

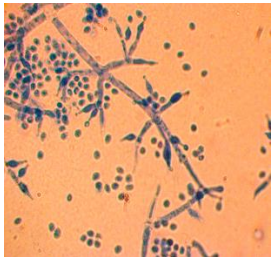

<p>RH3</p>		
<p>RH8</p>		
<p>RH16</p>		
<p>RH20</p>		
<p>RH21</p>		



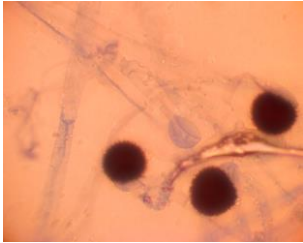
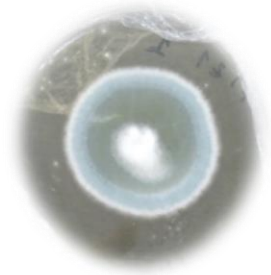
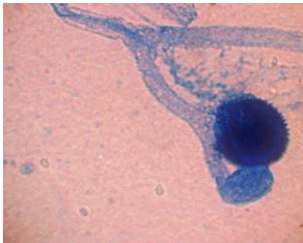
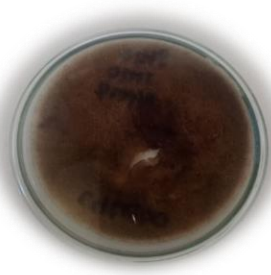
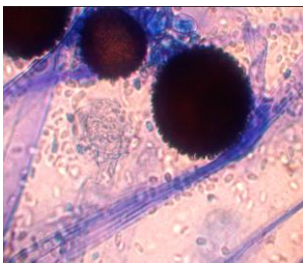

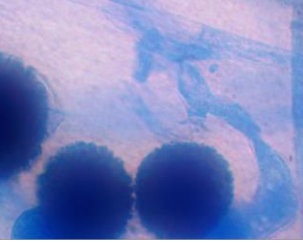

RH26		
RH35		
RH37		

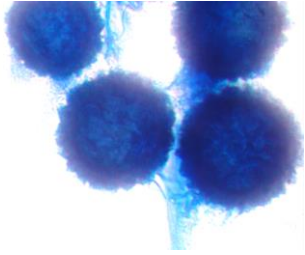

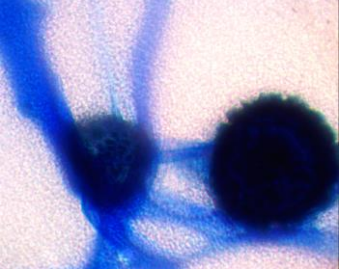

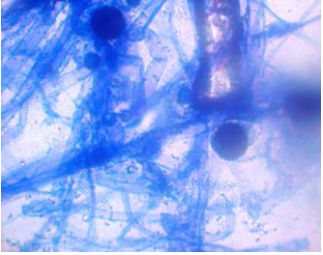

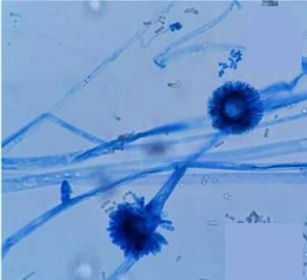

Cepas de <i>Metarhizium</i> spp.	Descripción Microscópica	Imágenes de referencia
SH7		
SH10		
SH12		
SH17		
SH35		

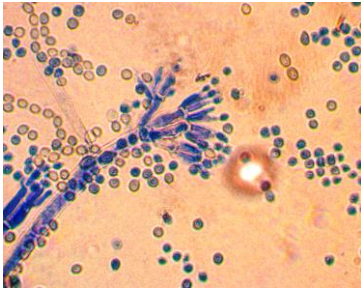

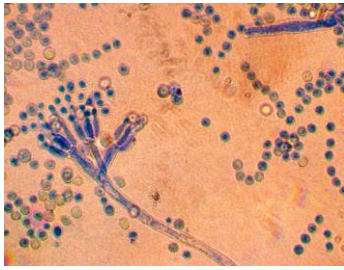

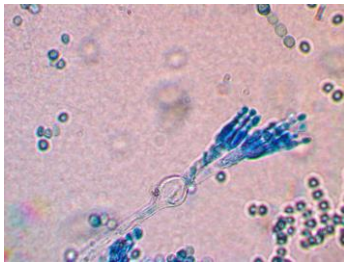

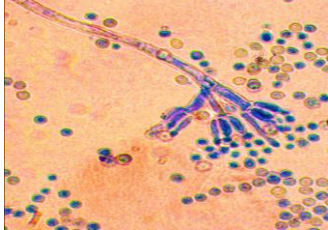

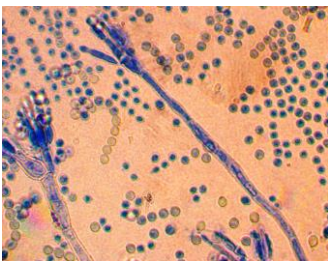

RH1		
RH11		
RH12		
RH14		
RH15		

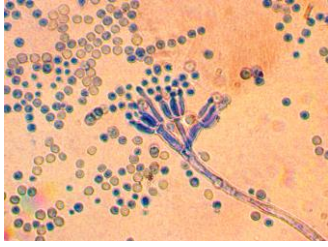
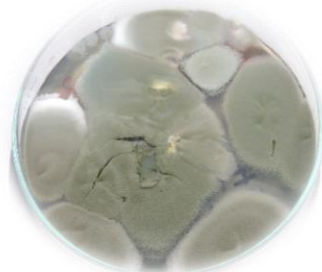
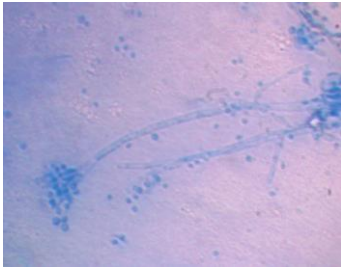
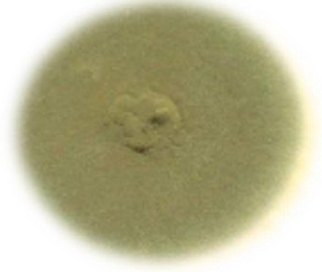
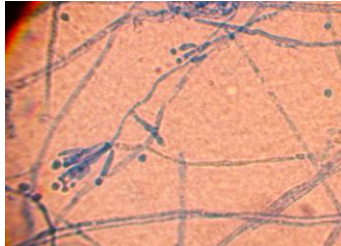
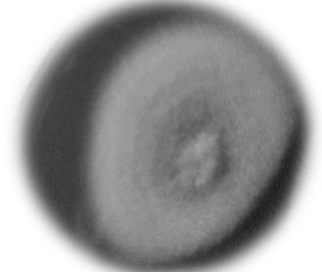
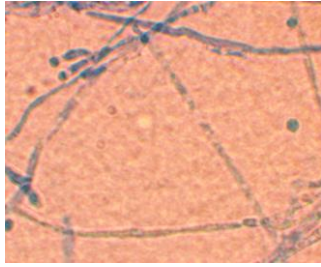

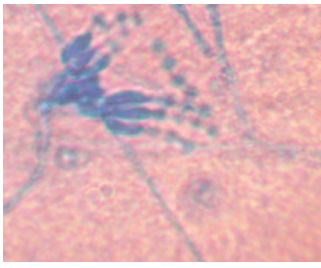

RH17		
------	---	---

Anexo 3. Imágenes microscópicas y macroscópicas de cepas patógenas obtenidas en este estudio.

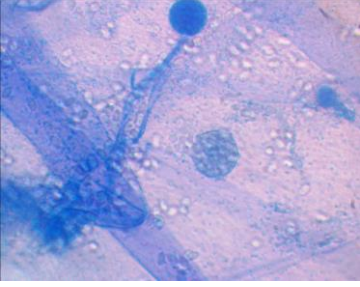

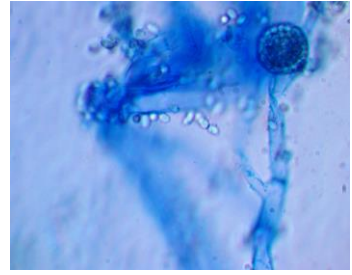
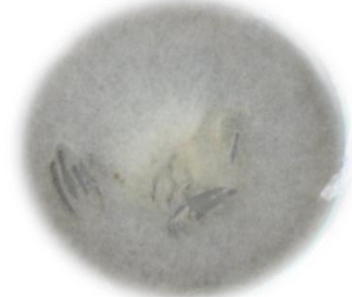

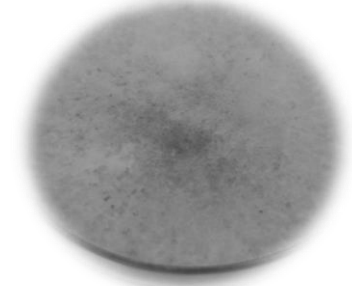
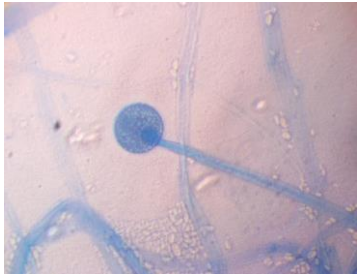

Cepas de <i>Aspergillus</i> spp.	Descripción Microscópica	Imágenes de referencia
SH1		
SH6		
SH16		
SH20		

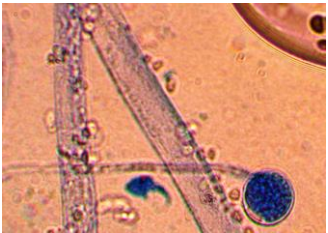



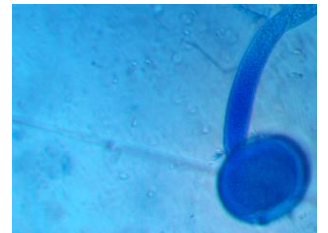

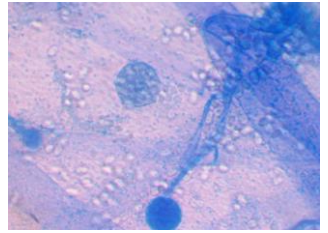

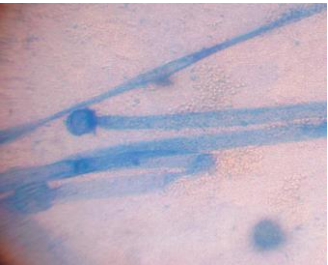

SH22		
SH32		
SH36		
RH9		





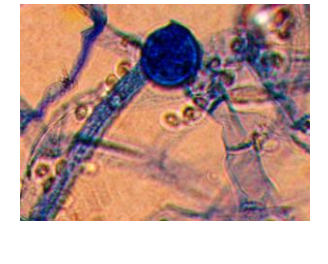

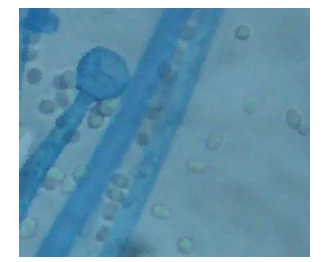



Cepas de <i>Penicillium</i> spp.	Descripción Microscópica	Imágenes de referencia
SH2		
SH5		
SH19		
SH23		
SH25		

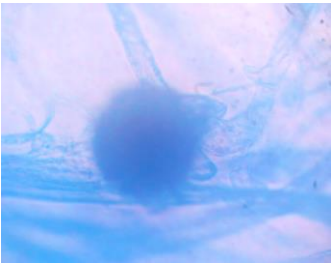


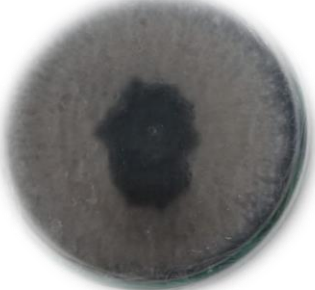
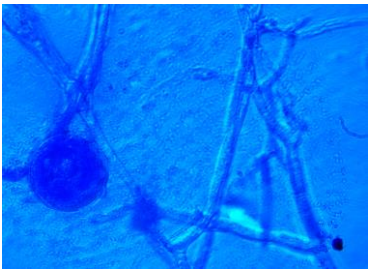
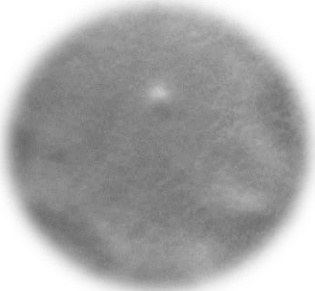
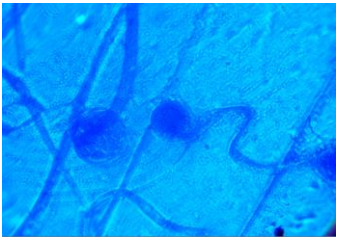
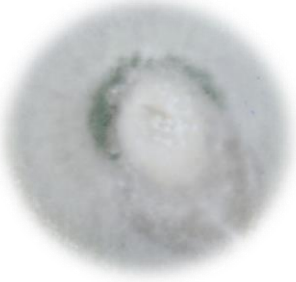


SH37		
SH42		
SH44		
SH47		
RH7		



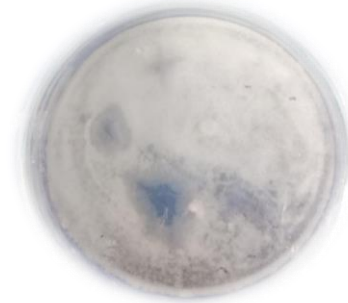
Cepas de <i>Mucor</i> spp.	Descripción Microscópica	Imágenes de referencia
SH9		
SH38		
SH39		
SH40		

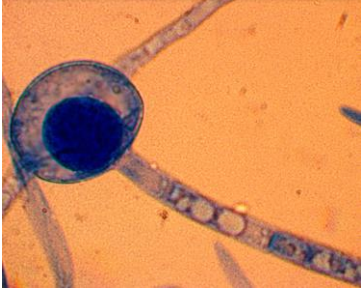

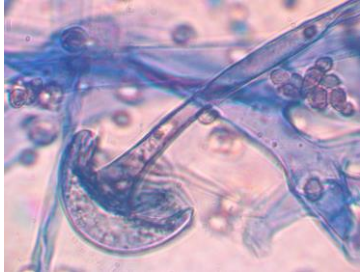



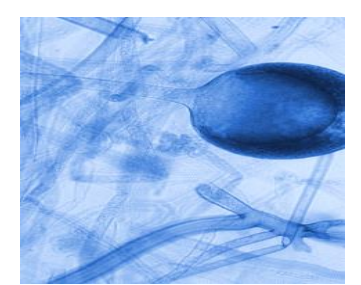
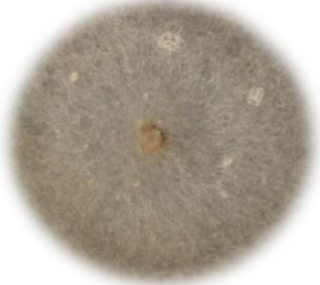
SH43		
RH2		
RH19		
RH22		
RH23		

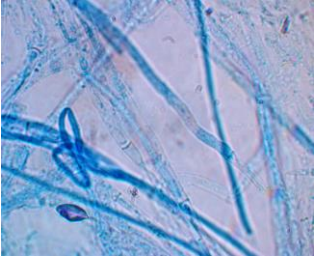
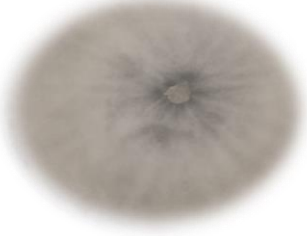
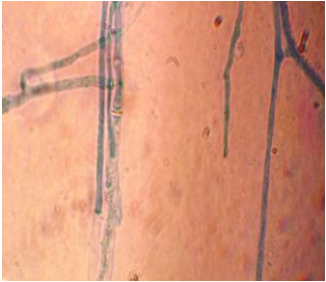

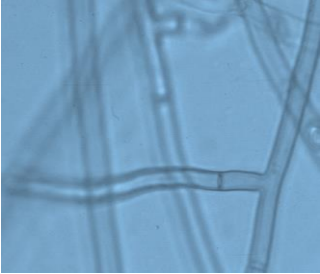
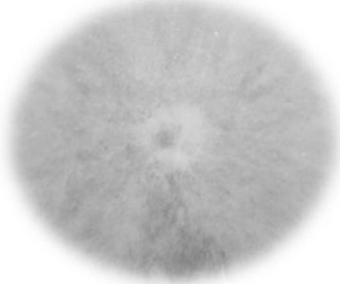
RH27		
RH30		
RH33		
RH34		
RH36		

Cepas de <i>Pythium</i> spp.	Descripción Microscópica	Imágenes de referencia
SH11		
SH27		
SH31		
RH4		
RH18		

RH28



Cepas de <i>Rhizopus</i> spp.	Descripción Microscópica	Imágenes de referencia
SH13		
SH24		
SH45		
RH29		

Cepas de <i>Rhizoctonia</i> spp.	Descripción Microscópica	Imágenes de referencia
SH15		
SH34		
SH41		

## 7 BIBLIOGRAFÍA

- Abd-El-Kareem, F., Elshahawy, I. E., & Abd-Elgawad, M. M. M. (2019). Local Trichoderma strains as a control strategy of complex black root rot disease of strawberry in Egypt. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1). <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0206-7>
- Abeyratne, G. D. D., & Deshappriya, N. (2018). The effect of pH on the biological control activities of a Trichoderma sp. against Fusarium sp. isolated from the commercial onion fields in Sri Lanka. *Tropical Plant Research*, 5(2), 121-128. <https://doi.org/10.22271/tp.2018.v5.i2.017>
- Andrade Hoyos, P., Luna Cruz, A., Osorio Hernández, E., Molina Gayosso, E., Landero Valenzuela, N., Jair Barrales Cureño, J. H., Cuanalá, M., & Bonilla, J. C. (2019). *Antagonismo de Trichoderma spp. vs hongos asociados a la marchitez de chile*. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-09342019000601259#:~:text=Los aislamientos de Trichoderma spp,Fusarium oxysporum%2C Rhizoctonia solani y](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342019000601259#:~:text=Los aislamientos de Trichoderma spp,Fusarium oxysporum%2C Rhizoctonia solani y)
- Arias Tauta, J. K., & Jerez Ramirez, A. del P. (2008). *Elaboración de un atlas para la descripción macroscópica y microscópica de hongos fitopatógenos de interés en especies de flores de corte cultivadas en la Sabana de Bogotá*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Arturo, C., & Lorena, A. (2015). Cultivo de frutilla en una realidad sin bromuro de metilo en Chile. *Revista de Investigación, Problemas fitosanitarios del cultivo de frutilla que justifican la desinfección de suelo*, 36. <https://biblioteca.inia.cl/handle/20.500.14001/62071>
- B. Martínez, Danay Infante, & Yusimy Reyes. (2013). Trichoderma spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Rev. Protección Veg. Vol. 28 No. 1 (2013): 1-11*. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522013000100001](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000100001)
- Bohórquez Parra, L. F., & Díaz Torres, Y. K. (2010). *Evaluación de aislamientos de Fusarium spp. de diferentes orígenes, frente a factores de crecimiento asociados a patogenicidad* [Pontificia Universidad Javeriana]. <https://bibliotecadigital.oducal.com/Record/ir-10554-8539/Details?sid=182497>
- Burbano Rosero, E. M., Caetano de Almeida, B., Otero Ramírez, I. D., & Álvarez, S. L. (2017). *Manual de biología molecular*. Universidad de Nariño. <http://up-rid2.up.ac.pa:8080/xmlui/handle/123456789/2219>
- Cano M.A. (2013). *Estrategias biológicas para el manejo de enfermedades en el cultivo de fresa (Fragaria spp.)*. [https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencias\\_hortícolas/article/view/2240](https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencias_hortícolas/article/view/2240)
- Cruz-Lachica, I., Márquez-Zequera, I., García-Estrada, R. S., Carrillo-Fasio, J. A., León-Félix, J., & Allende-Molar, R. (2017). Identificación de hongos mucorales causantes de la pudrición blanda en frutos de papaya (Carica papaya L.) en México. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 35(3). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1611-3>
- Cruz Coronel, A. (2022). *Control biológico de Fusarium solani resistente a fungicidas con cepas de Trichoderma spp.: Una alternativa agroecológica para el cultivo de fresa en Puebla, México* [Benemérita Universidad Autónoma de Puebla]. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/16423%0A>



- Descalzo Garrido, R. (2022). *Efectos del cambio de uso del suelo en la microbiota edáfica* [Universidad Miguel Hernández de Elche]. <http://dspace.umh.es/handle/11000/26131>
- Dobronski Arcos, J., & Pullupaxi Toapanta, M. E. (2016). *Evaluación de trichoderma para el control de Fusarium oxysporum en el cultivo de tomate riñón* [Universidad Tecnica de Ambato]. [http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/26343/1/Tesis 98 Medicina Veterinaria y Zootecnia -CD 512.pdf](http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/26343/1/Tesis%2098%20Medicina%20Veterinaria%20y%20Zootecnia%20-%20CD%20512.pdf)
- Gebremariam, A., Chekol, Y., & Assefa, F. (2021). *Caracterización fenotípica, molecular y de virulencia de hongos entomopatógenos Metarhizium.pdf*. <https://pdf.sciencedirectassets.com/313379/1-s2.0-S2405844020X00065/1-s2.0-S2405844021011944/main.pdf?X-Amz-Security-Token=IQoJb3JpZ2luX2VjEOT%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2FwEaCXVzLWVhc3QtMSJHMEUCIQCugbulcR0PhoN69R5D9A%2BQoqFR9OWpq7YFInnO%2FVVXpwlGsmMSVcs>
- Gerardo Velázquez-Del Valle, M., Bautista-Baños, S., & Niurka Hernández-Lauzardo, A. (2007). *Estrategias de Control de Rhizopus stolonifer Ehrenb. (Ex Fr.) Lind, Agente Causal de Pudriciones Postcosecha en Productos Agrícolas*. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092008000100008](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092008000100008)
- Giménez, G., Paullier, J., & Maeso, D. (2015). Identificación y manejo de las principales enfermedades y plagas en el cultivo de frutilla. En *Unidad de Agronegocios y Difusión del INIA*. (82.<sup>a</sup> ed., Número 82). [http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos compartidos/111219240807161309.pdf](http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/111219240807161309.pdf)
- González Martínez, K. I. (2020). Inhibición de Sclerotinia sclerotiorum por metabolitos volátiles y no volátiles producidos por especies nativas del genero Trichoderma [Universidad Michoacana De San Nicolás De Hidalgo]. En *Revista Agronómica del Noroeste Argentino* (Vol. 34, Número 2). <http://www.faz.unt.edu.ar/ranar/rana34267.pdf>
- Guédez Clemencia, Cañizales Luis, Castillo Carmen, & Olivar Rafael. (2009). *Efecto antagonico de Trichoderma harzianum sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (Fragaria spp)*. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199416353007>
- Gutierrez Cano, A. (2015). El cultivo de fresa en el oriente antioqueño. En U. B. Pontifica (Ed.), *Seninario Nacional de Fruales* (Iv, p. 392). [https://books.google.com.co/books?id=G8CnojHybXoC&pg=PA70&lpg=PA70&dq=:+Pudrición+de+la+raíz+\(Rhizoctonia+solani\)+provoca+un+colapso+total+de+la+planta+durante+la+época+de+cosecha.+Las+hojas+bajas+to man+un+color+púrpura+y+los+peciolos+se+tornar+color+café](https://books.google.com.co/books?id=G8CnojHybXoC&pg=PA70&lpg=PA70&dq=:+Pudrición+de+la+raíz+(Rhizoctonia+solani)+provoca+un+colapso+total+de+la+planta+durante+la+época+de+cosecha.+Las+hojas+bajas+to man+un+color+púrpura+y+los+peciolos+se+tornar+color+café)
- Hafizi, R., Salleh, B., & Latiffah, Z. (2013). *Morphological and molecular characterization of Fusarium. solani and F. oxysporum associated with crown disease of oil palm*. [www.sbmicrobiologia.org.br](http://www.sbmicrobiologia.org.br)
- Hao, Q., Albaghdady, D. M. D., Xiao, Y., Xiao, X., Mo, C., Tian, T., & Wang, G. (2021). Endophytic Metarhizium anisopliae is a potential biocontrol agent against wheat Fusarium head blight caused by Fusarium graminearum. *Journal of Plant Pathology*, 103(3), 875-885. <https://doi.org/10.1007/s42161-021-00866-6>
- Henao-Henao, E. D., Hernandez-Medina, C. A., Salazar-González, C., Velasco-

- Belalcazar, M. L., & Gómez-López, E. D. (2018). Identificación molecular de aislamientos de *Fusarium* asociados a maracuyá en el Valle del Cauca, Colombia. *Agronomía Mesoamericana*, 29(1), 53. <https://doi.org/10.15517/ma.v29i1.27114>
- Hernández Medina, C. A. (2016). *Especies de Fusarium y Penicillium asociadas a frutales en los departamentos del Cauca y Valle de Cauca, Colombia* [Universidad Nacional de Colombia]. <http://bdigital.unal.edu.co/52931/>
- Insuasty, C. E., Acosta Rodríguez, J., Salazar González, C., & García, C. B. (2014). Evaluación de cepas de *Trichoderma* spp. para el manejo del amarillamiento de arveja causado por *Fusarium oxysporum*. En *Corpoica Cienc. Technol. Agropecu* (Número 2). [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0122-87062014000200010&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0122-87062014000200010&script=sci_arttext)
- Intana, W., Kheawleng, S., & Sunpapao, A. (2021). *Trichoderma asperellum* t76-14 released volatile organic compounds against postharvest fruit rot in muskmelons (*Cucumis melo*) caused by *Fusarium incarnatum*. *Journal of Fungi*, 7(1), 1-13. <https://doi.org/10.3390/jof7010046>
- Jamil, A. (2021). Antifungal and plant growth promoting activity of *Trichoderma* spp. Against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* colonizing tomato. *Journal of Plant Protection Research*, 61(3), 243-253. <https://doi.org/10.24425/jppr.2021.137950>
- Lastra Alcalde, E. (2021). *Fusariosis de los cultivos de la fresa y el espárrago en España: Caracterización y métodos de control* [Universidad de Sevilla]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=305661>
- Liseth, D., Moreno, T., Marina, L., & Forero, L. (2013). Microbial Populations Associated with the Rhizosphere and Phyllosphere Plants of Cape Gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *Revista de Ciencias*, 18(2). <https://go.gale.com/ps/i.do?id=GALE%7CA458999746&sid=googleScholar&v=2.1&it=r&linkaccess=abs&issn=01211935&p=IFME&sw=w&userGroupName=anon~16d0247b&aty=open-web-entry>
- Marín, P., Moretti, A., Ritieni, A., Jurado, M., Vázquez, C., & González-Jaén, M. T. (2012). Phylogenetic analyses and toxigenic profiles of *Fusarium equiseti* and *Fusarium acuminatum* isolated from cereals from Southern Europe. *Food Microbiology*, 31(2), 229-237. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.03.014>
- Mariscal Amaro, L., Rivera Yerena, A., Dávalos González, P. A., & Ávila Martínez, D. (2016). Situación actual de hongos asociados a la secadera de la fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) En Guanajato, México. *Agrociencia*, 51, 673-681. <https://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v51n6/1405-3195-agro-51-06-00673-en.pdf>
- Marulanda Medina, C. (2017). *Identificación de aislamientos de Phytophthora cinnamomi asociados aguacate en el sur occidente de Colombia* [Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/64244>
- Matute Calle, P. (2019). Control Biológico del Moho Gris (*Botrytis cinerea*) en cultivos de Fresa (*Fragaria vesca* L.) mediante hongos filamentosos antagonistas. En *Universidad Politécnica Salesiana*. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/18147/1/UPS-CT008620.pdf>
- Morales Mora, L. A., Andrade Hoyos, P., Valencia de Ita, M. A., Romero Arenas, O., Silva Rojas, H. V., & Contreras Paredes, C. A. (2020). Characterization

- of strawberry associated fungi and in vitro antagonistic effect of *Trichoderma harzianum*. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 38(3). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2005-7>
- Morin-Sardin, S., Jany, J. L., Artigaud, S., Pichereau, V., Bernay, B., Coton, E., & Madec, S. (2017). Proteomic analysis of the adaptative response of *Mucor* spp. to cheese environment. *Journal of Proteomics*, 154, 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.12.001>
- Mulatu, A., Megersa, N., Teferi, D., Alemu, T., & Vetukuri, R. R. (2023). Biological management of coffee wilt disease (*Fusarium xylarioides*) using antagonistic *Trichoderma* isolates. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1113949>
- Osorio, V. (2009). Microorganismos del suelo y su efecto sobre la disponibilidad y absorción de nutrientes por las plantas. En *Materia orgánica biología del suelo y productividad agrícola: Segundo seminario regional comité regional eje cafetero* (pp. 43-71). Cenicafé. [https://doi.org/10.38141/10791/0003\\_3](https://doi.org/10.38141/10791/0003_3)
- Parraguirre Lezama, C., Romero-Arenas, O., Valencia de Ita, M. D. L. A., Rivera, A., Sangerman Jarquín, D. M., & Huerta-Lara, M. (2023). In Vitro Study of the Compatibility of Four Species of *Trichoderma* with Three Fungicides and Their Antagonistic Activity against *Fusarium solani*. *Horticulturae*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/horticulturae9080905>
- Pastrana León, A. M. (2014). *Incidencia y epidemiología de nuevos hongos patógenos de fresa en la provincia de Huelva. Desarrollo de herramientas biotecnológicas y aplicación de otras estrategias de control*. [Universidad de Sevilla]. <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/68567/2014pastrincid.pdf;jsessionid=C172F430645398E8BFBAC32497625FF6?sequence=1>
- Pérez-Rodríguez, L. R., Pérez-Moreno, L., Guzmán-Mendoza, R., Sanzón-Gómez, D., Belmonte-Vargas, J. R., Pérez-Rodríguez, L. R., Pérez-Moreno, L., Guzmán-Mendoza, R., Sanzón-Gómez, D., & Belmonte-Vargas, J. R. (2019). Sensibilidad in vitro de hongos fitopatógenos causantes de enfermedades en fresa a controladores biológicos y fungicidas, en el estado de Guanajuato, México. *Acta universitaria*, 29, 1-11. <https://doi.org/10.15174/AU.2019.2339>
- Pérez, D., & García Godos, P. (2019). Identificación del agente causal del marchitamiento en *Caesalpinia spinosa* "tara" y el efecto antagónico de aislados de *Bacillus* spp. y *Trichoderma* sp. *Ecología Aplicada*, 18(1), 51. <https://doi.org/10.21704/rea.v18i1.1306>
- Picardal, J. P., Danielle, E., Tundag, L., Picardal, M. T., & Goc-Ong, G. B. (2019). *Antagonistic Activity of Metarhizium anisopliae (Metschnikoff) Against Phytopathogenic Fusarium oxysporum f. sp. cubense (Schlecht.) as a Biological Control*. <https://jhe.cnu.edu.ph/index.php/ojs3/article/view/13>
- Pradhan, D. A., Bagagoni, P., & Makandar, R. (2023). Assessing rhizosphere *Trichoderma asperellum* strains for root colonizing and antagonistic competencies against *Fusarium* wilt through molecular and biochemical responses in castor. *Biological Control*, 184. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2023.105280>
- Rajani, P., Rajasekaran, C., Vasanthakumari, M. M., Olsson, S. B., Ravikanth, G., & Uma Shaanker, R. (2021). Inhibition of plant pathogenic fungi by endophytic *Trichoderma* spp. through mycoparasitism and volatile organic compounds. *Microbiological Research*, 242(August 2020), 126595.

- <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126595>
- Ronnie Gakegne, E., & Martínez Coca, B. (2018). Antibiosis and effect of pH-temperature on the antagonism of *Trichoderma asperellum* strains against *Alternaria solani*. *Revista de Protección Vegetal*, 33(2). <http://opn.to/a/0XV5m>
- Saito, S., Michailides, T. J., & Xiao, C. L. (2016). Mucor Rot—An emerging postharvest disease of mandarin fruit caused by *mucor piriformis* and other *Mucor* spp. In California. *Plant Disease*, 100(6), 1054-1063. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-15-1173-RE>
- Saldaña Jaramillo, J. (2021). *Control de hongos patógenos con Bacillus subtilis y Trichoderma koningii en el cultivo de fresa en condiciones de campo* [Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional CIIDIR MICHOACÁN]. <http://tesis.ipn.mx/handle/123456789/30374>
- Samuels, G. J., Ismaiel, A., Mulaw, T. B., Szakacs, G., Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P., & Jaklitsch, W. M. (2012). The Longibrachiatum Clade of *Trichoderma*: A revision with new species. *Fungal Diversity*, 55, 77-108. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0152-2>
- Sánchez Leon, G. L., & Bustos, A. (2019). Potencial antagónico de cepas de *Trichoderma* spp . , contra patógenos los Cerros Orientales de Bogotá. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 15(2), 107-115. <https://doi.org/https://doi.org/10.18359/rfcb.3899>
- Sánchez Soto, V. (2018). Aislamiento e identificación de bacterias con potencial de biocontrol a *Alternaria* sp., asociadas a *Solanum lycopersicum* [Universidad Nacional de Colombia]. En *Universidad Nacional de Colombia*. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/64242>
- Scudeletti, D., Cruscio, C. A. C., Bossolani, J. W., Moretti, L. G., Momesso, L., Servaz Tubaña, B., de Castro, S. G. Q., De Oliveira, E. F., & Hungria, M. (2021). *Trichoderma asperellum* Inoculation as a Tool for Attenuating Drought Stress in Sugarcane. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.645542>
- Shalaby, M. A., Matter, I. A., Ghariab, M. M., & Darwesh, O. M. (2023). Biosorption performance of the multi-metal tolerant fungus *Aspergillus* sp. for removal of some metallic nanoparticles from aqueous solutions. *Heliyon*, 9(5). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16125>
- Tedersoo, L., & Nilsson, R. H. (2016). Molecular identification of fungi. En *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*. <https://doi.org/10.1002/9781118951446.ch17>
- Wang, R., Yu, X., Yin, Y., Norvienyeku, J., Asad Ali Khan, R., Zhang, M., Ren, S., Chen, J., & Liu, T. (2023). Biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt by *Trichoderma asperellum* FJ035 dependent on antagonism and spatiotemporal competition with *Fusarium oxysporum*. *Biological Control*. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2023.105334>
- Yinmei Liu, Youkun Yang, & Bin Wang. (2022). Entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhiziumanisopliae* play roles of maize (Zeamays) growth promoter. *Applied Soil Ecology*, 188(April). <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2023.104925>
- Zin, N. A., & Badaluddin, N. A. (2020). Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. *Annals of Agricultural Sciences*, 65(2), 168-178. <https://doi.org/10.1016/j.aogas.2020.09.003>

- Zitnick-Anderson, K. K. (2013). *Characterization and identification of Pythium on soybean in North Dakota* [University Of Agriculture and Applied Science]. <https://www.proquest.com/openview/b32f7d43198ee61e34539ba8d7461db8/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750>
- Abd-El-Kareem, F., Elshahawy, I. E., & Abd-Elgawad, M. M. M. (2019). Local Trichoderma strains as a control strategy of complex black root rot disease of strawberry in Egypt. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1). <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0206-7>
- Agricultura, M. de. (2021). Cadena de la fresa en Colombia. *MinAgricultura*, 1–22. [https://sioc.minagricultura.gov.co/Fresa/Documentos/2021-03-31\\_Cifras\\_Sectoriales.pdf](https://sioc.minagricultura.gov.co/Fresa/Documentos/2021-03-31_Cifras_Sectoriales.pdf)
- Arias Cifuentes, E. L., & Piñeros Espinosa, P. A. (2008). *Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestra de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde*. <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8233>
- Arias Tauta, J. K., & Jerez Ramirez, A. del P. (2008). *Elaboración de un atlas para la descripción macroscópica y microscópica de hongos fitopatógenos de interés en especies de flores de corte cultivadas en la Sabana de Bogotá*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Calderon Gomez, L. (2017). *CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA DE COMERCIALIZACIÓN DE LA FRESA EN FRESCO EN LA PROVINCIA DE SOACHA- BOGOTÁ D.C* [Universidad Militar Nueva Granada]. <https://repository.unimilitar.edu.co/handle/10654/6451>
- Cano M.A. (2013). *Estrategias biológicas para el manejo de enfermedades en el cultivo de fresa (Fragaria spp.)*. [https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencias\\_hortícolas/article/view/2240](https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencias_hortícolas/article/view/2240)
- Cruz Coronel, A. (2022). *Control biológico de Fusarium solani resistente a fungicidas con cepas de Trichoderma spp.: Una alternativa agroecológica para el cultivo de fresa en Puebla, México* [Benemérita Universidad Autónoma de Puebla]. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/16423%0A>
- Cruz-Lachica, I., Márquez-Zequera, I., García-Estrada, R. S., Carrillo-Fasio, J. A., León-Félix, J., & Allende-Molar, R. (2017). Identificación de hongos mucorales causantes de la pudrición blanda en frutos de papaya (Carica papaya L.) en México. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 35(3). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1611-3>
- Fernández Barbosa, R. J., & Suárez Mesa, C. L. (2009). Antagonismo in vitro de trichoderma harzianum rifai sobre fusarium oxysporum schlecht f. sp passiflorae en maracuyá (passiflora edulis sims var. flavicarpa) del municipio zona bananera colombiana. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín*. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/37049>
- Gebremariam, A., Chekol, Y., & Assefa, F. (2021). *Caracterización fenotípica, molecular y de virulencia de hongos entomopatógenos Metarhizium.pdf*.
- Hafizi, R., Salleh, B., & Latiffah, Z. (2013). *Morphological and molecular characterization of Fusarium. solani and F. oxysporum associated with crown disease of oil palm*. [www.sbmicrobiologia.org.br](http://www.sbmicrobiologia.org.br)
- Jamil, A. (2021). Antifungal and plant growth promoting activity of Trichoderma spp. Against Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici colonizing tomato. *Journal of Plant Protection Research*, 61(3), 243–253. <https://doi.org/10.24425/jppr.2021.137950>

- Kikot Gabriel. (2012). *SECCIÓN I: Aislamiento e identificación de Fusarium spp. a partir de granos de trigo. Relación entre ocurrencia de la especie y la incidencia de la enfermedad*. <https://es.scribd.com/document/353268950/I-Aislamiento-e-Identificacion-de-Fusarium-Spp-a-Partir-de-Granos-de-Trigo>
- Márquez-Fernández, O., Medel-Ortiz, R., Palestina, E. N., & Belingheri, M. E. (2020). Identificación de dos cepas de *Fusarium* productoras de pigmentos aisladas de *Bemisia* sp. (Hemiptera). *Scientia Fungorum*, 50, e1262. <https://doi.org/10.33885/sf.2020.50.1262>
- Matute Calle, P. (2019). Control Biológico del Moho Gris (*Botrytis cinerea*) en cultivos de Fresa (*Fragaria vesca* L.) mediante hongos filamentosos antagonistas. In *Universidad Politécnica Salesiana*. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/18147/1/UPS-CT008620.pdf>
- Morales Mora, L. Á. (2022). *Estudio de la relación de hongos asociados al cultivo de fresa y su respuesta a la inoculación del bio-gel fúngico a base de Trichoderma sp., in vitro* [BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA INSTITUTO DE CIENCIAS CENTRO DE AGROECOLOGIA]. <https://repositorioinstitucional.buap.mx/items/928e1f86-50a7-445c-b47e-8c06d08f9c2b>
- Morales Mora, L. A., Andrade Hoyos, P., Valencia de Ita, M. A., Romero Arenas, O., Silva Rojas, H. V., & Contreras Paredes, C. A. (2020). Characterization of strawberry associated fungi and in vitro antagonistic effect of *Trichoderma harzianum*. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 38(3). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2005-7>
- Mulatu, A., Megersa, N., Teferi, D., Alemu, T., & Vetukuri, R. R. (2023). Biological management of coffee wilt disease (*Fusarium xylarioides*) using antagonistic *Trichoderma* isolates. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1113949>
- Parraguirre Lezama, C., Romero-Arenas, O., Valencia de Ita, M. D. L. A., Rivera, A., Sangerman Jarquín, D. M., & Huerta-Lara, M. (2023). In Vitro Study of the Compatibility of Four Species of *Trichoderma* with Three Fungicides and Their Antagonistic Activity against *Fusarium solani*. *Horticulturae*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/horticulturae9080905>
- Pastrana, A. M., Basallote-Ureba, M. J., Aguado, A., Akdi, K., & Capote, N. (2016). Biological control of strawberry soil-borne pathogens *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium solani*, using *Trichoderma asperellum* and *Bacillus* spp. *Phytopathologia Mediterranea*, 55(1), 109–120. [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-16363](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-16363)
- Pastrana, A. M., Borrero, C., Pérez, A. G., & Avilés, M. (2023). Soilborne pathogens affect strawberry fruit flavor and quality. *Plant Science*, 326(June 2022). <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111533>
- Pérez-Ortega, E., Rivera-Espinosa, R. A., Saggin-Junior, O. J., & Fernández-Suárez, K. (2023). Effect of pH on the bioprotection exerted by some strains of arbuscular mycorrhizal fungi. *Cultivos Tropicales*, 43(3), p-ISSN. <https://ediciones.inca.edu.cu/index.php/ediciones/article/view/1674>
- Pérez-Rodríguez, L. R., Pérez-Moreno, L., Guzmán-Mendoza, R., Sanzón-Gómez, D., Belmonte-Vargas, J. R., Pérez-Rodríguez, L. R., Pérez-Moreno, L., Guzmán-Mendoza, R., Sanzón-Gómez, D., & Belmonte-Vargas, J. R. (2019). Sensibilidad in vitro de hongos fitopatógenos causantes de enfermedades en fresa a controladores biológicos y fungicidas, en el estado

- de Guanajuato, México. *Acta Universitaria*, 29, 1–11. <https://doi.org/10.15174/AU.2019.2339>
- Picardal, J. P., Danielle, E., Tundag, L., Picardal, M. T., & Goc-Ong, G. B. (2019). *Antagonistic Activity of Metarhizium anisopliae (Metschnikoff) Against Phytopathogenic Fusarium oxysporum f. sp. cubense (Schlecht.) as a Biological Control*. <https://jhe.cnu.edu.ph/index.php/ojs3/article/view/13>
- Pradhan, D. A., Bagagoni, P., & Makandar, R. (2023). Assessing rhizosphere Trichoderma asperellum strains for root colonizing and antagonistic competencies against Fusarium wilt through molecular and biochemical responses in castor. *Biological Control*, 184. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2023.105280>
- Rajani, P., Rajasekaran, C., Vasanthakumari, M. M., Olsson, S. B., Ravikanth, G., & Uma Shaanker, R. (2021). Inhibition of plant pathogenic fungi by endophytic Trichoderma spp. through mycoparasitism and volatile organic compounds. *Microbiological Research*, 242(August 2020), 126595. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126595>
- Rentería-Martínez, M. E., Guerra-Camacho, M. Á., Ochoa-Meza, A., Moreno-Salazar, S. F., Meza-Moller, A. D. C., & Guzmán-Ortiz, J. M. (2018). Descripción y comparación entre morfotipos de Fusarium brachygibbosum, F. falciforme y F. oxysporum patógenicos en sandía cultivada en Sonora, México. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 37(1). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1808-1>
- Retana, K., Adolfo Ramírez-Coché, J., Castro, O., & Blanco-Meneses, M. (2017). *CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE Fusarium oxysporum F. SP. Apii ASOCIADO A LA MARCHITEZ DEL APIO EN COSTA RICA*. [www.mag.go.cr/revagr/index.html](http://www.mag.go.cr/revagr/index.html)[www.cia.ucr.ac.cr](http://www.cia.ucr.ac.cr)
- Santamaría Giraldo, A. B. (2019). *Perfil productivo del municipio de Silvia en el Cauca para el desarrollo y la competitividad territorial de la Región Pacífico* [Universidad Autónoma de Occidente]. <https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/3455320>
- Scudeletti, D., Crusciol, C. A. C., Bossolani, J. W., Moretti, L. G., Momesso, L., Servaz Tubaña, B., de Castro, S. G. Q., De Oliveira, E. F., & Hungria, M. (2021). Trichoderma asperellum Inoculation as a Tool for Attenuating Drought Stress in Sugarcane. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.645542>
- Shalaby, M. A., Matter, I. A., Ghariieb, M. M., & Darwesh, O. M. (2023). Biosorption performance of the multi-metal tolerant fungus Aspergillus sp. for removal of some metallic nanoparticles from aqueous solutions. *Heliyon*, 9(5). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16125>
- Vásquez Cárdenas, J. A. (2010). *Caracterización microbiológica y producción de Trichoderma harzianum Y Trichoderma viride en cultivo artesanal* [Pontificia Universidad Javeriana]. <http://bibliotecavirtualoducal.uc.cl/vufind/Record/oai:localhost:10554-8662>
- Zakariya, N. A., Majeed, S., & Jusof, W. H. W. (2022). Investigation of antioxidant and antibacterial activity of iron oxide nanoparticles (IONPS) synthesized from the aqueous extract of Penicillium spp. *Sensors International*, 3. <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2022.100164>
- Zin, N. A., & Badaluddin, N. A. (2020). Biological functions of Trichoderma spp. for agriculture applications. In *Annals of Agricultural Sciences* (Vol. 65, Issue

2, pp. 168–178). Faculty of Agriculture, Ain-Shams University.  
<https://doi.org/10.1016/j.aoas.2020.09.003>

Zitnick-Anderson, K. K. (2013). *Characterization and identification of Pythium on soybean in North Dakota* [University Of Agriculture and Applied Science].  
<https://www.proquest.com/openview/b32f7d43198ee61e34539ba8d7461db8/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750>