



Patogenicidad, agresividad y carga de inóculo inducidos por dos haplotipos-ITS de *Neopestalotiopsis rosae*, aislados de fresa (*Fragaria x ananassa*) y zarzamora (*Rubus* sp.)

Citalmina Erandy Montes-Hernández¹, Gustavo Mora-Aguilera^{1*}, María Elizabeth Morales-Cortés², Gerardo Acevedo-Sánchez³, Ángel López-Zárate⁴. ¹Postgrado en Fitosanidad. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km. 36.5, Carr. México-Texcoco. C. P. 56230 Texcoco, Edo. Méx., ²ExA-Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carretera Méx. -Tex., Texcoco, Edo. Méx. C. P. 56227., ³CP-LANREF, ⁴Agrícola LOINARA, Los Reyes, Michoacán. Fresno 66. C.P. 60364. México.

***Autor de Correspondencia:**

Gustavo Mora-Aguilera
morag@colpos.mx

Sección:

Edición periódica

Recibido:

14 Junio, 2024

Aceptado:

25 Diciembre, 2025

Publicado:

31 Diciembre, 2025

Adelantada 2026

Cita:

Montes-Hernández CE, Mora-Aguilera G, Morales-Cortés ME, Acevedo-Sánchez G y López-Zárate A. 2026 Patogenicidad, agresividad y carga de inóculo inducidos por dos haplotipos-ITS de *Neopestalotiopsis rosae*, aislados de fresa (*Fragaria x ananassa*) y zarzamora (*Rubus* sp.). Revista Mexicana de Fitopatología 44(1): 110. <https://doi.org/10.18781/R.ME.X.FIT.2406-5>

RESUMEN

Antecedentes/Objetivo. En fresa (*Fragaria x ananassa*), principal frutilla-rosácea en México, se reportó recientemente en Michoacán la ocurrencia de *Neopestalotiopsis rosae* (Ascomycota: Sporocadaceae). El objetivo fue analizar, con un enfoque etiológico-epidemiológico, la implicación de dos haplotipos-ITS de *N. rosae*, asociados a cinco aislados de fresa y zarzamora (*Rubus* sp.) seleccionados por prevalencia regional, en la patogénesis, agresividad y carga de inóculo en fresa cv. San Andreas.

Materiales y Métodos. Tres aislados del Haplotipo 1 / Fresa (H1): F142P40S, F6P35R, F17P34R, y dos del Haplotipo 2 (H2) / Zarzamora: F142D93R y Z13P27R se cultivaron en V8 / 25° / 14 d hasta conidiomas, y en PDA / 25° / 7 d para obtención de inóculo líquido y sólido, respectivamente. Por aislado se evaluaron ocho plantas de fresa cv. San Andreas de tres meses de edad; se inocularon dos hojas trifoliadas / 4 plantas con 4 mL aspersión 1×10^6 conidios mL^{-1} , y 4 plantas con bloques de micelio 5×5 mm por herida en corona. En 8 plantas testigo se asperjó agua estéril. Las plantas se mantuvieron en invernadero semicubierto. A partir de 72 hdi, cada 3 d / 3 meses se midió: Número de lesiones (NL), Diámetro de lesión (DL), Núm. Lesiones esporulantes (LE), Altura planta, Diámetro de corona, y Unidades clorofila SPAD 502 (UC). Por Haplotipo se estimó el *Periodo de Incubación (Pi)*, *Periodo de Latencia (Pl)*, y *Periodo de Generación (Pg)*. Cada 30 min se registró T° y HR con HOBO U23. La patogenicidad se validó con postulados de Koch. Los reaislados H1 y H2 se confirmaron culturalmente y por ITS1/ITS4. ANOVA, en Parcelas Divididas, y Tukey ($p = 0.05$) se ejecutó en RStudio.

Resultados. Los cinco aislados de *N. rosae* fueron más infectivos en **hoja** ($p = 0.0001$), pero exhibieron agresividad variable y significativa ($p = 0.0001$) en NL, LE, y DL, con expresión de lesiones foliares circulares de color café claro, borde oscuro y halo rojizo en haz y envés. Aislados de H1 fueron más patogénicos respecto a H2 (p.e. 3504 vs 270 NL / planta), siendo H1 - F142P40S más agresivo ($p = 0.05$), con promedio de NL = 187.5 y LE = 8.45 a 2 y 26 días después de la inoculación (ddi), respectivamente. En contraste, H2 - F142D93R y H2 - Z13P27R tuvieron NL = 20 y 25 a 87 y 95 ddi, respectivamente, con máximo rango promedio de 0.19 - 0.37 LE > 73 ddi. Análogamente, en **corona** todos los aislamientos fueron patogénicos, pero con menor agresividad y sin diferencia estadística. Se presentó coloración rojiza - oscura y pudrición necrótica interna en corona y menor densidad de raíz. Sobresalió H1 - F17P34R con máximo NL = 20 y LE < 0.1 a 85 ddi. En **hoja**, la velocidad de expresión sintomática y tasa de esporulación, aunque variable, fue mayor en aislados H1 vs H2, determinados, respectivamente, por 2 vs 4 ddi **Pi**, 14 -16 (3 d) vs 33 - 40 (7 d) ddi **Pl**, y 14 - 73 (59 d) vs 33 - 56 (23 d) ddi **Pg**. La infección en **corona** fue más lenta con 28 d **Pi** con ambos haplotipos. La agresividad contrastante entre aislados no tuvo efecto significativo en altura - planta y diámetro - corona, pero sí en reducción de UC con máximo de 14.5 en H1 - F142P40S respecto al testigo. ITS de 33 reaislados permitieron confirmar la patogenicidad de H1 y H2.

Conclusión. A través de NL, LE, UC, **Pi**, **Pl**, y **Pg**, significativamente contrastantes, se demostró la variabilidad patogénica de dos haplotipos-ITS de *N. rosae* prevalentes en Michoacán obtenidos de fresa y zarzamora. Se aborda una novel comprensión mecanística de la patogénesis, y se reporta por primera vez a *N. rosae* asociado a zarzamora con capacidad patogénica en fresa, pero con menor agresividad. Un manejo regional sostenible debe considerar la capacidad variable del hongo y la interacción con otros patógenos con capacidad vascular.

Palabras clave: Berries, Unidades Clorofila, Periodo de incubación, Periodo de latencia, Fisiología



INTRODUCCIÓN

La agroindustria de frutillas o berries en México representan un valor comercial de 3789 millones de dólares y generan una tasa de empleo, directo e indirecto, de las más altas del país (DGSIA, 2025; González *et al.*, 2019). La producción de fresa, primero nacional seguido de la zarzamora, ha mantenido un incremento sostenido con 582992.46 toneladas generadas en 13742.86 has en 2024 (DGSIA, 2025). El sistema productivo de berries se caracteriza por alto dinamismo con cambio constante de variedades, incorporación de innovaciones tecnológicas con fines de rendimiento y un flujo intensivo de planta para renovación de plantaciones, en particular en fresa. Esto ha contribuido al incremento gradual de diversos problemas fitosanitarios en adición a la endémica ‘*secadera*’ causada por un complejo fungoso con prevalencia regional de *Fusarium* spp. y cuyas pérdidas pueden ascender hasta el 50 % (Garay-Serrano *et al.*, 2021; Ceja-Torres *et al.*, 2014; 2001).

En 2017, con carácter epidémico de baja intensidad, se observaron en fresa síntomas no reportados previamente en México consistentes en pudrición de raíz-corona y tizón foliar en plantas jóvenes e inicio de fructificación en Albión, Festival y otras variedades de plantaciones comerciales de Jacona y Zamora, Mich. El primer diagnóstico, incluyendo postulados de Koch, lo realizó Raúl Soto demostrando la implicación de *Neopestalotiopsis* sp., posiblemente *N. rosae*, debido a reportes de esta especie en cv Festival en Egipto (Essa *et al.*, 2018) (R. Soto. 2018. Comunicación Personal, Agroquímica Jacona). Con esta base, varios grupos de investigación iniciaron estudios confirmatorios con énfasis en fresa. Así, Rebollar-Alviter y colaboradores confirmó a *Neopestalotiopsis rosae* (Rebollar-Alviter *et al.*, 2020). Sin embargo, en 2019 ya se había reportado *Pestalotiopsis* sp en cultivo de fresa en Puebla, México (Morales-Mora *et al.*, 2019 y 2020), y previamente en 2005 en *Rosa* sp., otra especie rosácea (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY904051.1/>). En uno de los primeros reportes en berries, este género se reportó en arándano en China asociado a tizón foliar (Luan *et al.*, 2008).

En la más reciente revisión taxonómica de *Pestalotiopsis* (Maharachchikumbura *et al.*, 2014), *Neopestalotiopsis*, junto con *Pseudopestalotiopsis*, emerge como un nuevo género con base en características morfológicas y análisis genómico con LSU (Subunidad Grande del ADN Ribosomal) y multilocus con *Internal transcribed spacer* (ITS), β -*tubulin* (TUB) y *translation elongation factor 1- α* (TEF). Debido a que estos tres géneros comparten conidios de cuatro septas, alargados, rectos o ligeramente curvos con 3-5 apéndices a partir de la célula aplicar hialina, la diferenciación morfológica es con base en la célula conidiógena y en la coloración de las tres células centrales combinado con las regiones génicas ITS, TUB y/o TEF dependiendo del nivel del estudio taxonómico requerido (Maharachchikumbura *et al.*, 2014; 2012), es posible que *Neopestalotiopsis* haya estado presente previo a los primeros reportes epidémicos en fresa en la región de Zamora, México. A partir de la propuesta de Maharachchikumbura y colaboradores *et al.*, 2014),

En 2018 CP-LANREF, a partir de los trabajos de R. Soto, integró a su investigación etiológica-epidemiológica, con énfasis en *Fusarium* y *Trichoderma*, el estatus de *N. rosae* para lo cual realizó un muestreo regional en cultivos de fresa y zarzamora bajo la premisa que *Neopestalotiopsis* no podría estar restringido a fresa, debido a la predominancia de estos cultivos en la vertiente de berries de Michoacán y que posiblemente podría estar asociado con *Fusarium* debido al colapso eventual de la planta similar a ‘*secadera*’. Esta presunción etiológica tiene como fundamento que *Pestalotia*, el género (conidium 5-septas) a partir del cual se derivaron *Pestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis*, y *Pseudopestalotiopsis*

(Maharachchikumbura *et al.*, 2014) incluyen hongos saprofitos, endófitos y parásitos generalmente considerados secundarios asociados a manchas foliares o de frutos de plantas perennes tropicales y subtropicales (Maharachchikumbura *et al.*, 2014 y 2012), sin antecedentes a nivel vascular. Fue hasta recientemente, principalmente en fresa, que se han registrado síntomas a nivel vascular, inducidos pudrición de raíz y corona con eventual tizon foliar y marchitez causados por *N. rosae* (Olivares-Rodríguez *et al.*, 2024; Lawrence *et al.*, 2023; Sun *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2020; Rebollar-Alviter *et al.*, 2020; Essa *et al.*, 2018).

En 2019 se confirmó la presencia de *N. rosae* en fresa y zarzamora con base en estudios morfológicos e ITS (G. Mora. CP LANREF, No Publicado; Montes-Hernández *et al.*, 2021). En este trabajo, el objetivo fue analizar con un enfoque etiológico-epidemiológico, la implicación de dos haplotipos-ITS de *Neopestalotiopsis rosae*, asociados a cinco aislados de fresa (*Fragaria x ananassa*) y zarzamora (*Rubus* sp) seleccionados por prevalencia en la prospección regional de CP-LANREF, en el proceso de patogénesis, agresividad y carga de inóculo en fresa cv. San Andreas. Reportes preliminares de este trabajo se publicaron en Suplemento SMF/RMF (Montes-Hernández *et al.*, 2024a y 2024b).

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen de aislados e identificación de *Neopestalotiopsis rosae*. En 2018, cinco aislamientos representativos se obtuvieron a partir de un diagnóstico epidemiológico extensivo en la región de Los Reyes - Zamora, Michoacán con 44 muestras de tejido y rizosfera. Las muestras se obtuvieron de 18 plantaciones de fresa (*Fragaria x ananassa*) y zarzamora (*Rubus* sp.) y fueron seleccionadas con manejo agrícola contrastante y diferentes variedades cultivadas (CP-LANREF, 2019. No publicado). Los aislados se identificaron morfológica y genómicamente con el gen ITS mediante los procesos moleculares y secuenciación descritos en secciones siguientes (Montes-Hernández *et al.*, 2021). El experimento se realizó en invernadero en condiciones controladas ubicado en Tequila, Jalisco km 15 carr. Guadalajara - Tepic.

Preparación de inóculo. Para inducir el crecimiento de los cinco aislados (H1: F142P40S, F6P35R y F17P34R, H2: F142D93R y Z13P27R) se preparó medio V8 a partir de 150 g de jugo V8 Campbell, 40 g de agar y 1 000 mL de agua desmineralizada + 0.25 g de cloranfenicol después de esterilizar. Por cada aislado se sembraron cinco repeticiones y se incubaron a 25 °C durante 14 días para obtener conidiomas. Se rasparon colonias con agua estéril para remover los conidios. Se tomó 1 mL de la solución, se vertió en un tubo Falcon con 15 mL de agua estéril, se homogenizó y tomó una muestra de 100 µL para contabilizar los conidios hasta obtener la concentración de 1×10^6 conidios por mL. Se obtuvo un total de 16 mL por aislado. Para el inóculo sólido, se emplearon cuadros de micelio de 5 x 5 mm. Los cinco aislados se sembraron en medio PDA (40 g de Potato Dextrosa Agar, 20 g de agar, 1 000 mL agua desmineralizada + cloranfenicol después de esterilizar) con tres repeticiones.

Ensayo de patogenicidad *in vivo* en hojas y corona. La prueba de patogenicidad se realizó en 48 plantas de fresa cv. San Andreas de tres meses de edad trasplantadas en macetas de 1 L con Peatmoss estéril y húmedo. Sobre la corona expuesta se colocó una placa acetato circular con la finalidad de evitar contaminación de micelio y esporas hacia

tejido superior de la planta. Se utilizaron ocho plantas de fresa por aislado (40 plantas); cuatro destinadas a inoculación por aspersión en tejido foliar y cuatro para inoculación por herida en corona. En inoculación por aspersión foliar, se seleccionaron dos hojas trifoliadas por planta. La suspensión de conidios se asperjó sobre los folíolos seleccionados cubriendo totalmente el haz y envés. Por planta se aplicaron 4 mL de suspensión, inmediatamente después se colocó una bolsa de polipapel de 1 kg cubriendo la planta durante tres días, creando un microclima óptimo para garantizar el proceso de infección. Se evaluaron los síntomas visuales sobre el haz y envés, número de lesiones y lesiones esporulantes en cada uno de los folíolos. Se evaluaron en total 144 folíolos.

Para inoculación por herida en corona, se realizó una herida con bisturí estéril, posteriormente se colocó un cuadro de medio con la colonia incrustado con un palillo de madera estéril. En cada planta se evaluó la internalización del hongo observado al realizar el corte longitudinal de la corona. Se emplearon ocho plantas como testigo. La evaluación de experimento inició 72 horas después de la inoculación (hdi) y cada tres días se evaluaron seis variables: Unidades clorofila con SPAD 502 plus (KONICA MINOLTA), altura de planta, diámetro de corona con vernier digital marca (Truper), diámetro de lesión (mm), número de lesiones y número de lesiones esporulantes. Se estimó el *Periodo de Incubación (Pi)*, *Periodo de Latencia (Pl)* y *Periodo de Generación (Pg)* sensu Vanderplank. Además, se registró temperatura (°C) y humedad relativa (HR) con datalogger HOBO U23 Pro V2 configurado para lecturas cada 30 min.

Reaislamiento de *Neopestalotiopsis rosae* y cultivo monospórico. Para finalizar los postulados de Koch, por planta inoculada se seleccionó un folíolo, tallo, corona y raíces con síntomas putativos para realizar cortes de 5 x 5 mm. Cada corte se desinfectó con alcohol 70 % e hipoclorito de sodio al 2 % durante 2 min por cada sustancia, y tres enjuagues con agua desmineralizada estéril. El tejido completamente seco se sembró en cajas de PDA (90 x 15 mm) colocando cinco fragmentos de tejido por caja. Se incubó en cámara bioclimática durante 5 días. Al observar crecimiento de micelio, se transfirió a nuevas cajas (90 x 15 mm) con medio PDA usando agujas de disección y se incubaron hasta la aparición de conidiomas. Para realizar el cultivo monospórico, se tomó parte del conidioma con un asa y se sembró en estría simple en medio Agar-Agua (20 g Agar, 20 mL ácido láctico, 1 L de agua, 0.250 g Cloranfenicol). La purificación de aislados se realizó mediante el método de punta de hifa, transferida a medio PDA y V8 para caracterización cultural. Las siembras se incubaron a 25 °C durante 16 días para favorecer el crecimiento micelial y desarrollo de conidiomas. Los resultados se compararon con estudios preliminares de caracterización de *N. rosae* en cinco medios de cultivo (Montes-Hernández *et al.*, 2021). Se generó un acervo fotográfico de 96 colonias de 16 dds usando cámara Canon EOS Rebel T6. Finalmente, los aislados monospóricos se conservaron en tres métodos: tubos inclinados de PDA en refrigeración a 4 °C, sílica gel y glicerol 10 % en congelador a -20 °C (Mendoza-Ramos *et al.*, 2021).

Extracción de ADN, PCR y secuenciación. Un total de 33 aislados monospóricos de *Neopestalotiopsis rosae*, a partir de los reaislamientos, fueron seleccionados por morfología colonial, fuente de aislamiento y prevalencia de colonia, nueve aislados de raíz, 10 de cuello, ocho de tallo y seis de folíolo. Se realizó la extracción de ADN usando el protocolo CTAB 2 % (Maharachchikumbura *et al.*, 2011) con ligeras modificaciones. Los fragmentos de ADN fueron amplificados usando los iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) / ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.*,

1990) utilizados en análisis multigénicos de este género (Maharachchikumbura *et al.*, 2011). Para PCR punto final, el volumen final del mix de reacción fue 25 μ L [1X de buffer de PCR (10X) INVITROGEN, 1 mM de $MgCl_2$ (INVITROGEN 25mM), 0.50 mM de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP's) PROMEGA, 200 nM de cada iniciador, 0.2 unidades de Platinum® Taq DNA polimerasa (Invitrogen) y 2 μ L de ADN (40 ng μ L⁻¹)]. Las condiciones de PCR en termociclador T-100 de BioRad consistieron en un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 5 min, seguido de 31 ciclos de amplificación a 94 °C por 1 min, 55 °C/1 min y 72 °C/1 min 30 s, y una extensión final a 72 °C/5 min. Los fragmentos amplificados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % y TBE 1X. Una vez confirmada la amplificación del fragmento de interés a 550 pb, los productos de PCR respectivo se secuenciaron con el servicio comercial de MacroGen Inc., Korea (<http://www.magrogen.com>).

Análisis estadístico. En MS Excel 2020, se integró una matriz con 12 variables totales. Se realizaron análisis temporales por variable clasificados por método de inoculación, haplotipo y aislado. En RStudio, se realizó un análisis de varianza en un diseño de parcelas divididas y comparación de medias con Tukey ($p \leq 0.05$), para determinar los efectos del método de inoculación y aislado en el número de lesiones y lesiones esporulantes de *Neopestalotiopsis rosae* sobre *Fragaria x ananassa*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La identificación morfológica y genómica de cinco aislados de *N. rosae*, cuatro de fresa y uno de zarzamora con 100 % de homología se asociaron a *N. rosae* en plantas de *Fragaria x ananassa* cv. San Andreas. Los aislados conformaron dos haplotipos (H), siendo F142P40S, F6P35R y F17P34R pertenecientes al H1; y Z13P27R (aislado de zarzamora) y F142D93R a H2. Los cinco aislados fueron diferencialmente patógenicos a *Neopestalotiopsis rosae* en plantas de *Fragaria x ananassa* cv. San Andreas (Figura 1).

Patogenicidad *in vivo* en hojas y corona. El experimento de patogenicidad en 40 plantas inoculadas y 33 aislados, obtenidos a partir de la prueba de patogenicidad, confirmaron con 100 % de homología a *Neopestalotiopsis rosae*. Por método de inoculación, la aspersión de 1×10^6 conidios mL⁻¹ de *N. rosae* en folíolos de plantas de fresa, exhibió síntomas asociados a lesiones circulares de color café claro con bordes oscuros y un halo rojizo en haz y envés del folíolo (Figura 1A y 1D). Estos síntomas concuerdan con Olivares-Rodríguez *et al.* (2024) en la misma variedad de fresa. En lesiones maduras se observó presencia de acérvulos con esporulaciones densas de conidios (Figura 1B, 1D y 1F). Los testigos absolutos no mostraron signos o síntomas (Figura 1E).

La inoculación por herida con cuadros de micelio colocados a nivel de corona, no mostraron síntomas de necrosis exterior. No obstante, los cortes longitudinales permitieron observar lesiones internas con coloración rojiza y direccionalidad descendente hacia el sistema radicular de la planta (Figura 2). La mayor patogenicidad para ambos métodos de inoculación se mostró con el aislado F142P40S de H1, mientras que F142D93R de H2 indujo mayor daño mediante la inoculación por aspersión. En raíz, se observó cambio de coloración a tono oscuro y clara reducción en la densidad de raíces (Figura 2). En general, no se evidenciaron diferencias cualitativas (características de síntomas) entre aislados; no obstante, la intensidad daño (desarrollo de lesiones y lesiones esporulantes, pérdida de tejido en menor tiempo) si mostró diferencias entre método de inoculación y aislado.

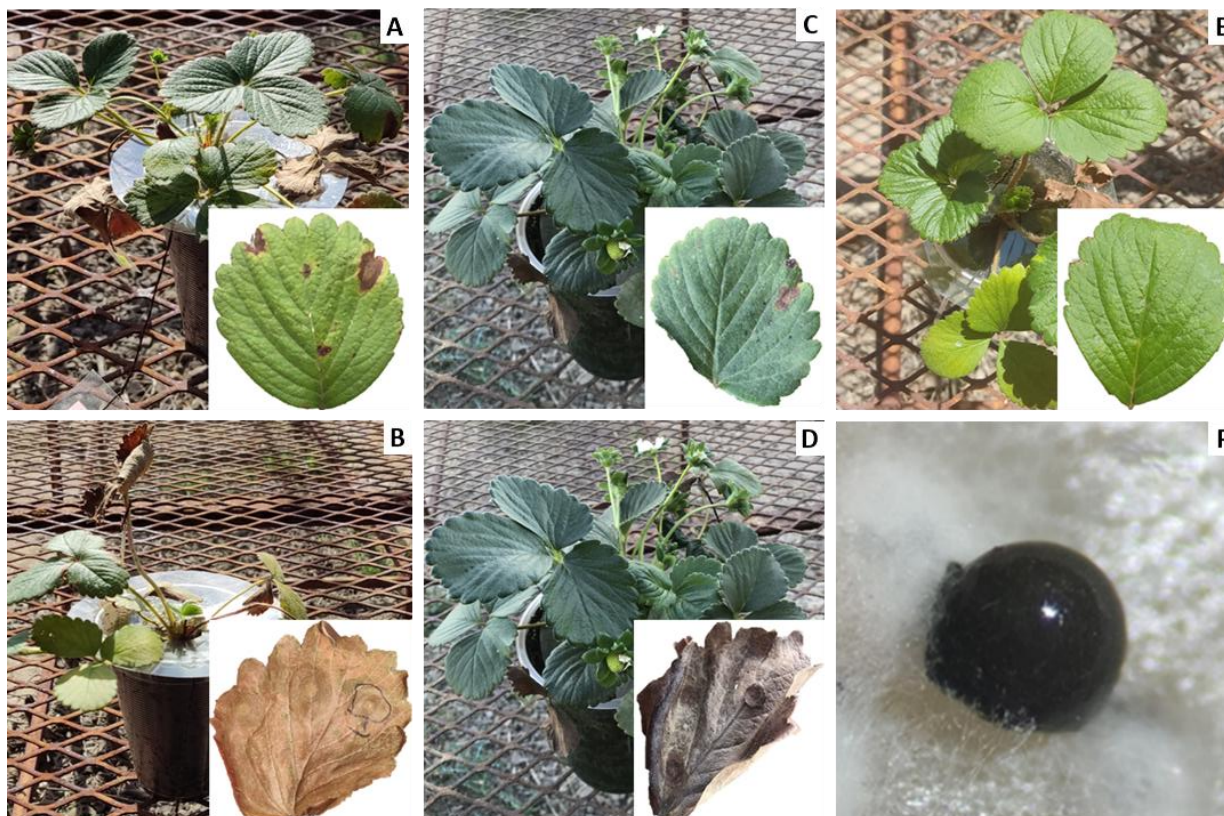


Figura 1. Expresión de lesiones y lesiones esporulantes en hoja de fresa cv. San Andreas inoculadas por aspersión con aislados de *N. rosae*. **A y B.** NL y LE a 21 días después de la inoculación (ddi) con F142P40S. **C y D.** Número de lesiones (NL) y Lesiones esporulantes (LE) a 77 ddi con el aislado Z13P27R **E.** Testigo absoluto, **F.** Conidioma de *N. rosae* en PDA.

Patogénesis de los aislados. El progreso patogénico de aislados de *N. rosae* obtenidos de fresa, en ambos haplotipos, mostraron mayor patogenicidad y daño sobre plantas de *Fragaria x ananassa* cv. San Andreas, incluso en el haplotipo 2 pero con agresividad atenuada (Figura 3). Con respecto al testigo, el H1 representado por el aislado F6P35R fue el más patogénico y severo, con daño máximo y pérdida de folíolos posterior a los 19 ddi, seguido de F142P40S a 40 ddi; y F17P34R un aislado de agresividad moderada-alta con daño foliar máximo después de los 63 ddi (Figura 3). Para el caso de los aislados del haplotipo 2, ambos mostraron patogenicidad con agresividad baja. El aislado de fresa F142D93R fue moderado, alcanzando daño máximo a los 63 ddi. El aislado de zarzamora Z13P27R mostró menor agresividad, posiblemente porque es una cepa aislada de *Rubus* sp., sugiriendo incompatibilidad en el proceso de patogénesis en un hospedero diferente como *Fragaria x ananassa* cv. San Andreas (Figura 3).

La comparación estadística de la agresividad de los aislados mediante número de lesiones (NL) y lesiones esporulantes (LE), mostró efectos de método de inoculación ($p < 0.0001$), aislado ($p < 0.0001$) y su interacción ($p < 0.0001$). La inoculación por aspersión indujo significativamente mayor cantidad de lesiones en los aislados del H1 con respecto al resto. Los aislados H2 en ambos métodos de inoculación y todos los aislados inoculados por herida no mostraron diferencias significativas con respecto al testigo (Figura 4A). Interesantemente, a nivel de esporulación el aislado F142P40S fue estadísticamente más patogénico y agresivo con respecto al resto de aislados para H1 y H2. El aislado F142D93R fue el menos agresivo sin diferencias significativas con respecto a los aislados inoculados por herida (Figura 4B).

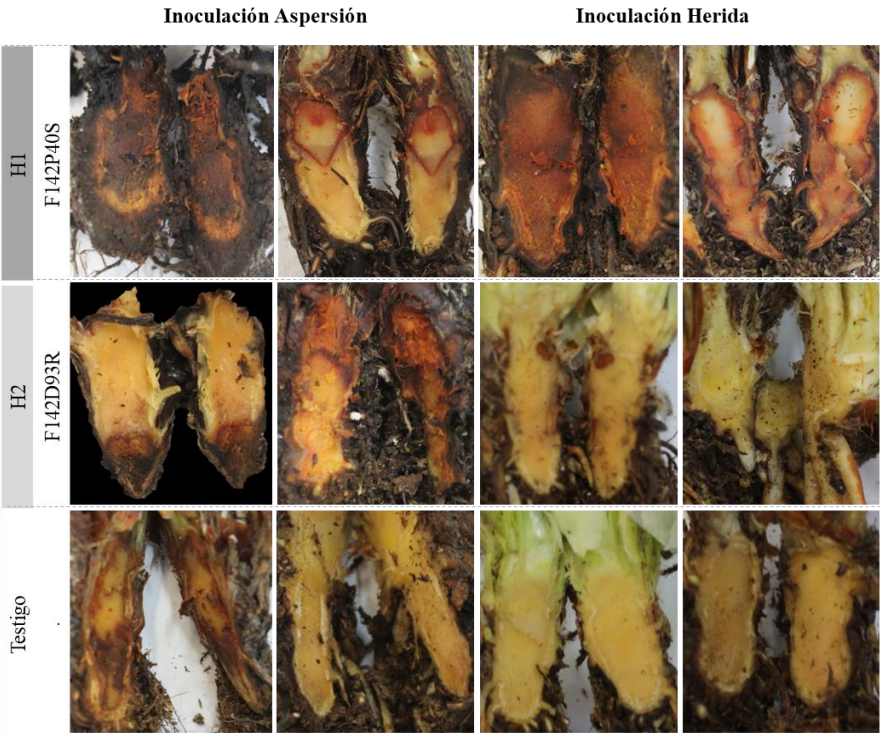


Figura 2. Corte longitudinal de corona de plantas de fresa cv. San Andreas a los 115 ddi inoculadas con *N. rosae*, F142P40S (H1) y F142D93R (H2). En inoculación por herida (B), H1 causó necrosis total. La corona muestra predominantemente cambios en la coloración de café claro a café oscuro-rojizo. En plantas testigo no se detectó cambio de coloración.

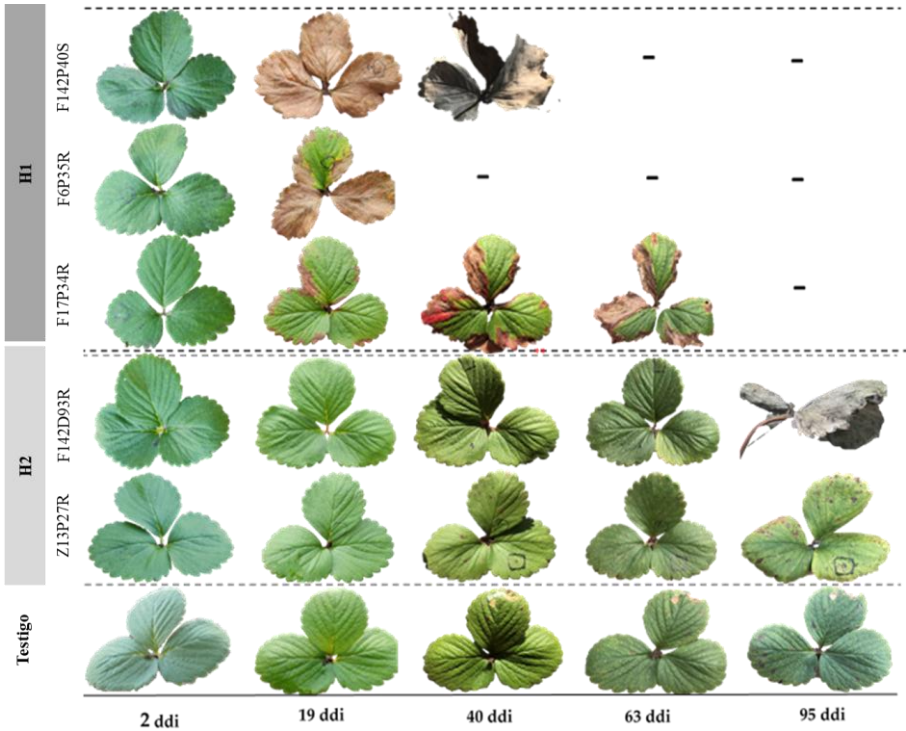


Figura 3. Progreso de lesión en lámina foliar de plantas de fresa cv. San Andreas inoculadas por aspersión con cinco aislados de *N. rosae* correspondientes del haplotipo H1 y H2 a los 2, 19, 40, 63 y 95 ddi. Los guiones representan pérdida de las hojas por deterioro total del tejido causado por la agresividad asociada a cada aislado. Por ejemplo, en F6P35R la pérdida de hojas se alcanza en 40 ddi.

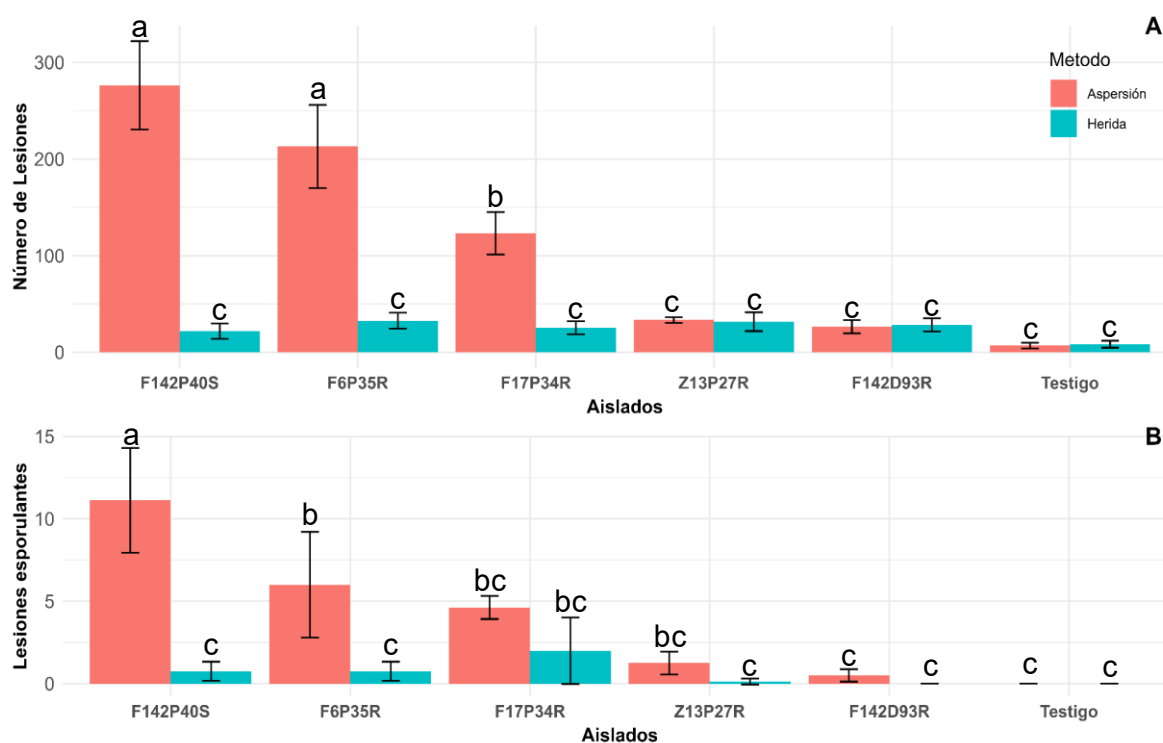


Figura 4. Análisis de varianza (Tukey, $p < 0.05$) en parcelas divididas, donde parcela grande es el método de inoculación y la parcela chica el aislado para las variables número de lesiones (A) y lesiones esporulantes (B). Letras diferentes muestran diferencias significativas con $\alpha = 0.05$.

Dinámica temporal de *Neopestalotiopsis rosae*. La dinámica temporal promedio de cinco aislados asociados a dos haplotipos (H1 y H2) de *N. rosae* fue variable y contrastante en lesiones y esporulación. Las lesiones inducidas por aislados del H1 iniciaron a los 2 ddi con un rango de 50–196 lesiones/planta. Los aislados F17P34R y F6P35R tuvieron incrementos máximos hasta los 7 ddi, posteriormente mostraron una tendencia decreciente hasta 23-75 ddi. Se registró un promedio de 3 504 lesiones/planta para H1 (Figura 5A y 6A). Comparativamente en los aislados de H2, la cantidad de lesiones fueron altamente variables expresándose entre los 2 - 33 ddi con un promedio significativamente menor de 270 lesiones/planta (Figura 5B y 6B).

Los aislados del H1 esporularon con mayor rapidez entre 14 y 16 ddi. Sin embargo, la duración en la producción de esporas fue diferente, p.e., el aislado F17P34R esporuló al menos 30 días más hasta los 75 ddi (Figura 5A y 6A). Los aislados del H2 mostraron mayor tiempo de producción de esporas entre 33 y 47 ddi, y específicamente el aislado Z13P27R tuvo lesiones esporulantes hasta el fin del experimento (Figura 5B y 6B). Las plantas testigo no mostraron síntomas. Integralmente, la dinámica temporal permitió corroborar la patogenicidad-agresividad del H1 asociada a la especialización al tejido de fresa, y la patogenicidad-agresividad moderada-baja del H2 particularmente del aislado obtenido de zarzamora (Z13P27R).

Periodos asociados a la patogénesis de *N. rosae*. La evaluación de número de lesiones (NL) y lesiones esporulantes (LE) permitió determinar el proceso de patogénesis de haplotipos de *N. rosae* a través de la cuantificación de los periodos de incubación (Pi) desde la deposición del inóculo inicial hasta la expresión sintomática; latencia (Pl) desde la deposición del inóculo hasta el inicio de la esporulación; y generación (Pg) desde la

expresión del primer signo hasta el final de esporulación, fueron dependientes de °C y HR (Figura 5 y 6). En la inoculación por aspersión, NL y LE mostraron variabilidad entre aislados. El haplotipo 1 (H1) fue más patogénico y agresivo en ambas variables con niveles máximos en el aislado F142P40S con NL = 187.5 a los 2 ddi y LE = 8.45 a los 26 ddi (Figura 5A). Comparativamente, el H2 mostró niveles máximos NL = 20 a los 87 ddi con el aislado F142D93R, y LE = 0.37 a los 89 ddi en el aislado Z13P27R (Figura 5B).

Notoriamente, umbrales de °C = 21.8 – 26.1 y HR = 65.2 – 92.01 fueron condiciones más inductivas para H1 en el periodo de 2 hasta 58 ddi; mientras que °C = 18.2 – 21.9 y HR < 64.9 fueron condiciones óptimas para H2 desde 61 hasta 100 ddi (Figura 5C). La asociación de periodos del proceso de patogénesis fue **Pi** = 2 ddi, **Pl** = 14 – 16 ddi, y **Pg** = 12 – 59 ddi en H1, notablemente más agresivo comparado con **Pi** = 4 ddi, **Pl** = 37 – 47 ddi, y **Pg** = 44 – 46 ddi en H2 (Figura 5D).

En la inoculación por herida en corona, NL y LE mostraron baja variabilidad entre aislados. La aparición de síntomas se retrasó respecto a la inoculación por aspersión. El aislado F142P40S (H1) fue el más patogénico y agresivo con el nivel más alto NL = 15.66 a los 87 ddi y LE = 0.33 a los 68 ddi (Figura 6A). Relativamente, el aislado de zarzamora Z13P27R (H2) mostró los niveles máximos NL = 24.22 a los 79 ddi y LE = 0.046 a los 68 ddi (Figura 6B). Los umbrales de °C = 18.4 – 24.8 y HR = 52.8 – 82.7 fueron condiciones más inductivas para H1 en el periodo de 26 hasta 93 ddi; condiciones de temperatura similares fueron inductivas para la expresión de lesiones de aislados H2. Sin embargo, no favorables para el desarrollo de lesiones esporulantes (Figura 6C).

La asociación de periodos del proceso de patogénesis fue **Pi** = 28 ddi, **Pl** = 30 – 42 ddi, y **Pg** = 40 – 69 ddi en H1, notablemente más agresivo y estable comparado con **Pi** = 28 ddi, **Pl** = 68 ddi, y **Pg** = 11 en H2; presenta el periodo de latencia más amplio (Figura 6D). Estudios de *N. rosae* sugieren que en condiciones de laboratorio 25 °C son favorables para crecimiento de micelio y expresión de conidiomas como se observó en el caso de los aislados del haplotipo 1 (Maharachchikumbura *et al.*, 2014). En campo la expresión de síntomas en plantas de fresa cv Albión se reportó entre 23-27 °C con alta humedad relativa (> 80 %) en condiciones de macro túneles (Rebollar-Alviter *et al.*, 2020).

Mundialmente, no se reportan estudios que determinen integralmente el ciclo de patogénesis de *N. rosae*. Algunos estudios se infieren resultados de **Pi**, por ejemplo, Rotondo y colaboradores (2023) en fresa cv. Cabrillo de cuatro semanas de edad e inóculo a concentración de 1×10^4 conidios mL⁻¹, registraron lesiones a 5 ddi; mientras que Wu y colaboradores (2020), en la variedad de fresa Xiang-shui en la etapa de tres a cuatro hojas y concentración de 1×10^6 conidios mL⁻¹ reportaron aparición del primer síntoma visual a los 10-14 ddi. Lo anterior sugiere que tanto patogénicidad y agresividad son atributos dependientes del cultivar, carga de inóculo (concentración conidios mL⁻¹) e inductividad climática. Este es el primer trabajo donde se estiman los tres periodos de patogenicidad asociados *Neopestalotiopsis rosae* en fresa cv. San Andreas, variedad de amplia cultivación en México por atributos como fruto de calidad, sabor y tolerancia a enfermedades (Eurosemillas, 2022).

Efecto de inoculación de *N. rosae* en características fisiológicas. Las variables fisiológicas evaluadas no mostraron cambios significativos durante el proceso de infección de *N. rosae* desde el periodo de incubación y latencia (2 - 14 ddi). La altura redujo entre 0 – 2.1 cm atribuible a la pérdida de hoja evaluable, incluso en el testigo. El diámetro de la corona mostró incrementos constantes de 0 – 0.2 cm sin diferencia significativa por método de inoculación o aislado (Cuadro 1).

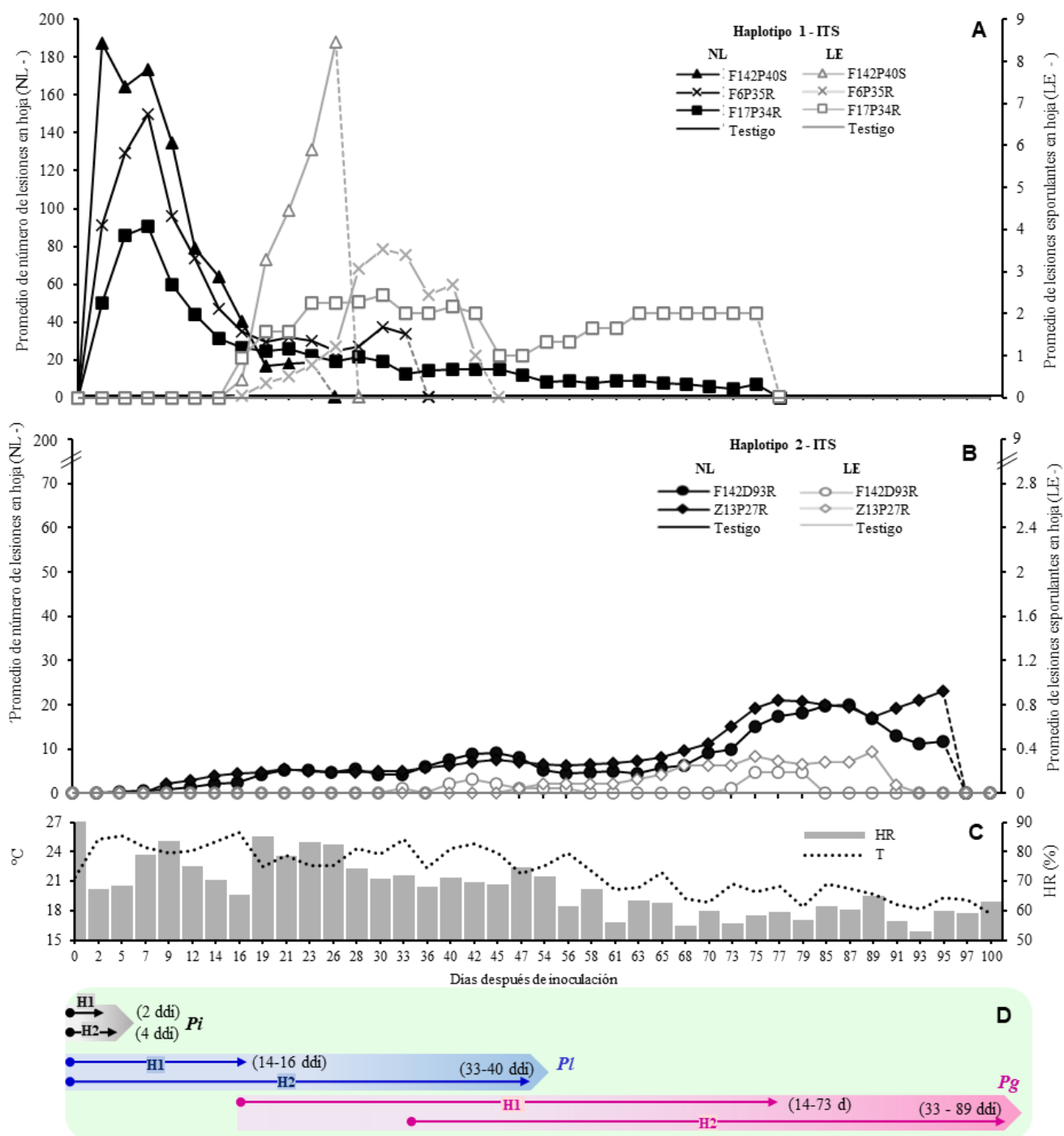


Figura 5. Dinámica de número de lesiones (NL) y lesiones esporulantes (LE) en hojas de fresa cv. San Andreas hasta 95 días por aspersión con cinco aislados de *N. rosae* obtenidos de fresa (F) y zarzamora (Z), **A.** Promedio absoluto de NL y LE de tres aislados del Haplotype 1 (H1). **B.** Promedio absoluto de NL y LE en dos aislados del Haplotype 2 (H2), **C.** Asociación de HR y T °C con el comportamiento del hongo sobre tejido hasta 100 días **D.** Estimación de periodo de incubación (Pi), periodo de latencia (Pl) y periodo de generación (Pg) por haplotipo de *N. rosae*.

Las unidades clorofila (UC) como atributo importante de seguimiento para determinar el estrés por factores bióticos o abióticos durante las tres etapas fenológicas; vegetativa, reproductiva y maduración debido a la pérdida de nitrógeno, clorosis asociada a deficiencias nutrimentales o presencia de patógenos (Vishwakarma, *et al.*, 2023). En el experimento, la mayor pérdida de UC ocurrió en aislados más patogénicos y agresivos. Los cuales causaron reducción de 2.1 a 14.5 UC, en comparación con aislados de agresividad moderada o atenuada que mostraron UC < 2.1.

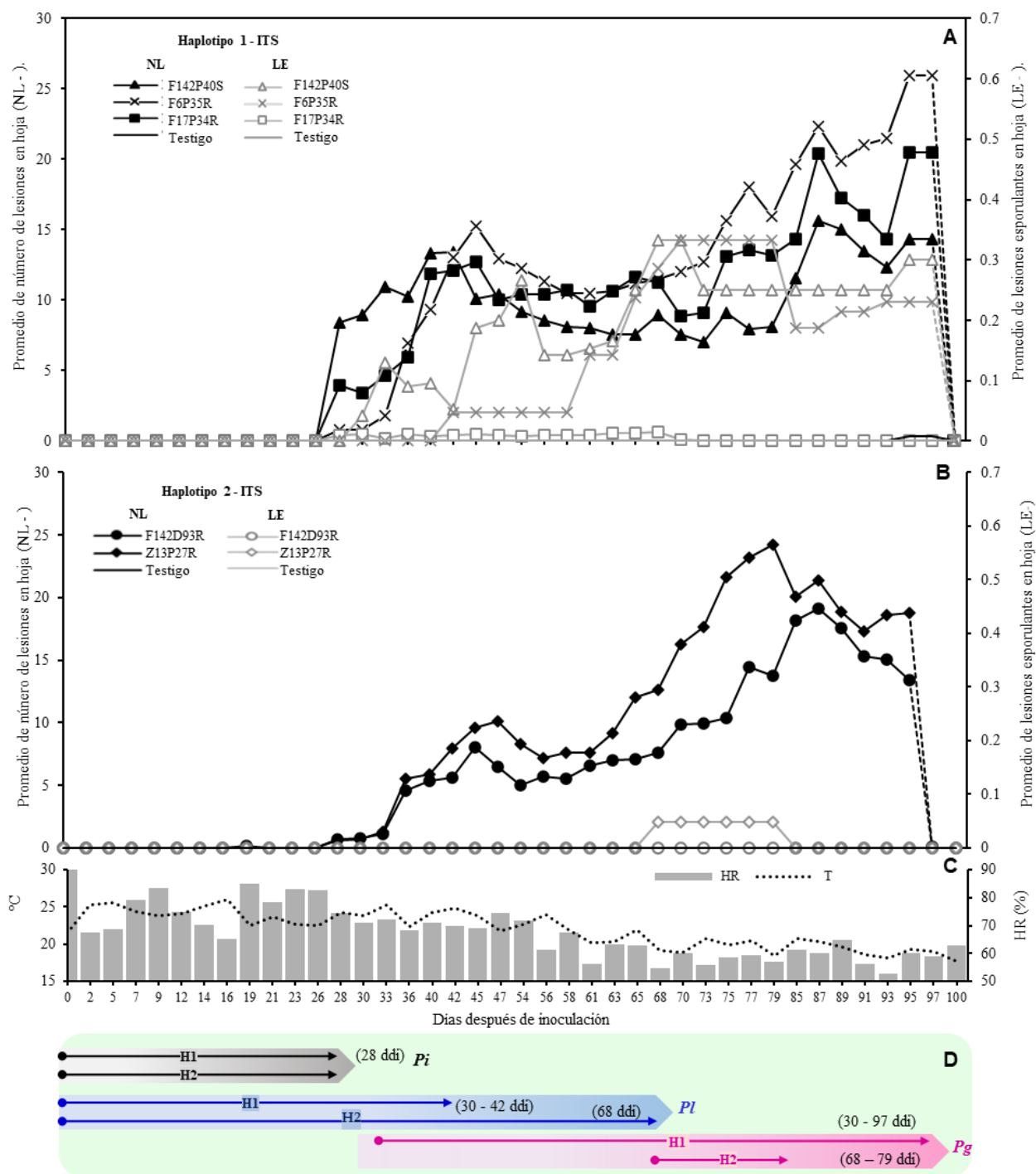


Figura 6. Dinámica de lesiones (NL) y lesiones esporulantes (LE) en hoja hasta 95 ddi por herida en corona con cinco aislados de *N. rosae* obtenidos de fresa (F) y zarzamora (Z), **A.** Promedio absoluto de NL y LE de tres aislados del H1, **B.** Promedio absoluto de NL y LE de dos aislados del H2, **C.** Asociación de HR y T °C con el comportamiento del hongo sobre tejido hasta 100 días, **D.** Estimación de periodo de incubación (Pi), periodo de latencia (Pl) y periodo de generación (Pg) por haplotipo de *N. rosae*.

Estos resultados sugieren efecto patogénico de aislados *N. rosae* en concentración de clorofila evidenciado por el amarillamiento, clorosis e incremento de lesiones necrosadas a nivel de tejido foliar (Cuadro 1). El proceso patogénico de *N. rosae* promueve alteraciones fisiológicas causando pérdidas en la productividad. La disminución UC puede ser variable según tipo de inoculación empleada sobre tejido (de Souza Marques *et al.*, 2024).

Cuadro 1. Promedio de Unidades clorofila (UC), altura de planta y diámetro de corona en plantas de fresa cv. San Andreas inoculadas por aspersión y herida con cinco aislados de *N. rosae*.

Inoculación	Haplotipo	ID	Periodo de incubación 2 ddi			Periodo de latencia 14 ddi		
			U.C	Altura (cm)	Diámetro de corona (cm)	U.C	Altura (cm)	Diámetro de corona (cm)
Aspersión	H1	F142P40S	43.8	16.5	0.9	29.3	14.4	1.1
		F6P35R	41.5	15.8	0.7	34.0	15.6	1.0
		F17P34R	40.5	13.5	0.6	37.0	13.1	0.9
	H2	F142D93R	41.1	15.8	0.8	40.2	16.2	1.0
		Z13P27R	40.0	15.3	0.8	38.0	15.3	1.0
		.	40.8	13.7	0.9	40.0	15.3	1.1
Herida	H1	F142P40S	41.3	17.2	0.9	40.8	17.4	1.1
		F6P35R	49.6	16.8	0.9	43.6	16.8	1.1
		F17P34R	41.3	15.8	0.8	39.2	15.3	1.1
	H2	F142D93R	42.4	16.0	1.1	40.3	16.6	1.1
		Z13P27R	37.8	17.4	0.8	36.1	17.7	0.9
		.	39.0	15.1	0.8	36.7	14.0	0.9

Reaislamiento y caracterización cultural de *N. rosae*. Se realizaron un total de 374 reaislamientos derivado de las pruebas de patogenicidad. Las siembras en medio PDA de tejidos hoja (100), tallo (86), corona (96) y raíz (92), mostraron en promedio crecimiento micelial después de la siembra (5-7 días). Las colonias mostraron micelio aéreo amarillento y otros blanquecinos, crecimiento rosetado, incluso bordes ondulados. Todas los aislados produjeron acérvulos de color negro sobre la colonia e inmersos en el medio de cultivo.

En general, el mayor porcentaje de UFC *Neopestalotiopsis rosae* fue contabilizado en corona con 34 %, seguido de raíz con 31 % y en menor proporción en hoja y tallo con 21 y 14 %, respectivamente. En el testigo no se contabilizaron UFC del hongo. Interesantemente, en el método por aspersión donde el inóculo fue depositado sobre el tejido aéreo, la mayor concentración de inóculo se contabilizó en corona (UFC = 44) y raíz (UFC = 38). Comparativamente, en la inoculación por herida, también se contabilizó la mayor carga de inóculo en corona (UFC = 83) y raíz (UFC = 88), y notablemente menor en hojas (UFC = 20) y tallos (UFC = 29). Lo anterior sugiere especialización parasítica del organismo principalmente en tejido de raíz, corona y tallo, como se ha documentado para los géneros *Pestalotiopsis*, *Pseudopestalotiopsis* y *Neopestalotiopsis* (Maharachchikumbura *et al.*, 2011).

De un total de 92 reaislamientos preliminares, se seleccionaron 33 (17 del haplotipo 1 y 16 del haplotipo 2) para caracterización cultural y molecular, mediante criterios de representatividad del aislado, método de inoculación y tipo de tejido. Además, aspectos morfológicos de la colonia; color, tipo de micelio, forma de crecimiento y producción de conidiomas. La caracterización cultural tuvo una duración total 16 ddi, de los cuales 12 días fueron para garantizar crecimiento homogéneo y 4 días para desarrollo de conidiomas en medio. El crecimiento en medio de PDA, según lo descrito por Maharachchikumbura *et al.* (2014), confirmó la variabilidad fenotípica y genómica (Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2020). Los cambios fueron notables en la morfología colonial; micelio aéreo con crecimiento plano y radial, mayor producción de conidiomas y pigmentación del medio de cultivo a una coloración naranja. Algunas especies de *Neopestalotiopsis* pueden producir metabolitos que inducen cambio de coloración del medio de cultivo (Jeewon *et al.*, 2002). Esto pudo estar implicado en este trabajo.

La caracterización molecular se corroboró por la amplificación de banda a 550 pb. Los resultados de secuenciación se compararon con las secuencias reportadas en el banco de genes (NCBI). Se consideró el porcentaje de identidad y cobertura >95 %. El gen ITS permitió identificar a los aislados a nivel especie. Sin embargo, al ser un gen universal y conservado, es menos informativo, representa baja diversidad de haplotipos y restringe la distribución. Además, dan lugar a una resolución y una ubicación de taxones deficientes en el árbol de máxima verosimilitud consensuado (Ramdial *et al.*, 2016). De esta manera, este gen no está asociado a la patogenicidad y agresividad. Se sugiere realizar un estudio con otros genes que permitan obtener información genética robusta.

CONCLUSIONES

A través de NL, LE, UC, **Pi**, **Pl**, y **Pg**, significativamente contratantes, se demostró la variabilidad patogénica de dos haplotipos-ITS de *N. rosae* prevalentes en Michoacán obtenidos de fresa y zarzamora. Se aborda una novel comprensión mecanística de la patogénesis, y se reporta por primera vez a *N. rosae* asociado a zarzamora con capacidad patogénica en fresa, pero con menor agresividad. Un manejo regional sostenible debe considerar la capacidad variable del hongo y la interacción con otros patógenos con capacidad vascular.

Limitaciones

Esta investigación se desarrolló con fresa var. San Andreas y un número limitado de aislados del hongo. El comportamiento patogénico de potenciales aislados del hongo en otras variedades puede diferir a los resultados encontrados en este trabajo.

Conflicto de interés. Este trabajo se ejecutó sin conflictos de interés.

Financiamiento. Al COLPOS por el apoyo logístico y financiero.

Agradecimientos

A Dario Isauro, de la empresa SEDECOM, y al personal técnico de Giddings por apoyo logístico en la región productora de berries, Michoacán. Al equipo CP-LANREF por su apoyo experimental y muestreo de campo. A Coral Mendoza Ramos por guía en la ejecución del proyecto.

Contribución de los autores

EMH y **EMG**, muestreo, planeación y ejecución experimental, primer borrador de publicación; **GMA**, concepción, muestreo en campo, análisis y escritura final. **GAS**, análisis estadístico, muestreo, **ALZ**, logística de campo.

REFERENCIAS

- Ceja-Torres L, Mora-Aguilera G and Mora-Aguilera A. 2014. Agronomical management influence on the spatiotemporal progress of strawberry dry wilt in Michoacan, Mexico. African Journal of Agricultural Research 9: 513-520. DOI: 10.5897/AJAR2014.8488
- Ceja-Torres L, Mora-Aguilera G, Téliz D, Mora-Aguilera A, Sánchez-García P, *et al.* 2008. Fungi prevalence and etiology of strawberry dry wilt under different management systems. Agrociencia 42: 451-461. <https://www.agrociencia-colpos.org/index.php/agrociencia/article/view/644/644>

- De Souza Marques M, Vitorino LC, Rosa M, Dário B, Silva FG, *et al.* 2024. Leaf physiology and histopathology of the interaction between the opportunistic phytopathogen *Fusarium equiseti* and *Gossypium hirsutum* plants. European Journal Plant Pathology 168: 329–349. <https://doi.org/10.1007/s10658-023-02759-z>
- Essa TA, Kamel SM, Ismail AM, and El-Ganainy SM. 2018. Characterization and chemical control of *Neopestalotiopsis rosae* the causal agent of strawberry root and crown rot in Egypt. Egyptian Journal of Phytopathology ID 221858557. <https://doi.org/10.21608/EJP.2018.87411>
- Eurosemillas 2020. San Andreas, Principales Características. <https://short.do/voJ6XO>.
- Garay-Serrano E, Cruz-Esteban S, Fernandez-Pavia S, Alvarado G and Gómez-Dorantes N. 2021. Pathogenic microorganisms infecting berries in Mexico. International Journal of Agriculture and Biology 25(5): 1007-1015. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.1758>
- González F, Rebollar S, Hernández J, Morales L y Ramírez O. 2019. Situación actual y perspectivas de la producción de berries en México. Revista Mexicana de Agronegocios. <https://www.redalyc.org/journal/141/14161295012/14161295012.pdf>
- Jeewon R, Liew EC and Hyde KD. 2002. Phylogenetic relationships of Pestalotiopsis and allied genera inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. Molecular Phylogenetics and Evolution 25(3): 378 - 392. [https://doi.org/10.1016/s1055-7903\(02\)00422-0](https://doi.org/10.1016/s1055-7903(02)00422-0).
- Krugh B, Bichham L and Miles D. 1994. The solid-state chlorophyll meter, a novel instrument for rapidly and accurately determining the chlorophyll concentrations in seedling leaves. Maize genetics cooperation. News Letter 68: 25 - 27.
- Maharachchikumbura SSN, Guo LD, Chuksatirote E, Bahkali AH and Hyde KD. 2011. Pestalotiopsis morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. Fungal Diversity 50:167-187. <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0125-x>
- Maharachchikumbura SSN, Hyde KD, Groenewald JZ, Xu J and Crous PW. 2014. Pestalotiopsis revisited. Studies in Mycology 79: 121 - 186. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.005>
- Maharachchikumbura SSN, Guo LD, Cai L, Chuksatirote E, Wu WP, *et al.* 2012. A multi-locus backbone tree for Pestalotiopsis, with a polyphasic characterization of 14 new species. Fungal Diversity 56: 95 – 129. DOI 10.1007/s13225-012-0198-1
- Lawrence DP, Brittain GD, Aglave B, and Sances FV. 2023. First Report of Neopestalotiopsis rosae causing crown and root rot of strawberry in California. Plant Disease 107: 566. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-22-0871-PDN>
- Luan YS, Shang ZT, Su Q, Feng L, and An LJ 2008. First report of a Pestalotiopsis sp. causing leaf spot of blueberry in China. Plant Disease 92:171. doi: 10.1094/PDIS-92-1-0171A
- Manzo SG, Guzmán GS, Rodríguez GM, James A y Orozco SM. 2005. Biología de Mycosphaerella fijiensis Morelet y su interacción con Musa spp. Revista Mexicana de Fitopatología 23:122 - 131.
- Mendoza-Ramos C, Mora-Aguilera G, Coria-Contreras JJ, Santana-Peñaloza B, Acevedo-Sánchez G, Martínez-Bustamante VI, Gutierrez-Espinosa MA and Rubio-Cortés R. 2021. Fusarium spp. and inoculum load estimation associated to comercial Agave tequilana offsets at different regional epidemic inductivity levels. Mexican Journal of Phytopathology 39(1): 1 - 18. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2006-8>
- Morales-Mora LA, Andrade-Hoyos P, Valencia-de Ita MA, Romero-Arenas O, Silva-Rojas HV, *et al.* 2020. Characterization of strawberry associated fungi and in vitro antagonistic effect of Trichoderma harzianum. Mexican Journal of Phytopathology 38: 434-449. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2005-7>
- Morales-Mora LA, Martínez-Salgado SJ, De Ita MAV, Andrade-Hoyos P, Silva-Rojas HV, *et al.* 2019. First report of leaf spot and anthracnosis caused by Pestalotiopsis sp. on strawberry in Puebla, Mexico. Plant Disease <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-19-1010-PDN>
- Montes-Hernández CE, Acevedo-Sánchez G, y Mora-Aguilera G. 2024a. Patogenicidad, agresividad y carga de inóculo de dos haplotipos-ITS de Neopestalotiopsis rosae en fresa (Fragaria x ananassa) cv. San Andreas. Revista Mexicana de Fitopatología 42s:105 pp. <https://proulrs.link/Ahp06z>
- Montes-Hernández CE, Campos-Cruces AA, Acevedo-Sánchez G y Mora-Aguilera G. 2024b. Patogenicidad, agresividad y carga de inóculo de dos haplotipos-ITS de Neopestalotiopsis rosae en zarzamora (Rubus sp.) cv. Madeline. Revista Mexicana de Fitopatología 42s: 106 pp. <https://proulrs.link/I9nrtt>
- Montes-Hernández CE, Morales-Cortés ME, Campos-Cruces AA, Mendoza-Ramos C, Martínez-Bustamante VI, *et al.* 2021. Caracterización morfológica de Neopestalotiopsis sp. en cinco medios de cultivo. Revista Mexicana de Fitopatología 39s: 106 pp. https://www.rmfm.smf.org.mx/suplemento/suplemento392021/VS392021_2.pdf
- Olivares-Rodríguez G, Angeles-Núñez JG, Mondragón-Rojas F, Rivas-Valencia P, *et al.* 2024. Control in vitro de Neopestalotiopsis sp. aislada de fresa empleando Trichoderma y fungicidas comerciales. Revista Mexicana de Fitopatología 42(4): 52. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2024-28>

- Ramdial H, Latchoo RK, Hosen FN and Rampersad SN. 2016. Phylogeny and haplotype analysis of fungi within the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex. *Phytopathology* 107: 109 - 120. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-16-0209-R>
- Rebollar-Alviter A, Silva-Rojas H, Fuentes-Aragón D, Acosta-González U, Martínez-Ruiz M. *et al.*, 2020. Una enfermedad fúngica emergente de la fresa asociada con la pudrición de la raíz, la pudrición de la corona y la mancha foliar causada por *Neopestalotiopsis rosae* en México. *Plant Disease* 104 (8). <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-19-2493-SC>.
- Rodríguez-Gálvez E, Hilário S, Lopes A and Alves A. 2020. Diversity and pathogenicity of *Lasiodiplodia* and *Neopestalotiopsis* species associated with stem blight and dieback of blueberry plants in Peru. *European Journal of Plant Pathology* 157: 89-102. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-01983-1>
- Rotondo F, Klass TL, Scott K, McCarteney M, Jacobs MJ, *et al.* 2023. First Report of *Neopestalotiopsis* disease in Ohio caused by an emerging and novel species of *Neopestalotiopsis* on strawberry. *Plant Disease* 107:940(3). <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-22-0400-PDN>
- Sun Q, Harishchandra D, Jia J, Zuo Q, Zhang G, *et al.* 2021. Role of *Neopestalotiopsis rosae* in causing root rot of strawberry in Beijing, China. *Crop Protection* 147: 105710. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105710>
- DGSIAP. 2025. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Consulta, diciembre 2025. https://nube.agricultura.gob.mx/cierre_agricola/
- Vishwakarma M, Kulhare PS and Tagore GS. 2023. Estimation of chlorophyll using SPAD. *International Journal of Environment and Climate Change*. 13: 1901-1912. 10.9734/IJECC/2023/v13i113348.
- White T J, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. 315–322 pp. *In*: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego. USA. <https://nature.berkeley.edu/brunslab/papers/white1990.pdf>
- Wu HY, Tsai CY, Wu YM, Ariyawansa HA, Chung CL, *et al.* 2020. First report of *Neopestalotiopsis rosae* causing leaf blight and crown rot on strawberry in Taiwan. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-20-1045-PDN>
- Wu HY, Tsai CY, Wu YM, Ariyawansa HA, Chung CL, *et al.* 2020. First report of *Neopestalotiopsis rosae* causing leaf blight and crown rot on strawberry in Taiwan. *Plant Disease e-Xtra*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-20-1045-PDN>