

Characterization of strawberry associated fungi and *in vitro* antagonistic effect of *Trichoderma harzianum*

Caracterización de hongos asociados al cultivo de fresa y efecto antagonista *in vitro* de *Trichoderma harzianum*

Luis Angel Morales-Mora, Petra Andrade-Hoyos, M. Angeles Valencia-de Ita, Omar Romero-Arenas*, Centro de Agroecología, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, San Pedro Zacachimalpa, 72960, Puebla, México; Hilda Victoria Silva-Rojas, Producción de Semillas, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México, México; Carlos A. Contreras-Paredes, Jardín Botánico Universitario, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla Colonia San Manuel, 72590 Puebla, Puebla, México. *Autor para correspondencia: biol.ora@hotmail.com

Recibido: 26 de Mayo, 2020.

Aceptado: 14 de Agosto, 2020.

Morales-Mora LA, Andrade-Hoyos P, Valencia-de Ita MA, Romero-Arenas O, Silva-Rojas HV and Contreras-Paredes CA. 2020. Characterization of strawberry associated fungi and *in vitro* antagonistic effect of *Trichoderma harzianum*. Mexican Journal of Phytopathology 38(3): 434-449.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2005-7

Primera publicación DOI: 25 de Agosto, 2020.

First DOI publication: August 25, 2020.

Resumen. México es el tercer productor de fresa a nivel mundial, donde la producción de este cultivo es de importancia económica y generación de divisas en el país. El objetivo de la presente investigación fue identificar y caracterizar morfológicamente los hongos asociados a enfermedades en un cultivo de la fresa, así como determinar la capacidad antagónica *in vitro* de la cepa T-H4 de

Abstract. Mexico is the third largest strawberry producer in the world, where the production of this crop is of economic importance and generates foreign exchange in the country. The objective of the present investigation was to identify and morphologically characterize the fungi associated with a commercial strawberry field, as well as to determine the *in vitro* antagonistic capacity of the T-H4 strain of *Trichoderma harzianum* in isolated fungi. Samples of plants from the strawberry crop with fungal symptoms were collected, sown in PDA medium and monosporic cultures were generated for their morphological characterization. The identified fungi and the strain T-H4 were compared in a dual way. Were identified and characterized three fungi associated with the fruit (*A. niger*, *Colletotrichum* sp. and *R. stolonifer*), three on leaves and stem (*Pestalotiopsis* sp., *Curvularia* sp. and *Alternaria* sp.) and two associated fungi on the root (*Rhizoctonia* sp. and *Fusarium* sp.). The T-H4

Trichoderma harzianum con los hongos identificados. Se colectaron muestras de plantas del cultivo de fresa con síntomas de enfermedades fúngicas, se sembraron en medio PDA y se generaron cultivos monospóricos para su caracterización morfológica. Los hongos identificados y la cepa T-H4 se confrontaron mediante cultivos duales. Se identificaron tres hongos asociados al fruto (*A. niger*, *Colletotrichum* sp. y *R. stolonifer*), tres en hojas y tallo (*Pestalotiopsis* sp., *Curvularia* sp. y *Alternaria* sp.) y dos hongos asociados a la raíz (*Rhizoctonia* sp. y *Fusarium* sp.). La cepa T-H4 presentó un nivel antagónico adecuado para *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp. y *Curvularia* sp., *in vitro*. Se sugiere realizar evaluaciones de control biológico con estos aislamientos en invernadero y a campo abierto, así como determinar su patogenicidad.

Palabras clave: Antagonismo, identificación taxonómica, crecimiento micelial, inhibición.

El cultivo de fresa (*Fragaria* × *ananassa*) está ampliamente distribuido en el mundo debido a su diversidad genotípica, naturaleza altamente heterocigótica y amplia gama de adaptaciones ambientales (Vikas-Kumar y Anil, 2019). En México, los estados de Jalisco, Tlaxcala, Michoacán, Baja California (Norte y Sur) y Guanajuato son los principales productores, pues aportan el 99% de la producción nacional. El estado de Puebla se posiciona en el noveno lugar de producción de fresa (SIAP, 2019). A pesar de su importancia, el cultivo presenta problemas fitosanitarios causados en su mayoría por hongos. Por mencionar algunos, se resaltan a *Fusarium solani* (Baiswar y Ngachan, 2018), *Pestalotiopsis* sp. (Morales-Mora *et al.*, 2019), *Curvularia inaequalis*, *C. spicifera* (Ayoubi *et al.*, 2017), *Colletotrichum fragariae*, *C. acutatum*

strain presented an antagonistic level suitable for *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp. and *Curvularia* sp., *in vitro*. It is suggested to carry out biological control evaluations with these isolates in the greenhouse and in the open field, as well as to determine their pathogenicity.

Key words: Antagonist, taxonomic identification, mycelial growth, inhibition.

The planting of strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) is widely distributed in the world due to its genotypic diversity, its highly heterozygotic nature, and the wide range of environmental adaptations (Vikas-Kumar and Anil, 2019). In Mexico, the states of Jalisco, Tlaxcala, Michoacán, Baja California, Baja California Sur and Guanajuato are the main producers, providing 99% of the country's production. The state of Puebla is ninth in strawberry production (SIAP, 2019). Despite its importance, the crop presents phytosanitary problems, mostly caused by fungi, some of the most important of which include *Fusarium solani* (Baiswar and Ngachan, 2018), *Pestalotiopsis* sp. (Morales-Mora *et al.*, 2019), *Curvularia inaequalis*, *C. spicifera* (Ayoubi *et al.*, 2017), *Colletotrichum fragariae*, *C. acutatum* (Chung *et al.*, 2019), *Rhizopus stolonifer* (Oliveira *et al.*, 2019) and *Aspergillus niger* (Chiotta *et al.*, 2009), to mention a few. These phytopathogens, whether alone or in combination, cause 70% of the production to go to waste, leading to economic losses (Lafuente-Rincón *et al.*, 2016). Chemical synthesis products have been used for decades to control these diseases (Gan and Wickings, 2017). However, their use is related to the creation of resistance and damages to both the environment and to human health (Andrade-Hoyos *et al.*, 2019).

(Chung *et al.*, 2019), *Rhizopus stolonifer* (Oliveira *et al.*, 2019) y *Aspergillus niger* (Chiotta *et al.*, 2009). Estos fitopatógenos solos o en conjunto originan pérdidas del 70% de la producción ocasionado mermas económicas (Lafuente-Rincón *et al.*, 2016). Los productos de síntesis química se han empleado por décadas para el control de estas enfermedades (Gan y Wickings, 2017). Sin embargo, el uso de éstos está relacionado con la generación de resistencia, daños al ambiente y la salud humana (Andrade-Hoyos *et al.*, 2019). Bajo esta premisa, el control biológico se considera una de las prácticas eficientes y ecológicamente viables para el desarrollo de una agricultura sostenible (Pérez-Torres *et al.*, 2018).

El género *Trichoderma* contiene a las especies antagonistas más relevantes, capaces de controlar un amplio número de hongos que afectan a las plantas de interés agrícola (Romero-Arenas *et al.*, 2017). El éxito y su uso en la agricultura se debe a sus mecanismos de acción como la competencia por espacio, micoparasitismo, antibiosis y la producción de compuestos volátiles (Nawrocka *et al.*, 2018; Hernández-Melchor *et al.*, 2019). En consecuencia, los objetivos de este trabajo fueron: 1) identificar y caracterizar morfológicamente a nivel género aislados fúngicos asociados a un cultivo de fresa de la variedad Camino Real en Atlixco Puebla, México y 2) determinar la capacidad antagonista y el porcentaje de inhibición del crecimiento radial *in vitro* de la cepa T-H4 de *Trichoderma harzianum* contra los hongos aislados del cultivo de fresa.

Zona del aislamiento. Se tomaron muestras de tejido vegetal del cultivo de fresa variedad “Camino Real” en una parcela de 2,000 m², de la comunidad de Xalpatlaco, Atlixco, Puebla (18° 56' 9.26" N y 98° 26' 16.56" O; 2,350 msnm), con antecedentes de alta incidencia de enfermedades fúngicas durante la producción primavera-verano 2018 y 2019.

Under this premise, biological control is considered an efficient and environmentally feasible practice for the development of a sustainable agriculture (Pérez-Torres *et al.*, 2018).

The genus *Trichoderma* contains the most relevant antagonistic species, capable of controlling a large number of fungi that affect plants of agricultural interest (Romero-Arenas *et al.*, 2017). Its success and use in agriculture are due to its action mechanisms, such as competition for space, mycoparasitism, antibiosis and the production of volatile compounds (Nawrocka *et al.*, 2018; Hernández-Melchor *et al.*, 2019). Consequently, the goals of the present work were 1) to identify and morphologically characterize fungal isolations related to a strawberry plantation of the Camino Real variety in Atlixco, Puebla, Mexico, at a genus level, and 2) to determine the antagonistic ability and the percentage of inhibition of radial growth *in vitro* of the strain T-H4 of *Trichoderma harzianum* against isolated fungi of the strawberry crop.

Isolation zone. Plant tissue samples were taken from the “Camino Real” strawberry crop variety in a 2,000 m² plot in the town of Xalpatlaco, Atlixco, Puebla (18°56'9.26" N y 98°26'16.56" W; 2,350 masl), with backgrounds of high incidence of fungal diseases during the 2018-2019 spring-summer production cycle. The sampling was directed, collecting samples with suspicious fungus symptoms; all samples were stored in plastic bags inside an ice cooler until they were transported to the laboratory.

Isolation of fungi of plant tissues. The samples were cut into 0.5 cm² sections of living and dead tissue. They were disinfested with 1.5% sodium hypochlorite and washed three times with distilled water, dried with sterile paper and finally planted in Petri dishes with a Potato Dextrose Agar (PDA)

El muestreo fue dirigido, colectando muestras con síntomas sospechosos de hongos; todas las muestras se mantuvieron en bolsas de plástico dentro de una hielera hasta su traslado al laboratorio.

Aislamiento de hongos de tejidos vegetales. Las muestras se cortaron en secciones de 0.5 cm² de tejido vivo y muerto, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5% y se lavaron tres veces con agua destilada, se secaron con papel estéril y finalmente se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) a una temperatura de 25 ± 2 °C con luz ambiental por tres días. Las colonias desarrolladas fueron aisladas y purificadas mediante cultivos monospóricos o transferencia de puntas de hifa y se conservaron en una solución de glicerol al 20% a -84 °C.

Caracterización morfológica y crecimiento micelial. La identificación a nivel género de los hongos se realizó comparando las características morfológicas de la colonia (textura, tipo de micelio, color, tipo de hifas) y se tomaron medidas de forma y tamaño de estructuras anamórficas, las cuales se compararon con claves taxonómicas de identificación de Barnett y Hunter (1998) en un sistema de micro cultivo utilizando un microscopio óptico (Carl Zeiss, Jena, Alemania) a 1000x magnificaciones (Samson *et al.*, 2014). Para la evaluación de la tasa de desarrollo micelial, se colocaron fragmentos de 0.25 cm² de agar con micelio de 10 días de crecimiento de cada hongo caracterizado en cajas Petri con PDA, se incubaron bajo oscuridad a 27 °C por 10 días y se midió el diámetro micelial cada 12 h para estimar la velocidad de crecimiento (cm), la cual se calculó con la función de crecimiento lineal $y=mx + b$ (donde 'y' es la distancia, 'x' es el tiempo y 'b' el factor constante) y se expresó en centímetros por día (cm d⁻¹) (Zeravakis *et al.*, 2001). El diámetro fue medido con un vernier digital (CD-6

medium at a temperature of 25 ± 2 °C with ambient light for three days. The cultures developed were isolated and purified using monosporic cultures or the transfer of hyphae tips, and kept in a 20% glycerol solution at -84 °C.

Morphological characterization and mycelial growth. The identification of the fungi at a genus level was carried out by comparing the morphological characteristics of the culture (texture, type of mycelia, color, type of hyphae) and measurements of shape and size of anamorphic structures, which were compared using taxonomic identification keys by Barnett and Hunter (1998) in a microculture system using an optical microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) at a magnification of 1000x (Samson *et al.*, 2014). For the evaluation of the mycelial development rate, 0.25 cm² pieces of agar were placed, along with 10-day old mycelia from each characterized fungus were placed in Petri dishes with PDA; they were incubated in the dark at 27 °C for 10 days, and the mycelial diameter was measured every 12 h to estimate the speed of growth (cm), which was calculated with the linear growth function $y=mx + b$ (where 'y' is distance, 'x' is time and 'b' is the constant factor) and expressed in centimeters per day (cm d⁻¹) (Zeravakis *et al.*, 2001). The diameter was measured using a digital caliper (CD-6 Mitutoyo), kept always in the same direction in triplicate, which was established at random for each repetition; only the average was used to calculate the development rate and the speed of mycelial growth per day.

Antagonism of *T. harzianum* towards fungi isolated from strawberry crop. The antagonism was evaluated with the strain T-H4 of *T. harzianum*, isolated from the root of *Persea americana*, the sequence of which was included in the National Center for Biological Information (NCBI) data

Mitutoyo), manteniendo siempre en la misma dirección por triplicado, la cual fue establecida al azar para cada repetición, se usó solo el promedio para calcular la tasa de desarrollo y la velocidad de crecimiento micelial por día.

Antagonismo de *T. harzianum* ante hongos aislados del cultivo de fresa.

La evaluación del antagonismo se realizó con la cepa T-H4 de *T. harzianum*, aislada de la raíz de *Persea americana*, cuya secuencia se incluyó en la base de datos del National Center for Biological Information (NCBI) con el número de acceso MK779064.1, mismo que está depositado en el laboratorio de Eco-Campus Valsequillo, del Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). La técnica de cultivo dual se utilizó de acuerdo con Andrade-Hoyos *et al.* (2019) por triplicado para determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento radial aplicando la fórmula $PICR = [(R1-R2/R1) \times 100]$ para cada ensayo evaluado por un lapso de siete a 10 días. Para complementar las evidencias del antagonismo, se comparó y clasificó cada ensayo con la escala establecida por Bell *et al.* (1982); I) Crecimiento de *Trichoderma* sp. cubrió toda la superficie del medio y redujo la colonia del patógeno, II) Crecimiento de *Trichoderma* sp. cubrió al menos 2/3 partes del medio, III) *Trichoderma* sp. y fitopatógeno crecieron ambos a la mitad de la superficie del medio, no se sobrepuso uno del otro, IV) Hongo patógeno creció al menos 2/3 partes del medio y resistió a la invasión de *Trichoderma* sp. y V) Crecimiento del patógeno cubrió toda la superficie del medio.

Análisis estadísticos. Los datos se analizaron con ANOVA (de dos vías) en el paquete estadístico IBM SPSS Statistics versión 25. La velocidad de crecimiento, tasa de desarrollo y PICR fueron las

base, with Access number MK779064.1, which is deposited in the Eco-Campus Valsequillo laboratory of the Science Institute, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). The dual culture technique was used following Andrade-Hoyos *et al.* (2019) in triplicate to determine the percentage of inhibition of radial growth applying the formula $PICR = [(R1-R2/R1) \times 100]$ for each assay evaluated in a lapse of 7 to 10 days. To complete the evidence of the antagonism, each assay was compared and classified using the scale established by Bell *et al.* (1982); I) Growth of *Trichoderma* sp. covered the entire surface of the medium and reduced the pathogen culture, II) Growth of *Trichoderma* sp. covered at least 2/3 of the medium, III) *Trichoderma* sp. and phytopathogen both grew to cover half of the Surface of the medium, did not overgrow each other, IV) Pathogenic fungus grew to cover at least 2/3 of the medium and resisted the invasion by *Trichoderma* sp. and V) Growth of the pathogen covered the entire surface of the medium.

Statistical analyses. The data were analyzed with an ANOVA (two-way) in the IBM SPSS Statistics statistical package, version 25. Growth speed, rate of development and PICR were the response variables with three repetitions is a totally random statistical design. The experiment was carried out twice for validation. A comparison of averages was carried out using the Tukey-Kramer method with a level of likelihood of $p \leq 0.05$.

Thirty plant tissue samples were taken: 10 root samples, 10 leaf samples and 10 stem samples with the presence of mycelia, as well as 20 mature strawberry fruits with disease symptoms, in which two root-related fungi, three leaf and stem-related fungi and three strawberry fruit-related fungi were identified.

variables de respuestas con tres repeticiones en un diseño estadístico completamente al azar. El experimento se repitió dos veces para su validación. Se realizó una comparación de medias por el método de Tukey-Kramer con un nivel de probabilidad de $p \leq 0.05$.

Se obtuvieron 30 muestras de tejidos vegetales: 10 muestras de raíz, 10 muestras de hojas y 10 muestras de tallos con presencia de micelio, así como 20 frutos maduros de fresa con síntomas de enfermedad, de los cuales se identificaron dos hongos asociados a la raíz; tres hongos asociados a hojas y tallos; así como tres hongos asociados al fruto de fresa.

Fusarium sp. Se aisló de la corona de la planta y se asoció a síntomas de marchitez. Las colonias fúngicas desarrollaron micelio aéreo abundante, de textura algodonosa y de color blanco. En el reverso, la colonia fue de color rosado y tiñó el agar de tonos entre púrpura y violeta (Rentería-Martínez *et al.*, 2018). En cuanto a las características microscópicas se observaron macroconidios (Figura 1A) ligeramente curvos de uno a cinco septos (Gordon, 2017) y microconidios en forma ovoide, yacientes de monofálides laterales (Figura 1B), pueden formar masas (simulan cabezas) pero nunca cadenas. Las colonias crecieron a una velocidad de $0.83 \pm 0.03 \text{ cm d}^{-1}$ (Cuadro 1), rango que concuerda con el estudio de Groenewald *et al.* (2006).

Rhizoctonia sp. El hongo se asoció a síntomas de marchitez y pudrición de raíz. La colonia en medio de cultivo PDA, se observó de color blanco al inicio y posteriormente de color marrón y café arena en su periferia, con textura aterciopelada y cerosa, con escaso micelio aéreo, y con una tasa de desarrollo de 1.05 cm por día (Cuadro 1). Se observaron hifas hialinas y septadas, algunas de tonalidades

Fusarium sp. This was isolated from the crown of the plant and related to symptoms of wilting. The fungal cultures developed abundant white aerial mycelia with a cotton-like texture. In the reverse, the culture was pink and it stained the agar with a purple-to-violet color (Rentería-Martínez *et al.*, 2018). Regarding microscopic characteristics, slightly curved macroconidia were observed (Figure 1A) with one to five septa (Gordon, 2017), along with oval-shaped microconidia, are born from lateral monophyllids (Figure 1B); they can form masses (simulating heads) but never chains. The cultures grew at a speed of $0.83 \pm 0.03 \text{ cm d}^{-1}$ (Table 1), a range which agrees with the study by Groenewald *et al.* (2006).

Rhizoctonia sp. This fungus was related to symptoms of wilting and root rot. The culture in the PDA culture medium initially presented a white color, and later, maroon and brown on the edges, with a velvetlike and waxy texture, with scarce aerial mycelia and a development rate of 1.05 cm per day (Table 1). Hyalin and septated hyphae were observed, some of which presented darker tones, with the formation of a right angle in some areas in which hyphae crossed (Figures 1 C and D), criteria to locate the fungus in the *Rhizoctonia* genus (González *et al.*, 2006).

Pestalotiopsis sp. The fungus was isolated from areas with necrosis, mainly on leaves and stems; the leaves presented acervuli, mainly on the necrotic areas, and the *Pestalotiopsis* genus was characterized (Morales-Mora *et al.*, 2019). The cultures displayed rosetted growth and scarce aerial mycelia, a white to creamy color on the inside, and on the Surface of the culture medium, bright black acervuli developed (Figure 1E). Conidia, typical to the *Pestalotiopsis* genus were observed, similar to those reported by Maharachchikumbura *et al.*

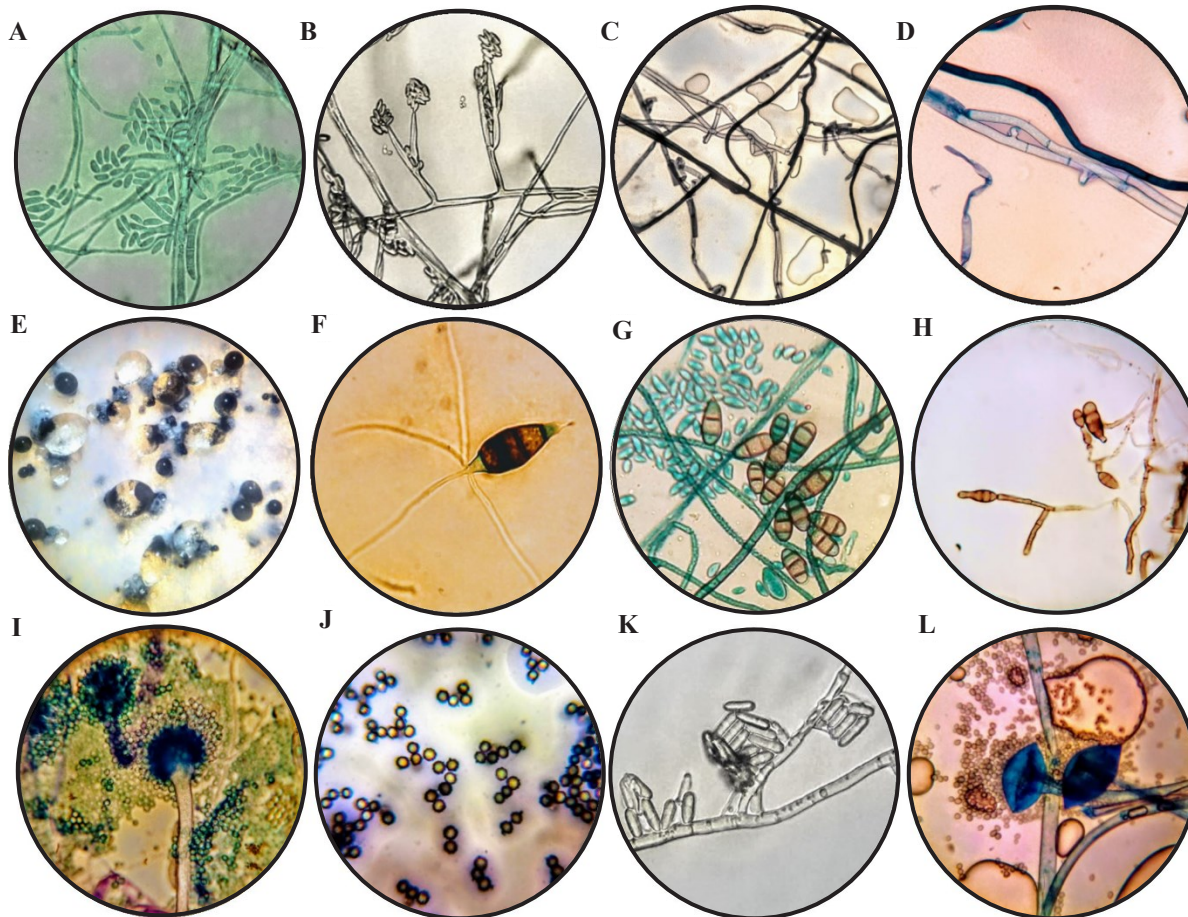


Figura 1. Características morfológicas, (A) Macroconidios septados (40 X) de *Fusarium* sp. teñidos con verde de malaquita; (B) Microconidios aglomerados en cabezas falsas sobre monofialides con presencia de septos (100 X) característicos de *Fusarium* sp.; (C) Micelio con ramificación y constricción en ángulo recto (40 X) de *Rhizoctonia* sp.; (D) Hifas septadas, con hifa naciente en un ángulo recto (100 X), de *Rhizoctonia* sp. teñidas con azul de metileno; (E) Conidiomas de color negro de *Pestalotiopsis* sp. en la superficie de la colonia; (F) Conidio (100 X) de *Pestalotiopsis* sp.; (G) Microconidios teñidos con verde de malaquita y presencia de conidios maduros (100 X) de *Curvularia* sp.; (H) Conidios ovoides a oblongos con celdillas (100 X) y sostenidos por hifas septadas de *Alternaria* sp.; (I) Conidióforo teñido con azul de metileno y métula hialina de *Aspergillus niger* (40 X); (J) Conidios globosos con crestas en su contorno (100 X) característicos de *Aspergillus niger*; (K) Conidios (100 X) de *Colletotrichum* sp.; (L) Esporangio maduro teñidos con azul de metileno de *Rhizopus stolonifer* (100 X).

Figure 1. Características morfológicas, (A) Macroconidios septados (40 X) de *Fusarium* sp. teñidos con verde de malaquita; (B) Microconidios aglomerados en cabezas falsas sobre monofialides con presencia de septos (100 X) característicos de *Fusarium* sp.; (C) Micelio con ramificación y constricción en ángulo recto (40 X) de *Rhizoctonia* sp.; (D) Hifas septadas, con hifa naciente en un ángulo recto (100 X), de *Rhizoctonia* sp. teñidas con azul de metileno; (E) Conidiomas de color negro de *Pestalotiopsis* sp. en la superficie de la colonia; (F) Conidio (100 X) de *Pestalotiopsis* sp.; (G) Microconidios teñidos con verde de malaquita y presencia de conidios maduros (100 X) de *Curvularia* sp.; (H) Conidios ovoides a oblongos con celdillas (100 X) y sostenidos por hifas septadas de *Alternaria* sp.; (I) Conidióforo teñido con azul de metileno y métula hialina de *Aspergillus niger* (40 X); (J) Conidios globosos con crestas en su contorno (100 X) característicos de *Aspergillus niger*; (K) Conidios (100 X) de *Colletotrichum* sp.; (L) Esporangio maduro teñidos con azul de metileno de *Rhizopus stolonifer* (100 X).

Cuadro 1. Clase de antagonismo de acuerdo a Bell *et al.* (1982), porcentaje de inhibición de crecimiento radial y tasa de desarrollo de diferentes hongos asociados al cultivo de fresa en Atlixco, Puebla.
Table 1. Type of antagonism according to Bell *et al.* (1982), percentage of inhibition of radial growth and rate of development of different fungi related to strawberry crops in Atlixco, Puebla.

Nombre	Tasa de desarrollo (mm/h) *	Velocidad de crecimiento (cm d ⁻¹) *	PICR*	Clase Antagonismo
<i>Colletotrichum</i> sp.	0.28 ± 0.007 ^c	0.75 ± 0.01 ^c	87.56 ± 1.60 ^a	II
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	0.28 ± 0.027 ^c	0.94 ± 0.08 ^d	71.11 ± 1.18 ^d	II
<i>Alternaria</i> sp.	0.18 ± 0.006 ^d	0.47 ± 0.01 ^f	81.33 ± 0.77 ^c	II
<i>Rhizoctonia</i> sp.	0.46 ± 0.052 ^b	0.47 ± 0.02 ^f	70.22 ± 5.46 ^{de}	III
<i>A. niger</i>	0.51 ± 0.067 ^b	1.33 ± 0.07 ^c	43.56 ± 6.73 ^f	III
<i>R. stolonifer</i>	0.56 ± 0.017 ^b	2.08 ± 0.28 ^a	28 ± 12.72 ^f	IV
<i>Curvularia</i> sp.	0.31 ± 0.027 ^c	1.52 ± 0.10 ^b	84 ± 0.77 ^b	II
<i>Fusarium</i> sp.	0.16 ± 0.013 ^d	0.83 ± 0.03 ^d	63.65 ± 1.50 ^c	III
<i>T. harzianum</i>	1.67 ± 0.01 ^a	1.86 ± 0.22 ^a		

*Letras diferentes significa diferencia significativa entre tratamientos de acuerdo con Tukey-Kramer para $p \leq 0.05$. /

*Different letters mean significant difference between treatments according to Tukey-Kramer for $p \leq 0.05$.

más oscuras, con formación de un ángulo recto en algunos sitios de entrecruzamiento de las hifas (Figuras 1 C y D), criterio para ubicar al hongo dentro del género *Rhizoctonia* (González *et al.*, 2006).

***Pestalotiopsis* sp.** El hongo se aisló de áreas con necrosis principalmente en hojas y tallos; en las hojas se observaron acérvulos, principalmente en las zonas necróticas y se caracterizó al género de *Pestalotiopsis* (Morales-Mora *et al.*, 2019). Las colonias mostraron crecimiento arrosado y micelio aéreo escaso, una coloración entre tonos blanco y crema, en su interior y en la superficie del medio de cultivo se desarrollaron acérvulos de color negro brillante (Figura 1E). Se observaron conidios característicos del género *Pestalotiopsis* similares a lo reportado por Maharachchikumbura *et al.* (2014), oscuros, ligeramente curvados, con seis células con la basal y la terminal hialina y, esta última puntiaguda con tres a cinco apéndices apicales hialinos, también elipsoidal (Figura 1F). Además, se observaron conidióforos hialinos, irregularmente ramificados, septados, lisos y cortos. Las colonias mostraron una tasa de desarrollo micelial promedio de 0.28 ± 0.027 mm h⁻¹ (Cuadro 1).

(2014), dark, slightly curved, with six cells with the basal and the hyalin terminal, the latter of which was pointy with three to five apical hyaline appendages, as well as ellipsoidal (Figure 1F). In addition, hyalin conidiophores were observed, irregularly ramified, septated, smooth and short. The cultures presented an average mycelial development of 0.28 ± 0.027 mm h⁻¹ (Table 1).

***Curvularia* sp.** The fungus was isolated from leaves with oval stains with light to dark chestnut tones, with yellowish edges. Some species of *Curvularia* are known to cause smut on the leaf and rotting of the strawberry (Ayoubi *et al.*, 2017). The fungal culture displayed abundant aerial mycelia, greenish black in color, and radial and expansive vegetative mycelia, dark brown in color and greyish white towards the edges of the reverse part of the culture. Septated hyphae, hyaline, light brown and ramified, 1.5-4 µm in width. Sympodial, spindle-shaped conidia with oval ends, with three or four divisions, gold-brown to pale brown in color, with divisions in the slightly hyaline ends, measuring between 10-25 µm in length and 7-10 µm in width. Hyalin conidiogenous cells, 7-12 µm in length by 5-10 µm

***Curvularia* sp.** El hongo se aisló de hojas con manchas ovaladas con tonos castaño claro hasta oscuros, con márgenes amarillentos. Algunas especies de *Curvularia* son conocidas por causar tizón en la hoja y podredumbre de la fresa (Ayoubi *et al.*, 2017). La colonia del hongo mostró abundante micelio aéreo, de color verde-negro y micelio vegetativo radial y expansivo de color café-oscuro y blanco grisáceo hacia la periferia de la parte reversa de la colonia. Hifas septadas, hialinas a marrón claro y ramificadas de 1.5-4 μm de ancho. Conidios de forma simpodial, fusiformes y ovalados en los extremos, con tres o cuatro divisiones, de color café-dorado a café-pálido, con divisiones de los extremos ligeramente hialinas y de tamaño entre 10-25 μm de largo y 7-10 μm de ancho. Células conidiógenas hialinas de 7-12 μm de largo por 5-10 μm de ancho, proliferando de forma simpodial con desprendimiento de microconidios (Figura 1G). Esta caracterización concuerda con algunas especies de *Curvularia* descritas por Madrid *et al.* (2014). La velocidad de crecimiento promedio fue de $1.52 \pm 0.10 \text{ cm d}^{-1}$ resultados similares a los reportados por Almaguer *et al.* (2013).

***Alternaria* sp.** El hongo se aisló de hojas con manchas foliares de forma irregular y de color café oscuro, con un contorno amarillento tenue; estos síntomas se asocian con infecciones de *Alternaria*. La colonia presentó una textura algodonosa, abundante y densa, de tonalidades entre blanco-gris y, posteriormente gris oscuro, como lo reportaron Mehmood *et al.* (2018) en el cultivo de fresa. En el anverso y reverso de la caja Petri, el agar se tiñó de un tono entre verde y negro. La cepa presentó hifas septadas, hialinas y conidios de forma ovoides a oblongos, septados transversal y longitudinalmente (Figura 1H), con tres hasta cinco divisiones en los conidios. Este hongo presentó una tasa de desarrollo micelial de $0.18 \pm 0.006 \text{ mm h}^{-1}$ (Cuadro 1).

in width, proliferating in a sympodial shape with the detachment of conidia (Figure 1G). This characterization matches some *Curvularia* species described by Madrid *et al.* (2014). Average growth speed was $1.52 \pm 0.10 \text{ cm d}^{-1}$. Similar results were reported by Almaguer *et al.* (2013).

***Alternaria* sp.** The fungus was isolated from leaves with irregularly-shaped, dark brown foliar spots with a pale yellow edge, symptoms which are associated with *Alternaria* infections. The culture presented a dense, abundant cotton-like texture with tones between white and gray, and later dark gray, as reported by Mehmood *et al.* (2018) for strawberry crops. On both sides of the Petri dish, the agar acquired a color between Green and black. The strain presented septated hyphae, hyaline and oval to oblong-shaped conidia, septated transversally and longitudinally (Figure 1H), with three to five divisions in the conidia. This fungus presented a mycelial growth rate of $0.18 \pm 0.006 \text{ mm h}^{-1}$ (Table 1).

***Aspergillus niger*.** The fungus was isolated from fruits with signs of “strawberry rot” and characterized as *A. niger* (Chiotta *et al.*, 2009). The culture presented mycelia with black scattered growth, with a dense, grainy texture. Microscopic characteristics observed included biserialated and radial conidial heads from aerial hyphae, de 5-7 μm in diameter, with thick, smooth, hyaline walls, pale maroon in color, an almost spherical vesicle, 10 μm in diameter, in which metulas develop, covering the entire surface. Its maroon globular conidia (Figure 1 I-J) are normally rugged with uneven crests and bulges (Krijgsheld *et al.*, 2013). Growth speed was of $1.33 \pm 0.07 \text{ cm d}^{-1}$ (Table 1). Jørgensen *et al.* (2011) reported a vegetative growth of *A. niger* N402 in a maltose medium of 0.22 to 0.24 mm h^{-1} .

Aspergillus niger. El hongo se aisló de frutos con signos de “podredumbre de la frutilla” y se caracterizó como *A. niger* (Chiotta *et al.*, 2009). La colonia presentó micelio con crecimiento disperso de color negro oscuro, con textura granular y densa. Dentro de las características microscópicas se observaron cabezas conidiales biseriadas y radiales procedentes de hifas aéreas de 5-7 μm de diámetro, de paredes gruesas, lisas, hialinas y de color marrón pálido, vesícula casi esférica de 10 μm de diámetro de donde se desarrollaron métulas, ocupando toda la superficie. Sus conidios globosos de color marrón (Figura 1 I-J), normalmente rugosos con crestas irregulares y protuberancias (Krijgsheld *et al.*, 2013). La velocidad de crecimiento fue de $1.33 \pm 0.07 \text{ cm d}^{-1}$ (Cuadro 1). Jørgensen *et al.* (2011) reportan un crecimiento vegetativo de *A. niger* N402 en medio maltosa de 0.22 a 0.24 mm h^{-1} .

Colletotrichum sp. El hongo se aisló de frutos que presentaron lesiones necróticas, hundidas, en forma de anillos concéntricos. Los principales hongos asociados a estos síntomas de enfermedad pertenecen al género *Colletotrichum* (*C. acutatum*, *C. gloeosporioides* y *C. fragariae*) (Howard *et al.*, 1992). Las colonias presentaron micelio de tonos naranja-pálido a naranja-salmón; así mismo desarrolló un micelio aéreo con tonos blancos hasta rosados. Además, se observó la formación de aglomeraciones sobre la superficie de la colonia, estas eran de un color naranja brillante y en su interior se observó el desarrollo de conidios. Dichas estructuras se describen como conidiomas de tipo acérvulo (Dai *et al.*, 2006). Específicamente, la colonia aislada desarrolló acérvulos epidermales, conidios de forma cilíndrica con extremos redondeados, los cuales se generaron directamente de las monofiáldes provenientes de las hifas septadas (Figura 1K) (Freeman y Katan, 1997). Las colonias crecieron a velocidad de $0.75 \pm 0.01 \text{ cm d}^{-1}$ (Cuadro 1), rango

Colletotrichum sp. The fungus was isolated from fruits with sunken necrotic lesions in the shape of concentric rings. The main fungi related to these disease symptoms belong to the genus *Colletotrichum* (*C. acutatum*, *C. gloeosporioides* y *C. fragariae*) (Howard *et al.*, 1992). The cultures presented pale orange to salmon orange mycelia, and developed an aerial mycelium with white to pink tones. In addition, bright orange agglomerations formed on the surface of the culture, and conidia developed inside. These structures are described as acervular conidiomas (Dai *et al.*, 2006). Specifically, the isolated culture developed epidermal acervula, cylindrical conidia with rounded ends, which were generated directly from the monophyllids from the septated hyphae (Figure 1K) (Freeman and Katan, 1997). The cultures grew at a speed of $0.75 \pm 0.01 \text{ cm d}^{-1}$ (Table 1), which matches reports by Gutiérrez-Alonso *et al.* (2001), who evaluated different isolations of *C. gloeosporioides*.

Rhizopus stolonifer. The fungus was isolated from rotting fruits. The culture presented white and later gray cultures, cottonlike in texture, with rapid growth and with aerial mycelia. Growth speed was $2.08 \pm 0.28 \text{ cm d}^{-1}$ (Table 1); Hernández-Lauzardo *et al.* (2005) reported a higher growth rate (2.3 mm h^{-1}) of *R. stolonifer* during the four-day incubation period; higher results to those reported in the present investigation. Dark brown sporangiophora developed from a knot of rhizoids, spherical zygosporangia with thick, naked walls. This fungus is easily recognizable thanks to its hyaline or brownish side shoots, its numerous brown rhizoids and its black and lustrous sporangia (Figure 1L) (Farrera *et al.*, 2007).

Antagonism of *T. harzianum* towards fungi isolated from strawberry crop. Areas of

que concuerda con Gutiérrez-Alonso *et al.* (2001), quienes evaluaron distintos aislamientos de *C. gloeosporioides*.

***Rhizopus stolonifer*.** El hongo se aisló de frutos en descomposición. La colonia presentó colonias blancas y posteriormente gris, algodonosas con crecimiento rápido y con micelio aéreo. La velocidad de crecimiento fue de 2.08 ± 0.28 cm d⁻¹ (Cuadro 1); Hernández-Lauzardo *et al.* (2005) reportaron una tasa de crecimiento superior (2.3 mm h⁻¹) de *R. stolonifer* durante el período de incubación de cuatro días, resultados superiores a los reportados en esta investigación. Se observó el desarrollo de esporangióforos de color pardo oscuro que nacen de un nudo de rizoides, zigosporas esféricas de pared gruesa y desnuda. Este hongo se reconoce fácilmente por sus esporos hialinos o parduzcos, sus rizoides numerosos y pardos y sus esporangios negros y lustrosos (Figura 1L) (Farrera *et al.*, 2007).

Antagonismo de *T. harzianum* ante hongos aislados del cultivo de fresa. Se presentaron zonas de interacción entre *T. harzianum* y los hongos evaluados, donde se observó un parasitismo para todos los casos. La reducción en la tasa de crecimiento de los hongos en cultivos duales es un indicador de la capacidad antagónica de *Trichoderma* (Guigón-López *et al.*, 2010). El porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) varió en un rango de 28 a 87.6%, con diferencias significativas ($p < 0.05$). Los porcentajes de inhibición más altos se registraron en los confrontamientos con las cepas de *Colletotrichum* sp., *Alternaria* sp. y *Curvularia* sp. (Cuadro 1). En el confrontamiento con *Alternaria* sp. se observó nulo crecimiento al momento del contacto con el antagonista. Este efecto se reportó contra *A. porri*, al confrontarse con *T. harzianum* en pruebas *in vitro*; que también mostró fuerte actividad micoparasítica y alta capacidad competitiva por espacio y nutrientes (Mazrou *et al.*, 2020).

interaction were observed between *T. harzianum* and the evaluated fungi, in which parasitism was displayed in all cases. The reduction in growth rate of the fungi in dual cultures is an indicator of the antagonistic ability of *Trichoderma* (Guigón-López *et al.*, 2010). The percentage of inhibition of radial growth (PIRG) varied in a range of 28 to 87.6%, with significant differences ($p < 0.05$). The greatest percentages of inhibition were recorded in the confrontations with the strains of *Colletotrichum* sp., *Alternaria* sp. and *Curvularia* sp. (Table 1). No growth was observed in the confrontation with *Alternaria* sp. at the moment of contact with the antagonist. This effect was reported against *A. porri* when confronting *T. harzianum* in *in vitro* tests, which also displayed a strong mycoparasitic activity and a high ability of competition for space and nutrients (Mazrou *et al.*, 2020).

When studying *T. harzianum*, Gaviria-Hernández *et al.* (2013) obtained antagonism values of 65% for *C. gloeosporioides* and 79% for *C. acutatum*, results below those reported in the present investigation. On the other hand, Benhamou and Chet (1993) indicated strong aggression from the antagonist *T. harzianum* and susceptibility of *R. solani* from the second day after inoculation. These results coincide with those by Hernández-Lauzardo *et al.* (2005), who, under similar conditions, obtained a PIRG of 58% when they evaluated *T. harzianum* A-34 against *R. solani*, results lower than those reported in the present investigation. However, Andrade-Hoyos *et al.* (2019), found a PIRG of 87.9% for *R. solani* using *T. harzianum*.

In another study, Guédez *et al.* (2009) compared the mycelial growth of *T. harzianum* with *R. stolonifer* (3.22 cm), *R. solani* (3.1 cm) and *A. niger* (1.72 cm) and obtained significant differences ($p < 0.01$), similar results to those in the present investigation. Michel-Aceves *et al.* (2005) found that evaluating the antagonistic effect of native *Trichoderma* spp. isolations on the growth of *F.*

En un estudio realizado por Gaviria-Hernández *et al.* (2013), al estudiar *T. harzianum*, obtuvieron valores de antagonismo de 65% para *C. gloeosporioides* y 79% para *C. acutatum*, resultados inferiores a los reportados en la presente investigación. Por otro lado, Benhamou y Chet (1993) indicaron que existe gran agresividad por parte del antagonista *T. harzianum* y susceptibilidad de *R. solani* desde el segundo día después de la inoculación. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Hernández-Lauzardo *et al.* (2005), quienes en condiciones similares obtuvieron un PICR de 58% cuando evaluaron a *T. harzianum* A-34 contra *R. solani*, resultados menores a los reportados en la presente investigación; sin embargo, Andrade-Hoyos *et al.* (2019), encontraron un PICR de 87.9% para *R. solani* utilizando *T. harzianum*.

En otra investigación Guédez *et al.* (2009), compararon el crecimiento micelial de *T. harzianum* con *R. stolonifer* (3.22 cm), *R. solani* (3.1 cm) y *A. niger* (1.72 cm) obteniendo diferencias significativas ($p < 0.01$), resultados similares a la presente investigación. Michel-Aceves *et al.* (2005) encontraron que al evaluar el efecto antagónico de aislados nativos de *Trichoderma* spp., sobre el crecimiento de *F. oxysporum* y *F. subglutinans* fueron de 47.6% y 73%, respectivamente, resultados similares a los del presente estudio. Por otro lado, en una investigación reciente de Andrade-Hoyos *et al.* (2019), mencionan que *T. harzianum* inhibe el crecimiento de micelio en *F. oxysporum* hasta 35%. La actividad antagónica de *T. harzianum* fue menor con *A. niger* y *R. stolonifer*, donde los porcentajes de inhibición fueron de $43.56 \pm 6.73\%$ y $28 \pm 12.72\%$, respectivamente, valores que se clasifican en las clases III y IV (Figura 2) de acuerdo con la escala establecida por Bell *et al.* (1982). Corrêa *et al.* (2007), observaron un efecto antagónico nulo de cepas de *T. harzianum* y *T. aureoviride* frente a *Sclerotium rolfsii*. Esto podría indicar que los

oxysporum and *F. subglutinans* were 47.6% and 73%, respectively, similar results to those in the present investigation. On the other hand, a recent investigation by Andrade-Hoyos *et al.* (2019) mentions that *T. harzianum* inhibits the myceliar growth of *F. oxysporum* by up to 35%.

The antagonistic activity of *T. harzianum* was lower with *A. niger* and *R. stolonifer*, where the percentages of inhibition were $43.56 \pm 6.73\%$ and $28 \pm 12.72\%$, respectively, values classified in classes III and IV (Figure 2), according to the scale obtained by Bell *et al.* (1982). Corrêa *et al.* (2007), observed a null antagonistic effect for *T. harzianum* and *T. aureoviride* strains when faced with *Sclerotium rolfsii*. This could indicate that the *S. rolfsii* isolations are able to release substances into the culture medium when they come in contact with the antagonist, which hinder its progress and/or detox the metabolites secreted by *Trichoderma*, as mentioned by Duarte-Leal *et al.* (2017), therefore these aspects must be investigated further for other fungi, as in the case of *A. niger* and *R. stolonifer*.

Reyes *et al.* (2008) noted that one of the significant characteristics of *Trichoderma* is its high growth speed. García-Espejo *et al.* (2016) mentioned that the way in which *T. harzianum* probably inhibits the growth of the pathogen is due to the production of inhibiting compounds that spread into the culture medium; antibiosis by the production of volatile and non-volatile metabolites, which include pyrones, isocyanates, peptics and trichocines; in addition, the production of extracellular diffusible enzymes such as pectinases, cutinases, glucanases and chitinases. In this sense, it is possible to notice that *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp. and *Curvularia* sp. are more susceptible to the antagonistic fungus. Antagonism tests reflect the ability and genetic variability of the antagonist and the phytopathogen to resist antagonism, allowing the preliminary selection for

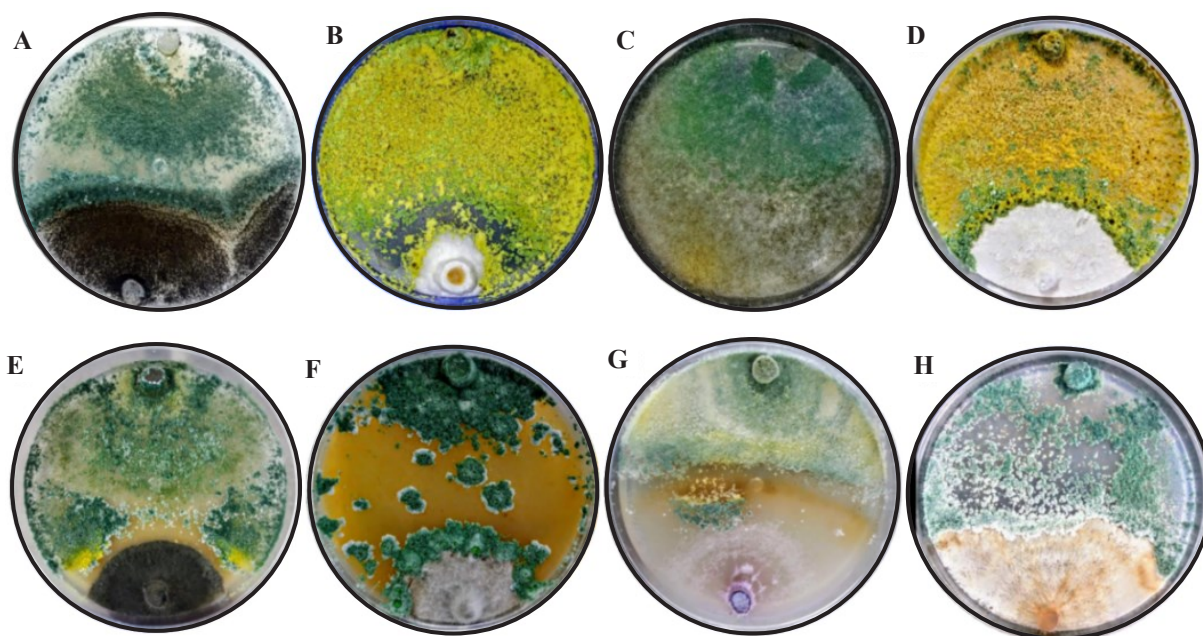


Figura 2. Antagonismo de la cepa T-H4 de *T. harzianum* en escala de Bell *et al.* (1982), (A) *Aspergillus niger*, (B) *Colletotrichum* sp., (C) *Rhizopus stolonifer*, (D) *Pestalotiopsis* sp., (E) *Curvularia* sp., (F) *Alternaria* sp., (G) *Fusarium* sp. y (H) *Rhizoctonia* sp.

Figure 2. Antagonismo de la cepa T-H4 de *T. harzianum* en escala de Bell *et al.* (1982), (A) *Aspergillus niger*, (B) *Colletotrichum* sp., (C) *Rhizopus stolonifer*, (D) *Pestalotiopsis* sp., (E) *Curvularia* sp., (F) *Alternaria* sp., (G) *Fusarium* sp. y (H) *Rhizoctonia* sp.

aislamientos de *S. rolfii* son capaces de liberar sustancias al medio de cultivo al entrar en contacto con el antagonista, que impiden el avance de este y/o desintoxican los metabolitos secretados por *Trichoderma*, como lo menciona Duarte-Leal *et al.* (2017), por lo que estos aspectos se deben continuar investigando para otros hongos, como es el caso de *A. niger* y *R. stolonifer*.

Reyes *et al.* (2008) notificaron que una de las características significativas de *Trichoderma* es su elevada velocidad de crecimiento. García-Espejo *et al.* (2016) mencionan que la forma en que *T. harzianum* probablemente inhibe el crecimiento del patógeno, es debido a la producción de compuestos inhibitorios que se difunden al medio de cultivo; antibiosis por producción de metabolitos volátiles y no volátiles entre los cuales se encuentran, pirones,

their evaluation under field conditions, as well as to complement and determine their biocontrolling activity (Fraire-Cordero *et al.*, 2003). In this area of study, potential perspectives open up, since the antagonistic microorganisms have been used as biocontrol agents in diseases in fresh fruit and crops with good results (Elad *et al.*, 1983).

The present investigation identified *Colletotrichum* sp., *A. niger* and *R. stolonifer* in relation to the strawberry fruit, *Pestalotiopsis* sp., *Curvularia* sp. and *Alternaria* sp., present in leaves and stems, and *Rhizoctonia* sp. and *Fusarium* sp. in relation to the root of the strawberry plant, of the Camino Real variety. The strain of *Trichoderma harzianum* (T-H4) displayed antagonistic activity *in vitro* against *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis*

isocianatos, pépticos y trichocinas; además, la producción de enzimas extracelulares difundibles tales como pectinasas, cutinasas, glucanasas y quitinasas. En este sentido, se logra observar que que *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp. y *Curvularia* sp., son más susceptibles al hongo antagonista.

Las pruebas de antagonismo reflejan la capacidad y variabilidad genética del antagonista y del fitopatógeno para resistir el antagonismo, permitiendo la selección preliminar para ser evaluados en condiciones de campo, así como para complementar y determinar su capacidad biocontroladora (Fraire-Cordero *et al.*, 2003). En esta área de estudio se abren perspectivas potenciales, debido a que los microorganismos antagonistas se han utilizado durante años como agentes de biocontrol para diversas enfermedades en fruta fresca y para cultivos con buenos resultados (Elad *et al.*, 1983).

En la presente investigación se logró identificar a *Colletotrichum* sp., *A. niger* y *R. stolonifer* asociados al fruto de fresa, *Pestalotiopsis* sp., *Curvularia* sp. y *Alternaria* sp., presentes en hojas y tallos y a *Rhizoctonia* sp. y *Fusarium* sp., asociados a la raíz del cultivo de fresa, variedad Camino Real. La cepa de *Trichoderma harzianum* (T-H4) mostró capacidad antagónica *in vitro* frente a *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp. y *Curvularia* sp., pero no consiguió inhibir el desarrollo de *R. stolonifer*.

LITERATURA CITADA

- Almaguer M, Rojas TI, Dobal V, Batista A, Rives N and Aira MJ. 2013. Effect of temperature on growth and germination of conidia in *Curvularia* and *Bipolaris* species isolated from the air. *Aerobiología* 29: 3-20. <https://doi.org/10.1007/s10453-012-9257-z>
- Andrade-Hoyos P, Luna-Cruz A, Hernández EO, Gayosso EM, Valenzuela NL and Cureño HJB. 2019. Antagonismo de *Trichoderma* spp. vs hongos asociados a la marchitez de Chile. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 10(6): 1259-1272. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i6.1326>
- Ayoubi N, Soleimani MJ, Zare R and Zafari D. 2017. First report of *Curvularia inaequalis* and *C. spicifera* causing leaf blight and fruit rot of strawberry in Iran. *Nova Hedwigia* 105: 75-85. https://doi.org/10.1127/NOVA_HEDWIGIA/2017/0402
- Baiswar P and Ngachan SV. 2018. First report of root and collar rot of strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) caused by *Ceratobasidium* sp. AG-B (o) (*Binucleate Rhizoctonia*) in India. *Plant Disease* 102(5):1035. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-17-1285-PDN>
- Barnett HL and Hunter BB. 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*. St. Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathological Society. 218 p.
- Bell DK, Wells HD and Markham CR. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72: 379-382. <https://doi.org/10.1094/Phyto-72-379>
- Benhamou N and Chet I. 1993. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. *Phytopathology* 83: 1062-1062. <https://doi.org/10.1094/phyto-83-1062>
- Corrêa S, Mello M, Ávila ZR, Minaré B, Raquel R and Gomes D. 2007. Cepas de *Trichoderma* spp., para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad* 11(1): 3-9. <https://www.redalyc.org/pdf/2091/209116144001.pdf>
- Chiotta ML, Ponsone ML, Combina M, Torres AM and Chulze SN. 2009. *Aspergillus* section *nigri* species isolated from different wine-grape growing regions in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 136(1): 137-141. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.013>
- Chung PC, Wu HY, Ariyawansa HA and Chung CL. 2019. First report of anthracnose crown rot of strawberry caused by *Colletotrichum siamense* in Taiwan. *Plant Disease* 103(7): 1775. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-18-2167-PDN>
- Dai FM, Ren XJ and Lu JP. 2006. First report of anthracnose fruit rot of strawberry caused by *Colletotrichum acutatum* in China. *Plant disease* 90(11): 1460-1460. <https://doi.org/10.1094/PD-90-1460A>
- Duarte-Leal Y, Lamz-Piedra A and Martínez-Coca B. 2017. Antagonismo *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt y Nirenberg frente a *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Revista de Protección Vegetal* 32(3): 1-11. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v32n3/rpv03317.pdf>
- Elad Y, Chet I, Boyle P and Henis Y. 1983. Parasitism of *Trichoderma* spp. On *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*, scanning electron microscopy and fluorescence

~~~~~ End of the English version ~~~~~

- microscopy. *Phytopathology* 73(1): 85-88. <https://doi.org/10.1094/Phyto-73-85>
- Farrera PRE, Zambrano VAE and Ortiz MFA. 2007. Identificación de hongos asociados a enfermedades del fruto de la fresa en el municipio Jáuregui del estado Táchira. *Revista de la Facultad de Agronomía* 24(2): 269-281. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-78182007000200005](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182007000200005)
- FAOSTAT. 2019. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/en/>
- Fraire-Cordero M, Yáñez-Morales M, Nieto-Ángel D and Vázquez-Gálvez G. 2003. Hongos patógenos en fruto de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch) en postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 285-91. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61221307.pdf>
- Freeman S and Katan T. 1997. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. *Phytopathology* 87: 516-521. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.5.516>
- Gan H. and Wickings K. 2017. Soil ecological responses to pest management in golf turf vary with management intensity, pesticide identity, and application program. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 246: 66-77. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.05.014>
- García-Espejo CN, Mamani-Mamani MM, Chávez-Lizárraga GA and Álvarez-Aliaga MT. 2016. Evaluación de la actividad enzimática del *Trichoderma inhamatum* (BOL-12 QD) como posible biocontrolador. *Journal of the Selva Andina Research Society* 7(1): 20-32. [http://www.scielo.org.bo/pdf/jsars/v7n1/v7n1\\_a04.pdf](http://www.scielo.org.bo/pdf/jsars/v7n1/v7n1_a04.pdf)
- Gaviria-Hernández V, Patiño-Hoyos LF and Saldarriaga-Cardona A. 2013. Evaluación *in vitro* de fungicidas comerciales para el control de *Colletotrichum* spp., en mora de castilla. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria* 14(1): 67-75. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol14\\_num1\\_art:344](https://doi.org/10.21930/rcta.vol14_num1_art:344)
- González GV, Portal OSM and Rubio V. 2006. Review. Biology and systematics of the form genus *Rhizoctonia*. *Spanish Journal of Agricultural Research* 4(1): 55-79. <https://doi.org/10.5424/sjar/2006041-178>
- Gordon TR. 2017. *Fusarium oxysporum* and the *Fusarium* wilt syndrome. *The Annual Review of Phytopathology* 55: 23-39. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-095919>
- Groenewald S, Van den Berg N, Marasas WF and Viljoen A. 2006. Biological, physiological and pathogenic variation in a genetically homogenous population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Australasian Plant Pathology* 35(4): 1-40. <https://doi.org/10.1071/AP06041>
- Guédez C, Cañizález L, Castillo C and Oliva R. 2009. Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* spp.). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 29(1): 34-38. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S131525562009000100007&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S131525562009000100007&lng=es&tlng=es)
- Guigón-López C, Guerrero-Prieto V, Vargas-Albores F, Carvajal-Millán E, Ávila-Quezada GD, Bravo-Luna L, Rouco M, Lanzuise S, Woo S, Lorito M. 2010. Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp. su tasa de crecimiento *in vitro* y antagonismo contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28(2): 87-96. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=612/61218468002>
- Gutiérrez-Alonso JG, Nieto-Ángel D, Téliz-Ortiz D, Zavaleta-Mejía E, Vaquera-Huerta H, Martínez-Damián T and Delgado-Sánchez F. 2001. Características de crecimiento, germinación, esporulación y patogenicidad de aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. obtenidos de frutos de mango (*Mangifera indica* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 19(1): 90-93. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=612/61219113>
- Hernández-Lauzardo AN, Bautista-Baños S, Velázquez del Valle MG, Rodríguez-Ambríz SL, Corona-Rangel ML, Solano-Navarro A and Bósquez-Molina E. 2005. Potencial del quitosano en el control de las enfermedades postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23: 198-205.
- Hernández-Melchor DJ, Ferrera-Cerrato R and Alarcón A. 2019. *Trichoderma*: importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences* 35(1): 98-112. <https://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205>
- Howard CM, Maas JL, Chandler CK and Albrechts EE. 1992. Anthracnose of Strawberry caused by the *Colletotrichum* complex in Florida. *Plant Disease* 76: 976-981. <https://doi.org/10.1094/PD-76-0976>
- Jørgensen TR, Nielsen KF, Arentshorst M, Park J, Van den Hondel CA, Frisvad JC, Ram AF. 2011. Submerged co-nidiation and product formation by *Aspergillus niger* at low specific growth rates are affected in aerial developmental mutants. *Applied and Environmental Microbiology* 77(15): 5270-5277. <https://doi.org/10.1128/AEM.00118-11>
- Krijgsheld P, Bleichrodt RJ, Veluw GJ, Wang F and Müller WG. 2013. Development of *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 74: 1-29. <https://doi.org/10.3114/sim0006>
- Lafuente-Rincón DF, Barboza-Corona JE, Salcedo-Hernández R, Abraham-Juárez R, Valadez-Lira JA, Quistián-Martínez D, De la Fuente-Salcido NM. 2016. Identificación molecular de hongos fitopatógenos de fresa por PCR (its y ef-1 $\alpha$ ) y susceptibilidad a bacteriocinas de *Bacillus thuringiensis*. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos* 1(1): 417-422. <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/1/3/72.pdf>
- Madrid H, Cunha KC, Gené J, Dijksterhuis J, Cano J, Sutton DA, Guarro J and Crous PW. 2014. Novel *Curvularia* species from clinical specimens. *Persoonia* 33: 48-60. <https://doi.org/10.3767/003158514X683538>
- Maharachchikumbura SS, 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>
- Mazrou YS, Makhlof AH, Elseehy MM, Awad MF and Hassan MM. 2020. Antagonistic activity and molecular characterization of biological control agent *Trichoderma harzianum* from Saudi Arabia. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 30(1): 4e. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-0207-8>
- Mehmood N, Riaz A, Naz F, Hassan I, Jaabeen N, Anwaar S and Gleason ML. 2018. First report of strawberry leaf spot caused by *Alternaria alternata* in Pakistan. *Plant Disease* 102(4): 820 <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-17-1464-PDN>

- Michel-Aceves AC, Otero-Sánchez MA, Darío R, Rebolledo-Domínguez O, Lezama-Gutiérrez R and Ariza-Flores R. 2005. *In vitro* mycoparasitic activity of *Trichoderma* spp. Against *Fusarium subglutinans* (Wollenweb and Reinke) PE Nelson, TA Toussoun, and Marasas, and *F. oxysporum* Schlechtend. Revista Mexicana de Fitopatología 23(3): 253-261. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20073103350>
- Morales-Mora LA, Martínez SSJ, Andrade-Hoyos P, Valencia de Ita, MA, Silva-Rojas HV and Romero-Arenas O. 2019. First report of leaf spot and anthracnosis caused by *Pestalotiopsis* sp., on strawberry in Puebla, Mexico. Plant Disease 103(10): 2668 <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-19-1010-PDN>
- Nawrocka J, Szczech M and Malolepsza U. 2018. *Trichoderma atroviride* enhances phenolic synthesis and cucumber protection against *Rhizoctonia solani*. Plant Protection Science 54(1): 17-23. <https://doi.org/10.17221/126/2016-PPS>
- Oliveira J, Parisi MC, Baggio JS, Silva PPM, Paviani B, Spoto MHF and Gloria EM. 2019. Control of *Rhizopus stolonifer* in strawberries by the combination of essential oil with carboxymethyl cellulose. International Journal of Food Microbiology 292: 150-158. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.12.014>
- Pérez-Torres E, Bernal-Cabrera A, Milanés-Virelles P, Sierra-Reyes Y, Leiva-Mora M, Marín-Guerra S and Monteagudo-Hernández O. 2018. Eficiencia de *Trichoderma harzianum* (cepa a-34) y sus filtrados en el control de tres enfermedades fúngicas foliares en arroz. Bioagro 30(1): 17-26.
- Rentería-Martínez ME, Guerra-Camacho MA, Ochoa-Meza A, Moreno-Salazar SF, Varela-Romero A, Gutiérrez-Millán LE and Meza-Moller AC. 2018. Multilocus phylogenetic analysis of fungal complex associated with root rot watermelon in Sonora, Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 36(2): 233-255. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1710-1>
- Reyes Y, Martínez B and Infante D. 2008. Evaluación de la actividad antagonista de trece aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia* sp. Revista Protección Vegetal 23(2): 112-117.
- Romero-Arenas O, Amaro JL, Damián MA, Valencia de Ita MA, Rivera A and Huerta M. 2017. Bio-preparados de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Phytophthora capsici* en el cultivo de tomate de Puebla, México. ITEA 113(4): 313-324. <https://doi.org/10.12706/itea.2017.019>
- Samson RA, Visagie CM and Houbraken J. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. Studies in Mycology 78:141-173. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) 2019. Atlas Agroalimentario 1080-2019.
- Vikas-Kumar S and Anil KG. 2019. Growth responses of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) plants grown at different planting density using pvc pipe under protected cultivation. Bangladesh Journal of Botany 48(1): 1-7.
- Zeravakis G, Philippoussis A, Ioannidou S and Diamantopoulou P. 2001. Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates. Folia microbiologica 46(3): 231e. <https://doi.org/10.1007/BF02818539>