

Antracnosis causada por *Colletotrichum acutatum* Simmonds en frutos de fresa en los estados Lara y Trujillo, Venezuela

Antracnosis caused by *Colletotrichum acutatum* Simmonds in strawberry fruit in Lara and Trujillo states, Venezuela

L. Urdaneta¹, M.E. Sanabria², D. Rodríguez² y M. Pérez de Camacaro²

¹Departamento Fitosanitario. Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. Maracaibo, estado Zulia.

²Postgrados de Agronomía, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto, estado Lara.

Resumen

La antracnosis es la enfermedad de mayor importancia económica en el cultivo de la fresa en Venezuela, y es causada por un complejo de especies de *Colletotrichum* (*C. acutatum*, *C. gloeosporioides* y *C. fragariae*). Con la finalidad de identificar la o las especies de éste género presentes en las zonas productoras de los estados Lara y Trujillo, se realizó la caracterización morfológica de cuarenta y siete aislamientos monospóricos de hojas, peciolo, sépalos, pedúnculos y predominantemente de frutos. Cada uno de aislamientos del hongo fueron reactivados en agar agua acidificado a 25-27°C y 12 horas luz-oscuridad para comprobar la formación de clamidosporas y en papa dextrosa agar acidificado (PDAA) bajo las mismas condiciones, para establecer sus características culturales y morfológicas. Las colonias en PDAA presentaron un micelio grisáceo cubierto de masas de conidios de color salmón y en base a la forma predominante de éstas estructuras (fusiformes), su tamaño promedio (13,35 x 3,60 µm), la ausencia de setas en los acérvulos desarrollados sobre los frutos y a la formación de clamidosporas marrones, en todos los aislamientos se identificó la especie *C. acutatum*. Frutos fisiológicamente maduros se inocularon, por inmersión en una suspensión de 1.10⁶ conidios.mL⁻¹, presentándose en estos órganos síntomas y signos similares a los observados en el campo, y de todos fue aislado e identificado consistentemente *C. acutatum*, lo que constituye el primer reporte del hongo causando la antracnosis de la fresa en los estados Lara y Trujillo de Venezuela. **Palabras clave:** morfología, hongos, frutos, necrosis, *Fragaria x ananassa* Duch.

Abstract

Anthracoze is a mayor disease of cultivated strawberry and is caused by complex species of *Colletotrichum* (*C. acutatum*, *C. gloeosporioides* and *C. fragariae*). In order to identify the species of this genus presented in the production zones of Lara and Trujillo states, the morphological characterization was performed in forty-seven monosporic isolate leaves, petioles, sepals, peduncles and fruits mainly. Each of fungal isolates were reactivated in acidified water agar at 25-27°C and 12 h light-dark to see the formation of chlamydospores and potato dextrose agar acidified (PDAA) under the same conditions, to establish their cultural and morphological characteristics. The colonies of PDAA had a grayish mycelium covered with salmon conidial masses and based on the predominant form of these structures (fusiform), their average size (13.35 x 3.60 µm), the absence of setae on the acervuli developed on the fruits and the formation of brown chlamydospores on all isolates and were identified as *C. acutatum*. Physiologically mature fruits were inoculated by immersion in a suspension of 1.10⁶ conidia.mL⁻¹, occurring in these organs symptoms and signs similar to those observed in the field, and in all cases was isolated and identified consistently as *C. acutatum*, which is the first report of the fungus causing strawberry anthracnose in Lara and Trujillo states.

Key words: morphology, fungus, fruits, necrosis, *Fragaria x ananassa* Duch

Introducción

La antracnosis en el cultivo de la fresa (*Fragaria x ananassa* Duch) produce daños en todos los órganos de la planta y es causada por tres especies de *Colletotrichum*: *C. fragariae* A. N. Brooks; *C. acutatum* J. H. Simmonds y *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc (Smith, 2008; Xie *et al.*, 2010), éstos hongos pueden infectar las hojas, pecíolos, flores y pedúnculos, donde se presentan manchas oscuras, circulares, inicialmente pequeñas, pero que pueden coalescer y formar lesiones de mayor tamaño (Ivanoviæ *et al.*, 2007). De acuerdo a Smith (2007), *C. fragariae* y *C. acutatum* ocasionan necrosis que afectan rápidamente las flores y parte de los pedúnculos, los cuales se tornan oscuros, secos y quebradizos.

Introduction

Antracnosis in the strawberry crop (*Fragaria x ananassa* Duch) produces damages in the organs of the plant and is caused by three species of *Colletotrichum*: *C. fragariae* A. N. Brooks; *C. acutatum* J. H. Simmonds and *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc (Smith, 2008; Xie *et al.*, 2010), these fungi might infect the leaves, petioles, flowers and peduncles, where dark, circular and initially small dots are seen, but that may coalesce and form lesions of a higher size (Ivanoviæ *et al.*, 2007). According to Smith (2007), *C. fragariae* and *C. acutatum* cause necrosis that affect rapidly the flowers and the parts of the peduncles, which turn dark, dry and fragile.

The three species of *Colletotrichum* might infect the

Las tres especies de *Colletotrichum* pueden infectar los frutos de la fresa, pero *C. acutatum* es la más frecuentemente asociada a la antracnosis de éstos órganos, observándose sobre los frutos maduros, lesiones circulares, inicialmente son marrón claro y acuosas, que se tornan oscuras, secas y hundidas. Pueden presentarse de una a varias manchas y sobre éstas se aprecian masas de conidios rosadas, y en el caso de los frutos verdes las áreas necróticas son individuales y permanecen pequeñas y negras, hasta que éstos maduran (Smith, 2007), según Farrera *et al.* (2007) éstas áreas son pardas o negras, presentándose inicialmente en la región apical y luego se extienden hasta cubrirlos y momificarlos.

La taxonomía del género *Colletotrichum* se ha basado en su patogenicidad y en ciertas características morfológicas como el color de la colonia en medio de cultivo, forma y tamaño de los conidios, formación de clamidosporas, presencia o ausencia de las setas en los acérvulos y del estado perfecto o teleomórfico (Freeman and Katan, 1997).

En Venezuela, la antracnosis es de importancia económica ya que incide negativamente en los rendimientos del cultivo, por afectar a los frutos; además puede ocasionar la muerte de la planta. De acuerdo a Farrera *et al.* (2007), la enfermedad ocasiona pérdidas entre el 60-75%, pudiendo ser limitante para el cultivo de la fresa, debido a su naturaleza devastadora, la susceptibilidad de los cultivares y la baja efectividad de medidas para controlarla.

strawberry fruits, but *C. acutatum* is the one related with more frequency to the antracnosis of these organs, observing on the mature fruits circled lesions, which are initially light brown and aqueous, and then turn dark, dry and deep. One to several dots can appear and on these are seen the masses of pink conidials, and in the case of the green fruits, the necrotic areas are individual and remain small and are black, until they mature (Smith, 2007), according to Farrera *et al.* (2007) these areas are brownish or black, presenting initially in the apical region and later extending until covering of mummified them.

The taxonomy of the genus *Colletotrichum* is based on its pathogenicity and in some morphological characteristics, such as the color of the colony in a crop culture, shape and size of the conidial, formation of the chlamyospore, presence or absence of setae in the acervuli and the perfect phase of or teleomorphic (Freeman and Katan, 1997).

In Venezuela, the antracnosis has a great economic importance, since it has a negative influence in the yields of the crops, by affecting the fruits; also, it can cause the death of the plant. According to Farrera *et al.* (2007), the disease causes losses from 60-75%, and this can become into a limitation for the crop of the strawberry due to its devastating nature, the sensitivity of the cultivars and the low effectiveness of measures to control it.

The first report of the antracnosis in strawberry fruits in the country was carried out by Cedeño and Carrero

El primer reporte de la antracnosis en frutos de fresa, en el país, fue realizado por Cedeño y Carrero (1997), en el municipio Bolívar del estado Mérida, quienes identificaron a *Colletotrichum acutatum* como el agente causal de la enfermedad. Posteriormente, Guevara *et al.* (2004) señalaron a *C. gloeosporioides* como el responsable de la enfermedad en los municipios Tovar (estado Aragua) y El Jarillo (estado Miranda). Farrera *et al.* (2007) señalaron nuevamente la presencia de la especie *C. acutatum*, esta vez en el estado Táchira.

La presente investigación se planteó con la finalidad de determinar las especies de *Colletotrichum* que causan la antracnosis de la fresa en los estados Lara y Trujillo, Venezuela.

Materiales y métodos

Se colectaron cuarenta y siete muestras provenientes de dos fincas ubicadas en la localidad Humocar Alto, municipio Moran y una finca en Las Lajitas, municipio Torres del estado Lara; y tres fincas de la localidad Cabimbu y una finca en La Lagunita, municipio San Rafael de Carvajal del estado Trujillo, las mismas consistieron de hojas, peciolas, sépalos, frutos y pedúnculos de las plantas de fresa que presentaron los síntomas característicos de la antracnosis. El muestreo se realizó durante los meses de mayo, junio y julio del 2008.

Los órganos fueron lavados con jabón líquido (Mas[®] ácido sulfónico 15%) y enjuagados con agua corriente. Del margen de las lesiones, se cortaron segmentos de 0,25 cm², los cua-

(1997), in Bolívar county, Mérida state, they identified *Colletotrichum acutatum* such as the agent causing the disease. Consequently, Guevara *et al.* (2004) mentioned *C. gloeosporioides* as the responsible of the disease in the counties Tovar (Aragua states) and El Jarillo (Miranda state). Farrera *et al.* (2007) also mentioned the presence of *C. acutatum* but this time in Táchira state.

The objective of this research is to determine the species of *Colletotrichum* that cause the antracnosis on the strawberry, in Lara and Trujillo states, Venezuela.

Materials and methods

Forty seven samples were collected from two farms located on Humocar Alto, Moran county, and a farm located on Las Lajitas, Torres county, Lara state; and three farms on La Lagunita, San Rafael de Carvajal county, Trujillo state. The samples consisted on leaves, petioles, sepals, fruits and peduncles of the strawberry plants that presented the characteristic symptoms of the antracnosis. The sampling was done during May, June and July of 2008.

The organs were washed with liquid soap (Mas[®] sulphonic acid 15%) and rinsed with running water. In the margin of the lesions, segments of 0.25 cm², were cut, which were disinfected for 2 min with isopropyl alcohol (70%), and were washed 3 times in sterile distilled water (ADE), were dried in sterile absorbent paper and taken to Petri plates with acidified water-agar (AAA) with 10 drops of lactic acid (88%)

les se desinfectaron durante 2 min con alcohol isopropílico (70%), se lavaron 3 veces en agua destilada estéril (ADE), se secaron en papel absorbente estéril, se transfirieron a platos Petri con agar-agua-acidificado (AAA) con 10 gotas de ácido láctico (88%) por cada 250 mL de medio y se incubaron a 25-27°C, bajo un régimen de 12h de luz blanca fluorescente/12h de oscuridad, hasta que se observó el desarrollo micelial del hongo (French y Hebert, 1980; Castaño, 1998). Las colonias desarrolladas fueron subcultivadas en papa-dextrosa-agar-acidificado (PDAA). Los platos se incubaron bajo las mismas condiciones de luz y temperatura antes descritas, hasta que se observó la esporulación característica de *Colletotrichum* en el medio de cultivo.

Los aislamientos del hongo se codificaron, de acuerdo al estado de procedencia, finca, órgano de la planta donde fueron obtenidos y número de planta muestreada; de cada uno de ellos se realizaron dos cultivos monospóricos siguiendo la metodología propuesta por French y Hebert (1980), los cuales se preservaron en tubos de ensayo con PDAA a 8±2°C.

Caracterización cultural de los aislamientos de *Colletotrichum* sp.

Cada uno de los cultivos monospóricos preservados de *Colletotrichum* se reactivaron en PDAA, se incubaron a 25-27°C, bajo condiciones de 12h luz blanca fluorescente y 12h de oscuridad. Una vez observada la coloración naranja característica de la esporulación (7-15 días de edad) se realizó la caracterización del crecimiento en PDAA, considerando el color y aspecto de la colonia (algodonosa

for each 250 mL of the medium, and were incubated at 25-27°C, with a regimen of 12h of fluorescent white light/12 h of dark, until was observed the mycelium development of the fungi (French and Hebert, 1980; Castaño, 1998). The colonies developed were sub-cultivated in acidified-potato-dextrose-agar (PDAA). The plates were incubated under the same light conditions and temperature described before, until observing the characteristic sporulation of *Colletotrichum* in the culture medium.

The isolations of the fungus were codified according to the origin, farm, and organ of the plant where these were obtained, as long as the number of the sampled plant; two monosporic cultures were performed on each of these, following the methodology proposed by French and Hebert (1980), which were preserved in assay tubes with PDAA at 8±2°C.

Cultural characterization of the isolations of *Colletotrichum* sp.

Each of the preserved monosporic cultures of *Colletotrichum* activated in PDAA, were incubated at 25-27°C, under conditions of 12h of fluorescent white light and 12h of dark. Once observed the characteristic orange coloring of the sporulation (7-15 days old) the growth characterization in PDAA was performed, considering the color and the aspect of the colony (cottony or dusty), the presence of concentric rings and the coloring of conidial masses in both the surface as in the reverse of the colonies (Smith, 2008; Xie *et al.*, 2010).

Determination of the shape and size of the conidial

5 semi-permanent preparations were prepared with phenol lact through

o polvorienta), la presencia de anillos concéntricos y la coloración de las masas de conidios, tanto en la superficie como en el reverso de las colonias (Smith, 2008; Xie *et al.*, 2010).

Determinación de la forma y tamaño de los conidios

Se realizaron 5 preparaciones semipermanentes con lactofenol por aislamiento (French y Hebert, 1980) y se observaron los conidios con un microscopio óptico Olympus, modelo CH20 (400X), a través del ocular se tomaron de 2-3 fotografías lámina con una cámara fotográfica Cyber-shot DSC-W70 de 7,2 megapíxeles y con un zoom de 2,3, para un total de 10-15 fotografías. aislamiento¹. Utilizando el software ImageJ® (ImageJ, 2009), se determinó el largo y ancho de 100 conidios por aislamiento, los resultados fueron expresados en píxeles por el programa ImageJ (ImageJ, 2009) y se transformaron en micrómetros (μm). Simultáneamente, a partir de las fotografías se estableció la forma de cada uno de los conidios medidos en base a la terminación de sus puntas (ambos extremos ahusados, ambos redondeados o uno ahusado y el otro redondeado) y se calculó el porcentaje de cada una de las formas presentadas, para así establecer la predominante, siguiendo la metodología propuesta por Oliveira *et al.* (2005).

Formación de clamidosporas de *Colletotrichum* sp.

Los cultivos monospóricos de *Colletotrichum* se reactivaron en AAA (2%), se incubaron a 25-27°C, bajo condiciones de 12h luz blanca fluorescente y 12h de oscuridad, durante 25-30 días (Cedeño y Carrero, 1997). Utilizando los equipos y procedimientos ya

isolation (French and Hebert, 1980) and the conidial were observed with an optical microscope Olympus, model CH20 (400X), 2-3 photographs-lamina were taken using the ocular, with a photograph camera Cyber-shot DSC-W70 of 7.2 megapixels and a 2.3 zoom, for a total of 10-15 photographs. isolations. Using the software ImageJ® (ImageJ, 2009), the length and width of 100 conidials were determined by isolations, the results were expressed in pixels using the program ImageJ® (ImageJ, 2009), and were transformed in micrometers (μm). Simultaneously, after the photographs the shape of each of the measured conidials were established in base of the termination of their spikes (both extremes tapered, both rounded or one tapered and the other rounded), and the percentage of each of the presented shapes was calculated, to establish the predominant and following the methodology proposed by Oliveira *et al.* (2005).

Chlamydospore formation of *Colletotrichum* sp.

The monosporic cultures of *Colletotrichum* were reactivated in AAA (2%), were incubated at 25-27°C, under conditions of 12 h of fluorescent white light and 12 h of darkness for 25-30 days (Cedeño and Carrerp, 1997). Using the equipments and procedures described before, the width and length were measured in 25 chlamydospores by isolation of the fungus.

Pathogenicity test in fruits

A suspension of 1×10^6 conidials. mL^{-1} was prepared from each of the 47 isolations obtained from the fungus, which were reactivated in PDAA (7 days old).

descritos, se midió el ancho y largo de 25 clamidosporas por aislamiento del hongo.

Prueba de patogenicidad en frutos

De cada uno de los 47 aislamientos obtenidos del hongo, los cuales fueron reactivados en PDAA (7 días de edad), se preparó una suspensión de 1×10^6 conidios. mL⁻¹.

Los frutos de fresa utilizados fueron adquiridos en mercados informales de la ciudad de Cabudare, estado Lara, todos presentaban el mismo grado de madurez (estado 9) recomendado por Smith (2007), para garantizar la mayor uniformidad en su susceptibilidad a la infección por el patógeno.

Los frutos fueron lavados con jabón líquido (Mas[®] ácido sulfónico 15%) y enjuagados con agua corriente, desinfectados durante 3 min con hipoclorito de sodio al 1,5%, lavados 3 veces en ADE y secados con papel absorbente estéril, finalmente fueron inoculados por inmersión durante 2 min en la suspensión de conidios, se inocularon 5 frutos por cada aislamiento y 5 se sumergieron en ADE solamente, como tratamiento testigo. Luego fueron colocados en bandejas plásticas transparentes, con tapas de cierre hermético, de 10 x 8,5 x 5 cm, las cuales contenían mallas metálicas colocadas sobre papel absorbente humedecido con ADE. Las bandejas, fueron colocadas en una cámara de crecimiento con luz fluorescente ($22,6 - 26,9 \mu \text{ mol S}^{-1} \text{ m}^2$, por períodos de 12h de luz y 12 de oscuridad) a 18-20°C, utilizando para ello un aire acondicionado de 11.500 Btu.h⁻¹, se mantuvieron cerradas herméticamente durante 48h (incubación) y se realizaron ob-

The strawberry fruits were acquired in informal markets of Cabudare, Lara state, all the fruits presented the same maturity degree (phase 9) recommended by Smith (2007) to guarantee the highest uniformity on its susceptibility towards the infection by the pathogen.

The fruits were washed with liquid soap (Mas[®] sulphonic acid 15%) and rinsed with running water, disinfected for 3 min with sodium hypochlorite at 1.5%, washed 3 times in ADE and dried with sterile absorbent paper, finally were inoculated by immersion for 2 min in the suspension of the conidials, 5 fruits per each isolation were inoculated and 5 were only immersed in ADE, as witness treatment. Later, were put on clear plastic trays, with hermetic lids of 10 x 8.5 x 5 cm, which has metallic mesh put on wet absorbent paper with ADE. The trays were put on a growth chamber with fluorescent light ($22.6 - 26.9 \mu \text{ mol S}^{-1} \text{ m}^2$, for periods of 12 h of light and 12 of darkness) at 18-20°C, using for it an air conditioning of 11.500 Btu.h⁻¹, were kept hermetically closed for 48 h (incubation) and daily observations were done until the characteristics symptoms of the antracnosis appeared on the fruits (3-5 days)

Two inoculated fruits per isolation were selected, examining their surfaces with a stereoscopic magnifier Olympus, model SZ51 (10X), to determine the presence of acervuli, which were taken with a sterile dissection needle to perform 5 semi-permanent preparations with phenol lact by isolation. In these, it was also determined the shape and size (length

servaciones diarias, hasta que los síntomas característicos de la antracnosis aparecieron sobre los frutos (3-5 días).

Se seleccionaron dos frutos inoculados por aislamiento, examinando sus superficies con una lupa estereoscópica Olympus, modelo SZ51 (10X) para determinar la presencia de los acérvulos, los cuales fueron tomados con una aguja de disección estéril para realizar 5 preparaciones semipermanente con lactofenol por aislamiento. En las mismas también se determinó la forma y tamaño (largo y ancho) de 100 conidios a través del programa ImageJ (ImageJ, 2009), según el procedimiento antes descrito.

El reaislamiento del hongo de los frutos de fresa inoculados se realizó siguiendo el mismo procedimiento señalado para los órganos vegetales colectados en campo. Las colonias desarrolladas a partir de los segmentos de éste órgano fueron subcultivadas en el medio PDAA, los platos se incubaron bajo las mismas condiciones de luz y temperatura antes descritas, hasta apreciar la esporulación característica de *Colletotrichum* en el medio, se realizaron cinco preparaciones semipermanentes con lactofenol por aislamiento para definir nuevamente la forma y tamaño de 100 conidios por aislamiento, a través del programa ImageJ (ImageJ, 2009).

Se utilizó un diseño de bloques al azar para el análisis del tamaño de los conidios considerando como bloque las condiciones experimentales donde el hongo los formó (procedencia): 1) reactivación en PDAA de los cultivos monospóricos de los aislamientos de órganos vegetales, 2) frutos inocula-

and width) of 100 conidials using the software (ImageJ, 2009), following the procedure described before.

The fungus re-isolation of the inoculated strawberry fruits was done following the same procedure mentioned for the vegetal organs collected in the field in the culture PDAA, the plates were incubated under the same light conditions and temperature described before, until appreciating the characteristic sporulation of *Colletotrichum* in the medium; five semi-permanent preparations with phenol lact were prepared to define one more time the size and shape of 100 conidials per isolation, using the program ImageJ (ImageJ, 2009).

A completely split-plot randomized design was used for the analysis of the conidials considering as plots the experimental conditions where the fungus formed (origin): 1) reactivation in PDAA of the monosporic cultures of the isolations of vegetal organs, 2) inoculated fruits in the pathogenicity and 3) developed colonies after the segments of inoculated fruits and sub-cultivated in PDAA, with 100 replications (conidials) by isolation and plot (100x47x3=14.100 conidials measured), the variance analysis and the mean comparison were performed (Tukey test, $P < 0.05$), using the statistical program Statistix version 8.0® (Analytical Software, 2003).

Results and discussion

Cultural characteristics of the *Colletotrichum* sp isolations

The forty seven monosporic

dos en la prueba de patogenicidad y 3) colonias desarrolladas a partir de los segmentos de frutos inoculados y subcultivadas en PDAA, con 100 repeticiones (conidios) por aislamiento y por bloque (100x47x3= 14.100 conidios medidos), se realizaron análisis de varianza y comparación de medias (prueba de Tukey, $P < 0,05$), utilizando el programa estadístico Statistix versión 8.0® (Analytical Software, 2003).

Resultados y discusión

Características culturales de los aislamientos de *Colletotrichum* sp.

Los cuarenta y siete cultivos monospóricos, a los 7-13 días de edad, presentaron colonias de aspecto y coloración semejantes, siendo la superficie de éstas algodonosas, inicialmente blancas, luego se tornaron gris oscuro con anillos concéntricos constituidos por masas de conidios de color naranja brillante. Por el reverso de las colonias, se apreciaron anillos concéntricos naranja y negros, con bordes blancos. Esta coloración desarrollada por las colonias en PDA contrasta con la señalada por Smith (1990) y Xie *et al.* (2010) para *C. fragariae* (inicialmente beis y luego gris oscuro) y para *C. gloeosporioides* (gris olivo oscuro), pero coincide con las características culturales descritas por los últimos autores para *C. acutatum*, cuyos aislamientos fueron blancos durante 4-5 días y luego se tornaron marrón oscuro, además concuerda con la referida por Farrera *et al.* (2007) para *C. acutatum*, quienes señalaron que las colonias fueron

cultures of 7-13 days old presented colonies with similar aspect and coloring, being the surface of these some cottony, initially white and then turned out dark gray with concentric rings constituted by conidial masses of a brilliant orange color. On the reverse of the colonies, were observed orange and black concentric rings with white borders. This coloring developed by the colonies in PDA contrasts to the one mentioned by Smith (1990) and Xie *et al.* (2010) for *C. fragariae* (initially beige and then dark gray) and for *C. gloeosporioides* (dark olive gray), but agrees to the cultural characteristics described by the mentioned authors for *C. acutatum*, which isolations were white for 4-5 days and then turned dark brown, it also agree to the one referred by Farrera *et al.* (2007) for *C. acutatum*, who mentioned that the colonies were white, with a dark grey center and concentric orange rings in the center as in the margins.

Characteristics and shape of the conidials

The observed conidials in all the cases (monosporic, inoculated fruits and re-isolated) were hyaline, unicellular and straight (figure 1), also, these presented three shapes, thus were classified into three categories: 1) mixes with a rounded extreme and a tapered extreme (R-A) with both tapered extremes (A-A) and 3) with both rounded extremes (R_R), also, the frequency of each of these shapes was determined (table 1).

Fusiform conidials were mostly presented with both tapered extremes, the proportion of these was from 54 to 90% (86%) in the fungi colonies developed after the reactivation of the

blancas, con el centro gris oscuro y anillos concéntricos color naranja tanto en el centro como en los márgenes.

Características y forma de los conidios

Los conidios observados en todos los casos (monospóricos, frutos inoculados y reaislamientos) fueron hialinos, unicelulares y rectos (figura 1), además éstos presentaron tres formas, por lo que se clasificaron en tres categorías: 1) mixtos, con un extremo redondeado y otro ahusado (R-A), 2) con ambos extremos ahusados (A-A) y 3) con ambos redondeados (R-R), además, se determinó la frecuencia de cada una de éstas formas (cuadro 1). Se presentaron mayoritariamente conidios fusiformes,

monosporic cultures, from 47 to 100% (87%) on the inoculated fruits, and from 63 to 100% (89.3%) after the re-isolation of the fruits, only the monosporic of L_1F_1 , L_1F_5 , L_1Pd_3 and Tr_1F_4 presented the lowest percentage of these structures (table 1). According to Smith (1990), *C. acutatum* produces conidials with the three types of termination (rounded-tapered, tapered-tapered and rounded-rounded) but with a predominance on the tapered extremes, and also mentioning that this was observed in nine isolations of this pathogen (87% average), likewise, Denoyes and Baudry (1995) determined that the isolations of *C. acutatum* presented a dominance of the fusiforms.

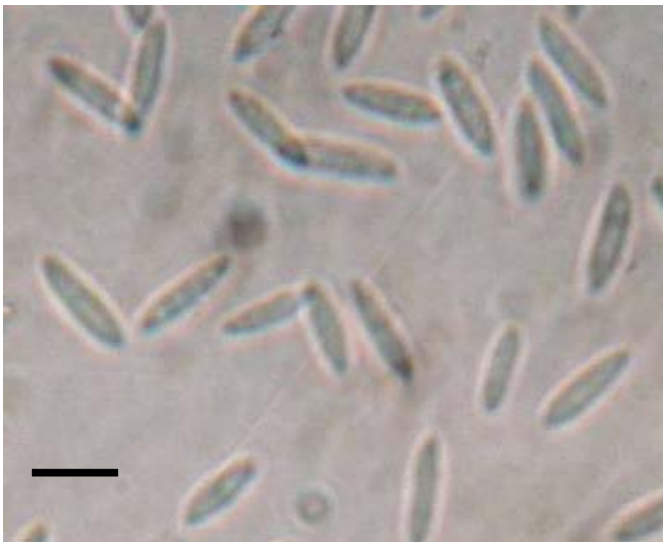


Figura 1. Conidios de *Colletotrichum acutatum* sp. predominantes en los aislamientos, con ambos extremos ahusados (400X). Bar=10 μ m.

Figure 1. *Colletotrichum acutatum* sp. conidials predominant on the isolations with both extremes tapered (400X). Bar=10 μ m.

Cuadro 1. Número de conidios con extremos redondeados y ahusados (R-A), extremos ahusados (A-A) y extremos redondeados (R-R) de cuarenta y siete aislamientos (Aislam.) de *Colletotrichum acutatum* de frutos (F) de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.), pedúnculos (Pd), sépalos (S), hojas (H), pecíolos (Pc), observados en la reactivación de los cultivos monosporicos, frutos inoculados y reaislamientos de frutos, colectados en tres fincas del estado Lara (L_{1,2,3}) y cuatro fincas en el estado Trujillo (Tr_{1,2,3,4}).

Table 1. Number of conidials with tapered and rounded extremes (R-A), tapered extremes (A-A) and rounded extremes (R-R) of forty seven isolations (Aislam.) of *Colletotrichum acutatum* of strawberry fruits (F) (*Fragaria x ananassa* Duch.), peduncles (Pd), sepals (S), leaves (H), petioles, observed in the reactivation of monosporic cultures, inoculated fruits and isolations of the fruits collected in three farms of Lara state (L_{1,2,3}) and four farms in Trujillo state. (Tr_{1,2,3,4}).

N°	Aislam.	Frutos						Reaislamientos					
		Monosporicos			Frutos			Reaislamientos			Frutos		
		R-A	A-A	R-R	Total	R-A	A-A	R-R	Total	R-A	A-A	R-R	Total
1	L ₁ F ₁	46	54	0	100	11	89	0	100	18	78	4	100
2	L ₁ F ₂	11	89	0	100	17	83	0	100	6	94	0	100
3	L ₁ F ₃	21	66	13	100	14	86	0	100	20	80	0	100
4	L ₁ F ₄	27	72	1	100	21	79	0	100	13	85	2	100
5	L ₁ F ₅	45	54	1	100	13	84	3	100	13	85	2	100
6	L ₁ Pd ₁	12	86	2	100	6	94	0	100	13	85	2	100
7	L ₁ Pd ₂	22	73	5	100	8	92	0	100	10	90	0	100
8	L ₁ Pd ₃	33	58	9	100	10	90	0	100	19	80	1	100
9	L ₁ Pd ₄	26	73	1	100	4	96	0	100	10	89	1	100
10	L ₁ S ₁	25	71	4	100	15	85	0	100	13	85	2	100
11	L ₁ H ₁	21	71	8	100	10	90	0	100	11	89	0	100
12	L ₁ Pc ₁	15	84	1	100	6	94	0	100	16	83	1	100
13	L ₂ F ₁	13	76	11	100	7	93	0	100	10	90	0	100
14	L ₂ F ₂	13	78	9	100	5	95	0	100	15	81	4	100
15	L ₂ F ₃	10	77	13	100	4	96	0	100	10	83	7	100

Cuadro 1. Número de conidios con extremos redondeados y ahusados (R-A), extremos ahusados (A-A) y extremos redondeados (R-R) de cuarenta y siete aislamientos (Aislam.) de *Colletotrichum acutatum* de frutos (F) de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.), pedúnculos (Pd), sépalos (S), hojas (H), pecíolos (Pc), observados en la reactivación de los cultivos monosporicos, frutos inoculados y reaislamientos de frutos, colectados en tres fincas del estado Lara (L_{1,2,3}) y cuatro fincas en el estado Trujillo (Tr_{1,2,3,4}) (Continuación).

Table 1. Number of conidials with tapered and rounded extremes (R-A), tapered extremes (A-A) and rounded extremes (R-R) of forty seven isolations (Aislam.) of *Colletotrichum acutatum* of strawberry fruits (F) (*Fragaria x ananassa* Duch.), peduncles (Pd), sepals (S), leaves (H), petioles, observed in the reactivation of monosporic cultures, inoculated fruits and isolations of the fruits collected in three farms of Lara state (L_{1,2,3}) and four farms in Trujillo state. (Tr_{1,2,3,4}) (Continuation).

N°	Aislam.	Monosporicos				Frutos				Reaislamientos			
		R-A	A-A	R-R	Total	R-A	A-A	R-R	Total	R-A	A-A	R-R	Total
16	L ₂ F ₄	12	76	12	100	7	93	0	100	24	72	4	100
17	L ₂ F ₅	14	72	14	100	3	96	1	100	10	90	0	100
18	L ₂ F ₆	20	73	7	100	5	95	0	100	13	77	10	100
19	L ₃ Pc ₁	18	72	10	100	6	94	0	100	2	98	0	100
20	L ₃ Pc ₂	15	75	10	100	6	94	0	100	13	84	3	100
21	L ₃ Pc ₃	17	75	8	100	8	92	0	100	14	82	4	100
22	L ₃ Pd ₁	11	84	5	100	6	94	0	100	16	82	2	100
23	L ₃ Pd ₂	12	84	4	100	10	90	0	100	13	84	3	100
24	L ₃ Pd ₃	19	73	8	100	7	93	0	100	10	87	3	100
25	L ₃ F ₁	16	82	2	100	15	85	0	100	30	63	7	100
26	Tr ₁ F ₁	5	84	11	100	9	91	0	100	10	87	3	100
27	Tr ₁ F ₂	15	85	0	100	13	86	1	100	10	88	2	100
28	Tr ₁ F ₃	26	71	3	100	4	96	0	100	0	100	0	100
29	Tr ₁ F ₄	38	59	3	100	45	47	8	100	0	100	0	100
30	Tr ₁ Pd ₁	17	81	2	100	20	78	2	100	0	100	0	100

Cuadro 1. Número de conidios con extremos redondeados y ahusados (R-A), extremos ahusados (A-A) y extremos redondeados (R-R) de cuarenta y siete aislamientos (Aislam.) de *Colletotrichum acutatum* de frutos (F) de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.), pedúnculos (Pd), sépalos (S), hojas (H), pecíolos (Pc), observados en la reactivación de los cultivos monospóricos, frutos inoculados y reaislamientos de frutos, colectados en tres fincas del estado Lara (L_{1,2,3}) y cuatro fincas en el estado Trujillo (Tr_{1,2,3,4}) (Continuación).

Table 1. Number of conidials with tapered and rounded extremes (R-A), tapered extremes (A-A) and rounded extremes (R-R) of forty seven isolations (Aislam.) of *Colletotrichum acutatum* of strawberry fruits (F) (*Fragaria x ananassa* Duch.), peduncles (Pd), sepals (S), leaves (H), petioles, observed in the reactivation of monosporic cultures, inoculated fruits and isolations of the fruits collected in three farms of Lara state (L_{1,2,3}) and four farms in Trujillo state. (Tr_{1,2,3,4}) (Continuation).

N°	Aislam.	Monospóricos						Frutos						Reaislamientos					
		R-A	A-A	R-R	Total	R-A	A-A	R-R	Total	R-A	A-A	R-R	Total	R-A	A-A	R-R	Total		
31	Tr ₁ Pd ₂	13	86	1	100	13	86	1	100	13	86	1	100	0	100	0	100		
32	Tr ₁ F ₁	24	73	3	100	9	89	2	100	13	87	2	100	13	87	0	100		
33	Tr ₂ F ₂	32	62	6	100	6	94	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100		
34	Tr ₂ F ₃	31	67	2	100	16	82	2	100	2	98	2	100	2	98	0	100		
35	Tr ₂ F ₁	33	67	0	100	11	89	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100		
36	Tr ₃ F ₂	21	79	0	100	25	75	0	100	10	89	0	100	10	89	1	100		
37	Tr ₃ F ₃	10	90	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100		
38	Tr ₃ F ₄	31	69	0	100	17	82	1	100	0	100	1	100	0	100	0	100		
39	Tr ₃ F ₅	12	88	0	100	29	68	3	100	8	92	3	100	8	92	0	100		
40	Tr ₃ F ₆	24	76	0	100	12	88	0	100	12	88	0	100	0	100	0	100		
41	Tr ₃ Pd ₁	15	82	3	100	33	62	5	100	15	84	5	100	15	84	1	100		
42	Tr ₃ Pd ₂	21	73	6	100	15	83	2	100	7	92	2	100	7	92	1	100		
43	Tr ₃ S ₁	11	88	1	100	13	85	2	100	11	88	2	100	11	88	1	100		
44	Tr ₄ F ₁	21	79	0	100	29	71	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100		
45	Tr ₄ F ₂	14	86	0	100	16	84	0	100	16	84	0	100	0	100	0	100		
46	Tr ₄ F ₃	17	82	1	100	5	95	0	100	5	95	0	100	0	100	0	100		
47	Tr ₄ F ₄	20	77	3	100	20	76	4	100	20	76	4	100	3	97	0	100		

con ambos extremos ahusados, la proporción de éstos fue de 54 a 90% (86%) en las colonias fúngicas desarrolladas a partir de la reactivación de los cultivos monospóricos, de 47 a 100% (87%) sobre los frutos inoculados y de 63 a 100% (89,3%) a partir del reaislamiento de los monospóricos de L_1F_1 , L_1F_5 , L_1Pd_3 y Tr_1F_4 presentaron el menor porcentaje de éstas estructuras (cuadro 1). Según Smith (1990), *C. acutatum* produce conidios con los tres tipos de terminación (redondeados-ahusados, ahusados-ahusados y redondeados-redondeados) pero con predominancia de los extremos ahusados, señalando además que nueve aislamientos de este patógeno los presentaron (87% en promedio), así mismo Denoyes y Baudry (1995) determinaron que los aislamientos de *C. acutatum* presentaban dominancia de los fusiformes.

Por otra parte, Villanueva *et al.* (2008) encontró que *C. fragarie* presentaba conidios con un extremo obtuso y otro ahusado, mientras que en *C. gloeosporioides* ambos eran obtusos. De la misma manera, Xie *et al.* (2010) señalaron que en *C. fragarie* fueron ovalados y en *C. gloeosporioides*, oblongos con puntas obtusas, de acuerdo a éste criterio morfológico, todos los aislamientos en la presente investigación se correspondieron con *Colletotrichum acutatum*.

Características de los conidios durante el proceso de germinación (cultivos monospóricos)

Los conidios de *Colletotrichum* sp. al germinar formaron un septo y los tubos germinativos en uno o ambos extremos, resultados que coincidie-

On the other hand, Villanueva *et al.* (2008) found that *C. fragarie* presented conidials with an obtuse extreme and another tapered one; meanwhile, in *C. gloeosporioides* both were obtuse. Likewise, Xie *et al.* (2010) mentioned that in *C. fragarie* were oval and in *C. gloeosporioides*, oblongs with obtuse spikes, according to this morphological criterion, all the isolations, in the current research, corresponded to *Colletotrichum acutatum*.

Conidial characteristics during the germination process (monosporic cultures)

Conidials of *Colletotrichum* sp. when germinated formed a septum and germinative tubes in one or both extreme, these results agree to those mentioned by Leandro *et al.* (2001), Sutton (1980) and Cedeño and Carro (1997), the latter authors also reported the lateral germination for *C. acutatum* obtained from strawberry samples in Venezuela, which was not observed in this research. However, Arroyo *et al.* (2005) observed that the lateral germination is not a frequent event, and it only predominates in one of the two extremes.

Size of the *Colletotrichum* sp. conidials

Significant differences presented for the variables longitude and width of the conidials, for both the isolations and the precedence factor (table 2), these presented a higher longitude (13.76 μm) when developed on the inoculated fruits, follow by the ones formed after the re-isolations of these organs (13.53 μm), reaching the lowest longitude (12.78 μm) after the monosporic cultures, this tendency

ron con los señalados por Leandro *et al.* (2001), Sutton (1980) y Cedeño y Carrero (1997), estos últimos autores reportaron, además la germinación lateral para *C. acutatum* obtenido de muestras de frutos de fresa en Venezuela, la cual no fue observada en ésta investigación. Sin embargo, Arroyo *et al.* (2005) observaron que la germinación lateral es un evento poco frecuente, predominando sólo en uno de los dos extremos.

Tamaño de los conidios de *Colletotrichum* sp.

Se presentaron diferencias significativas para las variables longitud y ancho de los conidios, tanto para los aislamientos como para el factor procedencia (cuadro 2), estos presentaron una mayor longitud (13,76 μm) cuando se desarrollaron sobre los frutos inoculados, seguidos por los formados a partir de los reaislamientos de éstos órganos (13,53 μm), alcanzando la menor longitud (12,78 μm) a partir de los cultivos monospóricos, ésta tendencia fue similar para la variable ancho (cuadro 2). Siendo los frutos uno de los sustratos naturales donde se desarrolla *Colletotrichum* sp. en el patosistema fresa-antracnosis, era de esperarse que sobre éstos, los conidios alcanzaran mayores medidas, además, la prueba de patogenicidad se realizó a 18-20°C, rango de temperatura considerado óptimo para el crecimiento de éste patógeno (Smith, 2008).

Los aislamientos de *Colletotrichum* del estado Trujillo, que presentaron la mayor y menor longitud fueron Tr_3Pd_1 y Tr_1F_3 (14,22 y 12,21 μm , respectivamente) y para el estado Lara fueron L_1Pd_2 y L_2Pd_2 (14,03 y 12,58 μm respectivamente). Con relación al ancho L_1Pd_3 y Tr_3Pd_1

was similar for the variable width (table 2). Since the fruits are one of the natural substrates where *Colletotrichum* sp. develops in the strawberry-antracnosis scab, it was expected that the conidials reach higher measures on these; the pathogenicity test was carried out at 18-20°C, which is an optimum temperature rank for the growing of this pathogen (Smith, 2008).

The isolations of *Colletotrichum* of Trujillo that presented the highest and lowest longitude were Tr_3Pd_1 and Tr_1F_3 (14.22 and 12.21 μm , respectively) and for Lara were L_1Pd_2 and L_2Pd_2 (14.03 and 12.58 μm respectively). In relation to the width L_1Pd_3 and Tr_3Pd_1 (4.06 and 3.63 μm) presented the highest values and, Tr_3S_1 and L_2Pc_1 (3.22 and 3.44 μm) the lowest (table 3).

Conidials presented ranks from 12.21-14.22 x 3.22-4.06 μm , with averages of 13.36 x 3.6 μm , which do not correspond to the ones reported by Gunnel and Gubler (1992) and Xie *et al.* (2010) for *C. gloeosporioides* (15 x 4.3 μm and 13.5 x 5.5 μm) and for *C. fragariae* (18 x 4 μm and 16 x 4.5 μm). According to these results the average measured obtained for the forty seven isolations are closer to the ones mentioned by these authors for *C. acutatum* (15.5 x 3.7 μm and 13.5 x 4.4 μm).

Chlamydospore formation of *Colletotrichum* sp.

In the culture media AAA, all the isolations formed chlamydospores in the hyphae after 25d of incubation, initially were hyalines and later turned out dark brown, most presented double wall and were interspersed (figura 2).

Cuadro 2. Longitud y ancho (μm) promedio de conidios de cuarenta y siete aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.), observados en la reactivación de los cultivos monospóricos, frutos inoculados y reaislamiento de frutos.

Table 2. Average longitude and width (μm) of conidials from forty seven isolations of *Colletotrichum acutatum* of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch), observed in the reactivation of monosporic cultures, inoculated fruits and re-isolation of fruits.

Procedencia de los conidios	Longitud (μm)
Frutos inoculados	13,76 ^a
Reaislamiento de frutos inoculados	13,53 ^b
Cultivos monospóricos	12,78 ^c
Procedencia de los conidios	Ancho (μm)
Frutos inoculados	3,80 ^a
Cultivos monospóricos	3,60 ^b
Reaislamiento de frutos inoculados	3,38 ^c

Valores con la misma letra no difieren estadísticamente, Tukey ($P \leq 0,05$).

(4,06 y 3,63 μm) presentaron los mayores valores, y Tr_3S_1 y L_2Pc_1 (3,22 y 3,44 μm) los menores (cuadro 3).

Los conidios presentaron rangos de 12,21-14,22 x 3,22-4,06 μm , con promedios de 13,36 x 3,6 μm , los cuales no se corresponden con los reportados por Gunnell and Gubler (1992) y Xie *et al.* (2010) para *C. gloeosporioides* (15 x 4,3 μm y 13,5 x 5,5 μm) y para *C. fragariae* (18 x 4 μm y 16 x 4,5 μm). De acuerdo a estos resultados las medidas promedios obtenidas para los cuarenta y siete aislamientos se acercan más a las señaladas por estos autores para la especie *C. acutatum* (15,5 x 3,7 μm y 13,5 x 4,4 μm).

Formación de clamidosporas de *Colletotrichum* sp.

En el medio de cultivo AAA, todos los aislamientos formaron

Cedeño and Carrero (1997) mencionaron que *C. acutatum* desarrolló estas estructuras de resistencia después de que el micelio se sumergió en cultivos producidos por tres semanas en AAA.

El análisis de variancia realizado para el tamaño de la clamidospora determinó que existen diferencias significativas entre los aislamientos, el que presentó el mayor valor para la longitud fue Tr_3S_1 (12,33 μm), seguido por L_2Pd_1 (11,74 μm), el menor fue producido por Tr_4F_2 y Tr_4F_3 (8,59 y 8,92 μm , respectivamente) (tabla 4). En relación con el ancho, el mayor valor fue Tr_3S_1 (10,94 μm) y el menor Tr_3F_5 (7,08 μm), los aislamientos de Lara que produjeron las clamidosporas con mayor y menor ancho fueron L_2Pd_1 (10,48 μm) y L_2F_1

Cuadro 3. Longitud y ancho (µm) promedio de conidios de cuarenta y siete aislamientos de *Colletotrichum acutatum* (AÑADIR) de frutos (F) de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.), pedúnculos (Pd), sépalos (S), hojas (H), pecíolos (Pc), observados en la reactivación de los cultivos monospóricos, frutos inoculados y reaislamientos de frutos, colectados en tres fincas del estado Lara (L_{1,2,3}) y cuatro fincas en el estado Trujillo (Tr_{1,2,3,4}).

Table 3. Average longitude and width (µm) of conidials from forty seven isolations of *Colletotrichum acutatum* of strawberry fruits (F) (*Fragaria x ananassa* Duch), peduncles (Pd), sepals (S), leaves (H), petioles (Pc), observed in the reactivation of monosporic cultures, inoculated fruits and reisolation of the fruits, collected in three farms of Lara state (L_{1,2,3}) and four farms in Trujillo state (Tr_{1,2,3,4}).

Aislamiento	Longitud (µm)	Grupo	Ancho (µm)	Grupo
Tr ₃ Pd ₁	14,22	A	3,63	A
Tr ₃ F ₆	14,07	AB	3,49	B
L ₁ Pd ₂	14,03	AB	3,91	B
L ₁ Pd ₃	14,02	AB	4,06	BC
Tr ₄ F ₃	13,98	ABC	3,32	BCD
L ₁ Pd ₁	13,96	ABCD	3,85	BCDE
L ₃ F ₁	13,96	ABCD	3,64	BCDE
L ₁ Pc ₁	13,92	ABCDE	3,67	BCDEF
L ₁ F ₁	13,87	ABCDEF	3,68	BCDEF
Tr ₃ F ₅	13,87	ABCDEF	3,49	CDEFG
Tr ₂ F ₃	13,86	ABCDEFG	3,53	CDEFG
Tr ₃ F ₂	13,76	ABCDEFGH	3,55	DEFGH
L ₁ Pd ₄	13,76	ABCDEFGH	3,73	EFGH
Tr ₄ F ₂	13,71	ABCDEFGHI	3,49	EFGHI
Tr ₄ F ₁	13,64	BCDEFGHI	3,32	FGHI
Tr ₁ F ₄	13,63	BCDEFGHIJ	3,55	FGHI
L ₁ F ₂	13,61	BCDEFGHIJK	3,88	GHIJ
L ₁ H ₁	13,60	BCDEFGHIJK	3,76	GHIJK
Tr ₃ Pd ₂	13,55	BCDEFGHIJKL	3,53	GHIJK
Tr ₂ F ₂	13,53	BCDEFGHIJKLM	3,47	GHIJKL
Tr ₃ F ₁	13,43	CDEFGHIJKLMN	3,39	HIJKL
L ₂ Pd ₁	13,43	DEFGHIJKLMNO	3,64	HIJKL
Tr ₂ F ₁	13,41	EFGHIJKLMNOP	3,50	IJKLM
L ₂ F ₄	13,40	EFGHIJKLMNOP	3,86	JKLMN

Valores con la misma letra no difieren estadísticamente, Tukey (P<0,05).

Cuadro 3. Longitud y ancho (µm) promedio de conidios de cuarenta y siete aislamientos de *Colletotrichum acutatum* (AÑADIR) de frutos (F) de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.), pedúnculos (Pd), sépalos (S), hojas (H), pecíolos (Pc), observados en la reactivación de los cultivos monospóricos, frutos inoculados y reaislamientos de frutos, colectados en tres fincas del estado Lara (L_{1,2,3}) y cuatro fincas en el estado Trujillo (Tr_{1,2,3,4}) (Continuación).

Table 3. Average longitude and width (µm) of conidials from forty seven isolations of *Colletotrichum acutatum* of strawberry fruits (F) (*Fragaria x ananassa* Duch), peduncles (Pd), sepals (S), leaves (H), petioles (Pc), observed in the reactivation of monosporic cultures, inoculated fruits and reisolation of the fruits, collected in three farms of Lara state (L_{1,2,3}) and four farms in Trujillo state (Tr_{1,2,3,4}) (Continuation).

Aislamiento	Longitud (µm)	Grupo	Ancho (µm)	Grupo
Tr ₁ Pd ₁	13,35	FGHIJKLMNOPQ	3,45	JKLMN
L ₂ Pc ₁	13,32	GHIJKLMNOPQ	3,44	JKLMN
L ₁ F ₅	13,27	HJKLMNOPQ	3,83	JKLMN
Tr ₁ Pd ₂	13,22	HJKLMNOPQ	3,34	JKLMN
L ₁ F ₃	13,20	IJKLMNOPQ	3,74	LMNO
L ₁ F ₃	13,20	IJKLMNOPQ	3,74	LMNO
L ₂ Pd ₃	13,19	IJKLMNOPQ	3,63	MNO
Tr ₃ F ₄	13,16	IJKLMNOPQR	3,50	MNO
L ₁ F ₄	13,08	JKLMNOPQRS	3,89	MNO
Tr ₃ F ₃	13,06	KLMNOPQRS	3,33	NO
L ₂ Pc ₃	13,04	LMNOPQRS	3,61	NO
Tr ₄ F ₄	13,00	LMNOPQRS	3,36	NOP
L ₂ F ₅	12,99	MNOPQRS	3,81	NOP
L ₂ F ₁	12,98	MNOPQRS	3,75	NOP
L ₂ F ₂	12,95	NOPQRS	3,75	NOPQ
L ₁ S ₁	12,88	OPQRS	3,80	NOPQR
L ₂ Pc ₂	12,88	PQRS	3,47	OPQR
L ₂ F ₆	12,85	QRST	3,65	PQR
Tr ₁ F ₂	12,85	QRST	3,48	QRS
L ₂ F ₃	12,63	RSTU	3,69	QRS
Tr ₃ S ₁	12,60	STU	3,22	QRS
L ₂ Pd ₂	12,58	STU	3,52	RS
Tr ₁ F ₁	12,31	TU	3,56	RS
Tr ₁ F ₃	12,21	U	3,34	S

Valores con la misma letra no difieren estadísticamente, Tukey (P<0,05).

clamidosporas en las hifas, a partir de los 25 d de incubación, inicialmente fueron hialinas y después se tornaron marrón oscuro, la mayoría presentaron doble pared y estaban intercaladas (figura 2). Cedeño y Carrero (1997) señalaron que *C. acutatum* desarrolló éstas estructuras de resistencia a partir del micelio inmerso en cultivos producidos por tres semanas en AAA.

El análisis de varianza realizado para el tamaño de las clamidosporas determinó que existen diferencias significativas entre los aislamientos, la que presentó el mayor valor para la longitud fue Tr_3S_1 (12,33 μm), seguida de L_2Pd_1 (11,74 μm), las más pequeñas fueron producidas por Tr_4F_2 y Tr_4F_3 (8,59 y 8,92 μm , respectivamen-

(7.27 μm) (table 4). The rank reached was of (8.59-12.33 μm) x (7.08-10.94 μm), with averages of 10.33 x 8.74 μm ; these resistance structures resulted to be bigger than the ones reported by Cedeño and Carrero (1997), which measures were of 5-11 x 4-6 μm .

Pathogenicity test

Colletotrichum sp. Fungus was re-isolated consistently from all the inoculated strawberry fruits, on which three days after the post-inoculation some initial symptoms of antracnosis were observe, such as circular small areas and slightly tapered with dark coffee color, these lesions incremented rapidly after the fifth day. These symptoms agreed to the ones described by Carrero and Cedeño (1997) and Farrera *et al.* (2007) in fruits collected



Figura 2. Clamidosporas formadas por *Colletotrichum acutatum* en el medio agar agua acidificado. A y B. Coloración marrón pálida presente en las etapas iniciales de formación y presencia de doble pared celular y C. Clamidospora madura marrón oscuro. Bar=10 μm .

Figure 2. Chlamyospore formed by *Colletotrichum acutatum* sp. in acidified water agar. A and B. Pale brownish coloring present on the initial formation phases and the presence of double cellular wall and mature C. Chlamyospore dark brown. Bar=10 μm .

Cuadro 4. Largo y ancho promedio (im) de las clamidosporas de los cuarenta y siete aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de frutos (F) de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.), pedúnculos (Pd), sépalos (S), hojas (H), pecíolos (Pc), observados en la reactivación de los cultivos monospóricos, frutos inoculados y reaislamientos de frutos, colectados en tres fincas del estado Lara (L_{1,2,3}) y cuatro fincas en el estado Trujillo (Tr_{1,2,3,4}).

Table 4. Average length and width (µm) of chlamydospore from the forty seven isolations of *Colletotrichum Acutatum* of strawberry fruits (F) (*Fragaria x ananassa* Duch.), peduncles (PD), sepals (S), leaves (H), petioles (Pc), observed in the reactivation of monosporic cultures, inoculated fruits and re-isolation of fruits, collected into three farms of Lara state (L_{1,2,3}) and four farms in Trujillo state (Tr_{1,2,3,4}).

Aislamiento	Longitud (µm)	Grupo	Ancho (µm)	Grupo
Tr ₃ S ₁	12,33	A	10,94	A
L ₂ Pd ₁	11,74	AB	10,48	AB
L ₁ Pd ₄	11,64	AB	10,15	ABC
Tr ₃ F ₃	11,61	AB	10,22	ABC
L ₁ Pd ₂	11,53	ABC	9,73	ABCD
L ₁ Pd ₃	11,34	ABCD	9,91	ABCDE
L ₂ Pc ₂	11,32	ABCD	9,83	ABCDEF
L ₂ F ₃	11,28	ABCD	9,43	ABCDEFG
L ₁ F ₄	11,21	ABCDE	8,84	ABCDEFGH
Tr ₂ F ₃	11,16	ABCDE	9,49	ABCDEFGHI
Tr ₃ Pd ₂	11,15	ABCDE	9,17	ABCDEFGHI
L ₁ F ₅	11,10	ABCDE	9,16	ABCDEFGHI
Tr ₃ F ₁	11,09	ABCDE	9,34	ABCDEFGHI
L ₁ S ₁	11,01	ABCDE	8,31	ABCDEFGHIJ
Tr ₃ F ₆	11,00	ABCDE	9,34	ABCDEFGHIJ
L ₂ Pc ₃	10,95	ABCDE	8,45	ABCDEFGHIJK
Tr ₁ F ₄	10,89	ABCDEF	9,35	ABCDEFGHIJK
L ₁ F ₃	10,84	ABCDEF	9,36	ABCDEFGHIJK
L ₂ F ₅	10,69	ABCDEF	9,08	ABCDEFGHIJK
Tr ₃ F ₄	10,66	ABCDEF	8,97	ABCDEFGHIJK
L ₁ Pd ₁	10,60	ABCDEF	8,64	ABCDEFGHIJK
L ₂ F ₂	10,60	ABCDEF	9,23	ABCDEFGHIJK
Tr ₁ Pd ₂	10,52	ABCDEF	9,19	BCDEFGHIJK
Tr ₁ F ₃	10,44	ABCDEF	8,64	BCDEFGHIJK
Tr ₄ F ₄	10,25	ABCDEF	8,96	BCDEFGHIJK

Valores con la misma letra no difieren estadísticamente, Tukey (P<0,05).

Cuadro 4. Largo y ancho promedio (im) de las clamidosporas de los cuarenta y siete aislamientos de *Colletotrichum* sp. de frutos (F) de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.), pedúnculos (Pd), sépalos (S), hojas (H), pecíolos (Pc), observados en la reactivación de los cultivos monospóricos, frutos inoculados y reaislamientos de frutos, colectados en dos localidades del estado Lara (L) y del estado Trujillo (Tr) (Continuación).

Table 4. Average length and width (µm) of chlamydospore from the forty seven isolations of *Colletotrichum* Acutatum of strawberry fruits (F) (*Fragaria x ananassa* Duch.), peduncles (PD), sepals (S), leaves (H), petioles (Pc), observed in the reactivation of monosporic cultures, inoculated fruits and re-isolation of fruits, collected into three farms of Lara state (L_{1,2,3}) and four farms in Trujillo state (Tr_{1,2,3,4}) (Continuation).

Aislamiento	Longitud (µm)	Grupo	Ancho (µm)	Grupo
L ₂ F ₄	10,22	ABCDEF	9,16	BCDEFGHIJK
L ₂ Pd ₃	10,19	ABCDEF	8,85	BCDEFGHIJK
L ₂ Pd ₂	10,15	ABCDEF	8,72	BCDEFGHIJK
L ₂ Pc ₁	10,05	ABCDEF	8,58	BCDEFGHIJK
Tr ₂ F ₂	9,89	BCDEF	8,72	BCDEFGHIJK
L ₁ H ₁	9,84	BCDEF	7,76	CDEFGHIJK
Tr ₂ F ₁	9,70	BCDEF	8,22	CDEFGHIJK
L ₁ Pc ₁	9,62	BCDEF	7,79	CDEFGHIJK
L ₁ F ₂	9,55	BCDEF	8,25	CDEFGHIJK
Tr ₃ F ₂	9,53	BCDEF	8,40	CDEFGHIJK
L ₂ F ₁	9,52	BCDEF	7,27	DEFGHIJK
Tr ₁ F ₂	9,48	BCDEF	8,31	DEFGHIJK
L ₃ F ₁	9,46	BCDEF	8,21	EFGHIJK
Tr ₄ F ₁	9,25	CDEF	7,38	EFGHIJK
Tr ₁ F ₁	9,20	DEF	7,84	EFGHIJK
L ₁ F ₁	9,17	DEF	7,54	FGHIJK
Tr ₁ Pd ₁	9,11	DEF	8,02	GHIJK
L ₂ F ₆	9,09	DEF	7,76	GHIJK
Tr ₃ Pd ₁	9,08	DEF	7,65	HIJK
Tr ₃ F ₅	9,05	DEF	7,08	IJK
Tr ₄ F ₃	8,92	EF	7,22	JK
Tr ₄ F ₂	8,59	F	7,60	K

Valores con la misma letra no difieren estadísticamente, Tukey (P<0,05).

te) (cuadro 4). Con relación al ancho, el mayor valor fue para Tr_3S_1 (10,94 μm) y el menor para Tr_3F_5 (7,08 μm), los aislamientos de Lara que produjeron las clamidosporas con mayor y menor ancho fueron L_2Pd_1 (10,48 μm) y L_2F_1 (7,27 μm) (cuadro 4). El rango alcanzado fue de (8,59-12,33 μm) x (7,08-10,94 μm), con promedios de 10,33 x 8,74 μm ; estas estructuras de resistencia resultaron ser más grandes que las reportadas por Cedeño y Carrero (1997), cuyas medidas fueron de 5-11 x 4-6 μm .

Prueba de patogenicidad

El hongo *Colletotrichum* sp. fue reaislado consistentemente de todos los frutos de fresa inoculados, sobre los cuales, a los tres días postinoculación se observaron los síntomas iniciales de la antracnosis, pequeñas áreas circulares, ligeramente hundidas de color café oscuro, estas lesiones se incrementaron rápidamente a partir del quinto día. Estos síntomas coincidieron con los descritos por Carrero y Cedeño (1997) y Farrera *et al.* (2007) en frutos colectados en los estados Mérida y Táchira. Con relación al periodo de incubación, este fue similar al señalado por Tanaka y Passos (2002), Ferreira *et al.* (2009) y Staðková *et al.* (2011) quienes determinaron que las lesiones en frutos inoculados en campo y en condiciones postcosecha con *C. acutatum* fueron visibles también a partir del 3-4 d.

También se observaron masas de conidios de color naranja o salmón sobre los frutos de fresa, 6 d después de la inoculación, los cuales se formaron en acérvulos constituidos por conidióforos hialinos, que se caracterizaron por la ausencia de setas (figura

in Mérida and Táchira. In relation to the incubation period, this was similar to the one mentioned by Tanaka and Passos (2002) Ferreira *et al.* (2009) and Staðková *et al.* (2011) who determined that the lesions on the fruits inoculated in the field and on post-harvest conditions with *C. acutatum* were also visible after days 3-4.

There were also observed conidials with orange or light orange color on the strawberry fruits 6 days after the inoculations, which were formed in acervuli constituted by hyaline conidiophores which were characterized by the absence of setae (figure 3). Smith (2008) mentioned that out of the three species that cause antracnosis in the crop of strawberry, only *C. gloeosporioides* and *C. fragariae* formed it, meanwhile, *C. acutatum* does not. Likewise, Živkovic *et al.* (2010) mentioned that the nine isolations of tomato fruits with antracnosis, which were morphological and molecular identified as *C. acutatum* did not show it either. On the contrary, Xie *et al.* (2010) mentioned that the three species identified causing antracnosis in the strawberry crops in China (*C. gloeosporioides*, *C. fragariae* and *C. acutatum*) did produce it.

Identification of the specie

The cultural characterization of each of the isolations of the fungus, the chlamydospore in the AAA media, the absence of setae in the acervuli formed on the inoculated fruits, the predominant shape of the conidials and the size of these allowed determining that the isolated and identified specie was *C. acutatum* (Sutton, 1980; Smith, 1990; Cedeño y Carrero, 1997; Freeman y Katan, 1997; Oliveira *et*

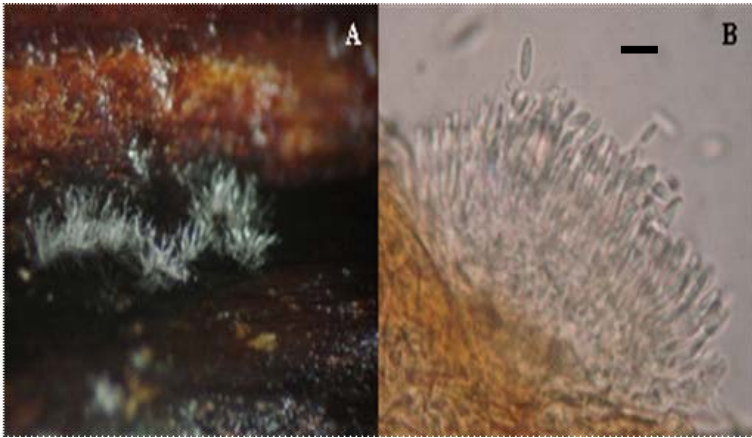


Figura 3. Estructuras reproductivas producidas por *Colletotrichum* sp. A. Acérvulos sobre la superficie de frutos de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) inoculados. B. Detalles de un acérvulo (400X). Bar=10 µm.

Figure 3. Reproductive structures produced by *Colletotrichum* sp. A. Acervuli on the surface of inoculated strawberry fruits (*Fragaria x ananassa* Duch.). B. Details of an acervulus (400X). Bar=10 µm.

3). Smith (2008) señaló que de las tres especies que causan antracnosis en el cultivo de la fresa, sólo *C. gloeosporioides* y *C. fragariae* las forman, mientras que *C. acutatum* no. Igualmente, Živkoviec *et al.* (2010) señalaron que los nueve aislamientos de frutos de tomate con antracnosis, identificados morfológica y molecularmente como *C. acutatum*, tampoco las presentaron. En contraste con estos autores, Xie *et al.* (2010) señalaron que las tres especies identificadas causando antracnosis en cultivos de fresa en China (*C. gloeosporioides*, *C. fragariae* y *C. acutatum*) las produjeron.

Identificación de la especie

La caracterización cultural de cada uno de los aislamientos del hon-

al., 2005; Farrera *et al.*, 2007; Smith, 2008; Živkoviec *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2010) in the forty seven samples collected from sepals, peduncles, petioles, foliar lamina and strawberry fruits, in the production units of Lara and Trujillo.

Conclusion

In the states of Venezuela, Lara (Morán and Torres counties, Humocaró Alto and Las Lajitas respectively) and Trujillo (San Rafael de Carvajal, Cabimbú and La Lagunita), the antracnosis of the strawberry crop is caused by *Colletotrichum acutatum*. It was also observed the variability on the size of the conidials and the chlamydospore,

go, la formación de clamidosporas en el medio AAA, la ausencia de setas en los acérvulos formados sobre los frutos inoculados, la forma predominante de los conidios y el tamaño de los mismos, permitieron determinar que la especie aislada e identificada en cuarenta y siete muestras colectadas, de sépalos, pedúnculos, pecíolos, lámina foliar y frutos de fresa, en las unidades de producción de los estados Lara y Trujillo, fue *C. acutatum* (Sutton, 1980; Smith, 1990; Cedeño y Carrero, 1997; Freeman y Katan, 1997; Oliveira *et al.*, 2005; Farrera *et al.*, 2007; Smith, 2008; Živkovic *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2010).

Conclusión

En los estados de Venezuela, Lara (municipios Morán y Torres, localidades Humocar Alto y Las Lajitas respectivamente) y Trujillo (municipio San Rafael de Carvajal, localidades Cabimbú y La Lagunita), la antracnosis del cultivo de la fresa, es ocasionada por *Colletotrichum acutatum*. Se observó, además, variabilidad en el tamaño de los conidios y las clamidosporas, lo cual no parece estar relacionado con el lugar de procedencia, ni con el órgano del cual fue aislado.

Literatura citada

Analytical Software. 2003. Statistix for Windows. Versión 8.0.

Arroyo, F., J. Moreno, G. García, B. de los Santos, C. Barrau, M. Porras, C. Blanco y F. Romero. 2005. Ultraestructure of the early stages of *Colletotrichum acutatum* infection

which does not seem to be related to the origin place or the organ from which were isolated.

End of english version

of strawberry tissues. Can. J. Bot. 83: 491-500.

Castaño, J. 1998. Prácticas de laboratorio de fitopatología. 2da edición. Centro editorial de la Universidad de Caldas. Colombia. 103 p.

Cedeño, L. y C. Carrero. 1997. Antracnosis causada por *Colletotrichum acutatum* en frutos de fresa en Mérida, Venezuela. Interciencia. 22(6):315-319.

Denoyes, B. y A. Baudry. 1995. Species identification and pathogenicity study of French *Colletotrichum* strains isolated from strawberry using morphological and cultural characteristics. Phytopathology. 85: 53-57.

Farrera, R., A. Zambrano y F. Ortiz. 2007. Identificación de hongos asociados a enfermedades del fruto de la fresa en el municipio Jáuregui del estado Táchira. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 24: 269-281.

Ferreira, T., M. Camargo y R. Panizzi. 2009. Efeito de extractos de plantas medicinais no controle de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da flor preta do morangueiro. Summa Phytopathologica. 35(3): 196-201.

Freeman, S. y T. Katan. 1997. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. Phytopathology. 87:516-521.

French, E. y T. Hebert. 1980. Métodos de investigación fitopatológica. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica. 289 p.

Guevara, Y., A. Aponte y A. Maselli. 2004. Enfermedades del cultivo de la fresa

en dos localidades agrícolas de Aragón y Miranda. INIA Divulga 3. 22-24 p.

American perspective. HortScience. 43(1):69-73.

Gunnell, P. y Gubler D. 1992. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. Mycologia. 84(2):157-165.

Staðková, B., J. Vichová y R. Pokorný. 2011. Virulencia of *Colletotrichum acutatum* isolates to several host plants. Acta Universitatis Agriculturae Et Silviculturae Mendelianae Brunensis. LIX(3): 161-170.

ImageJ. 2009. URL:<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>. ImageJ Image Processing and Analysis in Java. (Consulta: Septiembre 25, 2009).

Sutton, B. 1980. The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute. Kew. Surrey, England. 696 p.

Ivanoviæ, M., B. Duduk, M. Ivanoviæ y M. Ivanoviæ. 2007. Anthracnose-a new strawberry disease in Serbia and its control by fungicides. Proc. Nat. Sci. 113: 71-81.

Tanaka, M. y F. Passos. 2002. Caracterização patogênica de *Colletotrichum acutatum* e *C. fragariae* asociados à antracnose do morangueiro. Fitopatologia Brasileira. 27:484-488.

Leandro, L., M. Gleason, F. Nutter, S. Wegulo y P. Dixon. 2001. Germination and sporulation of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. Phytopathology. 91(7):659-664.

Villanueva, R., M. Yáñez, A. Hernández. 2008. Especies de *Colletotrichum* en chirimoya (*Annona cherimola* Mill.). Agrociencia. 42(1):689-701.

Oliveira, R., J. Moral, K. Bouhmidi y A. Trapero. 2005. Caracterización morfológica y cultural de aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la antracnosis del olivo. Bol. San. Veg. Plagas. 31: 531-548.

Xie, L., J. Zhang, Y. Wan y D. Hu. 2010. Identification of *Colletotrichum* spp. isolated from strawberry in Zhejiang province and Shanghai city, China. J. Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol). 11(1):61-70.

Smith, B. 1990. Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. Plant Disease. 74: 69-76.

Živkoviæ, S., S. Stojanoviæ, Z. Ivanoviæ, N. Trkulja, N. Dolovac, G. Aleksia y J. Bala. 2010. Morphological and molecular identification of *Colletotrichum acutatum* from tomato fruit. Phytomed. (Belgrade). 25(3): 231-239.

Smith, B. 2007. Developmental stage and temperatura affect strawberry flower and fruit susceptibility to anthracnose. NASS/NASGA Proceedings. 55-57.

Smith, B. 2008. Epidemiology and pathology of strawberry anthracnose: a North