

Caracterización fisiológica y patogénica de aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la antracnosis del olivo

J. MORAL, R. OLIVEIRA, J. C. TELLO, A. TRAPERO

La Antracnosis del olivo, causada por *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*, es una grave enfermedad en numerosas regiones olivareras del mundo, originando podredumbre de aceitunas (aceituna jabonosa) y puntisecado de ramas. Los aislados de *Colletotrichum* causantes de la Antracnosis del olivo en Andalucía presentan características morfológicas y culturales intermedias entre estas dos especies, aunque algo más próximas a la morfoespecie *C. acutatum*. En este trabajo, los aislados andaluces se han comparado con aislados representativos de las dos especies respecto a algunas características fisiológicas y patogénicas. El crecimiento de los aislados en un medio con caseína y en PDA con el fungicida benomilo ha puesto de manifiesto que los aislados andaluces produjeron hidrólisis de la caseína y fueron tolerantes al benomilo, al igual que los aislados de referencia de *C. acutatum*. La inoculación de frutos separados de almendro, fresa, manzano, naranjo y olivo, así como de hojas de adelfa, con aislados de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* procedentes de diferentes huéspedes (fresa, naranjo y olivo) ha puesto de manifiesto diferencias de virulencia y cierto grado de especialización patogénica entre aislados. La mayor especialización patogénica correspondió a los aislados de olivo, ya que fueron más virulentos en aceitunas que el resto de aislados y los únicos que causaron el síndrome de aceituna jabonosa. Aunque existieron diferencias de virulencia entre ellos, éstas no se correspondieron con la especie morfológica de *Colletotrichum*. Las aceitunas maduras fueron más susceptibles que las verdes, pero éstas permitieron detectar mayores diferencias entre aislados. Las hojas de adelfa permitieron diferenciar los aislados de olivo, que resultaron no patogénicos o escasamente virulentos, del resto de los aislados, que fueron altamente virulentos.

J. MORAL, A. TRAPERO. Grupo de Patología Agroforestal. Dpto. de Agronomía. ETSIAM. Campus Universitario de Rabanales. Universidad de Córdoba. Apdo. 3048. 14080-Córdoba

R. OLIVEIRA. Facultad de Ciencias Agrarias de Huambo, Universidade Agostinho Neto, Angola

J. C. TELLO. Dpto. Producción Vegetal. EPS. Universidad de Almería. La Cañada de San Urbano s/n. 04120-Almería

Palabras clave: *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *Olea europaea*, *Gloeosporium olivarum*.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades conocidas como "Antracnosis" afectan a hojas, ramas y frutos y se presentan como manchas oscuras o lesiones deprimidas con los bordes ligeramente elevados. La mayoría de los hongos responsables de estas enfermedades pertenecen a cua-

tro géneros de ascomicetos: *Diplocarpon*, *Elsinoë*, *Glomerella* y *Gnomonia*, que se corresponden con distintos géneros de hongos imperfectos pertenecientes a los *Melanconiales*. Dentro de los anamorfos, los más importantes son *Colletotrichum* (= *Gloeosporium*), *Coryneum*, *Cylindrosporium*, *Marssonina*, *Melanconium* y *Sphaceloma* (AGRIOS, 2005).

En España y Portugal se acepta que el agente causal de la Antracnosis del olivo (*Olea europaea*) lo constituyen dos especies de *Colletotrichum*: *C. acutatum*, como especie principal; y *C. gloeosporioides* de presencia ocasional (MARTÍN y GARCÍA-FIGUERES, 1999; MARTÍN *et al.*, 2002; TALHINHAS *et al.*, 2005). En cambio, en Sicilia los aislados de *Colletotrichum* que afectan al olivo han sido

descritos como *C. gloeosporioides sensu stricto* (SACARITO *et al.*, 2003). Aunque los aislados de *Colletotrichum* que afectan al olivo en Calabria, Apulia y Cerdeña (sur de Italia) y Umbria (centro de Italia) han mostrado características genéticas y fisiológicas distintas a *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*, siendo descritos como *Colletotrichum* sp. olivo-específico (AGOSTEO *et al.*, 2003).

Cuadro 1. Aislados de *Colletotrichum* spp. estudiados

Aislado	Especie	Huésped	Tejido afectado	Procedencia
COL-09	<i>Colletotrichum acutatum</i> ¹	Olivo	Pedúnculo	Antequera, Málaga
COL-24	<i>Colletotrichum acutatum</i> ¹	Olivo	Fruto	Rute, Córdoba
COL-25	<i>Colletotrichum acutatum</i> ¹	Olivo	Tallo	Rute, Córdoba
COL-30	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Olivo	Pedúnculo	Antequera, Málaga
COL-38	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Fruto	Las Navas C. Sevilla
COL-41	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ²	Olivo	Fruto	Montsia, Tarragona
COL-42	<i>Colletotrichum acutatum</i> ²	Olivo	Fruto	Montsia, Tarragona
COL-45	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ²	Fresa	Fruto	IMI-356878
COL-49	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Fruto	Osuna, Sevilla
COL-50	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Fruto	Lucena, Córdoba
COL-51	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Fruto	Lucena, Córdoba
COL-55	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Fruto	Mollina, Málaga
COL-57	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Fruto	Archidona, Málaga
COL-59	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Fruto	Archidona, Málaga
COL-60	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Fruto	Archidona, Málaga
COL-61	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Fruto	Iznajar, Córdoba
COL-65	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Fruto	Montilla, Córdoba
COL-66	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Olivo	Fruto	Hornachuelos, Córdoba
COL-68	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Fruto	Montilla, Córdoba
COL-69	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Naranja	Hoja	La Palomera, Córdoba
COL-77	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Fruto	Constantina, Sevilla
COL-79	<i>Glomerella acutata</i>	Naranja	Tallo	Huelva
COL-83	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Fruto	Montilla, Córdoba
COL-84	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Fresa	Fruto	Sevilla
COL-85	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Fresa	Fruto	Sevilla
COL-86	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Fresa	Fruto	Sevilla
COL-87	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Fruto	Montilla, Córdoba
COL-88	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Olivo	Fruto	Montilla, Córdoba
COL-89	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Fruto	Cabra, Córdoba
COL-90	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Fruto	Cabra, Córdoba

Los aislados que no tienen especie indicada muestran características morfológicas intermedias a ambas especies, complejo *C. acutatum* / *C. gloeosporioides*. ¹Aislados de características morfológicas intermedias pero identificados molecularmente como *C. acutatum*. ²Aislados de referencia.

En Andalucía, OLIVEIRA *et al.* (2005) han estudiado distintas características morfológicas y culturales de aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la Antracnosis del olivo. La característica que se ha mostrado más útil para diferenciar entre especies ha sido la morfología de los extremos de las conidias. La mayoría de los aislados (94.5%) mostraron más del 60% de las conidias mixtas, con un extremo agudo (fusiforme) y el otro redondeado, mientras que las conidias de *C. gloeosporioides* presentaron los dos extremos redondeados, y las de *C. acutatum*, mayoritariamente los dos extremos agudos (elipsoidales). Además, las conidias de los aislados de Andalucía son más estrechas que las descritas por SUTTON (1980; 1992) para *C. acutatum*, aunque sí se ajustan a la anchura descrita por otros autores para esta especie (SMITH y BLACK, 1990). Por tanto, la mayoría de aislados de *Colletotrichum* estudiados han mostrado características morfológicas intermedias a ambas especies, de ahí, que se hayan incluido en el complejo *C. acutatum/C. gloeosporioides*.

Para completar el estudio anterior, en el presente trabajo se ha realizado una caracterización fisiológica y patogénica de aislados de *Colletotrichum* spp. que afectan al olivo en Andalucía. Las características fisiológicas más usadas para la identificación de especies de *Colletotrichum* son el crecimiento en diferentes medios de cultivo a diferentes temperaturas, y la sensibilidad a distintos fungicidas (SUTTON, 1992; FREEMAN *et al.*, 1998; ADASKAVEG y HARTIN, 1997). Así, se acepta que los aislados de *C. acutatum* de cítricos no son muy sensibles a Benomilo, sufriendo un inhibición del crecimiento entorno al 50% a $1 \mu\text{g ml}^{-1}$. A la misma dosis, el crecimiento de los aislados de *C. gloeosporioides* es completamente inhibido (PERES *et al.*, 2004). La capacidad de hidrolizar distintas proteínas también se ha empleado para la diferenciación de especies fúngicas. En el caso de *Colletotrichum* spp. se ha utilizado la capacidad de hidrolizar caseína, observándose que los aislados de *C. acutatum* poseen esta capacidad mientras que los de *C. gloeosporioides* no

(MARTÍN y GARCÍA-FIGUERES, 1999; MARTÍN *et al.*, 2002).

Por otro lado, los estudios de patogenicidad también se han utilizado para la caracterización de especies fúngicas. Así, VAN DER AA *et al.*, (1990), proponen la realización de tests de patogenicidad en *Anemone coronaria* para separar la especie *C. acutatum* (patogénica) de *C. gloeosporioides* (no patogénica). En este sentido, los estudios realizados han mostrado que la mayoría de las especies de *Colletotrichum* están poco especializadas, aunque en pocas ocasiones se han incluido aislados de *C. acutatum* (BERNSTEIN *et al.*, 1995; PERES *et al.*, 2005). En los estudios realizados con aislados de olivo (MORAL, 2004; MUGNAI *et al.*, 1993), se ha observado que muestran una apreciable especialización patogénica aunque son capaces de infectar y desarrollar enfermedad en otros huéspedes distintos al de origen.

El objetivo principal del presente trabajo es caracterizar fisiológica y patogénicamente los aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la Antracnosis del olivo en Andalucía.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Origen de los aislados

Los aislados de *Colletotrichum* spp. procedían de frutos, pedúnculos, hojas y tallos de distintos cultivares de olivo en las provincias de Córdoba, Málaga y Sevilla. Además, se incluyeron varios aislados de olivo y fresa de la colección del Laboratorio de Sanidad Vegetal de Barcelona, dos aislados de naranjo de Huelva y Córdoba, y tres aislados de fresa de Sevilla (Cuadro 1).

2. Caracterización fisiológica

2.1. Sensibilidad al fungicida Benomilo

La sensibilidad al fungicida Benomilo se estudió sembrando 30 aislados de *Colletotrichum* spp. en Agar Patata Dextrosa (PDA: Difco™ Potato Dextrose Agar) con $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de fungicida. Para conseguir una buena distribución del fungicida en el medio de cultivo se preparó una suspensión de 15 mg de fungicida comercial (Benomilo 50%; Aragone-

sas Agro, WP) en 50 ml de Agua Desionizada Destilada (ADD) y estéril. La suspensión se trasvasó a 1450 ml de PDA antes de su solidificación (45°C) y se homogenizó. Por último, el medio se vertió en placas de Petri de 9 cm (25 ml placa⁻¹).

Los aislados se sembraron situando discos (5 mm) de PDA procedentes de la periferia de una colonia en crecimiento. Las placas se sellaron con Parafilm® y se incubaron a 22±2°C con fotoperíodo alterno de 12 h con luz blanca y próxima a ultravioleta (40 µE m⁻² s⁻¹).

La evaluación se realizó a los 7 días midiéndose el diámetro mayor y menor de cada colonia. El cálculo del porcentaje de inhibición se realizó comparando el crecimiento de cada aislado en PDA y PDA más 5 µg ml⁻¹ de Benomilo. La unidad experimental del ensayo fue la placa de Petri. Se dispusieron tres placas por aislado y se hicieron dos repeticiones del ensayo.

2.2 Evaluación de la capacidad de hidrolizar caseína

Se estudió la capacidad de hidrolizar caseína de 30 aislados de *Colletotrichum* spp. sembrándolos en el medio de hidrólisis de la caseína (CHM). La base de este medio fue Agar Agua (AA) al 2% y como fuente de caseína se utilizó leche en polvo descremada (Sveltesse Nestle®).

En un ensayo previo, se evaluaron cuatro concentraciones de leche en polvo en el CHM. Para ello, se prepararon cuatro disoluciones al 10, 15, 20 y 25% de leche en polvo en ADD. Las disoluciones se esterilizaron en autoclave a 120°C durante 15 min. A continuación, se añadían 20 ml de la disolución de leche a evaluación a 980 ml de AA antes de su solidificación. De las cuatro concentraciones evaluadas, la más adecuada fue la que usaba una disolución de leche al 15%, ya que se formaban halos de hidrólisis de varios mm que contrastaban bien con el color del medio. De ahí, que se utilizará esta concentración para el resto del ensayo.

El medio se vertió en placas de Petri de 9 cm de diámetro (25 ml placa⁻¹) y la siembra

e incubación se realizó como se describe en el apartado anterior. La evaluación se realizó a los 5 días de incubación, tomándose como dato la presencia o ausencia del halo de hidrólisis alrededor de la colonia del patógeno. La unidad experimental del ensayo fue la placa de Petri. Se dispusieron tres placas por aislado y se hicieron dos repeticiones del ensayo.

2.3. Análisis de los datos

Los datos se analizaron mediante el programa Statistix 8 (Analytical Software, 2003). Se aplicó un análisis de la varianza completamente al azar y las comparaciones de medias se realizaron según el test HSD (Mínima Diferencia Significativa) protegido de Tukey, al nivel de probabilidad del 5%.

3. Caracterización patogénica de aislados

3.1 Inoculación de aceitunas maduras

Se inocularon aceitunas sueltas y sanas con índice de madurez 3 (BARRANCO y RALLO, 2005) de la variedad susceptible 'Hojiblanca' (MORAL *et al.*, 2004), con 17 aislados de *Colletotrichum* spp. de olivo, 1 de *C. gloeosporioides* de fresa y 1 de *C. gloeosporioides* de naranjo.

Las aceitunas fueron recogidas de árboles sanos e introducidas en matraces con 1 litro de ADD estéril al que se añadieron 6 gotas de Tween-20. Los matraces se mantuvieron durante 4 min en un baño de ultrasonidos para eliminar el cobre procedente de los tratamientos químicos aplicados a los olivos en el campo. A continuación, las aceitunas se lavaron suavemente, manteniéndose bajo una corriente de agua durante 45 min. Después se sumergieron en lejía (50 g Cl l⁻¹) al 10% durante 1 min, se lavaron nuevamente y se dejaron secar.

La inoculación se realizó sumergiendo las aceitunas en una suspensión de 10⁶ conidias ml⁻¹ durante 30 min. Los testigos se sumergieron en ADD estéril.

Las aceitunas inoculadas se incubaron en cámaras húmedas (100% humedad relativa) en las condiciones anteriormente descritas.

Se realizaron tres repeticiones (cámaras húmedas) con 20 aceitunas por tratamiento.

La evaluación se realizó semanalmente durante 21 días utilizando una escala de severidad de 0-6 (0=no síntomas, 1=1-25% superficie de la aceituna afectada, 2=26-50%, 3=51-75%, 4=76-99%, 5=100% aceituna con podredumbre (jabonosa), 6=aceituna momificada). Posteriormente, se calculó el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) y se dividió por un valor máximo teórico para obtener el ABCPE relativa (%).

3.1. Inoculación de aceitunas inmaduras

Se inocularon aceitunas sueltas y sanas con índice de madurez 0 (BARRANCO y RALLO, 2005) de la variedad susceptible 'Hojiblanca' (MORAL *et al.*, 2004) con 5 aislados de *Colletotrichum* spp. de olivo, 1 de *C. acutatum* de fresa, 1 de *C. gloeosporioides* y 1 de *Glomerella cingulata* de naranjo.

La inoculación se realizó por pulverización (2 kg cm⁻²) de una suspensión de 5x10⁵ conidias ml⁻¹. La preparación de los frutos, la incubación y evaluación se realizaron según lo descrito en el apartado anterior. Se realizaron tres repeticiones (cámaras húmedas con 20 aceitunas) por aislado.

3.2. Inoculación de frutos y hojas de distintos huéspedes

Se realizaron inoculaciones cruzadas en las que se utilizaron 2 aislados de *C. acutatum* y 1 del complejo *C. acutatum/C. gloeosporioides* de olivo, 1 de *C. gloeosporioides* de naranjo, 1 de *G. cingulata* de naranjo y 1 de *C. gloeosporioides* de fresa. Se inocularon los siguientes sustratos: frutos maduros de manzano (*Malus x domestica* 'Golden Delicious') y naranjo (*Citrus sinensis* 'Navel Lanelate'); frutos inmaduros de fresa (*Fragaria x ananassa* 'Camarosa') y almendra (*Prunus dulcis* 'Guara'); y hojas jóvenes de adelfa (*Nerium oleander*). Por último, se evaluó la capacidad patogénica de 2 aislados de naranjo y 1 de fresa en aceitunas 'Hojiblanca' sobremaduras (recogidas en Abril) comparándose con un aislado de olivo de virulencia media.

Los frutos y hojas fueron lavados con ADD y desinfectados sumergiéndolos en agua con lejía (50 g Cl l⁻¹) al 10% durante 1 min, posteriormente se volvieron a lavar y se dejaron secar.

La inoculación se realizó situando sobre la superficie de los frutos un bloque (9mm) de PDA con micelio y conidias del patógeno. Con un alfiler esterilizado se atravesó el bloque de PDA clavándose someramente en la superficie del fruto. Las hojas de adelfa se inocularon de igual forma pero con tres bloques (7 mm) de inóculo por hoja. Este método se había mostrado útil para estudiar diferencias de virulencia entre aislados en ensayos previos (MORAL, 2004). La inoculación de las aceitunas e incubación se realizaron de la forma descrita anteriormente. Se dispusieron tres repeticiones (cámaras húmedas con 10 frutos u hojas) por aislado y huésped. En el caso de las aceitunas nuevamente se utilizaron 20 frutos en cada repetición.

La evaluación se realizó periódicamente midiéndose el diámetro mayor y menor de la lesión causada por el patógeno. Para las almendras y aceitunas, se utilizó la escala descrita anteriormente. El tiempo de incubación osciló en función de la velocidad a la que se desarrollaron las lesiones: 12 días para las fresas, 14 para las aceitunas, 18 para las hojas de adelfa, 21 para las almendras y 41 para las naranjas. Con las evaluaciones temporales se calculó el ARBCPE (%) respecto a un máximo teórico.

Para los testigos se utilizaron bloques de PDA sin el patógeno. En el caso de las aceitunas se utilizó ADD estéril. Cuando finalizó el ensayo se realizaron aislamientos en PDA a partir de los tejidos afectados.

3.3. Análisis de los datos

Los datos se analizaron mediante el programa Statistix 8 (Analytical Software, 2003). El diseño experimental fue completamente al azar y se aplicó un análisis de la varianza. Cuando fue necesario, el ARBCPE (%) se transformó como $\arcsen \sqrt{\%/100}$. La comparación de medias se rea-

lizó según el test HSD (Mínima Diferencia Significativa) de Tukey, al nivel de probabilidad del 5%.

RESULTADOS

1. Sensibilidad al fungicida Benomilo

El crecimiento micelial de los aislados de *Colletotrichum* spp. en PDA con 5 µg ml⁻¹ fue muy variable. El aislado COL-41 no fue capaz de crecer en el medio con fungicida, en cambio, el aislado COL-42 sólo disminuyó su crecimiento un 41%. La inhibición estuvo influida significativamente ($P < 0.05$) por el aislado. La comparación de medias (Test de Tukey) mostró que los aislados COL-41, COL-45, COL-69 y COL-79 fueron los más afectados por el Benomilo sin mostrar diferencias significativas entre sí. Por el contrario, los aislados más tolerantes al fungicida fueron el COL-42, COL-89 y COL-90 (Cuadro 2).

En general, se diferenciaron dos grupos. El primero formado por aquellos aislados identificados en base a sus características morfológicas como *C. gloeosporioides* (COL-41, COL-45, COL-69) o *G. cingulata* (COL-79), procedentes de naranjo, fresa y olivo de Cataluña que se mostraron extremadamente sensibles (inhibición >95%) al fungicida. El segundo constituido por los aislados de *C. acutatum* de fresa y de *Colletotrichum* spp. de olivo de Andalucía. Este grupo mostró un comportamiento continuo con 9 grupos homogéneos en los que el porcentaje de inhibición oscilaba entre un 41 y un 70% (Cuadro 2).

Cabe destacar que los aislados de olivo de Andalucía COL-30 y COL-88 (tipo morfológico *C. gloeosporioides*) se mostraron moderadamente tolerantes al Benomilo.

Además de la comentada inhibición del crecimiento, las colonias que se desarrollaron en PDA más Benomilo presentaron menor desarrollo de micelio aéreo algodonoso y mayor producción de conidias.

2. Evaluación de la capacidad de hidrolizar caseína

El halo de hidrólisis se pudo apreciar en torno a las colonias de los aislados de *Colle-*

totrichum spp. desde el primer día de incubación. No se observaron diferencias en la transparencia del halo de hidrólisis pero sí en su tamaño (Cuadro 2).

Los aislados identificados atendiendo a sus características morfológicas como *C. gloeosporioides* (COL-41, COL-45, COL-69) o *Glomerella cingulata* (COL-79), procedentes de olivo de Cataluña, fresa y naranjo, no mostraron capacidad de hidrolizar la caseína. En cambio, los aislados de *C. acutatum* de fresa y de *Colletotrichum* spp. de olivo de Andalucía sí mostraron halo de hidrólisis en el medio CHM. Cabe destacar que todos los aislados de olivo de Andalucía, independientemente de sus características morfológicas, mostraron halo de hidrólisis en torno a la colonia en crecimiento (Cuadro 2).

3. Inoculación de aceitunas maduras

Todos los aislados de *Colletotrichum* spp. evaluados, independientemente del huésped de origen, fueron patogénicos en aceitunas maduras (IM=3) aunque hubo diferencias muy acusadas de virulencia. La comparación de medias utilizando el test de Tukey mostró 5 grupos homogéneos. El grupo mayoritario estaba formado por aislados de olivo con un ARBCPE >67% (Figura 1). Todos los aislados de olivo causaron en los frutos inoculados exudados anaranjados-mucilaginosos de conidias (síndrome de "Aceituna jabonosa") característicos de la Antracnosis del olivo (Figura 2D). Los aislados de referencia (COL-9 y COL-30) fueron los menos virulentos de los aislados de olivo evaluados.

Los aislados de fresa y naranjo (COL-45 y COL-69) fueron escasamente patogénicos (ARBCPE < 11%) diferenciándose significativamente ($P = 0.05$) del resto de aislados de olivo. Además, las aceitunas afectadas por éstos mostraron lesiones necróticas redondeadas cubiertas de pústulas sin producir el síndrome característico de aceituna jabonosa. La observación al microscopio (400A) confirmó que las pústulas se trataban de conidiomas acervulares (acérvulos) poco desarrollados y sin esporular.

Cuadro 2. Sensibilidad al fungicida Benomilo y capacidad de hidrolizar la caseína de los aislados de *Colletotrichum* spp. estudiados

Aislado ¹	Inhibición (%) ²	Hidrólisis Caseína ³
COL-41	100.0	-
COL-69	99.65	-
COL-79	99.40	-
COL-45	96.56	-
COL-55	70.21	++
COL-77	69.90	++
COL-83	69.80	++
COL-25	69.26	++
COL-59	68.95	++
COL-51	67.63	++
COL-60	66.93	++
COL-24	64.98	++
COL-88	64.47	++
COL-87	64.33	++
COL-30	63.68	++
COL-68	61.88	++
COL-49	61.65	++
COL-84	60.54	++
COL-65	60.42	++
COL-50	59.79	++
COL-38	58.88	++
COL-86	58.66	+
COL-57	57.24	++
COL-66	56.43	++
COL-61	55.71	++
COL-09	55.71	++
COL-85	51.20	+
COL-90	46.51	++
COL-89	43.49	++
COL-42	41.38	++
HSD ⁴	6.32	

¹ Las características de los aislados se indican en Cuadro 1. ² Inhibición del crecimiento micelial en el medio PDA con Benomilo (5 µg/ml). ³ Nivel de actividad proteolítica: '-' sin actividad; '+' halo de hidrólisis ≤ 2mm de anchura; '++' halo de hidrólisis >2mm de anchura. ⁴ Mínima diferencia significativa según test de Tukey protegido de Fisher (P=0.05).

4. Inoculación de aceitunas inmaduras

Al igual que en el caso anterior los 5 aislados de olivo, independientemente del tipo morfológico, fueron patogénicos aunque con diferencias significativas (P=0.05) de virulencia. Nuevamente, el aislado de referencia (COL-30) fue el menos virulento de los de

olivo. Todos los aislados de olivo causaron el síndrome característico de "Aceitunas jabonosa".

Los aislados de *C. gloeosporioides* y *G. cingulata* de naranjo (COL-69 y COL-79) fueron escasamente patogénicos, con un 18 y 5% de ARBCPE, respectivamente; además,

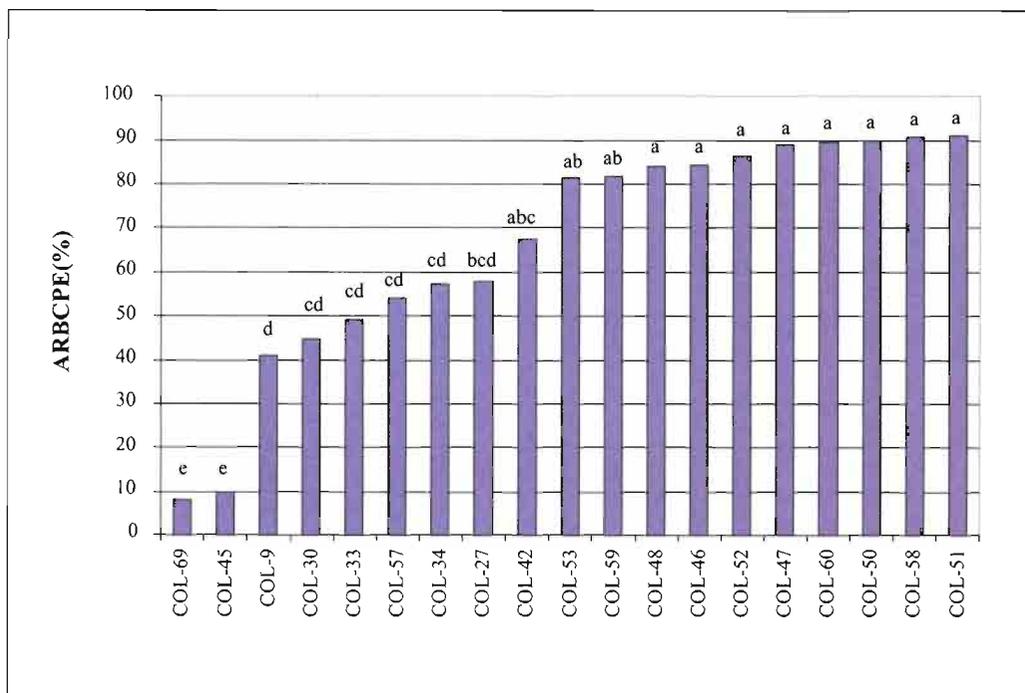


Figura 1. Área Relativa Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad en aceitunas maduras de la variedad 'Hojiblanca' inoculadas con 19 aislados de *Colletotrichum* spp. Barras con la misma letra no difieren significativamente entre sí, según el test de Tukey protegido de Fisher ($P=0,05$).

causaron necrosis localizadas diferenciándose de los síntomas causado por los aislados de olivo (Figura 3; Figura 2C).

Los aislados de *Colletotrichum* spp. de fresa (COL-84 y COL-86) fueron no patógenos aunque causaron una maduración anómala. Así, mientras en los testigos la epidermis del fruto viró a negro ($IM=4$) en los inoculados ésta mostró "islas verdes" en los puntos de infección (Figura 3; Figura 2B).

5. Inoculación de frutos y hojas de distintos huéspedes

En el tercer ensayo de inoculación, la mayoría de aislados fueron patógenos en los distintos huéspedes aunque hubo diferencias de virulencia muy acusadas. En las aceitunas sobremaduras los 4 aislados fueron patógenos. El aislado de olivo (COL-57) fue notablemente más virulento y se diferen-

ció significativamente ($P=0,05$) de los tres restantes (Cuadro 3). Nuevamente, los aislados procedentes de naranjo y fresa presentaron síntomas diferentes a los aislados de olivo (Figura 2C). Debido al estado de sobremadurez del fruto, el aislado de olivo produjo abundante micelio y acérvulos en la superficie de las aceitunas.

Los aislados ensayados causaron en las hojas de adelfa una mancha necrótica seguida de un halo clorótico (Figura 4C). Únicamente los aislados de naranjo (COL-69 y COL-79) llegaron a formar acérvulos. Los aislados de olivo fueron escasamente virulentos, resultando uno de ellos (COL-9) no patógeno (Cuadro 3).

En las almendras, los 6 aislados ensayados se mostraron patógenos aunque con diferencias significativas ($P=0,05$) de virulencia. Cabe destacar, que las almendras testigos pre-

sentaron podredumbre causada por *Alternaria* sp. La infección por *Colletotrichum* spp. en las almendras se confirmó por el reaislamiento del patógeno de zonas alejadas del punto de inoculación. La infección conjunta por ambos patógenos fue común y, en general, causó síntomas severos (Cuadro 3).

Los seis aislados evaluados fueron patógenos sobre frutos de fresa aunque hubo diferencias significativas ($P=0,05$) de virulencia (Cuadro 3). Además de las diferencias de virulencia, los aislados Col-42, Col-57 y, en menor medida el Col-45, se diferenciaron de los restantes en los síntomas inducidos produciendo una gran cantidad de acérvulos con masas anaranjadas de conidias (Figura 4A).

Cinco de los seis aislados evaluados fueron patógenos sobre manzana aunque con diferencias significativas ($P=0,05$) de virulencia. Las diferencias en la severidad fueron muy acusadas durante los primeros días del ensayo y disminuyeron conforme avanzó éste. La comparación de medias mostró tres grupos homogéneos destacando por su virulencia el aislado COL-69. La sintomatología fue muy similar en todos los casos aunque hubo diferencias en la capacidad de producir acérvulos sobre las lesiones (Cuadro 3; Figura 4B).

El aislado COL-45 se comportó como no patógeno sobre naranja. Dos naranjas mostraron infecciones por *Penicillium* sp. y se retiraron del ensayo para evitar contamina-

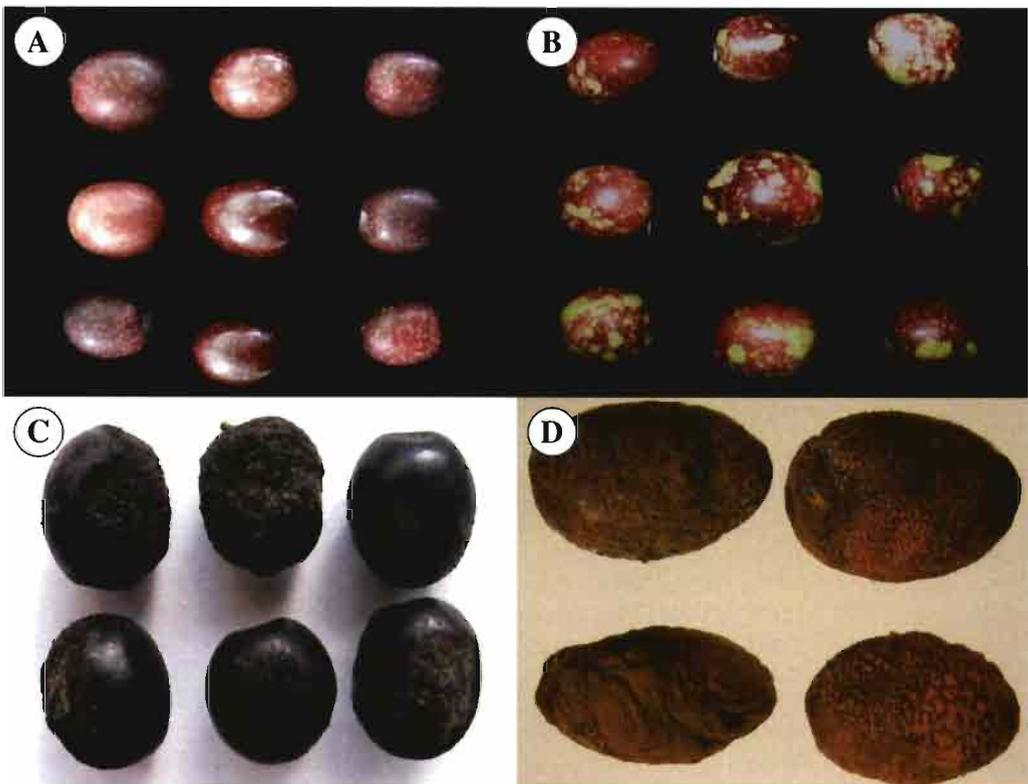


Figura 2. Síntomas causados por *Colletotrichum* spp. y *Glomerella cingulata* en aceitunas. A) Aceitunas testigo. B) Inoculadas con *C. acutatum* de fresa, obsérvense las "islas verdes". C) Inoculadas con *G. cingulata* de naranjo. D) Inoculadas con *C. acutatum* de olivo, obsérvense el síndrome característico "Aceituna jamboné"

Cuadro 3. Inoculación de aislados de *Colletotrichum* spp. en frutos y hojas de distintos huéspedes

Aislado ¹	Huésped de origen	Severidad de los síntomas causados					
		Olivo (fruto sobremaduro)	Adelfa (hojas jóvenes)	Almedro (fruto inmaduro)	Fresa (fruto inmaduro)	Manzano (fruto maduro)	Naranja (fruto maduro)
COL-57	Olivo	70,66a ² / ++ ³	3,35b / -	77,04a / ++	37,93b / ++	45,40b / ++	4,11b / -
COL-42	Olivo	-	5,42b / -	77,29a / ++	31,11bc / ++	24,79bc / ++	3,43b / -
COL-09	Olivo	-	NP ⁴	78,49a / ++	2,65d / -	23,71c / -	7,70 b / -
COL-69	Naranja	33,46b / +	39,92ab / ++	61,34ab / ++	61,09a / ++	92,79a / ++	73,67a / -
COL-79	Naranja	31,04b / +	82,24a / ++	74,99ab / ++	4,49d / ++	14,14c / ++	12,76b / -
COL-45	Fresa	35,90b / +	66,41a / -	52,57bc / ++	19,41c / ++	NP	NP
Testigo	-	-	-	33,01c ⁵ / -	-	-	-

¹Las características de los aislados se indican en el Cuadro 1. ²Área relativa bajo la curva de progreso de la enfermedad (%), medias con la misma letra no difieren significativamente entre sí, según el test de Tukey protegido de Fisher (P=0.05). ³Formación de conidiomas: '++' acérvulos esporulados; '+' acérvulos no esporulados; '-' ausencia de acérvulos. ⁴NP, aislado no patógeno. ⁵Infección causada por *Alternaria* sp.

ciones. Las diferencias de virulencia fueron muy patentes: el aislado COL-69, causó lesiones de 82 mm a los 41 días y el COL-79 de 20 mm; mientras que los aislados de olivo COL-9, 57 y 42 produjeron lesiones inferiores a 9 mm. La comparación de medias del ARBCPE (%) mostró dos grupos homogéneos distintos, diferenciándose significativamente (P=0.05) el aislado COL-69 del resto. Ninguno de los aislados formó acérvulos sobre las lesiones (Cuadro 3; Figura 4D). En los aislamientos realizados a partir de las lesiones se obtuvo, en todos los casos, el patógeno inoculado.

DISCUSIÓN

La heterogeneidad de las poblaciones de *Colletotrichum* ha impedido que puedan identificarse claramente las especies de este género mediante caracteres morfológicos o fisiológicos. La presencia de aislados con características morfológicas y fisiológicas intermedias ha sido observada por distintos autores (FÖRSTER y ADASKAVEG, 1999; GUERBER *et al.*, 2003). Así, aislados con características morfológicas intermedias a *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* se han asociado a la Antracnosis del olivo en Andalucía (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Este trabajo supone la continuación del llevado a cabo por OLI-

VEIRA *et al.* (2005), estudiando características fisiológicas y patológicas de los mismos aislados.

Los ensayos de resistencia a Benomilo han mostrado que los aislados de *C. gloeosporioides* y *G. cingulata* procedentes de olivo de Cataluña, naranja y fresa son muy sensibles a este fungicida. En cambio, los aislados causantes de la Antracnosis del olivo en Andalucía, independientemente de su tipo morfológico, se han mostrado moderadamente tolerantes. Estos resultados no se ajustan al comportamiento esperado, ya que se acepta que los aislados de *C. gloeosporioides* son muy sensibles a Benomilo, mientras que los de *C. acutatum* son relativamente tolerantes (BERSTEIN *et al.*, 1995; BROWN *et al.*, 1996; FREEMAN *et al.*, 1998). La mayor sensibilidad de los aislados de *C. gloeosporioides* al fungicida Benomilo también ha sido observada con aislados de olivo (AGOSTEO *et al.*, 2000., TALHINHAS *et al.*, 2005). No obstante, existen excepciones a este comportamiento (FREEMAN *et al.*, 1998).

La tolerancia al Benomilo de los aislados del complejo *C. acutatum/C. gloeosporioides* de olivo de Andalucía confirma su mayor proximidad a la especie *C. acutatum*, como indican otros datos morfológicos y genéticos (MARTÍN *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2005). La menor sensibilidad de estos aislados a

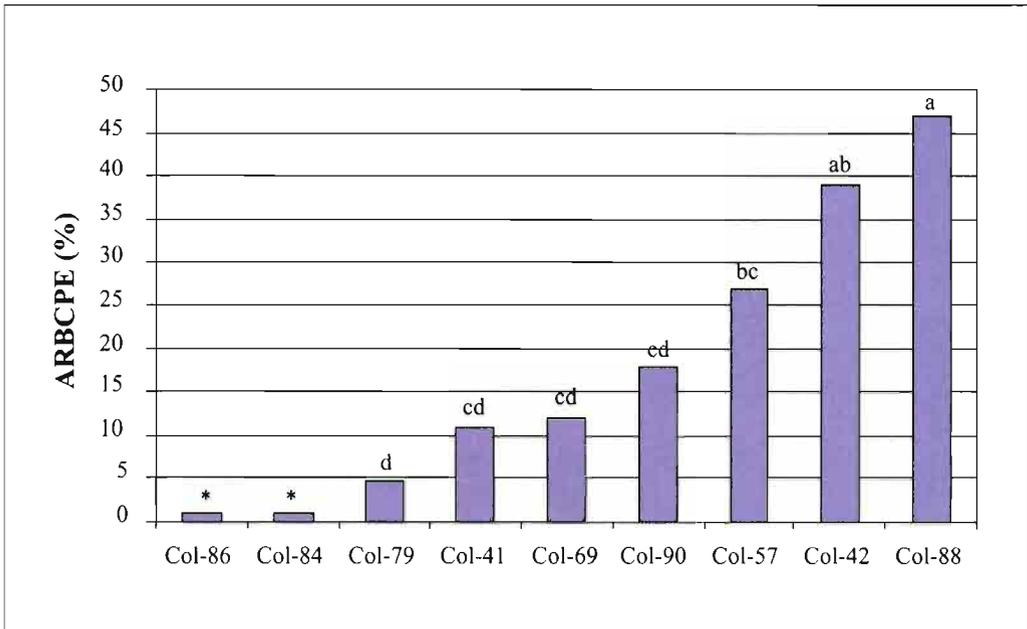


Figura 3. Área Relativa Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad en aceitunas inmaduras de la variedad 'Hojiblanca' inoculadas con 9 aislados de *Colletotrichum* spp. Barras con la misma letra no difieren significativamente entre sí, según el test de Tukey protegido de Fisher ($P=0,05$). *Aislados no patogénicos

Benomilo también podría atribuirse al uso de dicho fungicida en la lucha contra patógenos foliares del olivo, pero este fungicida no ha sido comúnmente utilizado en el olivar andaluz. Además, en investigaciones recientes no se ha encontrado relación entre el historial de aplicación del Benomilo en una plantación y la resistencia de los aislados procedentes de ésta (PERES *et al.*, 2004).

El segundo factor fisiológico estudiado ha sido la capacidad para hidrolizar la caseína. Los aislados de *Colletotrichum* de olivo de Andalucía, independientemente de su tipo morfológico, presentaron actividad proteolítica, expresada mediante un halo translúcido en el borde de la colonia. En cambio los aislados de *C. gloeosporioides* de olivo procedentes de Cataluña, naranjo o fresa no mostraron esta cualidad. Estos resultados coinciden con los obtenidos por MARTÍN *et al.* (2002), y nuevamente muestran la mayor proximidad de los aislados de olivo de Andalucía a la especie *C. acutatum*.

La patogenicidad o especialización patogénica de los aislados de *Colletotrichum* spp. sobre sus huéspedes ha sido un carácter utilizado tradicionalmente en la identificación de especies o subespecies de este género (ARX, 1970; SUTTON, 1980). Sin embargo, este punto ha sido poco desarrollado en el caso de la Antracnosis del olivo. La caracterización patogénica de *Colletotrichum* spp. en aceitunas requiere tener en cuenta dos factores críticos: la existencia de heridas en los frutos y su estado de madurez. El primero de ellos es un factor que puede ser determinante en la infección (BAILEY *et al.*, 1992). En aceitunas, generalmente se admite que no son necesarias las heridas para que se desarrolle enfermedad (MATEO-SAGASTA, 1968; BOUHMIDI, 1999), aunque existen referencias que contradicen esta afirmación (GRANITI y LAVIOLA, 1981; GRANITI *et al.*, 1993). En este trabajo, se observa que la susceptibilidad aumenta con la maduración del fruto y que el patógeno es capaz de producir

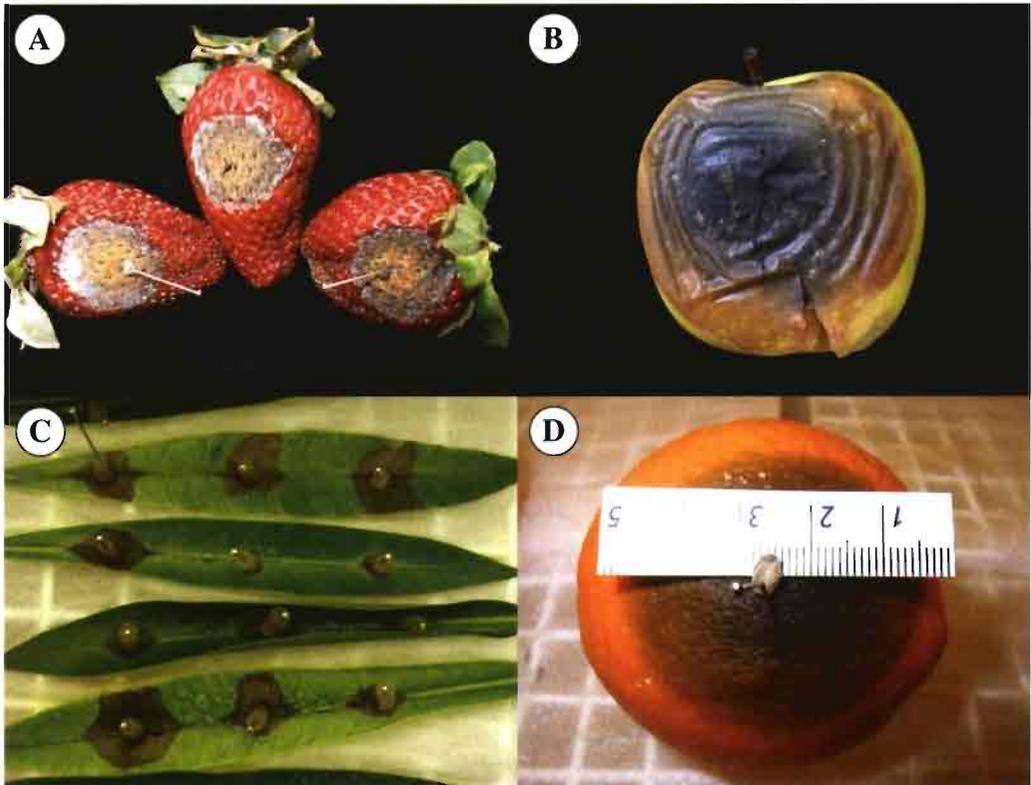


Figura 4. Síntomas causados por *Colletotrichum* spp. y *Glomerella cingulata* en distintos huéspedes. A) Fresas inoculadas con *C. acutatum* de olivo. B) Manzanas inoculadas con *C. gloeosporioides* de naranjo. C) Hojas de adelfa inoculadas con *G. cingulata* de naranjo. D) Naranja inoculación con *C. gloeosporioides* de naranjo.

infección y enfermedad en ausencia de heridas como previamente se había observado (BOUHMI, 1999).

Por otro lado, los ensayos han demostrado que existen diferencias de virulencia entre aislados de olivo coincidiendo con observaciones de otros autores (MUGNAI *et al.*, 1993; TALHINHAS *et al.*, 2005). La menor virulencia de los aislados de referencia COL-9 (*C. acutatum*), COL-30 (*C. gloeosporioides*) y COL-42 (*C. acutatum*) podría atribuirse a un fenómeno común de pérdida de virulencia (atenuación) por envejecimiento y cultivo continuado en sustratos artificiales (DHINGRA y SINCLAIR, 1995). Las diferencias de virulencia entre los aislados de

olivo y de otros huéspedes en aceituna fueron notables y más acusadas cuando los ensayos se realizaron con aceitunas inmaduros. Además, cabe destacar que los aislados de fresa y naranjo nunca llegaron a causar el síndrome de Aceituna jabonosa, aunque otros autores no han observado diferencias de síntomas (MUGNAI *et al.*, 1993; TALHINHAS *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos muestran una notable especialización patogénica de los aislados de olivo de Andalucía. Estas observaciones permiten sugerir que el agente causal de la Antracnosis del olivo en Andalucía puede tratarse de una forma especializada de *Colletotrichum*, como se ha indicado en el sur y centro de Italia (AGOS-

TEO *et al.*, 2003; SCARITO *et al.*, 2003). Sin embargo, nuestros resultados contrastan con investigaciones que muestran que la población que ataca al olivo en Cataluña y Portugal está formada mayoritariamente por *C. acutatum* aunque ocasionalmente se aísla *C. gloeosporioides* (MARTÍN y GARCÍA, 1999; TALHINHAS *et al.*, 2005). Una tercera situación se da en Sicilia (Italia) donde todos los aislados estudiados se ajustan a la especie *C. gloeosporioides* (SCARITO *et al.*, 2003). Las diferencias observadas en los aislados de *Colletotrichum* spp. entre las distintas zonas oleícolas europeas puede deberse a un fenómeno de especialización geográfica y/o varietal al tratarse de zonas aisladas y generalmente de cultivo monovarietal.

La presencia de micelio aéreo en la aceituna maduras, un síntoma anómalo para *Colletotrichum* spp., pudo deberse al debilitamiento de la epidermis debido al estado de sobremadurez de los frutos. Este síntoma también ha sido observado por otros autores (TALHINHAS *et al.*, 2005).

La inoculación de fresas inmaduras del cv. 'Camarosa' ha puesto de manifiesto grandes diferencias de virulencia entre aislados destacando uno de naranjo (Col-69) y dos de olivo (COL-57 y COL-42). El aislado procedente de fresa (COL-45) resultó poco virulento, lo que contrasta con estudios previos que destacan la mayor virulencia de los aislados procedentes del mismo huésped (LEGARD, 2000; FREEMAN *et al.*, 2001). Nuevamente se trata de un aislado de referencia antiguo que podría haber perdido virulencia.

La elevada virulencia mostrada por los aislados de olivo y naranjo en fresa tiene especial importancia por varios motivos: i) la especie *C. acutatum* es un patógeno de cuarentena en la UE, ii) en las actuales plantaciones de fresa en Andalucía existe una elevada homogeneidad genética con un predominio de variedades sin resistencia (ej. 'Camarosa'), iii) existen zonas agrícolas (Huelva) con plantaciones próximas de fresa, naranjo y olivo. No obstante, la dispersión de las conidias en condiciones naturales se produce a corta distancia, mientras que la

dispersión a media y larga distancia está asociada a las labores agrícolas y al estado sexual del hongo (*G. acutata*), el cual nunca se ha detectado en campo (LEGARD, 2000; PERES *et al.*, 2005). Asimismo, las inoculaciones artificiales se realizan en condiciones óptimas para que se desarrolle enfermedad si se comparan con las condiciones de infección natural. Lo anterior podría explicar el que no se hayan encontrado evidencias de que la infección cruzada se produzca en campo (FREEMAN *et al.*, 1998).

Las diferencias de virulencia entre los distintos aislados inoculados en naranjas han sido muy notables. Los dos aislados que procedían de naranjas fueron los más virulentos, destacando el Col-69 (*C. gloeosporioides*). Los aislados de *Colletotrichum* spp. utilizados causaron lesiones mínimas (< 10 mm) en las naranjas. La especialización patogénica de las especies de *Colletotrichum* en diferentes tejidos del naranjo ha sido descrita: los aislados de *C. gloeosporioides* causan lesiones deprimidas en la superficie de las naranjas, principalmente en posrecolección; mientras que los aislados de *C. acutatum* infectan a los pétalos e inducen la caída de frutos pequeños y la formación de cálices persistentes (AGOSTINI y TIMMER, 1992; TIMMER y BROWN, 2000). La no patogenicidad o escasa virulencia de los aislados de olivo en cítricos también ha sido observada por otros autores (CABRAL, 1941; LATINOVIC y VUCINIC, 2002; MUGNAI *et al.*, 1993).

En las almendras, el método utilizado permitió comparar la virulencia de los aislados a pesar de las interferencias causadas por *Alternaria* sp. Posiblemente, la capa pilosa que tapiza el exocarpo de la drupa sirvió de protección a las conidias de *Alternaria* sp. que escaparon a la desinfestación con lejía. En cualquier caso, el reaislamiento de *Colletotrichum* de zonas alejadas al punto de inoculación confirmó la infección y enfermedad de las almendras. En estudios previos se había constatado la infección en almendra por aislados de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* procedentes de distintos huéspedes; aunque las técnicas moleculares (RAPD)

han demostrado que los biotipos que afectan a almendra en California y en Carolina del Norte son diferentes de los que infectan a fresa, melocotón y manzana (ADASKAVEG y FÖRSTER, 2000; FREEMAN *et al.*, 1998). Por otro lado, la escasa importancia económica que tiene la Antracnosis del almendro en España podría deberse a las condiciones de aridez que se dan en las zonas de producción durante los primeros estadios del desarrollo del fruto.

Las inoculaciones cruzadas con aislados de *Colletotrichum* procedentes de distintos huéspedes en manzana han sido frecuentes en los estudios de patogenidad de este coelomiceto (BERNSTEIN *et al.*, 1995; FREEMAN *et al.*, 1998; 2001). En el presente trabajo los aislados de *Colletotrichum* spp. de olivo han sido patogénicos en manzana coincidiendo con otros autores (GRANITI *et al.*, 1993; MUGNAI *et al.*, 1993).

La inoculación en hojas jóvenes de adelfa ha permitido separar los aislados de *Colletotrichum* spp. de olivo, que han resultado no patogénicos o escasamente virulentos, del resto de aislados ensayados. En estudios anteriores se había observado el comportamiento no patogénico de los aislados de olivo en hojas de adelfa, mientras que aislados de *C. gloeosporioides* de *Annona muricata* y naranjo sí ocasionaron infección y enfermedad (CACCIOLA *et al.*, 1996).

Puede concluirse que los aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la Antracnosis del olivo en Andalucía, independientemente de su tipo morfológico, muestran características fisiológicas próximas a la especie *C. acutatum*. Asimismo, las inoculaciones realizadas han mostrado que estos aislados poseen una notable especialización patogénica sobre olivo si bien son capaces de infectar y desarrollar síntomas en otros huéspedes. Actualmente, aislados con conidias atípicas, con uno o los dos extremos redondeados, han sido identificados como *C. acutatum sensu lato* en base a criterios moleculares (GUERBER *et al.*, 2003). Por lo tanto, la caracterización molecular puede ser clave en el esclarecimiento de la etiología de la Antracnosis del olivo en Andalucía.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a todos los miembros del Grupo de Patología Agroforestal de la Universidad de Córdoba, al Dr. Francesc García-Figueroles por los aislados de *Colletotrichum* del Laboratorio de Sanidad Vegetal de Barcelona y especialmente a Paqui Luque por su magnífica asistencia técnica. El Dr. Oliveira ha sido becario de la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI). Los trabajos realizados se han financiado con los proyectos AGL-2000-1725 y AGL2004-7495.

ABSTRACT

MORAL J., R. OLIVEIRA, J. C. TELLO, A. TRAPERO. 2007. Physiological and pathogenic characterization of *Colletotrichum* isolates causing olive anthracnose. *Bol. San. Veg. Plagas*, 33: 219-234.

Olive anthracnose, caused by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*, is a serious disease in many regions in the world, causing fruit rot and branch dieback. Isolates of *Colletotrichum* causing olive anthracnose in Andalusia, southern Spain, have morphological and cultural characteristics intermediate between both species, although closer to *C. acutatum* morphospecies. In this research work, isolates from Andalusia were compared with representative isolates of *C. acutatum* and *C. gloeosporioides* for physiological and pathogenic characteristics. Growth of isolates on a casein medium and PDA emended with the fungicide benomyl showed that Andalusian isolates produced casein hydrolysis and were tolerant to benomyl, similar to *C. acutatum* isolates. Inoculation of detached fruits of almond, apple, olive, orange, and strawberry, and leaves of oleander with isolates of *C. acutatum* and *C. gloeosporioides* from three different hosts (olive, orange and strawberry) showed great differences in virulence and some degree of host specialization. Higher host specialization occurred with isolates from olive. On olive

fruits, these isolates caused typical anthracnose symptoms and they were more virulent than the rest of *Colletotrichum* isolates. Olive isolates differed in virulence on olive fruits, although there were not differences between both *Colletotrichum* species. Mature olive fruits were more susceptible than immature ones, but immature fruits showed higher differences amongst isolates. Other important differential host for olive isolates was oleander. On oleander leaves, olive isolates were not pathogenic or scarcely virulent while isolates from other hosts were highly virulent.

Key words: *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *Gloeosporium olivarium*, *Olea europaea*.

REFERENCIAS

- ADASKAVEG, J. E., FÖRSTER, H. 2000. Occurrence and management of anthracnose epidemics caused by *Colletotrichum* species on tree fruit crops in California. In: *Colletotrichum: Host specificity, pathology, and host-pathogen interaction*. D. Prusky, S. Freeman, M.B. Dickman, eds. APS Press, St. Paul, MN. pp. 317-336.
- ADASKAVEG, J. E., HARTIN, R. J. 1997. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology*, **87**: 979-987.
- AGOSTEO, G. E., LI DESTRI NOCOSIA, M. G., MAGNANO DI SAN LIO, G., FRISULLO, S., CACCIOLA, S. O. 2000. Characterization of the causal agent of olive anthracnose in southern Italy. *Acta Hort.*, **586**: 713-716.
- AGOSTEO, G. E., MACRI, C., FAEDDA, R., PENNISI, A. M., CACCIOLA, S. O., DI SAN LIO, G. M. 2003. Epidemic outbreaks of olive anthracnose in central Italy. *J. Plant. Pathol.*, **85**: 280.
- AGOSTINI, J. P., TIMMER, L. W. 1992. Selective isolation procedures for differentiation of two strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. *Plant Dis.*, **76**: 1176-1178.
- AGRIOS, G. N. 2005. Plant Pathology, 5th ed. Elsevier Academic Press. San Diego, CA. 922 pp.
- ANALYTICAL SOFTWARE, 2003. Statistix 8 User's manual. Tallahassee, FL. pp. 359.
- ARX, J. A. VON. 1970. A revision of the fungi classified as *Gloeosporium*. *J. Cramer. Bibl. Mycol.*, **24**: 203 pp.
- BAILEY, J. A., O'CONNEL, R. J., PRING, R. J., NASH, C. 1992. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: *Colletotrichum: Biology, pathology and control*. J.A Bailey, M.J. Jeger, eds. CAB International, Wallingford, Oxon, UK. pp. 88-120.
- BARRANCO, D., RALLO, L. 2005. Épocas de floración y maduración. In: *Varietades de olivo en España*. Coedición MAPA/Mundi-Prensa, Madrid. pp. 281-292.
- BERNSTEIN, B., ZEHR, E.I., DEAM, R.A., SHABI, E. 1995. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan, and other hosts. *Plant Dis.*, **79**: 478-482.
- BOUHMIDI, K. 1999. Caracterización morfológica y patogénica de aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la "Aceituna jabonosa" del olivo. Tesis de Máster en Olivicultura y Elaiotecnia. ETSIAM, Universidad de Córdoba. 110 pp.
- BROWN, G. E., SREENIVAPRASAD, S., TIMMER, L. W. 1996. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology*, **86**: 523-527.
- CABRAL, R. V. G. 1941. Notas sobre *Gloeosporium olivarium*. *Agronomía Lusitana*, **3**: 49-58.
- CACCIOLA, S. O., PANE, A., AGOSTEO, G. E., MAGNANO DI SAN LIO, G. 1996. Osservazioni sull'epidemiologia dell'antracnosi dell'olivo in Calabria. *Informatore Fitopatologico*, **6**: 27-32.
- DHINGRA, O. D., SINCLAIR, J. B. 1995. Basic plant pathology methods. 2th ed. CRC Press, Boca Raton, L. 434 pp.
- FÖRSTER, H., ADASKAVEG, J. E. 1999. Identification of subpopulations of *Colletotrichum acutatum* and epidemiology of almond anthracnose in California. *Phytopathology*, **89**: 1056-1065.
- FREEMAN, S., KATAN, T., SHABI, E. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Dis.*, **82**: 596-605.
- FREEMAN, S., MINZ, D., MAYMON, M., ZVAIBIL, A. 2001. Genetic diversity within *Colletotrichum acutatum sensu* Simmonds. *Phytopathology*, **91**: 586-592.
- GRANITI, A., FRISULLO, S., PENNISI, A. 1993. Infections of *Glomerella cingulata* on olive in Italy. *EPPO Bulletin*, **23**: 457-465.
- GRANITI, A., LAVIOLA, C. 1981. Sguardo generale alle malattie parassitarie dell'olivo. *Informatore Fitopatol.*, **31**: 77-92.
- GUERBER, J. C., LIU, B., CORRELL, J. C., JOHNSTON, P. R. 2003. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum sensu lato* by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. *Mycologia*, **95**: 872-895.
- LATINOVIC, J. Y., VUCINIC, Z. 2002. Cultural characteristics, pathogenicity and host range of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from olive plants in Montenegro. *Acta Hort.*, **586**: 753-755.
- LEGARD, D. E. 2000. *Colletotrichum* diseases of strawberries in Florida. In: *Colletotrichum: Host specificity, pathology, and host-pathogen interaction*. D. Prusky, S. Freeman, M.B. Dickman, eds. APS Press, St. Paul, MN. pp. 292-299.
- MARTÍN, M. P., GARCÍA-FIGUERES, F. 1999. *Colletotrichum acutatum* y *C. gloeosporioides* cause anthracnose on olives. *Eur. J. Plant Pathol.*, **105**: 733-741.
- MARTÍN, M. P., GARCÍA-FIGUERES, F., TRAPERO, A. 2002. Indicadores específicos para detectar las especies de *Colletotrichum* causantes de la antracnosis de los olivos. *Bol. San. Veg. Plagas*, **28**: 43-50.

- MATEO-SAGASTA, E. 1968. Estudios básicos sobre *Gloeosporium olivarum* Alm. (Deuteromiceto Melanconial). *Bol. Patol. Veg. Entomol. Agric.*, **30**: 31-135.
- MORAL, J. 2004. Caracterización fisiológica y patogénica de aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la Antracnosis del olivo. Trabajo Profesional Fin de Carrera, Universidad de Almería, Almería. 182 pp.
- MORAL, J., ÁVILA, A., LÓPEZ-DONCEL, L.M., ALSALIMIYA, M., OLIVEIRA, R., GUTIÉRREZ, F., NAVARRO, N., BOUHMIDI, K., BENALI, A., ROCA, L., TRAPERO, A. 2005. Resistencia a los Repilos de distintas variedades de olivo. *Vida Rural*, **208**: 34-40.
- MUGNAL, L., SURICO, G., ROGAZZI, A. 1993. *Glomerella cingulata* on olive in India: morphological and pathological notes. *EPPO Bull.*, **23**: 449-455.
- OLIVEIRA, R., MORAL, J., BOUHMIDI, K., TRAPERO, A. 2005. Caracterización morfológica y cultural de aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la Antracnosis del olivo. *Bol. San. Veg. Plagas*, **31**: 531-548.
- PERES, N. A. R., SOUZA, N. L., PEEVER, T. L., TIMMER, L. W. 2004. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. *Plant Dis.*, **88**: 125-130.
- PERES, N. A. R., TIMMER, L. W., ADASKAVEG, J. E., CORRELL, J. C. 2005. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Dis.*, **89**: 784-796.
- SCARITO, G., PANE, A., RAUDINO, F., FRISULLO, S., CACCIOLA, S. O. 2003. *Colletotrichum gloeosporioides* causal agent of olive rots in Sicily. *J. Plant. Pathol.*, **85**: 310.
- SMITH, B.J., BLACK, L. L. 1990. Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. *Plant Dis.*, **74**: 69-76.
- SUTTON, B.C. 1980. The *Coelomycetes*. Fungi imperfecti with pycnidia, acervula and stromata. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK. 696 pp.
- SUTTON, B.C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: *Colletotrichum: Biology, pathology and control*. J.A. Bailey y M.J. Jeger, eds. CAB International, Wallingford. pp. 1-27.
- TALHINHAS, P., SREENIVASAPRASAD, S., NEVES-MARTINS, J., OLIVEIRA, H. 2005. Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* Groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**: 2987-2998.
- TIMMER, L. W., BROWN, G. E. 2000. Biology and control of anthracnose disease of citrus. In: *Colletotrichum: Host specificity, pathology, and host-pathogen interaction*. D. Prusky, S. Freeman, M.B. Dickman, eds. APS Press, St. Paul, MN.

(Recepción: 7 diciembre 2006)

(Aceptación: 24 enero 2007)