

Variabilidad morfológica y cultural de *Pseudocercospora cladosporioides*, agente del emplomado del olivo

A. ÁVILA DE LA CALLE, A. BENALI, A. TRAPERO CASAS

El Emplomado del olivo causado por el hongo *Pseudocercospora cladosporioides*, es una enfermedad importante y ampliamente distribuida en todas las regiones olivareñas del mundo, pero muy poco conocida. La escasa información disponible sobre esta enfermedad ha motivado que se inicie una línea de investigación sobre su etiología, epidemiología y control, en la que se enmarca el presente trabajo cuyo objetivo general es caracterizar aislados del patógeno por su morfología y estudiar el efecto de diferentes medios de cultivo y de la temperatura sobre el crecimiento *in vitro* de diversos aislados.

El método más rápido, fácil y efectivo para la obtención de aislados a partir de tejidos infectados y de cultivarlos *in vitro* resultó ser mediante transferencia directa de conidias a placas del medio de cultivo Patata-Dextrosa-Agar; sin embargo, la consecución de colonias se ve restringida por determinadas causas que impiden o dificultan su aislamiento en periodos distintos a los de invierno u otoño. En ningún caso las colonias obtenidas produjeron conidias, por lo que la caracterización morfológica se ha realizado sobre las conidias formadas en las lesiones de las hojas afectadas. Se han estudiado un total de 59 aislados de olivo, obtenidos de zonas olivareñas de España y Marruecos, así como 4 aislados de *P. ceratoniae* procedentes de algarrobo (*Ceratonia siliqua* L.) para la comparación con los anteriores. Los resultados muestran diferencias significativas entre los aislados para cada uno de los parámetros evaluados y mostraron una clara separación entre las dos especies.

Los estudios de crecimiento sobre distintos medios de cultivo han puesto de manifiesto que el PDA diluido resulta válido para realizar estudios sobre el efecto de distintos factores en el crecimiento micelial del hongo. Además estos estudios han demostrado que la luz no influye significativamente sobre el crecimiento del hongo. El patrón de crecimiento *in vitro* de 5 aislados de *P. cladosporioides* a distintas temperaturas puso de manifiesto una temperatura mínima algo inferior a 5°C, la óptima alrededor de los 21-22.5°C y la máxima cercana a los 30°C. Asimismo, estos estudios han demostrado que existen claras diferencias para la tasa de crecimiento entre los diferentes aislados estudiados.

A. ÁVILA DE LA CALLE, A. BENALI y A. TRAPERO CASAS. Dpto. de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba. Dirección correo electrónico: traper@uco.es

Palabras clave: *Olea europaea*, *Pseudocercospora cladosporioides*, *Mycocentrospora*, *Ceratonia siliqua*.

INTRODUCCIÓN

El Emplomado, "cercosporiosis" o Repilo plumizo, causado por el hongo *Pseudocercospora cladosporioides* (Sacc.) U. Braun, se encuentra ampliamente difundido en todas regiones de la Cuenca Mediterránea

donde se cultivan las variedades de olivo susceptibles, especialmente en años de primavera y otoños lluviosos y con temperaturas relativamente suaves.

El nombre de "emplomado" o "plumizo" hace referencia al color grisáceo o plumizo que presenta el envés de las hojas afectadas

por la enfermedad y que constituye el síntoma más característico de la misma. La denominación de “repilo” hace referencia a otra característica importante de la enfermedad: la caída de la hoja. El nombre de cercosporiosis deriva del agente causal, que inicialmente fue descrito como el hongo *Cercospora cladosporioides* Sacc. (BENALI, 2001). En España, la enfermedad se ha confundido tradicionalmente con el repilo (*Spilocaea oleagina* (Cast.) Hughes) y, en algunas comarcas olivareñas, con la antracnosis o aceituna jabonosa (*Colletotrichum* spp.). Por ello, en varias zonas de Andalucía se utiliza la denominación de “vivo” o “vivillo” del olivo para referirse a los ataques de estas tres enfermedades sin distinción entre ellas (TRAPERO *et al.*, 1998; TRAPERO, 2003). Debido a este hecho los daños causados por *P. cladosporioides* son poco conocidos.

La principal consecuencia de la enfermedad es la caída anticipada de las hojas, por

ello, la reducción de la superficie foliar genera una disminución de los rendimientos (PAPPAS, 1993). Al producir una intensa defoliación, fundamentalmente en los años más favorables para su desarrollo, causa una serie de efectos secundarios de gran importancia, entre ellos, se produce una deficiente actividad fotosintética, disminuyendo así la acumulación de reservas y afectando a la producción en años sucesivos (DEL MORAL y MEDINA, 1985) y a la capacidad de resistencia del olivo a otros agentes patógenos (GARCÍA-FIGUERES, 1991). Desde 1941 se conoce la importancia del ataque al fruto (HANSEN y RAWLINS, 1944). Sin embargo, la infección directa sobre las aceitunas no suele observarse todos los años (PROTA, 1995). Aunque, en años de fuertes ataques del patógeno, se suelen encontrar algunas parcelas que presentan casi el 100% de las aceitunas afectadas (DEL MORAL y MEDINA, 1985), lo que conlleva a una deficiente calidad del aceite aumentando marcadamente su acidez.

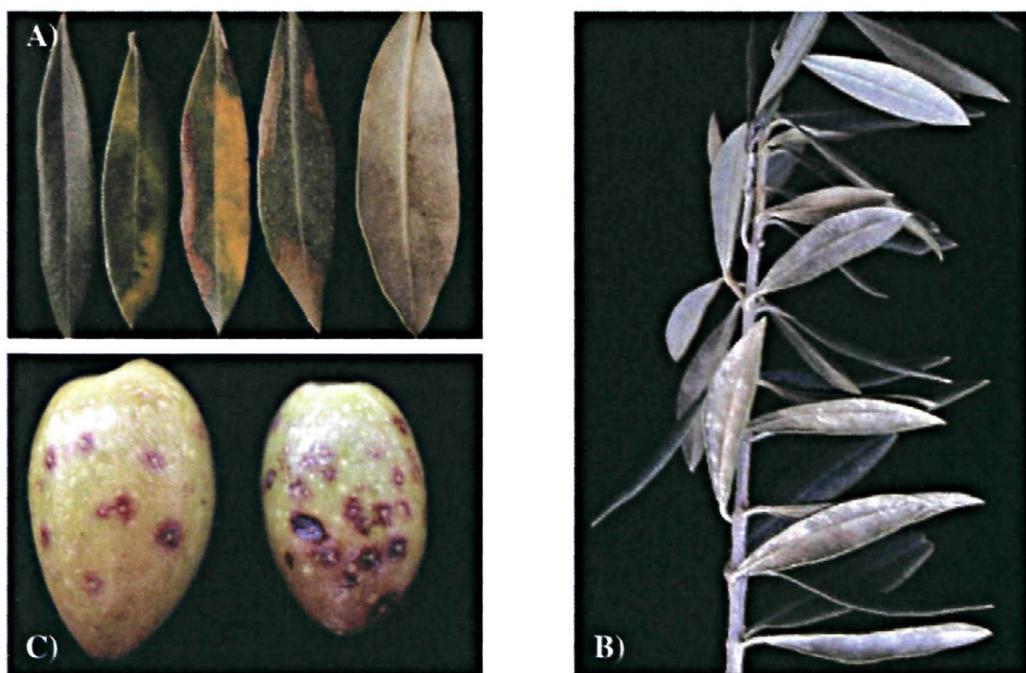


Figura 1: Síntomas del Empomado causado por *Pseudocercospora cladosporioides* en hojas de olivo (A y B) y en aceitunas (C).

La enfermedad en Europa afecta generalmente a las hojas, aunque en algunos países ha sido encontrada sobre frutos, pecíolos de hojas y pedúnculos de frutos (GRANITI y LAVIOLA, 1981). Los síntomas en el haz de las hojas consisten en manchas cloróticas irregulares poco aparentes, algunas de las cuales posteriormente se necrosan (Figura 1A). En el envés, aparecen manchas irregulares en forma y tamaño, de color plumizo debido a las fructificaciones del hongo (Figura 1A) (DEL MORAL y MEDINA, 1985; TRAPERO y BLANCO, 2001). Los síntomas generalmente son detectados sobre las hojas viejas de las ramas situadas en la parte baja del árbol (Figura 1B) (PAPPAS, 1993) y en ocasiones en hojas jóvenes de 4 ó 5 meses de edad (NIGRO *et al.*, 2000). En el fruto todavía verde se observan lesiones más o menos circulares, deprimidas de color variable según la variedad y el momento de su aparición que oscilan entre 3 y 7 mm de diámetro (Figura 1C) (HANSEN y RAWLINS, 1944; BOTTALICO y CORDA, 1995; TRAPERO y BLANCO, 2001).

En las lesiones de las hojas y frutos se producen las esporas asexuales o conidias, las cuales son cilíndricas, alargadas, con varias septas e irregularmente curvadas. Éstas son formadas sobre conidióforos rectos o ligeramente curvados, que emergen de un estroma basal (Figura 2). En algunas oca-

siones se han observado clamidosporas bicelulares, denominadas cuerpos diploidi-formes, que parecen ser estructuras de resistencia frente a condiciones adversas (GOLDANICH, 1964; GARCÍA-FIGUERES, 1991).

El nombre de *P. cladosporioides* hace referencia exclusivamente al estado asexual del hongo (BRAUN, 1993). El estado sexual no se conoce, pero en algunas ocasiones se ha observado, tanto en el medio de cultivo como en hojas afectadas, la presencia de cuerpos fructíferos que podrían ser espermogonios productores de espermacias. Dichos espermogonios forman parte de la reproducción sexual de numerosos hongos, aunque en el caso de este patógeno no se ha detectado la fase ascógena correspondiente a la reproducción sexual (TRAPERO *et al.*, 1998). Por tanto, se trata de un hongo imperfecto encuadrado en la familia Dematiaceae del orden Hyphomycetales, clase Hyphomycetes según la clasificación tradicional (KIRK *et al.*, 2001). La forma, tamaño y septación de las conidias, así como la forma y tamaño de los conidióforos son los caracteres más importantes para la identificación de las especies de *Cercospora* y géneros afines, como *Mycocentrospora* y *Pseudocercospora* (DEIGHTON, 1983; CROUS, 1998).

En cuanto a la especialización patogénica, la bibliografía coincide en que se trata de un patógeno cuyo único huésped es *Olea euro-*

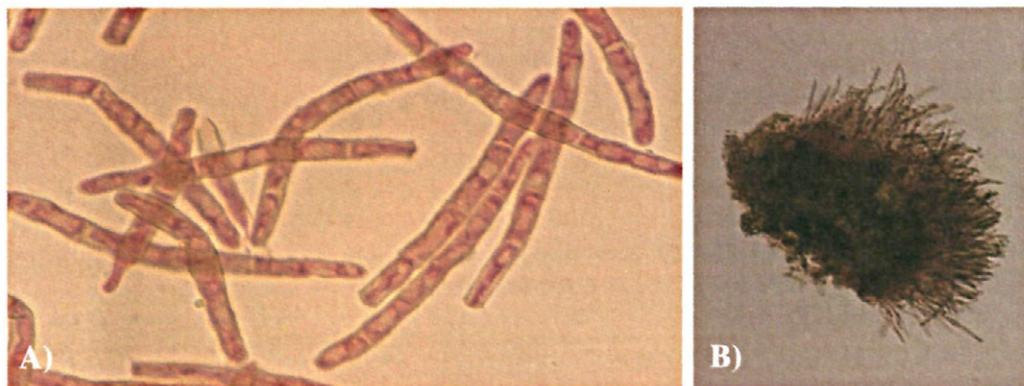


Figura 2: Conidias (A) y conidioma estromático de *Pseudocercospora cladosporioides* (B).

paea, existiendo grandes diferencias de susceptibilidad entre cultivares de olivo (GRANTI y LAVIOLA, 1981; TRAPERO *et al.*, 1998).

En España, la enfermedad fue diagnosticada en 1895, pero es poco conocida entre los agricultores, que suelen atribuir sus ataques a otros agentes, sobre todo al Repilo causado por *S. oleagina* (PAÚL y AROZAMENA, 1895; DEL MORAL y MEDINA, 1985). Debido fundamentalmente a la escasez de trabajos sobre el ciclo biológico y la epidemiología del Emplomado del olivo, poco se sabe acerca del control específico de este patógeno. Por ello, el objetivo general de este trabajo fue caracterizar aislados del patógeno por su morfología y estudiar el efecto de diferentes medios de cultivo y de temperatura sobre el crecimiento *in vitro* de diversos aislados del patógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Origen de los aislados

Se seleccionaron al azar y de la parte inferior del árbol hojas de olivo con síntomas del

Emplomado caracterizadas por la presencia de manchas de color grisáceo verdoso en el envés, signo de una abundante esporulación. Las muestras procedieron de diversas localizaciones y de distintas variedades de olivo según se representa en el Cuadro 1.

Con el fin de observar posibles diferencias con hongos afines se recogieron hojas de algarrobo (*Ceratonía siliqua* L.) procedentes del Jardín Botánico de Córdoba y de la Sierra de Córdoba con síntomas de la cercosporiosis causada por *Pseudocercospora ceratoniae* (Pat & Trab.) Deighton (VARO y TRAPERO, 2001).

2. Procesado de las muestras

En un primer momento todas las muestras recogidas fueron observadas al microscopio estereoscópico y óptico con el fin de confirmar la presencia del hongo. Para la realización de las medidas de los caracteres morfológicos se elaboraron una serie de suspensiones conidiales de cada una de las muestras. Para ello, en un tubo de vidrio estéril se añadió cierta cantidad de agua

Cuadro 1. Origen de las muestras de *Pseudocercospora* estudiadas

Referencia	Huésped/Varietad	Procedencia	Fecha de recogida
PM-01	Picholine marocaine	Nador, Marruecos	Octubre 98
LS-02	Lechín de Sevilla	Alameda del Obispo, Córdoba (Patrones)	Marzo 96
LS-03	Lechín de Sevilla	Alameda del Obispo, Córdoba (Río)	Marzo 95
CI-04	Cipresino	Alameda del Obispo, Córdoba (Triángulo)	Noviembre 00
LS-05	Lechín de Sevilla	Alameda del Obispo, Córdoba (Triángulo)	Noviembre 00
MC-06	Manzanillo Cordobés	La Palomera, Sierra de Córdoba	Noviembre 00
AC-07	Acebuché	Arroyo Pedroche, Córdoba	Noviembre 00
MO-08	Morisca	Montijo (Mérida)	Noviembre 00
PI-09	Picudo	Montijo (Mérida)	Noviembre 00
AC-10	Acebuché	Sierra de Córdoba	Diciembre 00
LS-11	Lechín de Sevilla	Alameda del Obispo, Córdoba	Diciembre 00
LS-12	Lechín de Sevilla	La Palomera, Sierra de Córdoba	Diciembre 00
DE-13	Desconocida	Valdejetas, Sierra de Córdoba	Diciembre 00
LS-14	Lechín de Sevilla	El Patriarca, Sierra de Córdoba	Diciembre 00
MA-15	Manzanilla de Sevilla	Caza liebre, Sevilla	Diciembre 00
MA-16	Manzanilla de Sevilla	Mataliebres, Ecija	Diciembre 00
HO-17	Hojiblanca	Antequera, Málaga	Diciembre 00
PM-18	Picholine marocaine	Ahfir, Marruecos	Enero 01

Referencia	Huésped/Varietad	Procedencia	Fecha de recogida
PM-19	Picholine marocaine	Dechra, Ahfir, Marruecos	Enero 01
PM-20	Picholine marocaine	Zeganagan, Marruecos	Enero 01
PM-21	Picholine marocaine	Beni sidel, Marruecos	Enero 01
AC-22	Acebucho	Dechra, Marruecos	Diciembre 00
PM-23	Picholine marocaine	Oumassine, Marruecos	Enero 01
PM-24	Picholine marocaine	Reggada, Marruecos	Diciembre 01
PM-25	Picholine marocaine	Berkane, Marruecos	Diciembre 01
PM-26	Picholine marocaine	Driouch, Marruecos	Enero 01
PM-27	Picholine marocaine	Hj Khadir, Marruecos	Enero 01
LS-28	Lechín de Sevilla	Alameda del Obispo, Córdoba (Triángulo)	Enero 01
LS-29	Lechín de Sevilla	Arroyo Pedroche, Co	Enero 01
MA-30	Manzanilla de Sevilla	Marchena, Sevilla	Febrero 01
CI-31	Cipresino	Alameda del Obispo, Córdoba (Triángulo)	Enero 01
FR-32	Frantoio	Alameda del Obispo, Córdoba (Triángulo)	Enero 01
BE-33	Blanqueta de Elvas	Alameda del Obispo, Córdoba (Triángulo)	Enero 01
AL-34	Algarrobo ¹	Jardín Botánico, Córdoba	Mayo 98
AR-35	Arbequina	El Rebato, Barcelona	Mayo 01
LS-36	Lechín de Sevilla	Umbráculo (plantones inoculados)	Mayo 01
AC-37	Acebucho	Alosno, Huelva	Julio 01
GO-38	Gordal	Trigueros, Huelva	Julio 01
DE-39	Desconocida	Sierra de Córdoba	Julio 01
AL-40	Algarrobo ¹	Jardín Botánico, Córdoba	Mayo 98
AL-41	Algarrobo ¹	Trassierra, Córdoba	Febrero 99
PI-42	Picudo	Cabra (Córdoba)	Octubre 01
AL-43	Algarrobo ¹	Desconocida	Octubre 01
LE-44	Lechín de Sevilla	Alameda del Obispo, Córdoba (Triángulo)	Octubre 01
LE-45	Lechín de Sevilla	Parcela Naranjo, Córdoba	Octubre 01
CI-46	Cipresino	Campo Mundial, Córdoba	Noviembre 01
OC-47	Ocal	Campo Mundial, Córdoba	Noviembre 01
ME-48	Memecik	Campo Mundial, Córdoba	Noviembre 01
CO-49	Corralones de Andújar	Campo Mundial, Córdoba	Noviembre 01
PI-50	Picudo	LLano Mesto (Montilla)	Noviembre 01
LE-51	Lechín de Sevilla	El Patriarca (Córdoba)	Noviembre 01
CH-52	Chalkidiki	Campo Mundial	Noviembre 01
CO-53	Coratina	Alameda del Obispo, Córdoba (Triángulo)	Diciembre 01
CO-54	Coratina	Alameda del Obispo, Córdoba. (Triángulo)	Diciembre 01
LE-55	Lechín de Sevilla	Alameda del Obispo, Córdoba (Triángulo)	Enero 02
PI-56	Picudo	Campo Mundial, Córdoba	Enero 02
PH-57	Picholine	Campo Mundial, Córdoba	Enero 02
PI-58	Picudo	Campo Mundial, Córdoba	Febrero 02
LE-59	Lechín de Sevilla	Campo Mundial, Córdoba	Febrero 02
VE-60	Verdial de Huevar	Campo Mundial, Córdoba	Abril 02
PI-61	Picholine	Campo Mundial, Córdoba	Abril 02
FR-62	Frantoio A. Cornisi	Campo Mundial, Córdoba	Mayo 02
FR-63	Frantoio A. Cornisi	Campo Mundial, Córdoba	Mayo 02

¹ Corresponde a la especie *Ceratonia siliqua*.

El resto se corresponde con diferentes variedades de la especie *Olea europaea*.

Cuadro 2. Aislados de *Pseudocercospora cladosporioides* en cultivo puro

CÓDIGO	HUÉSPED ¹	PROCEDENCIA	FECHA ²
PI101	Picual	Alameda del Obispo, Córdoba (Triángulo)	Octubre 01
LEMY2	Lechín de Sevilla	Alameda del Obispo, Córdoba (Triángulo)	Noviembre 97
LE501	Lechín de Sevilla	Parcela Naranjo, Córdoba	Octubre 01
LE701	Lechín de Sevilla	El Patriarca, Córdoba	Noviembre 01
BL1201	Blanqueta de Elvas	Alameda del Obispo, Córdoba (Triángulo)	Diciembre 01

¹ Variedades de la especie *Olea europaea*.

² La fecha corresponde a la época de aislamiento a partir de los conidiomas de las hojas.

(dependiendo de la intensidad de la esporulación) y sobre ésta se rasparon con una aguja emangada las lesiones de Emplomado presentes sobre la superficie de al menos 4 hojas. Sobre un portaobjetos se colocó una gota de la suspensión y sobre ésta se dispersó una gota del colorante Fuchsin ácido con lactoglicerol y se situó un cubreobjetos. Se elaboraron cuatro preparaciones por cada muestra.

Además de los montajes para la observación al microscopio, se realizaron siembras en placas de Petri con medio Patata-Dextrosa-Agar (PDA), con el objetivo de obtener cultivos puros de *P. cladosporioides*. Con la ayuda de un microscopio estereoscópico se localizaron los conidiomas y por medio de un capilar de vidrio humedecido en el medio de cultivo, se rozó suavemente y se introdujo su extremo en el medio de cultivo. Las placas previamente selladas con Parafilm®, fueron incubadas a 24°C con fotoperiodo de 12 h de luz blanca y próxima a UV y 12 h de oscuridad en un laboratorio de incubación. Al cabo de una semana cuando la colonia presentó un tamaño adecuado, se procedió a realizar su transferencia a un medio nuevo de PDA para la obtención de cultivos puros del hongo patógeno (Cuadro 2).

3. Caracterización morfológica

Para la caracterización morfológica, se utilizó el microscopio convencional con el objetivo 40X. Se determinó el tamaño de las conidias con una microrregla graduada (longitud y anchura) y se contó el número de septas de la conidia.

Por cada muestra se tomaron datos de 30 conidias, elegidas al azar y generalmente aquéllas que estuvieran libres. Dichas esporas se diferenciaron de los conidióforos por el color y el tamaño, y de la hifa vegetativa por su mayor grosor, extremo redondeado y presencia de microcicatrices.

4. Crecimiento en medios de cultivo

Para el estudio del crecimiento en distintos medios de cultivo se seleccionó un aislado puro conservado en el laboratorio de Patología Agroforestal del Departamento de Agronomía (ETSIAM) de la Universidad de Córdoba, designado con el código LEMY2, procedente de la variedad 'Lechín de Sevilla' de la parcela "Triángulo" del Centro de Investigación y Formación Agraria (C.I.F.A.) de Córdoba.

Fueron elaborados doce medios de cultivo, algunos de los cuales basados en extractos vegetales tales como hojas de olivo, de avena y de zanahoria y otros artificiales (Cuadro 3).

De las colonias del hongo se realizó una suspensión micelial mediante macerado de trozos de micelio en agua destilada estéril y tras su agitación en un Vortex® durante 30 seg se extendió con un asa de siembra sobre toda la superficie de placas de Petri de 9 cm de diámetro con medio de cultivo PDA. Tras 15 días de incubación a 22°C con un fotoperiodo de 12h luz blanca y próxima a UV/12h oscuridad se tomaron una serie de discos de 5 mm de diámetro con un sacabocados y se colocó uno en el centro de la placa de Petri de 6 cm de diámetro con alguno de los

Cuadro 3. Medios de cultivo utilizados para la evaluación del crecimiento *in vitro* de *Pseudocercospora cladosporioides*

Medio	Composición	Concentración (g/l)	Referencia ^a
EHO 300*	Extracto de hojas de olivo-Agar	(300-20)	1
EHO 100*	Extracto de hojas de olivo -Agar	(100-20)	1
EHO 30*	Extracto de hojas de olivo-Agar	(30-20)	1
EHO100 + es	Extracto de hojas de olivo-Agar	(100-20)	1
EHO + av.	Extracto de hoja de olivo-avena	(100-100)	1
V8	Jugo de 8 Vegetales-CaCO ₃	(200-3)	2
ELDA-ASP	Medio completo de Aspergillus: Extracto de levadura + Dextrosa + Agar	(1-10-20)	3
PDA	Patata-Dextrosa-Agar	(250-20-20)	2
PDAD	Patata-Dextrosa-Agar Diluido	(40-7,5-20)	2
CA	Zanahoria Agar	(200-15)	2
CDA	Czapek Dox Agar	45,4	4
MA	Extracto de malta-Agar	(20-20)	2

a

1: Sparapano y Graniti, 1978.

2: Dhingra y Sinclair, 1985.

3: Karaoglanidis et al., 2000.

4: Concentración recomendada del producto comercial.

* Medios de cultivos preparados a presión atmosférica en un baño a 100°C durante una hora. El resto fueron esterilizados en un autoclave a 120°C durante 20 min.

medios indicados anteriormente. Una vez finalizada la siembra, las placas se sellaron con cinta adhesiva de Parafilm® y se pusieron bajo dos tratamientos de condiciones ópticas (luz blanca y próxima a UV y oscuridad) a 22°C.

La evaluación del crecimiento *in vitro* de *P.cladosporioides* en distintos medios de cultivo se realizó a los 15 y a los 30 días, mediante el diámetro de las colonias del hongo en el medio.

5. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento micelial

La metodología aplicada en los ensayos sobre el crecimiento de los distintos aislados a diferentes temperaturas fue idéntica a la especificada en el apartado anterior en cuanto a la siembra del aislado (Figura 3). El medio de cultivo elegido para este experimento fue el PDA diluido, ya que los resultados del experimento anterior lo destacaban entre los mejores.

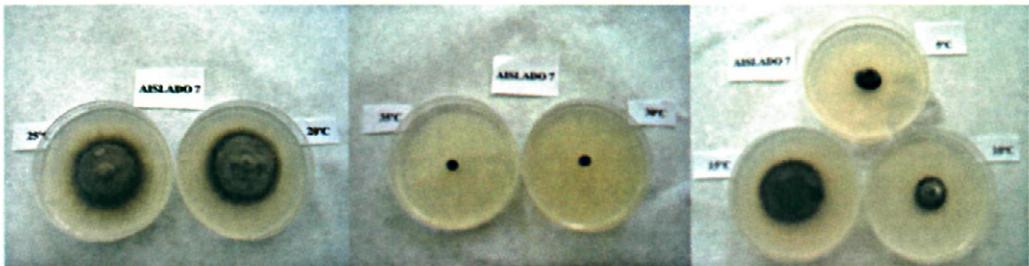


Figura 3: Colonias del aislado LE701 en el medio PDAD a los 60 días de crecimiento a distintas temperaturas.

El desarrollo de cinco aislados (Cuadro 2) se evaluó para una gama de temperaturas de 5° a 35°C a intervalos de cinco grados centígrados y en condiciones de oscuridad. Cada 10 días y hasta 2 meses después de la siembra directa se midió el diámetro de crecimiento de las colonias. De estas medidas se calculó la tasa mensual máxima de crecimiento (mm/mes) para cada aislado y temperatura.

6. Análisis de los datos

Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico "Statistix 7" (Analytical Software, 2000). La comparación de medias se realizó según el test DMS (Diferencia Mínima Significativa) protegido de Fisher, al nivel de probabilidad del 5% (STEEL y TORRIE, 1985).

Con los datos obtenidos en la caracterización morfológica se realizó un análisis de la varianza para cada una de las variables dependientes: longitud, anchura, relación longitud/anchura y número de septas de la conidia. Por otro lado, se elaboró una matriz de correlación entre todas las variables dependientes.

En la evaluación del crecimiento en distintos medios de cultivo se analizaron como variables dependientes el diámetro de la colonia a los 15 y 30 días. Las variables independientes consideradas fueron el medio de cultivo y la presencia o ausencia de luz.

La unidad experimental para el estudio del crecimiento de los distintos aislados fue una placa Petri, existiendo cinco repeticiones para cada una de las temperaturas y aislados evaluados. Así mismo, el ensayo se realizó en dos momentos distintos, considerándolos como dos bloques. Se realizó un análisis de la varianza global, siendo la variable dependiente la tasa mensual máxima y las independientes, la temperatura y los aislados. Además se realizó un análisis de varianza por cada aislado y por cada temperatura ensayada. Para la estimación de la curva de crecimiento de cada aislado entre las temperaturas de 5°C a 30°C se realizó un ajuste de regresión lineal.

RESULTADOS

1. Obtención de los aislados

A partir de las hojas con síntomas del Emplomado se consiguieron por transferencia directa de conidias a medio de cultivo PDA 5 aislados de *P. cladosporioides* (Cuadro 2). Las colonias de todos ellos presentaron un aspecto morfológico semejante. El micelio se desarrolló fundamentalmente sobre la superficie del medio de cultivo adquiriendo un aspecto de algodónoso a verrugoso de color blanco y con el borde marrón oliváceo oscuro más patente en el envés de la placa.

2. Caracterización morfológica

En las observaciones microscópicas, todas las conidias presentaron un aspecto morfológico idéntico: septas, la base truncada y el extremo apical redondeado, tal como están descritas para *P. cladosporioides* en la bibliografía (DEIHTON, 1983 ;BRAUN, 1993) (Figura 2A).

El análisis estadístico mostró la existencia de diferencias significativas entre aislados respecto a todas las variables dependientes: longitud, anchura, relación longitud/anchura y número de septas. Sin embargo, para estos parámetros, no se pudo establecer ninguna relación entre aislados según su origen geográfico o varietal (Cuadro 4).

La longitud media de las conidias resultó ser muy variable, los valores medios oscilaron en el intervalo de 63,8 μm a 37,1 μm . La mayor longitud de las esporas se dio en el aislado procedente de la variedad 'Blanqueta de Elvas' y la menor para el aislado procedente de 'Coratina'.

En el caso de la anchura, los valores fueron un poco más homogéneos. En general, las conidias del agente del Emplomado tuvieron una anchura media de 4,3 μm a 3,1 μm . Cabe destacar que todos los aislados de la especie *P. ceratoniae* tuvieron una menor anchura, entre con 2,5 a 2,1 μm , mostrando marcadas diferencias con las conidias de los aislados de *P. cladosporioides*. Dentro de las muestras de esta última especie, las esporas con mayor y

Cuadro 4. Características de las conidias de *Pseudocercospora* spp de diversos orígenes

Muestra	Longitud (μm)	Anchura (μm)	Long/Anch	Septas (n°)
PM-01	45.8 \pm 8.0	3.1 \pm 0.7	15.2 \pm 3.9	4.8 \pm 1.6
LS-02	54.1 \pm 9.7	3.7 \pm 0.9	15.5 \pm 3.9	4.7 \pm 1.5
LS-03	48.3 \pm 10.4	3.6 \pm 0.8	14.0 \pm 4.2	4.7 \pm 1.4
CI-04	47.7 \pm 12.4	3.3 \pm 0.5	14.5 \pm 3.8	3.5 \pm 1.4
LS-05	43.6 \pm 6.5	3.7 \pm 0.6	12.1 \pm 1.7	4.8 \pm 1.1
DE-06	48.0 \pm 13.0	3.6 \pm 0.5	13.7 \pm 4.6	4.2 \pm 1.3
AC-07	50.6 \pm 10.5	4.1 \pm 0.7	12.7 \pm 3.8	4.5 \pm 1.2
DE-08	49.5 \pm 11.7	3.6 \pm 0.7	14.5 \pm 4.7	4.4 \pm 1.1
PI-09	63.4 \pm 0.1	4.2 \pm 0.5	15.8 \pm 3.0	5.4 \pm 1.0
AC-10	57.1 \pm 10.7	3.9 \pm 0.6	15.0 \pm 3.3	5.5 \pm 1.0
LS-11	58.2 \pm 8.1	3.6 \pm 0.6	16.3 \pm 2.4	5.5 \pm 0.9
LS-12	57.6 \pm 8.2	3.6 \pm 0.5	16.1 \pm 2.5	5.1 \pm 1.0
DE-13	56.8 \pm 9.3	3.4 \pm 0.4	16.9 \pm 3.3	5.2 \pm 0.6
LS-14	52.8 \pm 8.6	3.3 \pm 0.4	16.1 \pm 2.1	4.7 \pm 0.7
MA-15	62.0 \pm 9.5	3.6 \pm 0.5	17.7 \pm 3.7	5.2 \pm 0.7
MA-16	55.4 \pm 7.3	3.6 \pm 0.5	15.8 \pm 3.2	4.4 \pm 0.7
HO-17	58.3 \pm 9.9	3.6 \pm 0.4	16.3 \pm 2.8	4.9 \pm 1.0
PM-18	53.3 \pm 8.3	3.5 \pm 0.3	15.4 \pm 3.3	4.6 \pm 0.8
PM-19	55.6 \pm 13.5	3.5 \pm 0.4	16.3 \pm 4.5	5.0 \pm 1.1
PM-20	55.0 \pm 6.7	3.6 \pm 0.4	15.4 \pm 2.6	4.9 \pm 0.7
PM-21	55.8 \pm 7.7	3.2 \pm 0.2	17.7 \pm 2.3	4.7 \pm 1.0
AC-22	52.1 \pm 7.7	3.3 \pm 0.2	16.1 \pm 2.6	4.2 \pm 0.6
PM-23	55.1 \pm 8.1	3.6 \pm 0.3	15.5 \pm 2.3	5.2 \pm 1.1
PM-24	54.8 \pm 6.0	3.1 \pm 0.2	17.6 \pm 2.5	4.9 \pm 0.6
PM-25	56.7 \pm 11.5	3.4 \pm 0.2	16.7 \pm 3.9	5.5 \pm 1.0
PM-26	61.8 \pm 6.7	3.1 \pm 0.2	20.1 \pm 2.4	5.8 \pm 0.8
PM-27	57.9 \pm 8.5	3.6 \pm 0.2	16.1 \pm 2.9	5.0 \pm 0.9
LS-28	62.1 \pm 9.3	3.6 \pm 0.2	17.2 \pm 2.9	5.5 \pm 0.8
LS-29	63.0 \pm 9.8	3.8 \pm 0.3	16.6 \pm 2.6	5.8 \pm 1.0
MA-30	51.2 \pm 6.8	3.3 \pm 0.2	15.4 \pm 1.9	4.4 \pm 0.8
CI-31	60.8 \pm 10.8	3.7 \pm 0.2	16.5 \pm 3.3	5.9 \pm 1.1
FR-32	57.7 \pm 7.8	3.5 \pm 0.4	16.7 \pm 3.0	5.4 \pm 0.9
BE-33	63.8 \pm 8.9	3.4 \pm 0.3	18.7 \pm 2.8	5.9 \pm 0.7
AL-34(1)	68.2 \pm 15.0	2.1 \pm 0.2	32.1 \pm 8.1	6.7 \pm 2.1
AR-35	47.4 \pm 8.4	3.5 \pm 0.3	13.7 \pm 2.4	3.6 \pm 0.6
LS-36	55.8 \pm 7.9	3.7 \pm 0.3	15.1 \pm 2.2	4.8 \pm 0.5
AC-37	54.8 \pm 9.3	3.6 \pm 0.3	15.3 \pm 2.5	4.3 \pm 1.0
GO-38	46.0 \pm 7.7	4.0 \pm 0.4	11.7 \pm 2.0	3.2 \pm 0.7
DE-39	56.7 \pm 9.1	3.0 \pm 0.3	18.7 \pm 2.9	4.8 \pm 0.6
AL-40(1)	64.0 \pm 11.2	2.3 \pm 0.2	28.8 \pm 5.8	6.7 \pm 1.2
AL-41(1)	49.4 \pm 7.6	2.5 \pm 0.4	20.5 \pm 4.7	5.4 \pm 1.1
DE-42	48.1 \pm 8.5	3.8 \pm 0.9	13.4 \pm 4.1	4.5 \pm 1.2
AL-43(1)	53.4 \pm 9.3	2.5 \pm 0.2	21.4 \pm 4.2	4.3 \pm 1.0

Muestra	Longitud (μm)	Anchura (μm)	Long/Anch	Septas (n°)
LS-44	55.4 \pm 9.4	4.2 \pm 0.8	13.9 \pm 3.7	4.2 \pm 0.9
LS-45	56.5 \pm 6.0	3.9 \pm 0.8	15.1 \pm 3.6	5.1 \pm 0.7
CI-46	57.5 \pm 9.0	3.8 \pm 0.7	15.7 \pm 4.0	4.8 \pm 1.0
OC-47	46.0 \pm 5.4	3.7 \pm 0.7	12.8 \pm 2.6	4.3 \pm 0.5
ME-48	46.8 \pm 7.8	3.9 \pm 0.5	12.1 \pm 2.7	4.0 \pm 0.7
CO-49	48.8 \pm 7.7	3.7 \pm 0.6	13.7 \pm 3.6	4.3 \pm 0.6
PI-50	51.9 \pm 6.7	4.3 \pm 0.5	12.4 \pm 2.2	4.6 \pm 0.7
LS-51	49.7 \pm 8.2	4.2 \pm 0.6	12.3 \pm 3.0	4.4 \pm 0.9
CH-52	48.8 \pm 9.0	4.1 \pm 0.7	12.3 \pm 4.1	4.4 \pm 0.7
CO-53	37.1 \pm 4.8	3.8 \pm 0.6	10.0 \pm 2.2	3.5 \pm 0.7
CO-54	44.1 \pm 5.4	3.8 \pm 0.7	11.8 \pm 2.4	4.4 \pm 5.2
LE-55	46.3 \pm 6.7	3.9 \pm 0.8	12.2 \pm 2.9	4.6 \pm 0.8
PI-56	53.8 \pm 6.3	3.9 \pm 0.6	14.4 \pm 3.6	4.9 \pm 0.7
PM-57	59.1 \pm 7.9	4.1 \pm 0.7	15.1 \pm 3.7	5.1 \pm 0.6
PI-58	54.0 \pm 6.8	4.1 \pm 0.6	13.6 \pm 3.2	4.5 \pm 0.7
LE-59	53.8 \pm 7.1	3.9 \pm 0.5	14.1 \pm 2.7	4.8 \pm 0.7
VE-60	52.2 \pm 6.4	4.2 \pm 0.7	12.8 \pm 2.9	4.6 \pm 0.7
PI-61	48.4 \pm 6.5	3.9 \pm 0.8	13.1 \pm 3.2	4.7 \pm 0.7
FR-62	44.7 \pm 5.8	3.8 \pm 0.6	12.1 \pm 2.3	4.6 \pm 0.7
FR-63	46.5 \pm 6.4	3.9 \pm 0.7	12.2 \pm 2.7	4.8 \pm 0.8
LSD_{0,05}	4.421	0.273	1.713	0.582

(1): Obtenidas de *Ceratonia siliqua*. El resto corresponde con diferentes variedades de *O. europaea*.

Cuadro 5. Crecimiento del aislado LEMY2 de *Pseudocercospora cladosporioides* en distintos medios de cultivo
Medios de cultivo

	15 días ^a			30 días		
	Luz	Oscuridad	Media	Luz	Oscuridad	Media
EHO 300 g/l	6.9	7.7	7.3 g*	14.7	15.6	15.2 cde
EHO 100 g/l	8.1	7.7	7.9 efg	14.3	16.2	15.3 cde
EHO 30 g/l	8.2	7.8	8.0 efg	15.3	14.5	14.9 de
EHO100+es	7.6	7.5	7.5 fg	14.8	13.8	14.3 e
EHO + Avena	8.5	8.4	8.4 def	16.1	16.3	16.2 bcde
V 8	9.0	8.7	8.8 cde	16.9	16.7	16.9 bcd
ELDA	8.1	8.6	8.3 defg	15.2	16.2	15.7 bcde
PDA normal	9.7	10.1	9.9 abc	15.8	18.4	17.1 bc
PDAD	10.6	10.7	10.7 a	17.6	17.8	17.8 ab
Zanahoria Agar	8.6	8.5	8.6 de	16.9	16.8	16.8 bcd
Czapek Dox Agar	10.0	9.9	9.9 ab	19.3	19.1	19.2 a
Extracto de malta Agar	9.0	9.5	9.2 bcd	17.6	17.8	17.7 ab
LSD_{0,05}			1.04			2.15

^a Diámetro medio en mm de las colonias incubadas a 22 – 24 °C bajo condiciones de iluminación continua y en oscuridad.

* Medias seguidas de una letra común no difieren significativamente según el test LSD protegido de Fisher para P = 0.05.

menor anchura correspondieron a aislados procedentes de la variedad 'Picudo' y 'Picholine marrocaïne', respectivamente.

La relación longitud /anchura de las conidias fue sensiblemente superior en las muestras de la especie *P. ceratoniae* que en las de *P. cladosporioides*. Por otro lado, el número de septas varió entre 6 y 3 tabiques transversales por espora, independientemente de la especie de *Pseudocercospora*.

El análisis de correlación entre todas las variables evaluadas no mostró ninguna relación entre el número de septas y la anchura o la longitud de la conidia, así como tampoco entre la anchura y la longitud.

3. Crecimiento en medios de cultivo

El crecimiento micelial de las colonias en los distintos medios de cultivo se evaluó a

los 15 y 30 días después de la siembra directa (Cuadro 5). A estos tiempos se realizó un análisis de la varianza global, el cual mostró que en cada uno de los periodos no existían diferencias significativas para la presencia o ausencia de luz en los diferentes medios de cultivo. Por el contrario, sí se observaron diferencias en cuanto al crecimiento radial de las colonias en función del medio de cultivo. Los medios que resultaron más favorables para el crecimiento del hongo en ambos periodos fueron el medio PDA diluido (PDAD) y Czapek Dox Agar (CDA). En cambio, los valores más bajos del diámetro de las colonias se obtuvieron con los distintos medios que contenían extracto de hojas de olivo (Figura 4). En ningún caso se observó la formación de conidias en el medio de cultivo.

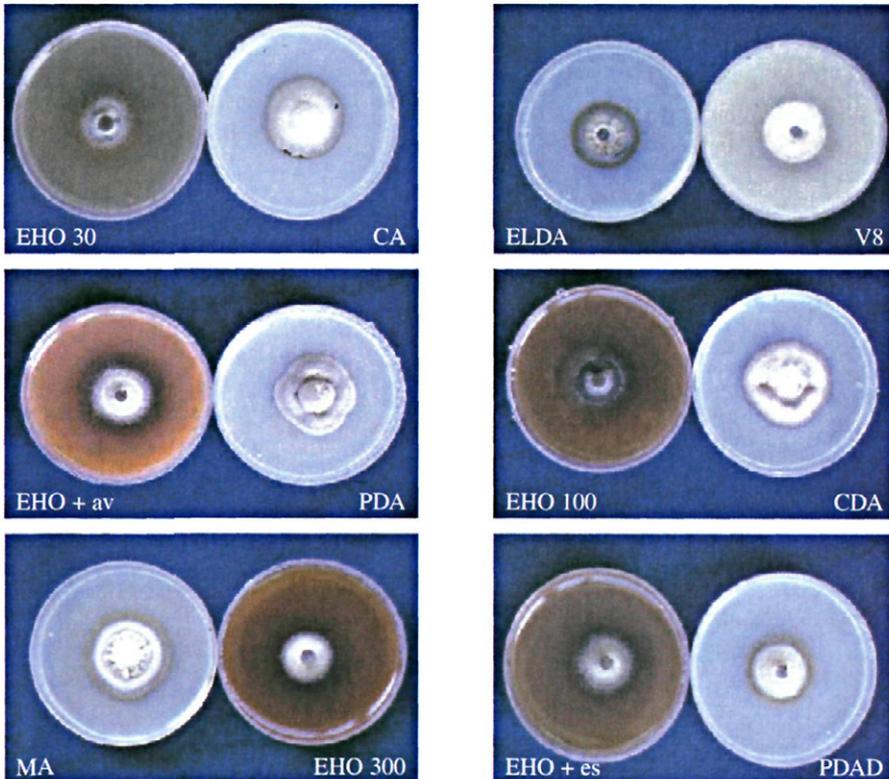
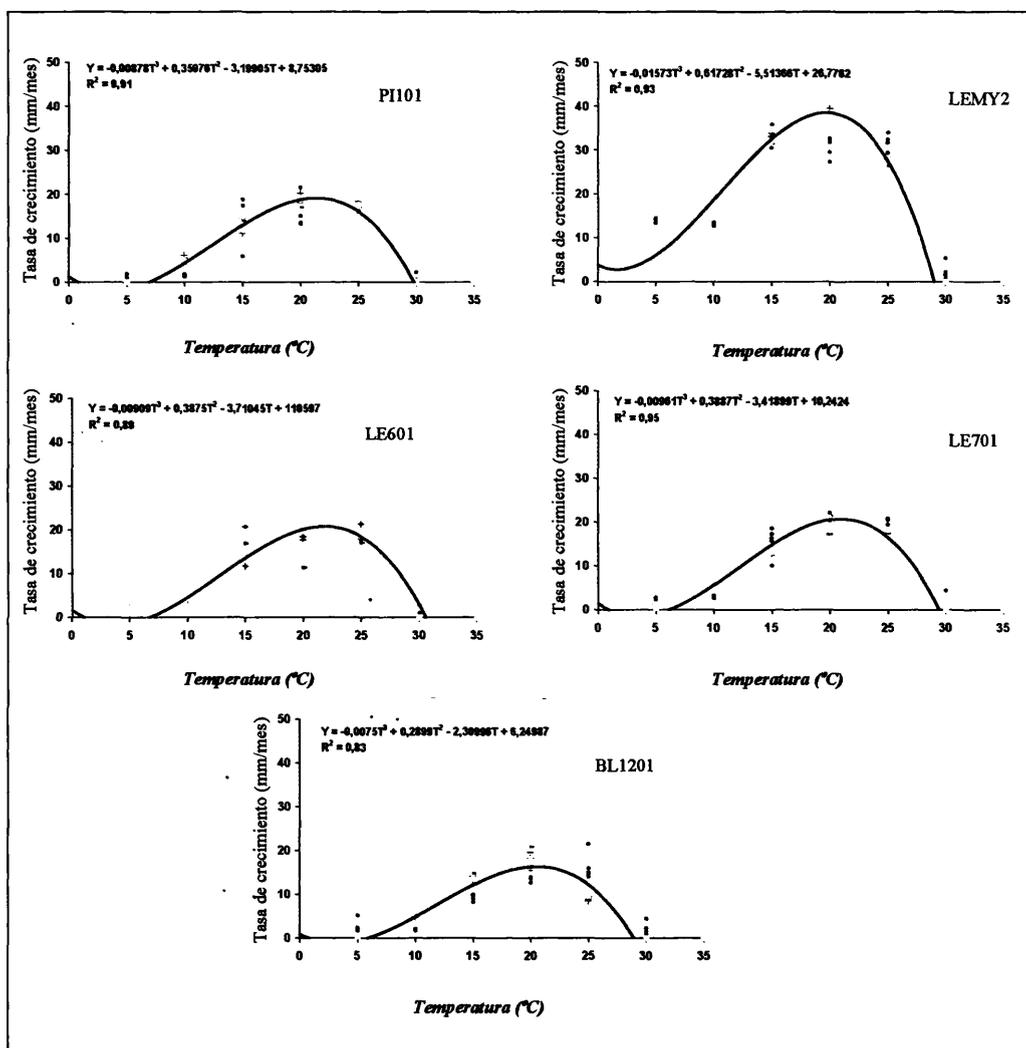


Figura 4: Colonias de *Pseudocercospora cladosporioides* en distintos medios de cultivo a los 30 días de la siembra.

Cuadro 6. Tasas de crecimiento máximo (mm/mes) de los aislados de *Pseudocercospora cladosporioides* en el medio PDAD a diferentes temperaturas

Aislado	Temperatura (°C)						
	5	10	15	20	25	30	35
PI101	0.6± 0.8b	3.2± 2.0b	13.8± 3.6b	17.0± 3.0b	16.9± 1.0bc	0.3± 0.7a	0
LEMY2	12.4± 1.8a	16.7± 3.9a	33.2± 1.6a	34.6± 4.5a	30.1± 2.3a	1.1± 1.7a	0
LE601	1.8± 0.5b	2.3± 0.5b	16.0± 3.1b	17.0± 3.2b	19.9± 2.5b	0.4± 0.9a	0
LE701	1.7± 0.9b	5.1± 2.2b	14.4± 2.6b	20.2± 1.4b	17.6± 2.2bc	0.5± 1.4a	0
BL1201	3.6± 1.5b	3.7± 1.4b	11.6± 2.3b	16.5± 2.7b	12.1± 5.0c	1.1± 1.5a	0
LSD _{0,05}	2.73	5.36	4.55	7.00	6.71	1.63	0

Figura 5: Curvas de crecimiento de los aislados de *Pseudocercospora cladosporioides*.

Cuadro 7. Curvas de regresión de los aislados de *Pseudocercospora cladosporioides*

Aislado	Ajuste	R ²	Tóptima ^a	TCmáx ^b
PI1101	$Y = 8.75305 - 3.19905T + 0.35976T^2 - 0.00878T^3$	0,91	21.9a	19.2bc
LEMY2	$Y = 26.7762 - 5.51366T + 0.61728T^2 - 0.01573T^3$	0,93	20.5a	37.8a
LE61001	$Y = 11.597 - 3.71045T + 0.38751T^2 - 0.00909T^3$	0,88	22.4a	21.1b
LE71101	$Y = 10.2424 - 3.41899T + 0.388T^2 - 0.00961T^3$	0,95	21.4a	21.0b
BL121201	$Y = 6.24987 - 2.30996T + 0.2899T^2 - 0.0075T^3$	0,83	21.0a	15.6c
LSD _{0,05}			4.25	2.78

^a Temperatura óptima (°C) estimada para la ecuación ajustada.

^b Tasa de crecimiento máxima (mm/mes) estimada por la ecuación ajustada.

4. Crecimiento a distintas temperaturas

El análisis de la tasa de crecimiento para cada uno de los aislados mostró diferencias significativas entre ellos, entre las temperaturas ensayadas y para la interacción entre ambas variables. Según el test LSD se obtuvieron tres grupos que difieren significativamente entre ellos. La mayor tasa de crecimiento se obtuvo en el aislado LEMY2 procedente de la variedad 'Lechín de Sevilla', seguidamente LE701 y LE501 también de la variedad 'Lechín de Sevilla' y, por último, el menor crecimiento medio fue para los aislados PI101 de 'Picual' y BL1201 de 'Blanqueta de Elvas' respectivamente.

Para el caso de las temperaturas también se obtuvieron diferencias significativas entre casi todos los intervalos ensayados. A las temperaturas de 5° y 10°C, los distintos aislados, presentaron un crecimiento muy bajo. El aislado LEMY2 fue el que tuvo un mayor crecimiento alcanzando una tasa de 12,4 mm/mes a los 5°C y de 16,7 mm/mes a los 10°C. Seguidamente fueron los aislados LE501, LE701, BL1201 y PI101, pero con un crecimiento mucho menor ya que la tasa no fue superior a los 5 mm/mes.

La temperatura óptima para el crecimiento de *P. cladosporioides* estuvo en el intervalo de 15°C a 25°C y como en las temperaturas anteriores, LEMY2 fue el que consiguió un mayor desarrollo en el medio de cultivo. A los 30°C el crecimiento fue muy bajo, no existiendo diferencias significativas entre las tasas de crecimiento entre los distintos aislados. Cuando la temperatura fue de 35°C no

se obtuvo crecimiento en ninguno de los aislados (Cuadro 6).

Una vez obtenida la tasa de crecimiento de cada uno de los aislados se buscó la función matemática que relacionase las variables tasa de crecimiento y temperatura, además de saber con qué precisión se puede predecir el valor que toma una variable y, para que valores dados del resto de variables. Por ello, se realizó un ajuste de regresión lineal, resultando el modelo polinómico de la forma: $Y = d + cT + bT^2 + aT^3$, debido a que fue la que mejor cumplía las condiciones de distribución de residuos, coeficientes de determinación (R²) y significación de los coeficientes de regresión. Y representa la tasa de crecimiento máxima diaria, T la temperatura (°C) y a, b, c son los coeficientes de regresión y d es el término independiente (Figura 5).

A partir de este modelo general se calculó la ecuación de crecimiento de cada uno de los aislados para las temperaturas del intervalo entre 5°C y 30°C (Cuadro 7). Una vez conocida la ecuación se obtuvo la temperatura óptima mediante la derivación de los polinomios y con este nuevo parámetro se determinó la tasa máxima de crecimiento por la ecuación. Los análisis estadísticos realizados no han mostrado diferencias significativas entre los aislados para la temperatura óptima, pero sí para la tasa de crecimiento máxima (Cuadro 7).

DISCUSIÓN

El Emplomado o repilo plumizo causado por *Pseudocercospora cladosporioides* es

una enfermedad del olivo conocida desde finales del siglo XIX, pero escasamente estudiada. Por esta razón se ha realizado el presente trabajo que forma parte de un proyecto más amplio dirigido a caracterizar la etiología y la epidemiología de la enfermedad con vistas a diseñar estrategias de lucha más eficaces.

La falta de estudios etiológicos y epidemiológicos ha impedido que se desarrollen medidas de lucha específicas contra el Emplomado; por ello, para el control de esta enfermedad se recomiendan las medidas utilizadas contra el Repilo (GRANTI y LAVIOLA, 1981; PAPPAS, 1993; TRAPERO y BLANCO, 2001).

Uno de los primeros aspectos que deben ser investigados cuando se inicia la caracterización de un patógeno es la posibilidad de su cultivo *in vitro* y, por tanto, de la producción de inóculo (conidias) en condiciones artificiales. Las únicas referencias al respecto para *P. cladosporioides*, son los trabajos de HANSEN y RAWLINS (1944), FAVALORO (1970) y PAPPAS (1993), que destacan la dificultad para aislarlo de las hojas y cultivarlo y la nula o muy escasa esporulación que presentan los cultivos. Nuestros resultados confirman dicha dificultad, ya que, las colonias de los aislados obtenidos en los mejores medios de cultivo ensayados crecen lentamente sin llegar a formar conidias. Estos resultados no son sorprendentes, ya que las limitaciones señaladas son habituales en otras especies de *Cercospora* y géneros afines (DHINGRA y SINCLAIR, 1995; CALDWELL, 1994), pero subrayan la necesidad de continuar investigando en esta línea debido a su importancia.

Debido a la dificultad para aislar y cultivar el patógeno *in vitro*, la caracterización morfológica de los aislados se ha realizado exclusivamente a partir de las observaciones microscópicas de las conidias y conidióforos presentes en las lesiones del envés de las hojas afectadas. Los resultados de las mediciones efectuadas señalan diferencias significativas entre aislados para el tamaño de las conidias; si bien, estas diferencias son

pequeñas si se comparan con los aislados de otra especie de *Pseudocercospora*, *P. ceratoniae*, que se utilizaron como comparación. Los valores medios del tamaño de las conidias de los aislados de *P. cladosporioides* estudiados concuerdan, en general, con los indicados por la bibliografía aunque difieren sensiblemente del gran tamaño de algunas conidias indicado por GARCÍA-FIGUERES en Cataluña (1991). Las diferencias observadas entre aislados de *P. cladosporioides* no guardaron relación con su origen geográfico o varietal, pero podrían deberse al estado de desarrollo (madurez) de las conidias en las lesiones, el cual está determinado, entre otros factores, por el momento de recogida de las muestras y por las condiciones ambientales.

Una vez que se obtiene el cultivo puro, el hongo es relativamente fácil de cultivar y el método puesto a punto en este trabajo, utilizando alguno de los mejores medios de cultivo ensayados, como el PDA diluido, resulta válido para realizar estudios sobre el efecto de diferentes factores (temperatura, luz, fungicidas, etc.) en el crecimiento micelial del hongo. En este sentido, los ensayos llevados a cabo en este trabajo, utilizando el medio PDA diluido, han demostrado que la luz no influye significativamente sobre el crecimiento del hongo y que en ningún caso se obtuvo la formación de conidias en medios de cultivo.

En la bibliografía revisada no se ha encontrado ninguna referencia sobre el efecto de la temperatura en el crecimiento del hongo, por ello, fue un objetivo prioritario considerado para este trabajo. PAPPAS (1993) indica 22°C como temperatura favorable para el crecimiento del hongo. Nuestros resultados han permitido determinar el patrón de crecimiento de 5 aislados de *P. cladosporioides* en función de la temperatura, siendo la óptima 21°C, la máxima cercana a 30°C y la mínima algo inferior a 5°C. Un aspecto destacado fue la lentitud del crecimiento de la colonia, que para la temperatura óptima se estima entre 15.6 y 37.8 mm/mes según el modelo de regresión ajustado.

tado. Esta tasa de crecimiento no difiere sensiblemente de los 30 mm alcanzados por las colonias de *P. cladosporioides* a los 60 días según PAPPAS (1993).

El patrón de crecimiento micelial de *P. cladosporioides* en función de la temperatura confirma la buena adaptación de este patógeno a las condiciones de clima mediterráneo del cultivo del olivo. Así, el otoño resulta una época muy favorable para la infección, ya que las lluvias en esta época suelen coincidir con valores moderados de la temperatura (12 – 25°C) durante un período relativamente largo de tiempo. Otro momento favorable es el final del invierno y principio de la primavera donde las lluvias vuelven a coincidir con valores similares de temperaturas durante otro largo período de tiempo. Ambos períodos han sido considerados importantes para el desarrollo del Emplomado en base a observaciones de campo (MODUGNO PETTINARI, 1953; GRANITI y LAVIOLA, 1981; PAPPAS, 1993). No obstante,

estos datos son todavía insuficientes para desarrollar estrategias más específicas en el control de esta enfermedad, ya que no se conocen suficientemente otros aspectos críticos del ciclo de patogénesis, como el efecto de la temperatura y de la humedad sobre la infección, la duración del período de latencia de las infecciones, o la capacidad del patógeno para mantenerse activo en las hojas infectadas, tanto las que permanecen en el árbol como las que caen al suelo (TRAPERO y BLANCO, 2001).

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido financiada por el proyecto AGL2000-1725 de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología. Queremos expresar también nuestro agradecimiento a todo el personal del laboratorio de Patología Agroforestal de la Universidad de Córdoba que de forma desinteresada nos han ayudado en la realización de estos estudios.

ABSTRACT

ÁVILA DE LA CALLE A., A. BENALI, A. TRAPERO CASAS. 2004. Morphological and cultural variability of *Pseudocercospora cladosporioides*, causal agent of olive cercosporiose. *Bol. San. Veg. Plagas*, 30: 369-384.

Olive cercosporiose caused by *Pseudocercospora cladosporioides* is an important fungal disease, widely distributed on most olive growing regions in the world, although scarcely studied. The lack of information about this disease let us to begin a research line on its etiology, epidemiology and control, so the objectives of the present work were to study culture media and environmental conditions to growth the fungus *in vitro* and to determine cultural and morphological variation among pathogen isolates from different geographical origins and cultivars.

The direct transfer of conidia and/or conidiophores to a plate with PDA medium proved to be the quickest, easiest and most effective way to isolate the fungi from infected leaves. However, we were not able to get isolates in season different to winter or fall. Conidia were not produced on any culture media assayed. For this reason, the characterisation of pathogen was performed using conidia formed on the lesions naturally infected leaves. Out of 59 isolates were studied from varies olive growing areas or cultivars in Spain and from Morocco. Additionally, 4 isolates of *Pseudocercospora ceratoniae* obtained from carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) were used for comparison. Result showed significant differences among isolates and greater differences between both fungal species.

The studies of culture media proved that diluted PDA resulted to be good to study the effect of the different factors on the mycelial growth. In addition, the light did not affect fungal growth. The growth pattern of an isolate of *P. cladosporioides* at different temperatures showed that the minimum temperature was slightly lower than 5°C, the optimum temperature ranged 21-22,5°C and the maximum temperature near 30°C. These studies also have demonstrated that there are significant differences between the growth rate of the isolates.

Key words: *Olea europaea*, *Pseudocercospora cladosporioides*, *Mycocentrospora*, *Ceratonia siliqua*.

REFERENCIAS

- ANALYTICAL SOFTWARE. 2000. Statistix 7: User's Manual, Analytical Software, Tallahassee, FL. 359 pp.
- BENALI, A. 2001. Aspectos etiológicos del Emplomado del olivo causado por *Pseudocercospora cladosporioides*. Tesis de Master en Olivicultura y Elaiotecnía. Universidad de Córdoba. 90 pp.
- BOTTALICO, A., CORDA, P. 1995. *Mycocentrospora cladosporioides* from olive drupes in Sardinia. *Plant Disease* 79: 320.
- BRAUN, U. 1993. Taxonomic notes on some species of *Cercospora* complex (III). *Mycotaxon* 48: 275-298.
- CALDWELL, V. 1994. Cercosporioid fungi on Australian native plants. PhD Thesis. Dep. Agriculture. University of Melbourne. 191 pp.
- CROUS, P.W. 1998. *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs. APS Press. St. Paul, MN. 170 pp.
- DEIGHTON, F.C. 1983. Studies on *Cercospora* and allied genera. VII. Further notes on *Cercoseptoria* and some new species and redispersions. *Mycological Papers* 151: 1-13.
- DHINGRA, O. D., SINCLAIR, J. B. 1985. Basic Plant Pathology Methods. CRC. Press, Boca Raton, Florida. 355 pp.
- FAVALORO, M.. 1970. Infezione di *Cercospora cladosporioides* Sacc. su frutti di olivo. *Informatore Fitopatol.* 20: 7-9.
- GARCÍA-FIGUERES, F. 1991. Repilos del olivo: ataque en fruto. *Phytoma España* 25:31-36.
- GOIDANICH, G. 1964. Manuale di patologia vegetale. Vol. 2. Edizioni Agricola Bologna, Italia. 1178-1179 pp.
- GRANITI, A., LAVIOLA, C. 1981. Sguardo generale alle malattie parassitarie dell'olivo. *Informatore Fitopatol.* 31: 77-92.
- HANSEN, H. N., RAWLINS, T. E. 1944. *Cercospora* fruit and leaf spot of olive. *Phytopathology* 34: 257-259.
- KARAOGLANIDIS, G., IOANNIDIS, P., THANASSAULOPOULOS, C. 2000. Reduced sensitivity of *Cercospora beticola* isolates to sterol-demethylation-inhibiting fungicides. *Plant Pathology* 49: 567-572.
- KIRK, P.M., CANNON, P.F., DAVID, J.C., STALPERS, J.A. 2001. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. 9th ed. CAB International, Wallingford, England. 655 pp.
- MODUGNO-PETTINARI C. 1953. Diffusione, biologia e terapia di *Cercospora cladosporioides* Sacc. Parassita dell'olivo in Italia. *Boll. Staz. Pat. Veg. A. X. S. III*, 233-244.
- MORAL, J. DEL., MEDINA, D. 1985. El "repilo plumizo" del olivo causado por *Cercospora cladosporioides* Sacc., enfermedad presente en España. *Bol. San. Veg. Plagas* 12: 31-35.
- NIGRO, F., IPPOLITO, A., GALLONE, P., CARMIGNANO, P., ROMANAZI, G. 2000. Cercosporiosis of olive in Apulia and attempts to control the disease. Proc. 4th International Symposium on Olive Growing. 70. Acta Horticulturae 586: 773-776.
- PAPPAS, A. C. 1993. *Mycocentrospora cladosporioides* on olive in Greece. *EPPO Bulletin* 23: 405-409.
- PAÚL y AROZAMENA, M. 1895. *Cycloconium oleaginum* y *Cercospora cladosporioides*. *Anales Soc. Esp. Hist. Nat.* 24 [Actas]. 144 pp.
- PROTA, U. 1995. Le malattie dell'olivo. *Informatore Fitopatol.* 45: 16-26.
- SPARAPANO, L., GRANITI, A. 1978. Cutin degradation by two scab fungi *Spilocaea oleagina* (Cast) Hugh. and *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. In: Current topics in Plant Pathology. Király, Z., ed. Akademiai Kiado, Budapest. 117-131 pp.
- STEEL, R. G. D., TORRIE, J. H. 1985. Bioestadística: principios y procedimientos. MacGraw-Hill, Bogotá. 622 pp.
- TRAPERO, A. 2003. Los "Repilos" del olivo. www.agroinformacion.com.
- TRAPERO, A., LÓPEZ DOCEL, L.M., VIRUEGA PUENTE, J. R. 1998. Los Repilos del olivo: etiología, epidemiología y estrategias de control. *Phytoma España* 102: 154-158.
- TRAPERO, A., BLANCO, M. A. 2001. Enfermedades. In: El cultivo del olivo. D. Barranco, R. Fernández-Escobar, L. Rallo, eds. Mundi-Prensa Junta de Andalucía, Madrid. 497-549 pp.
- VARO, R., TRAPERO, A. 2001. Enfermedades del algarrobo (*Ceratonia siliqua* L.) en Andalucía. Proc. III Congreso Forestal Español, Mesa 6: Protección y restauración del medio natural, Granada. 116-120 pp.

(Recepción: 17 junio 2003)

(Aceptación: 4 noviembre 2003)