

Caracterización morfológica y cultural de aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la Antracnosis del olivo

R. OLIVEIRA, J. MORAL, K. BOUHMI, A. TRAPERO

La Antracnosis del olivo, causada por especies fúngicas del género *Colletotrichum*, es una enfermedad grave ampliamente distribuida en todas las regiones del mundo donde se cultiva el olivo. La incidencia de la enfermedad varía marcadamente en función de la susceptibilidad varietal, las condiciones climáticas y la virulencia del patógeno. Uno de los aspectos menos conocidos de la enfermedad es la identificación del patógeno. Recientemente, se ha indicado que son dos las especies de *Colletotrichum* (*C. acutatum* y *C. gloeosporioides*) responsables de la Antracnosis del olivo, en lugar de una única especie (*C. gloeosporioides* = *Gloeosporium olivarum*) como se había considerado hasta ahora. En este trabajo se presentan los resultados de la caracterización morfológica y cultural de una colección de aislados de *Colletotrichum* obtenidos de olivos afectados de Antracnosis en varias comarcas olivícolas de Andalucía.

Aunque se han estudiado numerosos caracteres morfológicos y culturales, ninguno permitió una separación clara entre grupos de aislados o especies. No obstante, la forma de los extremos de las conidias fue el carácter más importante para su diferenciación. Casi todos los aislados de *Colletotrichum* de olivo (96%) tuvieron la mayoría de las conidias con un extremo redondeado y el otro agudo, diferenciándose de las conidias de *C. gloeosporioides*, con los dos extremos redondeados, y de las de *C. acutatum*, con los dos extremos agudos. Otras características estudiadas, como la coloración y el crecimiento de la colonia, la presencia de setas en los acérvulos, la presencia y morfología de las clamidosporas, la longitud y anchura de las conidias, o la formación de apresorios y conidias secundarias, mostraron una amplia variabilidad.

Atendiendo a los resultados obtenidos, los aislados de *Colletotrichum* causantes de la Antracnosis del olivo en Andalucía se clasificarían dentro del complejo *C. acutatum* / *C. gloeosporioides*. Si bien, han mostrado características morfológicas y culturales más próximas a la especie *C. acutatum*. Su identificación definitiva requerirá de estudios adicionales para la caracterización fisiológica, molecular y patogénica de los aislados.

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

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

K. BOUHMI. Dirección Provincial de Agricultura de Nador, Nador, Marruecos.

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

INTRODUCCIÓN

La enfermedad conocida como Antracnosis, "aceituna jabonosa" o "momificado" causada por *Colletotrichum* spp. está presente en la mayoría de países olivícolas, tanto de la cuenca mediterránea como de América, Asia y

Sudáfrica (GOTER, 1956; ANDRÉS, 1991; TRAPERO y BLANCO, 2004). El principal efecto sobre el olivo es la podredumbre de las aceitunas, asociada con una notable pérdida de peso y su caída prematura, originando aceites de elevada acidez y nula calidad organoléptica ("aceites colorados") (ANDRÉS, 1991).

Los nombres de "aceituna jabonosa" o "momificado" hacen referencia al síndrome que presentan los frutos afectados, que en los estados más avanzados de la enfermedad, muestran una podredumbre de aspecto jabonoso y si las condiciones climáticas son adecuadas se deshidratan y quedan momificados en los ramos (Figura 1A) (MATEO-SAGASTA, 1968; 1976; ANDRÉS, 1991; TRAPERO y BLANCO, 2004).

Los ataques de este patógeno en España se han consignado exclusivamente al fruto (MATEO-SAGASTA, 1968; GARCÍA-FIGUERES, 1995). Pero investigaciones recientes han puesto de manifiesto la desecación de ramas como segundo síndrome de esta enfermedad en Andalucía (Figura 1B) (BOUHMIDI, 1999; OLIVEIRA, 2003). Asimismo, se han descrito infecciones en pedúnculo, ramos, hojas (BOUHMIDI, 1999; OLIVEIRA, 2003), frutos jóvenes (GARCÍA-FIGUERES, 1998; OLIVEIRA y TRAPERO; 2002) e inflorescencias (GOTER, 1956; MORAL, 2004). La capacidad de infectar estructuras del árbol distintas del fruto puede modificar el ciclo de vida establecido hasta ahora para la enfermedad en España.

El hongo causante de la enfermedad fue descrito por Almeida en 1899 como *Gloeosporium olivarum* Alm. Con posterioridad, esta especie fue reclasificada en la especie compleja *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. et Sacc. (ARX, 1970), cuyo teleomorfo corresponde a la especie *Glome-*

rella cingulata (Stoneman) Spauld. et Schrenk, el cual ha sido observado sólo una vez en un cultivo puro de la India (MUGNAI *et al.*, 1993).

En la clasificación tradicional de los hongos, el género *Colletotrichum* se encuadra en la división *Eumycota*, subdivisión *Deuteromycotina*, clase *Coelomycetes* y orden *Melanconiales* (AINSWORTH, 1971). Si se clasifica este género atendiendo a su teleomorfo *Glomerella*, es decir desechando la subdivisión artificial *Deuteromycotina*, se encuadra en el phylum *Ascomycota*, clase *Ascomycetes*, subclase *Sordariomycetidae*, orden *incertae sedis* y familia *Glomerellaceae* (KIRK *et al.*, 2001).

Recientemente se ha descrito la especie *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds (teleomorfo: *Glomerella acutata* Guerber et Correll [2001]) como agente causal de la enfermedad en China (MARGARITA *et al.*, 1986), España (MARTÍN y GARCÍA-FIGUERES, 1999; BOUHMIDI, 1999), Italia (AGOSTEO *et al.*, 2000; CACCIOLA *et al.*, 2001) y Portugal (TALHINHAS *et al.*, 2004). En cambio, estudios realizados en Italia aportan evidencias de que las especies de *Colletotrichum* que afectan al olivo son genéticamente uniformes, posiblemente debido a la falta de reproducción sexual, y distintas de las especies que infectan a otros huéspedes. De ahí, que algunos autores consideran que el agente causal de la Antracnosis del olivo puede tra-



Figura 1. Síndromes de la Antracnosis del olivo causada por *Colletotrichum* spp. A) Podredumbre de aceitunas. B) Puntisecado de ramas con aceitunas momificadas.

tarse de una forma especial del *Colletotrichum gloeosporioides* o de otra especie de *Colletotrichum* basándose en algunas características morfológicas, fisiológicas y en el perfil electroforético (GRANITI *et al.*, 1993; AGOSTEO y PENNISI, 1994; AGOSTEO *et al.*, 1997).

En un intento de aclarar esta situación y dada la importancia de la enfermedad, en el Grupo de Patología Agroforestal de la Universidad de Córdoba inició una línea de investigación sobre la etiología y epidemiología de la Antracnosis del olivo en Andalucía (BOUHMIDI, 1999; OLIVEIRA, 2003; MORAL, 2004). En este trabajo se incluyen los resultados sobre la variabilidad morfológica y cultural de las poblaciones del patógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Origen de los aislados

Los aislados de *Colletotrichum* spp. fueron obtenidos a partir de muestreos realizados en frutos, pedúnculos, hojas y tallos de diferentes variedades de olivo en las provincias de Córdoba, Málaga y Sevilla. Además se incluyeron 4 aislados de referencia, dos de olivo (Col-41 y Col-42) y dos de fresa (Col-44 y Col-45), de la colección del Laboratorio de Sanidad Vegetal de Barcelona y se completó con 2 aislados de Naranja de Huelva y Córdoba (Cuadro 1).

2. Caracterización morfológica

Los aislados se cultivaron en placas de Petri con PDA (Agar-Patata-Dextrosa) durante 8-10 días bajo luz continua a 25 °C. De cada aislado se estudiaron los acérvulos y la morfología de 50 conidias. Las conidias se clasificaron según su forma en tres categorías: 0= conidias con los dos extremo redondeados; 1= conidias con un extremo redondeado y otro agudo (mixtas); 2= conidias con los dos extremos agudos. El tamaño de las conidias se determinó midiendo su longitud y anchura a 400 aumentos y se calculó la relación longitud/anchura. Para la caracterización del micelio se realizaron observaciones directas en las placas y montajes de los

aislados determinándose la morfología, coloración y la presencia de clamidosporas.

3. Efecto de la temperatura en el crecimiento micelial

El efecto de la temperatura en el crecimiento micelial del patógeno se estudió en 31 aislados de *Colletotrichum* spp. La siembra se realizó en placas de Petri con PDA utilizando un disco del patógeno de 5 mm. Las placas se incubaron a 10, 15, 20, 25 y 30°C, con fotoperiodo alterno de 12 horas, y a 35°C en oscuridad permanente.

A los 7 días de la siembra se midió el diámetro mayor y menor de cada colonia utilizando un escalímetro digital. Para cada aislado y temperatura se dispusieron tres repeticiones.

Los datos permitieron calcular la curva de crecimiento de cada aislado a distintas temperaturas y su temperatura óptima de desarrollo. Posteriormente, se eligió el modelo común que mejor se ajustó a los 31 aislados ensayados. La elección definitiva del modelo se realizó según los criterios: i) coeficiente de determinación (R^2), ii) significación de los coeficientes de las variables independientes y, iii) distribución de los residuos estandarizados (CAMPBELL y MADDEN, 1990).

4. Germinación de las conidias

Para la realización de este ensayo se utilizaron 31 aislados de *Colletotrichum* spp. cultivados durante 5 días en PDA. Las conidias se obtuvieron por raspado de la colonia con un asa de siembra y agua desionizada estéril. Las suspensiones conidiales de cada aislado se ajustaron a 10^5 conidias ml⁻¹.

Para la evaluación de la germinación de las conidias se utilizaron placas Microtest. En cada uno de los pocillos de la placas se depositaron 10µl de la suspensión de conidias (YOHALEM *et al.*, 1994). Las placas se incubaron durante 24 h a 25°C con fotoperiodo alterno de 12 h, añadiéndose 5 ml de "sodium azide" al 0.05% para detener la germinación. Se realizaron tres repeticiones por aislado.

De cada aislado ensayado se contabilizaron 100 conidias procedentes de las tres repeticiones utilizando el microscopio inver-

Cuadro 1. Aislados de *Colletotrichum* spp. estudiados

Aislado	Especie	Huésped	Tejido afectado	Procedencia
Col-1	<i>Colletotrichum acutatum</i> ¹	Olivo	Pedúnculo	Almodóvar, Córdoba
Col-3	<i>Colletotrichum acutatum</i> ¹	Olivo	Tallo	Almodóvar, Córdoba
Col-5	<i>Colletotrichum acutatum</i> ¹	Olivo	Pedúnculo	Sta. Cruz, Córdoba
Col-7	<i>Colletotrichum acutatum</i> ¹	Olivo	Pedúnculo	Sta. Cruz, Córdoba
Col-8	<i>Colletotrichum acutatum</i> ¹	Olivo	Pedúnculo	Sta. Cruz, Córdoba
Col-9	<i>Colletotrichum acutatum</i> ¹	Olivo	Pedúnculo	Antequera, Málaga
Col-10	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Pedúnculo	Antequera, Málaga
Col-12	<i>Colletotrichum acutatum</i> ¹	Olivo	Aceituna	Montilla, Córdoba
Col-14	<i>Colletotrichum acutatum</i> ¹	Olivo	Aceituna	Bella Vista, Córdoba
Col-23	<i>Colletotrichum acutatum</i> ¹	Olivo	Aceituna	Rute, Córdoba
Col-24	<i>Colletotrichum acutatum</i> ¹	Olivo	Aceituna	Rute, Córdoba
Col-25	<i>Colletotrichum acutatum</i> ¹	Olivo	Tallo	Rute, Córdoba
Col-26	<i>Colletotrichum acutatum</i> ¹	Olivo	Pedúnculo	Rute, Córdoba
Col-27	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Aceituna	Llanos D. Juan, Córdoba
Col-28	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Aceituna	Montilla, Córdoba
Col-29	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Pedúnculo	Llanos D. Juan, Córdoba
Col-30	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Olivo	Pedúnculo	Llanos D. Juan, Córdoba
Col-31	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Pedúnculo	Llanos D. Juan, Córdoba
Col-32	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Tallo	Llanos D. Juan, Córdoba
Col-33	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Pedúnculo	Montilla, Córdoba
Col-34	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Aceituna	Montilla, Córdoba
Col-35	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Pedúnculo	Montilla, Córdoba
Col-36	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Pedúnculo	Montilla, Córdoba
Col-37	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Aceituna	Nueva Carteya, Córdoba
Col-38	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Aceituna	Las Navas C., Sevilla
Col-39	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Aceituna	Montilla, Córdoba
Col-40	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Aceituna	Montilla, Córdoba
Col-41	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ²	Olivo	Aceituna	Montsia, Tarragona
Col-42	<i>Colletotrichum acutatum</i> ²	Olivo	Aceituna	Montsia, Tarragona
Col-44	<i>Colletotrichum fragariae</i> ²	Fresa	Fruto	IMI-345047
Col-45	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ²	Fresa	Fruto	IMI-356878
Col-46	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Tallo	Córdoba
Col-47	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Tallo	Córdoba
Col-48	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Tallo	Córdoba
Col-49	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Aceituna	Osuna, Sevilla
Col-50	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Aceituna	Lucena, Córdoba
Col-51	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Aceituna	Lucena, Córdoba
Col-52	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Aceituna	Antequera, Málaga
Col-53	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Aceituna	Antequera, Málaga
Col-54	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Aceituna	Córdoba
Col-55	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Aceituna	Mollina, Málaga
Col-56	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Hoja	Antequera, Málaga
Col-57	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Aceituna	Archidona, Málaga

Cuadro1 (Continuación). Aislados de *Colletotrichum* spp. estudiados

Aislado	Especie	Huésped	Tejido afectado	Procedencia
Col-58	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Aceituna	Archidona, Málaga
Col-59	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Aceituna	Archidona, Málaga
Col-60	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Aceituna	Archidona, Málaga
Col-61	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Aceituna	Iznajar, Córdoba
Col-62	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Aceituna	Iznajar, Córdoba
Col-63	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Aceituna	Cabra, Córdoba
Col-64	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Aceituna	Montilla, Córdoba
Col-65	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Aceituna	Montilla, Córdoba
Col-66	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Aceituna	Hornachuelos, Córdoba
Col-67	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Tallo	Córdoba
Col-68	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Aceituna	Córdoba
Col-69	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Naranja	Hoja	La Palomera, Córdoba
Col-70	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Aceituna	Montilla, Córdoba
Col-71	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Aceituna	Montilla, Córdoba
Col-72	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Aceituna	Montilla, Córdoba
Col-79	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Naranja	Tallo	Huelva
Col-88	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Olivo	Aceituna	Cabra, Córdoba
Col-93	<i>Colletotrichum</i> sp.	Olivo	Aceituna	Constantina, Sevilla

Los aislados que no tiene especie indicada muestran características morfológicas intermedias a ambas especies.

¹ Aislados de características morfológicas intermedias pero identificados molecularmente como *C. acutatum*.

² Aislados de referencia.

tido (400x). Se registraron las conidias no germinadas y las germinadas, diferenciando entre estas últimas si formaron o no apresorio. Posteriormente, se calculó el porcentaje de conidias germinadas (**G**) respecto al total de conidias evaluadas y el porcentaje de conidias germinadas con apresorios (**AP**) respecto al total de conidias germinadas.

5. Efecto de la temperatura y del tiempo de incubación en la germinación de las conidias

Para la realización de este ensayo se utilizaron los aislados Col-9 y Col-30. Se realizaron cámaras húmedas que consistían en placas de Petri con una capa de Agar-Agua (2%) en la base y otra en la tapa. En el interior de la cámara húmeda se situaron 3 cubreobjetos de vidrio, en el centro de los cuales se depositó una gota de 5 µl de la suspensión conidial. Las cámaras húmedas se incubaron a 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35°C. Como tiempos de incubación se utilizaron: 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36 y 48 h para cada tem-

peratura. Para cada par temperatura-tiempo y para cada aislado se preparó una cámara húmeda con tres repeticiones (gotas).

Transcurrido el tiempo de incubación, los cubreobjetos de vidrio se situaron sobre portaobjetos con una gota de fucsina ácida en lactofenol. Se contabilizaron 100 conidias al azar, procedentes de los tres cubreobjetos de vidrio, para cada combinación de temperatura-tiempo de incubación-aislado. Al igual que en el ensayo anterior se calcularon los parámetros **G** y **AP**.

Un parámetro adicional considerado fue el tiempo medio de germinación (TMG) durante las primeras 24 h que se calculó como:

$$TMG = \frac{1}{2G_n} \sum_{i=0}^{i=n} [(t_i + t_{i-1})(G_i - G_{i-1})]$$

t_i= Tiempo de evaluación de la germinación de las conidias

G= Germinación (%) a tiempo i

G_n= Germinación a las 24h

Se determinó la curva de germinación a las distintas temperaturas y tiempos para los aislados Col-9 y Col-30. Posteriormente, los datos se ajustaron matemáticamente a una curva de regresión, eligiendo el modelo común que mejor se ajustaba para ambos aislados. La elección de la ecuación se realizó basándose en los criterios descritos en el apartado 3. Utilizando las ecuaciones resultantes se calculó la temperatura óptima de germinación para cada aislado.

6. Análisis estadísticos

Los datos se analizaron utilizando el programa Statistix® 7 (ANALYTICAL SOFTWARE, 2000). Se aplicó el análisis de la varianza y las comparaciones de medias se realizaron según el test LSD (Mínimas Diferencias Significativas) protegido de Fisher, al nivel de significación de 5 % (STEEL y TORRIE, 1985).

RESULTADOS

1. Caracterización morfológica

Las colonias de los diferentes aislados de olivo presentaron una morfología similar, con formación de abundante micelio aéreo. Las hifas presentaban coloración marrón y clamidosporas irregulares en tamaño y forma (Figura 2A). Los aislados Col-10, Col-45 y Col-79 mostraron setas de tamaño reducido en los acérvulos, aunque su producción no fue constante y no se formaron en otros cultivos de los mismos aislados (Figura 2B). Una característica que sí resultó estable y específica para el aislado Col-69 fue la falta de zonación y la gran uniformidad de la colonia. Otro aislado con una colonia distintiva fue el Col-44 ya que mostró una coloración verde-grisácea.

La mayoría de los aislados presentaron principalmente conidias mixtas, si bien, los aislados Col-30, Col-45, Col-69, Col-79 y Col-88 mostraron más del 80% de conidias con ambos extremos redondeados (Cuadro 2, Figura 2C) que se corresponden con el tipo morfológico de *C. gloeosporioides*. En cambio, el aislado Col-42 presentó un 94% de conidias del tipo *C. acutatum*, con ambos

extremos agudos (Figura 2D). El aislado Col-93, de conidias mixtas, se diferenció del resto al presentar el 10 % de éstas con una ligera curvatura (Figura 2F).

La longitud de las conidias varió entre $15,7\pm 1,80$ y $12,5\pm 1,75$ μm de los aislados Col-5 y Col-79 respectivamente y la anchura entre $5,6\pm 0,62$ y $3,5\pm 0,54$ μm de los aislados Col-45 y Col-42 (Cuadro 2). Los aislados de olivo de Andalucía estudiados poseen unas dimensiones medias de $14,4\pm 1,68 \times 4,85\pm 0,52$ μm . El análisis de la varianza mostró diferencias significativas respecto a las dimensiones estudiadas. Si bien, la comparación de medias no permitió separar con claridad grupos homogéneos.

El aislado Col-79 (*C. gloeosporioides*) procedente de naranjo formó peritecas en PDA a los 14 días de incubación a 22°C. Las ascas y ascosporas correspondieron con el teleomorfo *Glomerella cingulata* (MORDUE, 1971). Las dimensiones de 25 ascas fueron muy variables, siendo su longitud y anchura media: $49,3\pm 10,39 \times 8,2\pm 0,99$ μm .

2. Efecto de la temperatura en el crecimiento micelial

Los 31 aislados de *Colletotrichum* spp. ensayados se desarrollaron en el intervalo de temperatura 10-30°C. Los 4 aislados de referencia (Col-41, Col-42, Col-44 y Col-45) tuvieron un crecimiento significativamente mayor que los demás aislados ensayados, efecto que fue más acusado a 30°C (Figura 5). Sólo los aislados Col-41 y Col-44 crecieron a 35°C, temperatura que resultó letal para los demás aislados, que no se desarrollaron con posterioridad cuando se incubaron a 25°C (Figura 3).

El análisis de la varianza demostró que existían diferencias significativas entre aislados, temperaturas y para la interacción aislado por temperatura.

La curva de regresión que mejor se ajustó para todos los aislados fue un polinomio de tercer grado (Figura 5). La ecuación general del ajuste realizado para todos los aislados ensayados, menos para los cuatro que mostraron un crecimiento mayor, quedó expresada por:

$$Y = 0.012T^3 + 0.393T^2 - 19.365$$

Y= diámetro de la colonia (mm)

T= temperatura en °C

La ecuación anterior permitió calcular la temperatura óptima de crecimiento que resultó 21.8°C.

Las observaciones realizadas sobre el color del anverso y reverso de las colonias de los aislados mostraron que, en general, las colonias de *Colletotrichum* spp. se oscurecen al aumentar la temperatura. Así, el color del anverso de la colonia de la mayoría de los aislados viró de

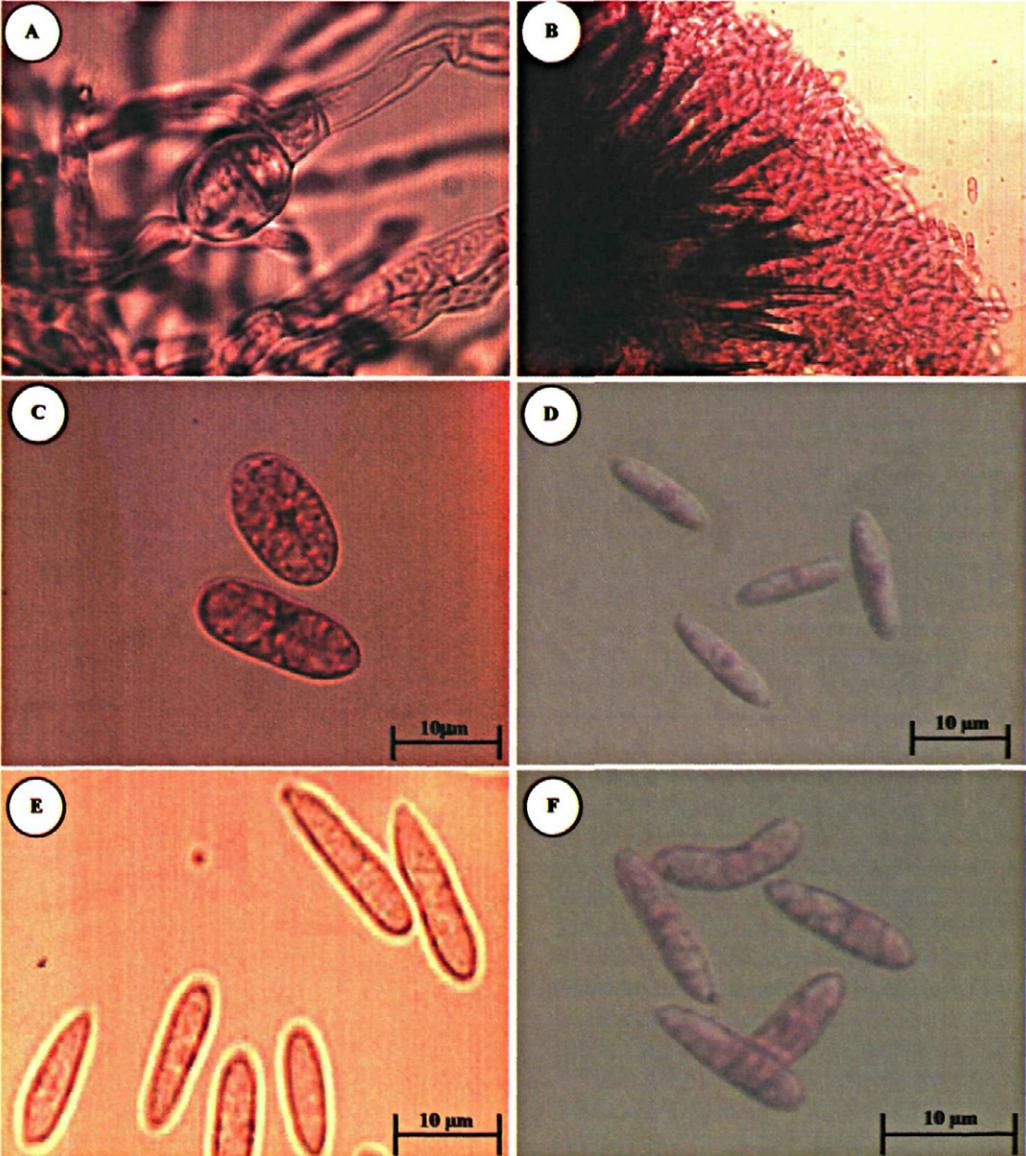


Figura 2. Estructuras de *Colletotrichum* spp. A) Clamidospora, B) Acérvulo con abundante formación de setas cortas, C) Conidias de *C. gloesporioides*, D) Conidias de *C. acutatum*, E) Conidias de *Colletotrichum* sp. de olivo, F) Conidia curvada del aislado Col-93 de *Colletotrichum* sp.

Cuadro2. Dimensiones y frecuencia de extremos agudos de las conidias de los aislados de *Colletotrichum* spp. estudiados¹

Aislados	Dimensiones (μm) ²			Extremos agudos (%) ³		
	Longitud	Anchura	Long/Anch	0	1	2
Col-1	14.8 ± 0.85	5.0 ± 0.00	3.0 ± 0.17	36	64	0
Col-3	14.9 ± 1.51	5.1 ± 0.71	3.0 ± 0.42	14	86	0
Col-5	15.7 ± 1.80	5.0 ± 0.00	3.1 ± 0.36	24	76	0
Col-7	15.5 ± 1.60	4.8 ± 0.53	3.3 ± 0.71	30	70	0
Col-8	15.1 ± 1.92	5.0 ± 0.00	3.0 ± 0.38	24	76	0
Col-9	14.8 ± 1.45	4.9 ± 0.18	3.0 ± 0.33	34	66	0
Col-10	15.3 ± 0.96	5.0 ± 0.00	3.1 ± 0.19	34	66	0
Col-12	14.0 ± 1.11	4.0 ± 0.52	3.5 ± 0.49	30	70	0
Col-14	15.2 ± 0.78	5.0 ± 0.00	3.0 ± 0.16	16	80	4
Col-23	14.9 ± 1.23	5.0 ± 0.00	3.0 ± 0.25	36	64	0
Col-24	15.1 ± 1.33	5.0 ± 0.00	3.0 ± 0.27	34	64	2
Col-25	15.1 ± 1.95	5.5 ± 0.09	2.9 ± 0.56	32	62	0
Col-26	15.6 ± 1.64	5.0 ± 0.00	3.1 ± 0.33	26	74	0
Col-27	15.6 ± 1.36	5.1 ± 0.49	3.1 ± 0.38	12	70	18
Col-28	15.1 ± 1.33	5.0 ± 0.00	3.0 ± 0.27	18	80	2
Col-29	15.0 ± 1.33	5.0 ± 0.00	3.0 ± 0.36	24	70	6
Col-30	12.5 ± 1.75	5.1 ± 0.38	2.4 ± 0.38	80	20	0
Col-31	14.0 ± 1.60	4.8 ± 0.69	3.0 ± 0.77	14	82	4
Col-32	15.4 ± 2.53	5.0 ± 0.00	3.1 ± 0.51	14	82	4
Col-33	15.3 ± 2.35	5.0 ± 0.00	3.1 ± 0.47	28	70	2
Col-34	14.4 ± 1.66	5.0 ± 0.00	2.9 ± 0.33	16	84	0
Col-35	14.8 ± 1.69	5.0 ± 0.00	3.0 ± 0.34	12	88	0
Col-36	14.5 ± 1.66	5.0 ± 0.00	2.9 ± 0.35	8	90	2
Col-37	14.5 ± 1.45	5.1 ± 0.49	2.9 ± 0.36	20	78	2
Col-38	14.7 ± 1.65	5.0 ± 0.00	2.9 ± 0.33	10	88	2
Col-39	14.9 ± 1.71	5.0 ± 0.00	3.0 ± 0.34	16	82	2
Col-40	14.3 ± 1.45	4.9 ± 0.39	2.9 ± 0.39	8	82	10
Col-41	14.8 ± 1.45	4.4 ± 0.72	3.5 ± 0.80	42	52	6
Col-42	13.9 ± 1.56	3.5 ± 0.54	4.2 ± 1.06	0	6	94
Col-44	13.9 ± 1.41	4.6 ± 0.70	3.1 ± 0.66	40	60	0
Col-45	14.0 ± 1.19	5.6 ± 0.62	2.6 ± 0.36	90	10	0
Col-46	13.9 ± 1.09	4.7 ± 0.49	3.0 ± 0.49	12	88	0
Col-47	13.6 ± 1.12	4.7 ± 0.55	3.0 ± 0.49	18	74	8
Col-48	14.0 ± 1.11	4.0 ± 0.52	3.5 ± 0.49	18	80	2
Col-49	14.4 ± 1.23	4.6 ± 0.59	3.2 ± 0.45	12	84	4
Col-50	13.9 ± 1.23	5.0 ± 0.12	2.8 ± 0.25	24	76	0
Col-51	13.5 ± 1.40	5.0 ± 0.18	2.7 ± 0.30	7	93	0
Col-52	13.1 ± 1.38	3.8 ± 0.19	3.5 ± 0.35	14	86	0
Col-53	13.3 ± 1.58	5.0 ± 0.04	2.7 ± 0.32	8	92	0
Col-54	13.1 ± 1.29	5.0 ± 0.25	2.7 ± 0.31	16	84	8
Col-55	14.3 ± 1.92	5.0 ± 0.18	2.9 ± 0.43	4	96	0

Cuadro2. Dimensiones y frecuencia de extremos agudos de las conidias de los aislados de *Colletotrichum* spp. estudiados¹

Aislados	Dimensiones (μm) ²			Extremos agudos (%) ³		
	Longitud	Anchura	Long/Anch	0	1	2
Col-56	14.4 ± 1.57	5.0 ± 0.25	2.9 ± 0.36	6	94	0
Col-57	13.5 ± 1.43	5.0 ± 0.18	2.7 ± 0.31	0	92	8
Col-58	13.7 ± 1.48	4.9 ± 0.41	2.8 ± 0.46	8	86	6
Col-59	13.8 ± 1.51	5.0 ± 0.18	2.8 ± 0.37	10	90	0
Col-60	14.0 ± 1.72	4.9 ± 0.38	2.9 ± 0.42	2	96	2
Col-61	13.5 ± 1.53	3.9 ± 0.41	3.5 ± 0.47	6	92	2
Col-62	14.0 ± 1.25	4.9 ± 0.38	2.9 ± 0.36	4	96	0
Col-63	13.6 ± 1.51	4.9 ± 0.34	2.8 ± 0.50	10	88	2
Col-64	15.4 ± 1.16	4.9 ± 0.30	3.1 ± 0.35	2	94	4
Col-65	14.9 ± 1.35	4.9 ± 0.41	3.1 ± 0.45	6	94	0
Col-66	14.8 ± 1.17	4.9 ± 0.34	3.0 ± 0.37	10	86	4
Col-67	12.8 ± 1.41	4.3 ± 0.62	3.0 ± 0.53	14	54	32
Col-68	13.6 ± 2.39	4.7 ± 0.52	2.9 ± 0.67	6	92	2
Col-69	13.2 ± 1.05	5.1 ± 0.23	2.6 ± 0.24	98	2	0
Col-70	15.3 ± 0.75	4.6 ± 0.58	3.4 ± 0.51	8	78	14
Col-71	13.9 ± 1.27	4.9 ± 0.58	2.8 ± 0.45	6	80	14
Col-72	15.2 ± 0.83	5.0 ± 0.18	3.1 ± 0.21	8	84	8
Col-79	12.6 ± 1.31	5.0 ± 0.02	2.6 ± 0.26	93	7	0
Col-88	12.9 ± 1.19	5.0 ± 0.04	2.6 ± 0.28	80	20	0
Col-93	14.2 ± 1.38	5.0 ± 0.10	3.0 ± 0.50	33	60	7
Media ⁴	14.4± 1.57	4.9±0.45	3.0 ± 0.47			
LSD ⁴ _{0,05}	0.58	0.16	0.16			
Media ⁵	14.4± 1.68	4.85±0.52	3.0 ± 0.51			
LSD ⁵ _{0,05}	0.59	0.16	0.17			

¹ Conidias obtenidas de cultivos en PDA a 25°C. ² Para cada dimensión se indica el valor medio y la desviación estándar correspondiente a 50 conidias. ³ Cada valor representa el porcentaje de conidias con 0, 1 y 2 extremos agudos. ⁴ Media y Diferencias mínimas significativas (LSD; P=0.05) de los 61 aislados estudiados. ⁵ Media y Diferencias mínimas significativas (LSD; P=0.05) del los 55 aislados causantes de la Antracnosis del olivo en Andalucía estudiados.

blanco mezclado con tonalidades naranja, rosa y marrón a gris con tonalidades similares conforme aumentó la temperatura.

3. Germinación de las conidias

Las conidias de *Colletotrichum* spp. presentaban tubos germinativos hialinos que se distinguían con facilidad por el colorante. En general, las conidias germinadas emitieron un único tubo germinativo con uno o dos apresorios. Los apresorios eran irregulares, ovoides y oscuros. En ocasiones, aparecieron conidias secundarias asociadas a la conidia madre (Figura 4).

El análisis de la varianza de la germinación de las conidias de *Colletotrichum* spp. reveló diferencias significativas entre los aislados, aunque en la comparación de medias no se distinguieron grupos homogéneos claros.

El porcentaje de conidias con apresorio respecto al total de las germinadas fue muy variable (6.3-100%). Destacaron los aislados Col-41, Col-42 y Col-45 con más del 80% de sus conidias germinadas formando apresorios. En cambio, menos del 30% de las conidias germinadas de los aislados Col-9, Col-

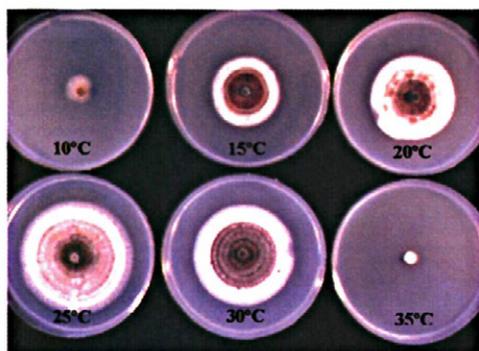


Figura 3. Colonias del aislado Col-41 en PDA a distintas temperaturas.

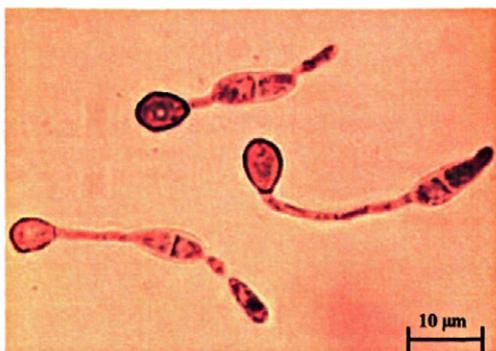


Figura 4. Germinación de conidias de *Colletotrichum* spp., nótese las conidias secundarias y los apresorios.

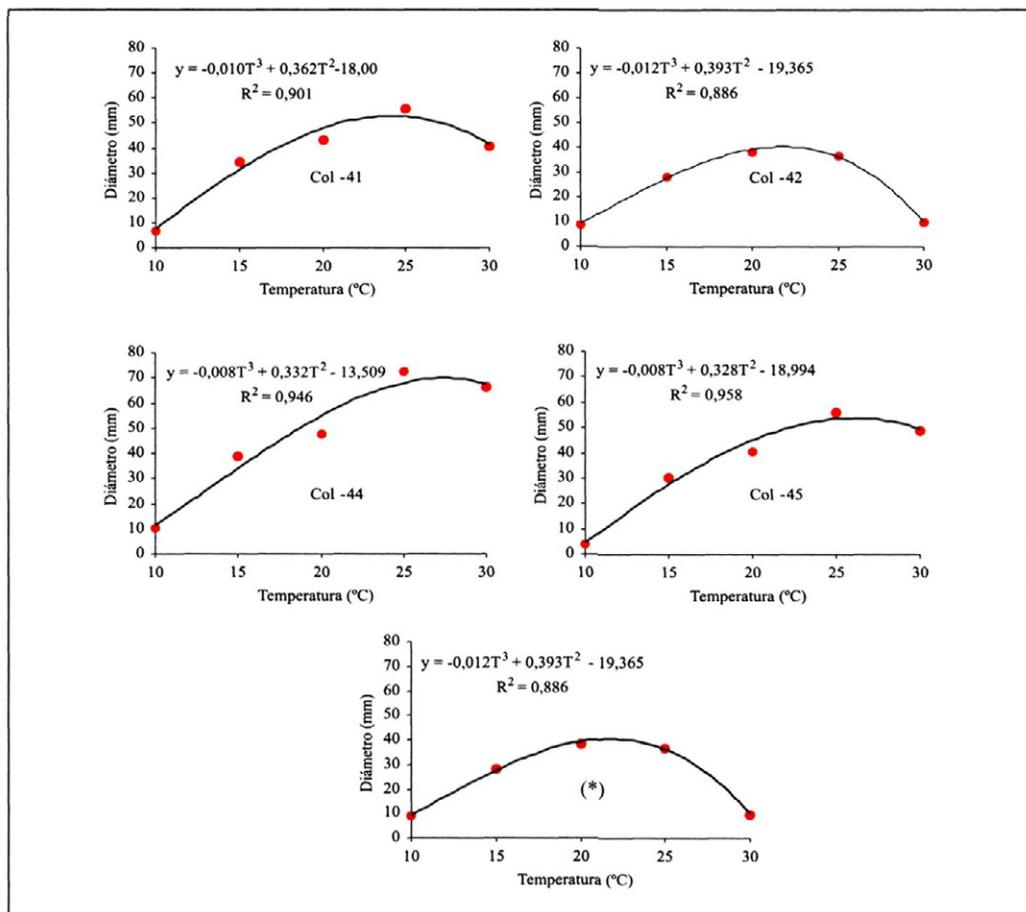


Figura 5. Curva de crecimiento de aislados de *Colletotrichum* spp. durante 7 días de incubación en medio PDA a distintas temperaturas. * Curva ajustada al conjunto de los 27 aislados de olivo ensayados, expeptuando los cuatro de referencia.

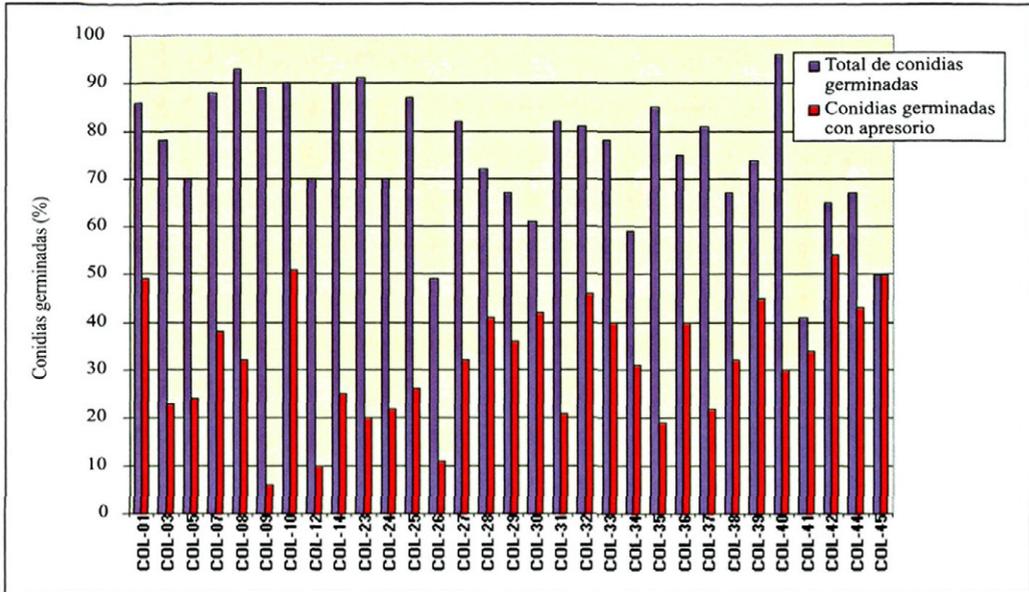


Figura 6. Porcentaje de conidias germinadas de distintos aislados de *Colletotrichum* spp. y conidias que han formado apresorio.

12, Col-23 y Col-26 formaron apresorios (Figura 6).

4. Efecto de la temperatura y del tiempo de incubación en la germinación de las conidias

Los resultados han demostrado que las conidias de los dos aislados de *Colletotrichum* spp. ensayados germinaron en el intervalo 5-30°C y no lo hicieron a 35°C. El análisis global de la varianza mostró que la germinación de las conidias estuvo influida significativamente por el aislado, la temperatura y el tiempo de incubación. Además existió interacción entre aislado y tiempo de incubación y entre temperatura y tiempo de incubación.

La proporción de conidias germinadas aumentó gradualmente con el tiempo de incubación pero varió con el aislado y la temperatura. En general, las conidias del aislado Col-30 germinaron más rápido que las del Col-9, siendo este efecto más marcado para los tiempos de incubación inferiores a 12 h. Estas diferencias fueron patentes en el

cálculo del tiempo medio de germinación (TMG) que fue de 4.9 h para el aislado Col-30 y de 6.1 h para el Col-9. En este análisis, la interacción aislado por temperatura no fue significativa, por lo que las diferencias entre aislados son válidas para todas las temperaturas ensayadas. El modelo que mejor se ajustó a la curva expresada por el TMG para cada temperatura fue un polinomio de segundo grado (Figura 7). Las ecuaciones ajustadas permitieron estimar las temperaturas óptimas de germinación que fueron de 20.9°C para el aislado Col-9 y 20.8°C para el Col-30 (Figura 7).

La formación de los apresorios en las conidias germinadas (Figuras 8A y B) también varió significativamente en función del aislado, de la temperatura y del tiempo de incubación, así como con la interacción entre aislado y temperatura y entre temperatura y tiempo de incubación. Los resultados obtenidos han demostrado diferencias significativas en la velocidad de formación de los apresorios entre los aislados, siendo más rápido

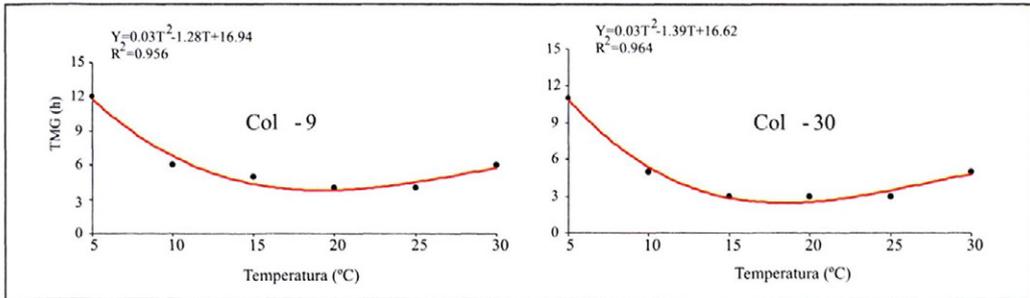


Figura 7. Efecto de la temperatura y del tiempo de incubación en la germinación de conidias de dos aislados (COL-9 y COL-30) de *Colletotrichum* spp.

el aislado Col-30 que el Col-9. Este efecto se mantuvo para todas las temperaturas del intervalo 5-30°C, y fue particularmente acusado y significativo para tiempos de incubación iguales o inferiores a 12 h. Las mayores diferencias entre los aislados se observaron a temperaturas altas. Así, a 25 y 30°C casi el 100% de las conidias del aislado Col-30 formaron apresorios a las 6 h de incubación, mientras que las conidias del aislado Col-9 alcanzaron valores similares después de 36 h (Figura 8).

Los dos aislados formaron conidias secundarias durante la germinación (Figura 5), siendo más frecuentes en el aislado Col-30.

DISCUSIÓN

Las investigaciones sobre la Antracnosis del olivo son escasas y esporádicas, como corresponde a un cultivo típicamente mediterráneo y a una enfermedad cuyas epidemias son importantes algunos años y en zonas puntuales (GRANITI *et al.*, 1993). Esta situación es particularmente llamativa en España (MATEO-SAGASTA, 1968; GARCÍA-FIGUERES, 1995; BOUHMIDI, 1999).

Uno de los aspectos de esta enfermedad que ha suscitado más interés entre los investigadores en los últimos años ha sido la correcta identificación del patógeno. Tradicionalmente el hongo responsable de esta enfermedad se ha identificado como *C. gloeosporioides* (sinónimo: *Gloeosporium oli-*

varum). Sin embargo, recientemente, se ha demostrado la implicación de dos especies: *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, desconociéndose la importancia relativa de cada una de ellas en el desarrollo de la enfermedad, lo que podría condicionar incluso las medidas de control.

Con este trabajo se da un primer paso para responder a esa cuestión, mediante la caracterización morfológica y cultural de los aislados de *Colletotrichum* spp. obtenidos de olivos afectados por Antracnosis. Dicha caracterización se ha llevado a cabo utilizando 55 aislados de olivo de Andalucía, dos de naranjo y cuatro aislados de referencia. Para ello, se han considerado las características morfológicas y culturales más utilizadas en la identificación de especies de *Colletotrichum*: conidias (forma y tamaño), acérvulos (presencia de estroma, setas, coloración de las masas de conidias), colonias en PDA (coloración, aspecto, micelio), presencia de clamidosporas y esclerocios, forma de los apresorios y crecimiento a diferentes temperaturas (AA *et al.*, 1990; FREEMAN *et al.*, 1998; SUTTON, 1980; 1992).

De todos los caracteres morfológicos estudiados ninguno permitió una separación clara de los aislados en grupos o especies morfológicas diferentes. No obstante, la curvatura de los extremos de las conidias, que es uno de los caracteres morfológicos más importantes en la taxonomía de especies de *Colletotrichum* (SUTTON, 1980; 1992), resul-

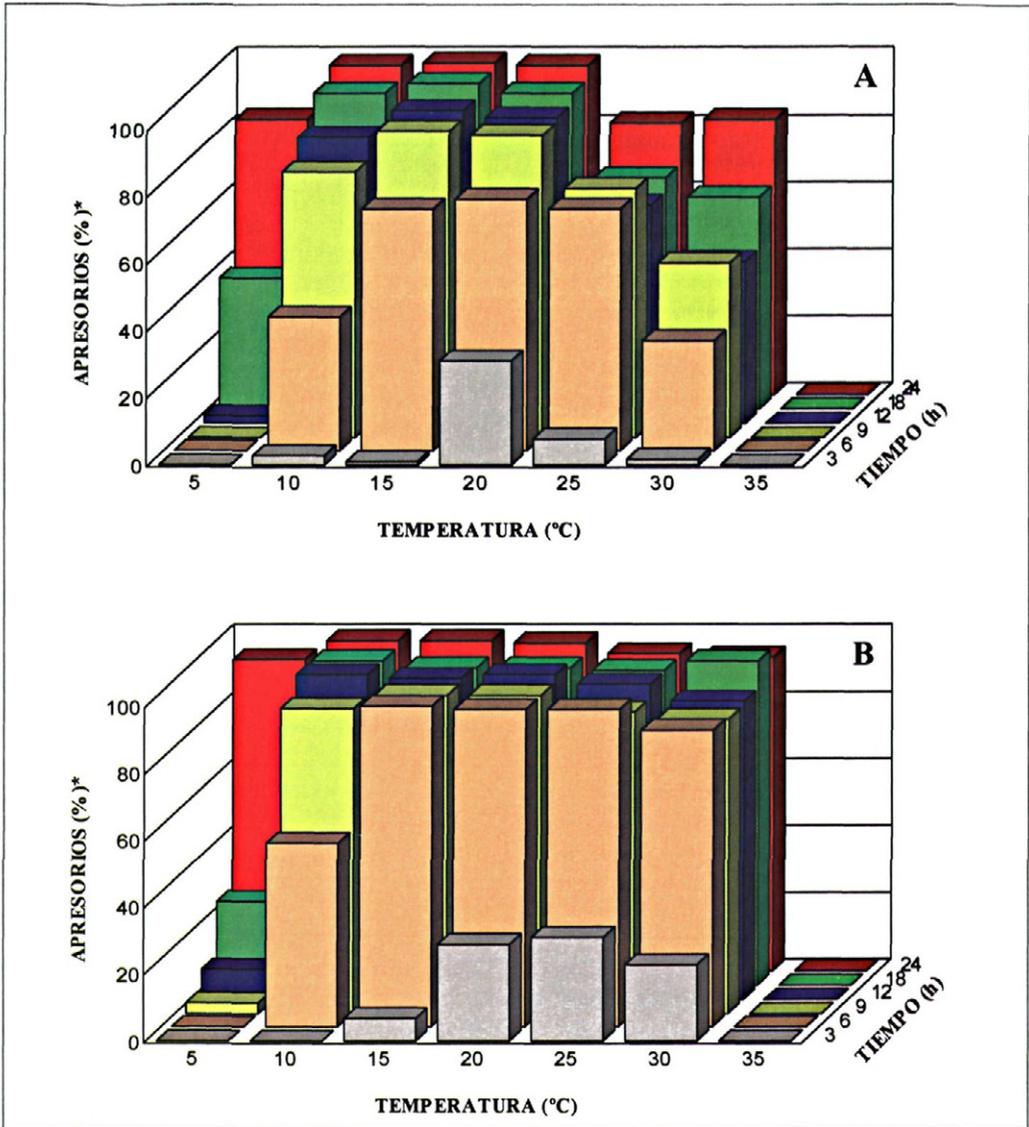


Figura 8. Efecto de la temperatura y del tiempo de incubación en la formación de apresorios en las conidias germinadas en *Colletotrichum* spp. A) aislado COL-9, B) aislado COL-30.

tó también el diferenciador más importante en nuestro estudio. De los 55 aislados de olivo estudiados, 53 aislados presentaron la mayoría de las conidias (>60 %) con al menos un extremo agudo, aunque la proporción de conidias con los dos extremos agudos fue muy baja. Los dos aislados restantes

(Col-30 y Col-88) mostraron el 80 % de las conidias con los dos extremos redondeados. En los 4 aislados de referencia, los extremos de las conidias se correspondieron con la identificación original, excepto para el aislado Col-41 (*C. gloeosporioides*), que presentó 58% de conidias con al menos un extremo

agudo. Por último, los dos aislados de naranjo (Col-69 y Col-79) presentaron más del 90% de las conidias con los dos extremos redondeados. Además cabe destacar que el aislado Col-93 mostró un 10% de conidias ligeramente curvadas, característica que se puede apreciar en algunas conidias del dibujo original realizado por ALMEIDA (1899).

El tamaño de las conidias, otro carácter morfológico de importancia taxonómica, no resultó diferencial en nuestro estudio, ya que se obtuvo una gradación continua en el tamaño de éstas; si bien, resultaron más anchas que las descritas por SUTTON (1980, 1992) para *C. acutatum*. En el análisis de la varianza correspondiente, aunque hubo diferencias significativas, se obtuvo un marcado solape entre la mayoría de los aislados. Los aislados Col-30, Col-69, Col-79 y Col-88 (tipo morfológico *C. gloeosporioides*) se distinguieron con claridad del resto por poseer conidias más cortas y con menor relación longitud/anchura; y el aislado Col-42 (tipo morfológico *C. acutatum*) por mostrar conidias más estrechas y mayor relación longitud/anchura.

Los restantes caracteres morfológicos estudiados no resultaron consistentes para establecer diferencias entre los aislados. Así, la presencia de setas en los acérvulos sólo se apreció en algunos aislados, pero no se mantuvieron en subcultivos de estos mismos aislados. Las clamidosporas se observaron en cultivos de todos los aislados, pero no se observaron diferencias en la forma, coloración o tamaño, al igual que para el micelio y los acérvulos. El color de la colonia mostró una ligera variación entre aislados, pero también varió con el cultivo y la temperatura para un mismo aislado y no permitió establecer grupos diferentes. Este carácter resultó diferencial para el aislado Col-44 (*C. fragariae*) que presentó una colonia de color verde-grisáceo y para el aislado Col-79 (*C. gloeosporioides*) que mostró una colonia rosa-salmón con abundante micelio aéreo rosado. Este último aislado formó estructuras sexuales correspondientes al teleomorfo *Glomerella cingulata*.

La germinación de las conidias y la formación de apresorios presentaron una eleva-

da variabilidad entre aislados, pero también en este caso hubo un marcado solapamiento entre ellos que no permitió establecer grupos diferentes. El aislado Col-45 (*C. gloeosporioides*) destacó por presentar un 100% de conidias germinadas con apresorios.

De acuerdo con las características morfológicas observadas, nuestros aislados de *Colletotrichum* se clasificarían dentro del complejo de especies *C. acutatum* / *C. gloeosporioides*. La diferencia morfológica fundamental entre ambas especies es que *C. acutatum* presenta las conidias fusiformes, mientras que las de *C. gloeosporioides* son cilíndricas (AA *et al.*, 1990; SUTTON, 1980; 1992). Sin embargo, en la práctica se observan numerosos aislados, con conidias de ambos tipos, o con conidias mixtas. Este es el caso de los aislados de olivo de Andalucía, por lo que la adscripción de éstos a una u otra especie resulta algo artificiosa o arbitraria. No obstante, si se considera como distintivo el que la mayoría de las conidias presenten al menos un extremo agudo frente a los dos extremos redondeados, de los 55 aislados de olivo estudiados, 53 se podrían clasificar como *C. acutatum* y tan sólo dos de ellos (Col-30 y Col-88) se identificarían como *C. gloeosporioides*. Atendiendo a esta característica los aislados de naranjo (Col-69 y Col-79) también se identificarían como *C. gloeosporioides*. De los aislados de referencia, tres de ellos presentaron sus características específicas propias y pudieron identificarse como *C. acutatum* (Col-42), *C. fragariae* (Col-44) y *C. gloeosporioides* (Col-45). Sin embargo el aislado Col-41 de *C. gloeosporioides*, como ya ha sido comentado, podría haber sido clasificado como *C. acutatum* atendiendo a la forma de las conidias.

Una vez más estos resultados ponen de manifiesto la imposibilidad de identificar todos los aislados de *Colletotrichum* basándose exclusivamente en características morfológicas o culturales. Esta dificultad ha llevado a numerosos autores a utilizar otras técnicas, como caracteres biológicos (sensibilidad a fungicidas, hidrólisis de la caseína, etc.), análisis de isoenzimas o técnicas moleculares (BONDE *et al.*, 1991; LIYANAGE *et al.*,

1992; MILLS *et al.*, 1992; BAILEY *et al.*, 1996; SHERRIFF *et al.*, 1996; MARTÍN *et al.*, 2002). Con frecuencia, estos análisis han servido para confirmar las pequeñas diferencias morfológicas o fisiológicas entre especies o grupos intraespecíficos y en otros casos están sirviendo para clarificar la confusión derivada de la existencia de numerosos aislados con caracteres intermedios (AA *et al.*, 1990). Las técnicas moleculares aplicadas a la taxonomía de *Colletotrichum* han experimentado un avance espectacular en los últimos años y en la actualidad constituyen una herramienta imprescindible para la caracterización de especies y aislados de este género (BROWN *et al.*, 1996; JOHNSTON y JONES, 1997; FREEMAN *et al.*, 1998; 2001; CANNON *et al.*, 2000; TAHLINHAS *et al.*, 2004).

Recientemente, estas técnicas han comenzado a utilizarse para la caracterización de los aislados de *Colletotrichum* causantes de la Antracnosis del Olivo en Cataluña (MARTÍN y GARCÍA-FIGUERES, 1998; MARTÍN *et al.*, 2002). Estos trabajos han permitido identificar a la mayoría de los aislados como *C. acutatum*, en lugar de *C. gloeosporioides*. Aunque nuestro trabajo de caracterización ha sido exclusivamente morfológico, debido a las dificultades indicadas, se enviaron 12 aislados (Col-1, 3, 5, 7, 8, 9, 12, 14, 23, 24, 25 y 26) al laboratorio de Sanidad Vegetal de Barcelona para su caracterización molecular. Los doce aislados se identificaron como *C. acutatum* (García-Figueres, *comunicación personal*). Aunque, habría que destacar que la región ITS y la subunidad 5.8s del ADNr utilizadas en estos análisis son muy conservadas intraespecíficamente por lo que nos son las más adecuadas para estudiar grupos subspecíficos o poblaciones particulares.

En las poblaciones del patógeno que afectan al olivo en Andalucía estudiadas, el 96% de los aislados presentan características morfológicas y moleculares próximas a la especie *C. acutatum*. Estos resultados se corresponden con los obtenidos en Italia y Portugal utilizando marcadores moleculares RAPD y ISSR (AGOSTEO *et al.*, 2000; CACCIOLA *et al.*, 2001; TAHLINHAS *et al.*, 2004).

La mayor proporción de aislados de *C. acutatum* respecto a *C. gloeosporioides* asociados con la Antracnosis del olivo en España y, posiblemente en otros países, podría sugerir una mejor adaptación de *C. acutatum* a las condiciones climáticas y agronómicas de estas comarcas olivareras. No obstante, no se conoce si *C. acutatum* es una especie de reciente introducción en el olivar o si estaba presente desde antaño, como parece que también podría deducirse de la descripción original de *Gloeosporium olivarum* realizada por ALMEIDA (1899) en Portugal.

El crecimiento a diferentes temperaturas, sobre todo a temperaturas altas (27-32°C), también ha sido un criterio utilizado para separar *C. gloeosporioides* de *C. acutatum*. Los aislados de la primera especie tienen una tasa de crecimiento sensiblemente mayor que los de la segunda (SMITH y BLACK, 1990; BERNSTEIN *et al.*, 1995; SHI *et al.*, 1996). Los 27 aislados de olivo de Andalucía ensayados presentaron un patrón de crecimiento similar, con un intervalo de 10-30°C, el óptimo de 21.8°C y una tasa de crecimiento para la temperatura óptima de 6.2 mm/día, con independencia de su morfología. Estos datos difirieron notablemente de los obtenidos con los 4 aislados de referencia que presentaron una mayor tasa de crecimiento, sobre todo a altas temperaturas. Dos de estos aislados, *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, tuvieron la misma tasa de crecimiento (7.5 mm/día) y otros dos, *C. fragariae* y *C. gloeosporioides*, crecieron también a 35°C. La inhibición del desarrollo de los aislados de olivo a 35°C ya ha sido descrito por otros autores (AGOSTEO y PENNISI, 1994). En cualquier caso, en diversos estudios se han observado desviaciones de la generalidad mencionada (BERNSTEIN *et al.*, 1995; FREEMAN *et al.*, 1998).

Para completar este aspecto, se estudió la influencia de la temperatura en la germinación de las conidias y en el crecimiento micelial utilizando un aislado de cada especie (Col-9 y Col-30). Ambos aislados tuvieron un patrón de crecimiento micelial similar para todo el intervalo de temperaturas, aunque existieron ligeras diferencias entre sus colo-

nias. En cambio, donde sí se obtuvieron diferencias notables y significativas fue para la germinación de las conidias. Para todo el intervalo de temperatura (10-30°C), las conidias del aislado Col-30 (tipo *C. gloeosporioides*) germinaron más rápido (TMG=4.9 h) que las del aislado Col-9 (tipo *C. acutatum*), con un TMG de 6.1 h. Un efecto similar se observó en la formación de apresorios, ya que fue un proceso paralelo a la germinación de conidias. Estos resultados, aparte de su interés epidemiológico, no son de gran utilidad con fines comparativos entre ambas especies de *Colletotrichum*. Para ello, sería necesario hacer un estudio más completo que incluyera un mayor número de aislados de cada especie. El limitado número de aislados del tipo *C. gloeosporioides* obtenido de olivo, junto con la tendencia a formar conidias secundarias durante el proceso de germinación, muy acusada en algunos aislados, han impedido la realización de este estudio comparativo.

Puede concluirse que la mayoría de los aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la Antracnosis del olivo en Andalucía presentan características morfológicas y cultu-

rales próximas a la especie *C. acutatum*; y que estudios posteriores de caracterización fisiológica y de especialización patogénica (GRANITI *et al.*, 1993; AGOSTEO y PENNISI, 1994; AGOSTEO *et al.*, 1997; MORAL y TRAPERO, 2004) junto con el diseño de nuevos cebadores para la caracterización molecular pueden terminar de esclarecer esta situación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren expresar su agradecimiento a todos los miembros del Grupo de Patología Agroforestal de la Universidad de Córdoba, así como a los Doctores Julio Cesar Tello Marquina de la Universidad Politécnica de Almería, y Francesc García Figueres, del Laboratorio de Sanitat Vegetal de Barcelona. El Doctor Rodríguez de Oliveira ha sido becario de la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI) y el Ingeniero Agrónomo Karim Bouhmidi ha sido becario del Consejo Oleícola Internacional (COI). Los trabajos realizados se han financiado con los proyectos AGR96-1082 y AGL2000-1725.

ABSTRACT

OLIVEIRA R., J. MORAL, K. BOUHMIDI, A. TRAPERO. 2005. Morphological and cultural characterization of isolates of *Colletotrichum* spp. causing olive anthracnose. *Bol. San. Veg. Plagas*, 31: 531-548.

Olive Anthracnose caused by fungal species of the genus *Colletotrichum* is a severe disease widely distributed in many olive growing regions in the world. Disease incidence greatly varies according to susceptibility of olive varieties, climatic conditions, and virulence of the pathogen population. Pathogen identification is one of the less known aspects of the disease. Recently it has been published that two *Colletotrichum* species (*C. acutatum* and *C. gloeosporioides*) are causal agents of olive Anthracnose, instead of a single species (*C. gloeosporioides* = *Gloeosporium olivarum*) traditionally accepted. In this research work we present results on morphological and cultural characterization of *Colletotrichum* isolates obtained from olive trees affected by anthracnose disease in several olive growing regions in southern Spain.

Although many morphological and cultural characteristics have been studied, no one of them allowed a clear separation amongst groups of isolates or species. However the shape of two ends of conidia was the most important character for differentiation. Almost all *Colletotrichum* isolates from olive (96%) had most of conidia with one rounded end, like the conidia ends of *C. gloeosporioides*, and the other end acute, similar to conidia ends of *C. acutatum*. Other characteristic studied, such as color and grown of colonies, acervular setae, chlamydospores, length and width of conidia, or the formation of apresoria and secondary conidia, showed a wide variation amongst isolates. According to these results isolates of *Colletotrichum* causing olive anthracnose in southern Spain would be classified in the complex *C. acutatum* / *C. gloeosporioides*, although their morphological and cultural characteristic are closer to the species *C. acutatum*. Further stu-

dies on physiological, molecular and pathogenic characterization of *Colletotrichum* isolates from olive are necessary to elucidate their identification.

Key words: *Olea europaea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum*, *Gloeosporium olivarum*, taxonomy.

REFERENCIAS

- AA, H.A. VAN DER, NOORDELOOS, M.E., GRUYTER, J. 1990. Species concepts in some larger genera of the Coelomycetes. *Studies in Mycology*, **32**: 3-19.
- AGOSTEO, G.E., CACCIOLA, S.O., PANE, A., FRISULLO, S. 1997. Vegetative compatibility groups of *Colletotrichum gloeosporioides* from olive in Italy. Proceedings of the 10th Congress of Mediterranean Phytopathological Union. Società Francsaise de Phytopathologie, Montpellier, Francia. pp. 95-99.
- 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. 4th Internal. *Acta Horticulturae*, **586**: 713-716
- AGOSTEO, G. E., PENNINSI, A. M. 1994. Confronto tra isolati di *Colletotrichum gloeosporioides* ottenuti da olivo e da agrumi in Calabria. *Micologia Italiana*, **1994**-1: 76-80
- AINSWORTH, G.C. 1971. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. 6th ed. CMI, Kew, Surrey, England. 663 pp.
- ALMEIDA, M.J.V. 1899. La gaffa des olives en Portugal. *Bulletin de la Societ  Mycologique de France*, **15**: 90-94.
- ANALYTICAL SOFTWARE, 2000. Statistix 7 User's manual. Tallahassee, FL. 359 pp.
- ANDR S, F. DE 1991. Enfermedades y plagas del Olivo. 2^a Edici n. Riquelme y Vargas Ediciones, S.L., Ja n. 646 pp.
- ARX, J.A. VON. 1970. A revision of the fungi classified as *Gloeosporium*. J. Cramer, *Bibl. Mycol.* **24**: 203 pp.
- BAILEY, J.A., NASH, C., MORGAN, L.W., O'CONNELL, R.J., TEBEEST, D.O. 1996. Molecular taxonomy of *Colletotrichum* species causing anthracnose on the Malvaceae. *Phytopathology*, **86**: 1076-1083.
- 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.
- BONDE, M.R., PETERSON, G.L., MAAS, J.L. 1991. Isozyme comparisons for identification of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Phytopathology*, **81**: 1523-1528.
- BOUHMIDI, K. 1999. Caracterización morfológica y patogénica de aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la "Aceituna jabonosa" del olivo. Tesis de M ster 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.
- CACCIOLA, S.A., AGOSTEO, G.E., FRISULLO, S., FAEDDA, R., MAGNANO DI SAN LIO, G. 2001. Characterization of the causal agent of olive anthracnose using RAPD-PCR. Proceedings 11th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union,  vora, Portugal. pp. 190-192.
- CAMPBELL, S. O., MADDEN, L. V. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. John Wiley and Sons, New York. 532 pp.
- CANNON, P., BRIDGE, P.D., MONTE, E. 2000. Linking the past, present, and future of *Colletotrichum* systematics. In: *Colletotrichum*: Host specificity, pathology, and host-pathogen interaction. D. Prusky, S. Freeman, M.B. Dickman, eds. APS Press, St. Paul, MN, USA. pp. 1-20.
- 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.
- GARCÍA-FIGUERES, F. 1995. Micoflora asociada a la aceituna. Su repercusión en la calidad del aceite. *Agricultura*, **760**: 931-933.
- GARCÍA-FIGUERES, F. 1998. Micosis de las aceitunas y su incidencia en la calidad del aceite. *Phytoma España*, **102**: 171-175.
- GORTER, G.J.M.A. 1956. Anthracnose fungi of olives. *Nature*, **178**: 1129-1130.
- GRANITI, A., FRISULLO, S., PENISSI, A. MAGNANO, L. 1993. Infections of *Glomerella cingulata* on olive in Italy. *EPP0 Bulletin*, **23**: 457-465.
- GUERBER, J.C., CORRELL, J.C. 2001. Characterization of *Glomerella acutata*, the teleomorph of *Colletotrichum acutatum*. *Mycol. Res.*, **93**: 216-229.
- JOHNSTON, P.R., JONES, D. 1997. Relationships among *Colletotrichum* isolates from fruits rots assessed using rDNA sequences. *Mycologia*, **89**: 420-430.
- KIRK, P.M., CANNON, P. F., DAVIS, J. C., STALPERS, J. A. 2001. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi. 9th eds. CAB International, Wallingford, Oxon, UK. 656 pp.
- LIYANAGE, H.D., MCMILAN, R.T., KISTLER, H.C. 1992. Two genetically distinct populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. *Phytopathology*, **82**: 1371-1376.
- MARGARITA, L., PORTA-PUGLIA, A., QUACQUARELLI, A. 1986. *Colletotrichum acutatum*, nuovo patogeno dell'olivo in China e confronto con l'agente della «lebbra» dell'olivo. *Ann. Ist. Sper. Patol. Veg. Roma*, **11**: 125-133.

- 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.
- MATEO-SAGASTA, E. 1976. Daños y enfermedades del olivo. In: Olivicultura moderna. FAO-INA. Ed. Agrícola Española, Madrid. pp. 213-234.
- MILLS, P.R., HODSON, A., BROWN, A.E. 1992. Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting tropical fruits. In: *Colletotrichum: Biology, pathology and control*. J.A. Bailey y M.J. Jeger, eds. CAB International, Wallingford, Oxon, U.K. pp. 269-288.
- MORDUE, J. E. M. 1971. *Glomerella cingulata*. C.M.I. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. 315: 2 pp.
- 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., TRAPERO, A. 2004. Caracterización fisiológica y patogénica de aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la Antracnosis del Olivo. XII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Lloret del Mar, Gerona.
- MUGNAI, L., SURICO, G., ROGAZZI, A. 1993. *Glomerella cingulata* on olive in India: morphological and pathological notes. *EPPA Bull.*, **23**: 449-455.
- OLIVEIRA, R., TRAPERO, A. 2002. Patogenicidad de *Colletotrichum* spp. en plantones de olivo. XI Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Almería.
- OLIVEIRA, R. 2003. Etiología y control químico de la Aceituna Jabonosa causada por *Colletotrichum* spp. Tesis doctoral, ETSIAM, Universidad de Córdoba. 260 pp.
- SHERRIFF, C., WHELAN, M.J., ARNOLD, G.M., LAFAYA, J.F., BRYGOO, Y., BAILEY, J.A. 1996. Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. *Exp. Mycol.*, **18**: 121-138.
- SHI, Y., CORRELL, J.C., CUERBER, J.C. 1996. Frequency of *Colletotrichum* species causing bitter rot of apple in the southeastern United States. *Plant Dis.*, **80**: 692-696.
- SMITH, B.J., BLACK, L. L. 1990. Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. *Plant Dis.*, **74**: 69-76.
- STEEL, R.G.D., TORRIE, J. H. 1985. Bioestadística. 2ª Ed. McGraw-Hill, Bogotá. 622 pp.
- 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. 2004. Population diversity and pathogenicity mechanisms of *Colletotrichum* spp. causing olive anthracnose. 7th Conference of the European Foundation for Plant Pathology and British Society for Plant Pathology. University of Aberdeen, UK.
- TRAPERO, A., BLANCO, M.A. 2004. Enfermedades. In: El cultivo de olivo. D. Barranco, R. Fernández-Escobar, L. Rallo, eds. Coedición Junta de Andalucía/Mundi-Prensa, Madrid. pp. 557-614.
- YOHALEM, D.S., HARRIS, R.F., ANDREWS, J.H. 1994. Aqueous extracts of spent mushroom substrate for foliar disease control. *Compost Science and Utilization*, **2**: 67-74.

(Recepción: 16 junio 2005)

(Aceptación: 30 agosto 2005)