



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

**Aportes al conocimiento de la  
epidemiología de la antracnosis del  
olivo: determinación de sitios de  
sobrevivencia de *Colletotrichum* spp.**

Ing. Agr. Bárbara Ferronato

Maestría en Ciencias Agrarias

Julio 2023

**Aportes al conocimiento de la epidemiología de la antracnosis del olivo: determinación de sitios de sobrevivencia de *Colletotrichum* spp.**

Ing. Agr. Bárbara Ferronato

Maestría en Ciencias Agrarias

Julio 2023

Tesis aprobada por el tribunal integrado por: Dra. (Ing. Agr.) Mercedes Arias, MSc.  
(Ing. Agr.) Paula Conde y Dra. (Ing. Agr.) Ana Elisa Silvera el 21 de julio de 2023.  
Autora: Ing. Agr. Bárbara Ferronato. Director: Dr. (Ing. Agr.) Pedro Mondino,  
Codirectora: Dra. (Ing. Agr.) Sandra Alaníz.

## TABLA DE CONTENIDO

	página
PÁGINA DE APROBACIÓN .....	III
RESUMEN.....	VI
SUMMARY .....	VIII
<b>1. <u>INTRODUCCIÓN</u></b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. OLIVICULTURA NACIONAL Y CONTEXTO</b>	
INTERNACIONAL.....	1
<b>1.2. ANTRACNOSIS DEL OLIVO</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2.1. <u>Agente causal</u></b> .....	<b>7</b>
<b>1.2.2. <u>Ciclo de la enfermedad</u></b> .....	<b>9</b>
<b>1.3. ANTRACNOSIS DEL OLIVO EN URUGUAY</b> .....	<b>11</b>
<b>2. <u>DETECTION AND QUANTIFICATION OF COLLETOTRICHUM</u></b>	
<b><u>SURVIVAL ON OLIVE TREE (<i>Olea europaea L.</i>)</u></b> .....	<b>14</b>
<b>2.1. RESUMEN</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2. SUMMARY</b> .....	<b>16</b>
<b>2.3. INTRODUCTION</b> .....	<b>17</b>
<b>2.4. MATERIALS AND METHODS</b> .....	<b>19</b>
<b>2.4.1. <u>Olive organs sampled and environmental description</u></b> .....	<b>19</b>
<b>2.4.2. <u>Colletotrichum survival detection</u></b> .....	<b>21</b>
<b>2.4.3. <u>Colletotrichum survival quantification</u></b> .....	<b>21</b>
<b>2.4.4. <u>Statistical analysis</u></b> .....	<b>23</b>
<b>2.5. RESULTS</b> .....	<b>23</b>
<b>2.5.1. <u>Environmental description</u></b> .....	<b>23</b>
<b>2.5.2. <u>Colletotrichum survival detection</u></b> .....	<b>25</b>
<b>2.5.3. <u>Colletotrichum survival quantification</u></b> .....	<b>30</b>
<b>2.6. DISCUSSION</b> .....	<b>31</b>
<b>2.7. ACKNOWLEDGEMENT</b> .....	<b>34</b>
<b>2.8. DATA AVAILABILITY</b> .....	<b>34</b>

2.9. DECLARATIONS.....	34
2.10. REFERENCES.....	35
3. <u>DISCUSIÓN GENERAL</u> .....	40
4. <u>CONCLUSIONES GENERALES</u> .....	46
5. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	47

## RESUMEN

El cultivo del olivo en Uruguay ha experimentado un crecimiento significativo en las últimas dos décadas, y se ha convertido en el segundo más extendido dentro de la fruticultura. Sin embargo, debido a su condición emergente, la información sobre las enfermedades que lo afectan es escasa y no es posible extrapolarla directamente de las zonas de producción tradicionales debido a las diferencias climáticas. En Uruguay la antracnosis del olivo es causada principalmente por *Colletotrichum acutatum* s.s. Sus síntomas principales incluyen la necrosis de flores y la podredumbre de fruto, sobre la cual es posible observar masas de conidios de color salmón. Este estudio se centró en determinar los sitios de sobrevivencia de *Colletotrichum* a campo y su importancia como fuentes de inóculo. Para ello, muestras mensuales fueron tomadas durante dos años consecutivos en un olivar comercial del cultivar Arebquina en Rocha, con antecedentes de alta incidencia de antracnosis. Las muestras incluyeron frutos momificados, hojas y madera de diferentes categorías. Se utilizaron dos metodologías para detectar y cuantificar el inóculo presente en las muestras. Una de ellas implicó congelar las muestras a -18 °C durante dos horas y luego inducir el desarrollo del patógeno en condiciones de alta humedad en cámara húmeda durante 30 días. La segunda metodología utilizó la técnica de qPCR para detectar y cuantificar el ADN de *Colletotrichum acutatum*. Ambas metodologías confirmaron que *Colletotrichum* sobrevive en distintas partes de la planta a lo largo del año, siendo los frutos momificados el sitio principal, seguidos de las hojas y la madera de las ramas. Para la categoría hojas, las amarillas y las hojas de ramas defoliadas fueron los lugares donde se encontró el patógeno con más frecuencia. En cuanto a la madera, las ramitas terminales secas y los brotes nuevos sanos mostraron una mayor presencia del patógeno. Se concluye que la principal fuente de inóculo primario es el propio árbol de olivo, con los frutos momificados, las hojas y la madera como sitios clave de sobrevivencia de inóculo para las infecciones de flores y frutos que inician las epidemias en cada temporada.

**Palabras clave:** Aceituna jabonosa, *Colletotrichum acutatum* s.s., *Olea europaea* L., sobrevivencia, PCR en tiempo real

**Contributions to the knowledge of the epidemiology of olive anthracnose:  
determination of survival sites of *Colletotrichum* spp.**

**SUMMARY**

Olive crop in Uruguay has experienced a significant growth in the past two decades, becoming the second most widespread crop within the fruit crop. However, due to its emerging nature, there is limited information on the diseases affecting olive trees, and direct extrapolation from traditional production areas is not possible due to climatic differences. In Uruguay, olive anthracnose is primarily caused by *Colletotrichum acutatum* s.s., with main symptoms including flower blight and fruit rot, characterized by the presence of salmon-colored conidial masses. This study aimed to determine the field survival sites of *Colletotrichum* and their significance as inoculum sources. Monthly samples were collected over two consecutive years from a commercial olive orchard of Arbequina cultivar in Rocha, known for its high incidence of anthracnose. The samples comprised of mummified fruits, leaves, and wood from different categories. Two methodologies were employed to detect and quantify the inoculum in the samples. One involved freezing the samples at -18 °C for two hours and subsequently inducing pathogen development under high humidity conditions in a moist chamber for 30 days. The second methodology utilized qPCR to detect and quantify the DNA of *Colletotrichum acutatum*. Both methodologies confirmed that *Colletotrichum* survives in many parts of the plant throughout the year, with mummified fruits being the primary site, followed by leaves and woody branches. Among the leaf category, yellow leaves and leaves from defoliated branches showed a higher frequency of pathogen presence. Regarding wood, dry terminal twigs and healthy new shoots showed a greater presence of the pathogen. It is concluded that the main primary inoculum source is the olive tree itself, with mummified fruits, leaves, and wood serving as key sites for inoculum survival, initiating flower and fruit infections that initiate epidemics each season

**Keywords:** Soapy olive, *Colletotrichum acutatum* s.s., *Olea europaea* L, overwinter, Real-time PCR.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. OLIVICULTURA NACIONAL Y CONTEXTO INTERNACIONAL**

El olivo (*Olea europaea* L.) es uno de los cultivos más antiguos utilizados por el hombre, cuyo origen se remonta a unos 6.000 años atrás en la región de Asia Menor. En el 600 a. C, el olivo es introducido a la península ibérica de la mano de los griegos y es desarrollado de manera vigorosa en el área del Mediterráneo, al punto que el olivo y su aceite son unos de los pocos elementos presentes en todos los países de su cuenca, cultivándose tanto en Europa como en África y Asia. Es en el siglo XVI que el olivo comienza a cultivarse en América Latina, siendo México, Chile y Perú los primeros países en iniciar este cultivo (Lucena et al., 1997, Tapia et al., 2012).

Actualmente, el olivo se produce entre los paralelos 30° y 45° de latitud de ambos hemisferios y ocupa 11 millones de hectáreas distribuidas en más de 40 países de los 5 continentes. En el año 2021 se cosecharon 10.338.179 hectáreas de olivos y la producción mundial de aceitunas en ese mismo año alcanzó las 23.054.310,6 según las últimas cifras disponibles brindadas por la Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Lucena et al., 1997, FAO, 2023).

Los principales países productores de olivo según área explotada son España, Túnez, Italia y Marruecos, mientras que Uruguay ocupa el lugar número 31. En Sudamérica, el principal productor es Argentina, seguido por Perú, Chile y luego Uruguay (tabla 1). La producción mundial de aceite de oliva para la zafra 2019-2020 alcanzó las 3.373.881,59 toneladas, siendo España el principal productor (FAO, 2023).

En Uruguay, el cultivo del olivo se remonta a la época de la fundación de la ciudad de Montevideo durante el año 1726. En esta primera etapa, el cultivo se circunscribió a la ciudad y sus alrededores. Para el año 1895 fueron promulgadas varias leyes que



incentivaron la instalación del cultivo en nuestro país y se alcanzaron, para el año 1950, las 1000 ha cultivadas (Villamil, 2009, Silveira et al., 2012).

**Tabla 1.** Principales países productores de olivas en el mundo según área cosechada

Ranking	País	Superficie (há)
1	España	2,623,290.00
2	Túnez	1,280,811.00
3	Italia	1,129,000.00
4	Marruecos	1,104,083.00
5	Turquía	889,168.00
6	Grecia	819,060.00
7	Siria	693,106.00
8	Argelia	440,008.00
9	Portugal	380,410.00
10	Libia	235,500.00
11	Argentina	123,703.00
12	Egipto	99,102.00
13	Líbano	66,654.00
14	Jordania	59,442.00
15	Albania	48,723.00
16	Australia	47,877.00
17	Irán	41,627.00
18	Palestina	40,587.00
19	Arabia Saudita	31,864.00
20	Perú	28,296.00
21	Israel	28,293.00
22	Chile	21,364.00
23	Croacia	19,940.00
24	Francia	17,010.00

25	EEUU	14,569.00
26	Chipre	9,700.00
27	México	9,452.00
28	Iraq	8,170.00
29	Macedonia Norte	5,559.00
30	El Salvador	5,508.00
31	Uruguay	5,024.00

Fuente: FAO (2023) con datos de 2021

En las últimas décadas se han conocido resultados de investigación que demuestran los beneficios para la salud del consumo de alimentos de la llamada dieta mediterránea y, en especial, del consumo de aceite de oliva incluido en dicha dieta (Estruch et al., 2013, Phillips 2015). Esto ha impulsado cambios en las preferencias de los consumidores, lo que ha aumentado la demanda de aceites de oliva y ha llevado a una nueva expansión del cultivo desde las zonas de producción mediterránea hacia nuevas áreas o regiones del mundo.

En este contexto de expansión mundial del cultivo, Uruguay retomó la producción de aceitunas a partir del año 2002 e ingresó en un período de crecimiento sostenido que duró varios años, durante los cuales el área cultivada aumentó desde las 1000 hectáreas hasta las 10.800 ha, máximo histórico alcanzado en el año 2016. Actualmente, la superficie cultivada con olivos se estabilizó en unas 5.900 hectáreas efectivamente cosechadas. El principal destino de la producción de olivas en Uruguay es la obtención de aceite. Durante la zafra 2019-2020, el 99 % de la producción fue destinada a ese fin (MGAP-DIEA, 2021). Durante la zafra 2018-2019, Uruguay tuvo su producción máxima, la cual ascendió a 2.533 t de aceite. En la zafra siguiente, la producción disminuyó drásticamente: se produjeron 295 t de aceite de oliva (MGAP-DIEA, 2021), lo que dejó en evidencia una de las características de esta especie que es la alternancia de producción, conocida también

como añerismo, que es el resultado del antagonismo entre el crecimiento de los frutos y el crecimiento vegetativo.

La mayor extensión del cultivo del olivo en Uruguay (87 % de la superficie) se ubica hacia la zona este del país. Los departamentos de Maldonado (31 %), Treinta y tres (24 %), Rocha (23 %) y Lavalleja (9 %) concentran la mayor parte de la producción. Le siguen Salto con 4 % y en el restante 8 % se distribuye en el resto del territorio (Ackermann y Gorga, 2019).

Los cultivares de olivo plantados en Uruguay en su mayoría son de origen italiano y español. Arbequina es el cultivar más plantado ocupando un área de 2.788 ha, lo que equivale al 47 % del olivar (MGAP, 2020). Se trata de un cultivar de origen español que produce aceites de muy buena calidad. Presenta bajo vigor y entrada precoz en producción. En Uruguay ha sido caracterizado como susceptible a enfermedades que afectan las hojas y muy sensible a enfermedades que afectan al fruto (Conde et al., 2019). En segundo lugar, se ubica el cultivar Coratina con una superficie plantada de 1.259 ha, representando el 21 % del olivar nacional (MGAP, 2020). Este cultivar es de origen italiano y, al igual que Arbequina, produce aceites de buena calidad. Se caracteriza por ser vigoroso y por su entrada precoz en producción. En cuanto a su resistencia a enfermedades, este cultivar ha sido caracterizado en Uruguay como susceptible a enfermedades que afectan el follaje, fundamentalmente al emplomado causado por el hongo *Pseudocercospora cladosporioides* y a enfermedades que afectan el fruto (Conde et al., 2019). El tercer cultivar en área de implantación es Picual, que ocupa 652 ha, lo que representa un 11 % de la superficie olivícola (MGAP, 2020). Picual es de origen español y se lo considera un cultivar vigoroso, de rápida entrada en producción. En cuanto a su susceptibilidad a enfermedades, en nuestras condiciones de producción se lo considera sensible a enfermedades que afectan el área foliar y a enfermedades que afectan el fruto (Conde et al., 2019). Estos tres cultivares ocupan el 79 % de la superficie cultivada. Además de los anteriormente citados, se puede mencionar a Frantoio, Leccino y Manzanilla, entre otros (MGAP, 2020).

La rápida expansión del cultivo ha provocado una alta demanda de conocimiento en los diferentes aspectos que atañen a la producción (Parras, 2012). A su vez, es difícil extrapolar la información existente en las regiones de origen de este cultivo, debido a las importantes diferencias climáticas existentes. El cultivo del olivo es originario de regiones áridas que se diferencian mucho de nuestro clima húmedo. En respuesta a esta demanda, desde el año 2002 se han desarrollado una serie de proyectos de I+D en los que participan INIA y la Facultad de Agronomía de la Udelar, intentando evaluar la adaptación del cultivo a las condiciones de desarrollo local. En este contexto, el Grupo Disciplinario de Fitopatología de la Facultad de Agronomía lleva adelante diferentes proyectos de investigación abordando distintos aspectos de la sanidad del cultivo. Uno de esos proyectos se denomina «Estudios etiológicos, epidemiológicos y de control de *Colletotrichum* spp. asociados al atizonado de panículas florales y podredumbre de frutos en el cultivo del olivo», y es en el cual se enmarca este trabajo de maestría.

## **1.2. ANTRACNOSIS DEL OLIVO**

La antracnosis o aceituna jabonosa es una de las principales enfermedades del olivo en todas las regiones en donde es cultivado y es causada por diversas especies de hongos pertenecientes al género *Colletotrichum* (Trapero y Blanco, 2008, Cacciola et al., 2012, Moral et al., 2012, Talhinhos et al., 2018).

El síntoma típico de esta enfermedad es una podredumbre de frutos sobre la cual, en condiciones de alta humedad, se exudan masas de esporas (conidios) de color salmón, embebidas en una sustancia mucilaginosa. Se trata de una podredumbre firme que avanza hasta cubrir la totalidad del fruto y provocar su deshidratación hasta quedar momificado. Los frutos momificados pueden caer al suelo o permanecer sobre la planta hasta la siguiente temporada. La susceptibilidad de los frutos se incrementa con la madurez, por lo que la incidencia de la enfermedad suele incrementarse durante la etapa que va desde el envero hasta la cosecha. Sin embargo,

en cultivares sensibles, en condiciones de alta presión de inóculo y con altas humedades es posible observar síntomas en frutos verdes. Esta enfermedad también ocasiona síntomas en hojas y brotes. En hojas puede ocasionar manchas foliares, amarillamiento y defoliación y, en caso de ataques severos, puede provocar la muerte de ramitas (Talhinhas et al., 2009, Cacciola et al., 2012, Moral et al., 2014, Talhinhas et al., 2018). Este último síntoma tiene consecuencias negativas sobre la producción de los años subsiguientes (Talhinhas et al., 2018). Mediante ensayos de inoculación artificial, Moral y colaboradores demostraron la capacidad de este patógeno de afectar las flores (Moral et al., 2009). En las regiones húmedas a las que se ha expandido el cultivo, los síntomas de atizonado de flores y destrucción de panículas florales son comunes. Esta sintomatología ha sido descrita en Sudáfrica (Gautier, 1956), Australia (Sergeeva et al., 2008), Grecia (Iliadi et al., 2018) y, más recientemente, Uruguay (Moreira et al., 2021) y Brasil (Filoda et al., 2021).

Además de las pérdidas directas antes mencionadas, la elaboración de aceites a partir de fruta infectada provoca un aumento en su acidez (debido a la mayor presencia de ácidos grasos libre), incrementa los niveles de peróxidos y disminuye su calidad sensorial general (Moral et al., 2014, Leoni et al., 2018, COI, 2022).

Los brotes epidémicos de esta enfermedad se asocian a la ocurrencia de temporadas lluviosas y con alta humedad relativa. La bibliografía registra que en Portugal entre los años 2004 y 2007 ocurrió un brote epidémico de tal magnitud que entre el 65 y el 100 % de las fincas evaluadas se vieron afectadas por la enfermedad (Talhinhas et al., 2009). La incidencia de la enfermedad varía en función de las condiciones ambientales, así es que en ese mismo brote epidémico en la región sur del Algarve los valores de incidencia fluctuaron entre 22 % (en los años más secos, 2004 y 2005) hasta 85 % (en el año más lluvioso, 2006). Otro brote epidémico registrado es el que tuvo lugar en el año 1997 en España, en las regiones de Málaga y Córdoba, donde se registraron pérdidas de hasta el 100 % de la cosecha debido a esta enfermedad (Trapero Casas, 2003). Para la misma región, recientemente ocurrió un nuevo brote epidémico que ocasionó daños y pérdidas graves durante la zafra 2012-2013. En esta

temporada, el brote epidémico fue explicado por la elevada pluviometría y la predominancia de temperaturas medias (Moral et al., 2014).

El manejo de la antracnosis incrementa los costos de producción del olivo, de tal modo que Trapero y colaboradores estimaron que el sector olivícola español invierte 200 millones de euros anualmente en controlar esta enfermedad (Trapero et al., 2009). A pesar de este esfuerzo, las pérdidas por la antracnosis ascienden a los 75,2 millones de euros por zafra en España (Moral et al., 2009).

### **1.2.1. Agente causal**

El género *Colletotrichum* abarca una gran diversidad de especies de patógenos de plantas, las cuales pueden causar enfermedades tanto a campo como en poscosecha en una amplia variedad de cultivos, tanto leñosos como herbáceos. Su distribución abarca regiones tropicales y subtropicales, aunque también hay especies que afectan cultivos en zonas templadas. Entre los cultivos más afectados se encuentran la frutilla, el mango, los cítricos, el palto, el manzano y el plátano, así como también el cultivo de café y cereales como el maíz, la caña de azúcar y el sorgo. Este género es considerado como el octavo patógeno de planta de mayor importancia en el ámbito mundial (Cannon et al., 2012, Damm et al., 2012a, Damm et al., 2012b, Dean et al. 2012, Weir et al., 2012).

Según su nivel de parasitismo, este género es clasificado como hemibiótrofo. En las primeras etapas de la infección, el patógeno adquiere los nutrientes necesarios para completar su ciclo, desde células vivas de su huésped. A esta primera fase se la denomina fase biótrofa y durante ella no se observan síntomas en el tejido infectado. Pasado un determinado tiempo, que variará según la interacción entre las variables huésped-patógeno-ambiente, inicia la fase necrotrófica, en la que comienza a colonizar las células de su huésped de manera destructiva. Como consecuencia, aparecen síntomas, principalmente de necrosis.

Diferentes especies de *Colletotrichum* tienen la capacidad de ocasionar infecciones latentes sin manifestar síntomas visibles hasta que los frutos maduran (Münch et al., 2008, Ranathunge et al., 2012, Da Silva et al., 2020).

Sobre los síntomas en condiciones de alta humedad se producen acérvulos que exudan masas de conidios, esporas de origen asexual, embebidas en una sustancia mucilaginosa soluble en agua y rica en glicoproteínas e inhibidores de la germinación que les sirven de protección. Al entrar en contacto con el agua, ya sea de lluvia o de riego, los conidios se dispersan, por salpicado o por goteo, y llegan a nuevos puntos donde podrán iniciar un nuevo ciclo de infección en la misma planta o en plantas vecinas (Ntahimpera et al., 1997, Khan y Hsiang, 2003, Da Silva et al., 2020). Eventualmente, en determinadas condiciones puede inducirse la reproducción sexual con formación de peritecios y producción de acosporas (Da Silva et al., 2020).

La antracnosis del olivo o aceituna jabonosa es ocasionada por diferentes especies de *Colletotrichum*. En el pasado, esta enfermedad ha sido asociada a la presencia de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* (Martín y García-Figueroles, 1999, Martín et al., 2002, Talhinhos et al., 2005, Cacciola et al., 2012). En los últimos años, la taxonomía de los complejos de especies *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. boninense* ha sido exhaustivamente revisada mediante el análisis combinado de 9 regiones génicas. Dentro de cada complejo, nuevas especies fueron identificadas y otras reubicadas en su lugar correcto (Damm et al., 2012a, 2012b, Weir et al., 2012).

Dentro del complejo de especies de *C. acutatum*, las especies *C. acutatum sensu stricto* (s. s.) y cinco nuevas especies, *C. simmondsii*, *C. fioriniae*, *C. godetiae* (syn. *C. clavatum*), *C. nymphaeae*, y *C. rhombiforme*, fueron encontradas asociadas al olivo (Shivas y Yu, 2009, Faedda et al., 2011, Damm et al., 2012a, Materatski et al., 2018).

Aislados de *Colletotrichum* provenientes de Italia, Australia, China y Montenegro que originalmente habían sido clasificados con base en las características

morfológicas y culturales como *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. fueron reclasificados utilizando las regiones ITS y TUB2 como *C. aenigma*, *C. gloeosporioides* s. s., *C. kahawae*, *C. queenslandicum*, *C. siamense* y *C. theobromicola*, del complejo de especies de *C. gloeosporioides* y *C. karstii* del complejo de especies de *C. boninense* (Schena et al., 2014).

Las condiciones ambientales, la presión de inóculo y la mayor o menor susceptibilidad del huésped (cultivares) son los factores que condicionan la prevalencia de un complejo sobre otro. La prevalencia de especies del complejo *C. acutatum* sobre especies del complejo *C. gloeosporioides* ocurre en regiones donde los brotes epidémicos son más agresivos y donde se considera a la antracnosis como una enfermedad endémica (Talhinhas et al., 2009, Cacciola et al., 2012, Materatski et al., 2018). En estudios recientes realizados en Uruguay por Moreira et al. (2021), determinaron que la especie predominante asociada a la antracnosis del olivo es *C. acutatum* s. s.

### **1.2.2. Ciclo de la enfermedad**

Conocer con precisión el ciclo de una enfermedad es indispensable al momento de idear medidas de control. Las infecciones en olivo pueden ocurrir durante la floración y, posteriormente, durante todas las etapas de desarrollo del fruto. La susceptibilidad a la antracnosis comienza en estadios tempranos del desarrollo de las panículas florales y se incrementa a medida que avanza la floración. De manera similar, la susceptibilidad de los frutos aumenta con la madurez, siendo máxima en las etapas de envero a cosecha (Moreira et al., 2022, Moreira et al., 2023). Para que ocurran infecciones, se necesitan presencia de agua libre y temperaturas medias. Por el contrario, estas son inhibidas cuando el clima es seco y las temperaturas mayores a 30 °C.

Las infecciones en floración causan el atizonado de la flor y de toda la panícula floral, lo que impide la formación de frutos. Además, sobre los órganos afectados en



esta etapa se producen conidios que sirven de inóculo secundario para el posterior ataque a los frutos. Los frutos afectados desarrollan el típico síntoma de podredumbre seca que evoluciona hasta causar la momificación del fruto. Los frutos momificados constituyen una de las fuentes de inóculo primario, ya que logran permanecer sobre el árbol hasta la próxima temporada. Los conidios que se producen en acérvulos en una matriz mucilaginosa constituyen el inóculo tanto primario como secundario de esta enfermedad. Hasta el momento no se ha encontrado la reproducción sexual de especies de *Colletotrichum* asociadas al cultivo del olivo ni en las zonas de origen ni en otras regiones del mundo, por lo que las ascosporas no revisten importancia en la epidemiología de la antracnosis del olivo. La dispersión de los conidios ocurre por salpicado de gotas de agua que transporten dichas esporas hacia nuevos tejidos sanos a infectar. El hongo es capaz de penetrar directamente los tejidos; sin embargo, la presencia de heridas facilita su entrada. Las temperaturas óptimas para la infección están entre los 17 y 24 °C y es necesaria la presencia de agua libre para la germinación de los conidios sobre el huésped (Moral et al., 2009, Cacciola et al., 2012, Moral y Trapero 2012, Talhinhos et al., 2018, Moreira et al., 2022, Romero et al., 2022).

La etapa de sobrevivencia de *Colletotrichum* spp. desde la cosecha hasta la siguiente floración en el cultivo del olivo no ha sido suficientemente estudiada y no existe consenso entre los diferentes autores acerca de cuáles serían los principales sitios. Al igual que en otros cultivos, los frutos momificados constituyen uno de los principales lugares de sobrevivencias y, por lo tanto, una de las principales fuentes de inóculo primario (Cacciola et al., 2012, Moral y Trapero 2012).

Todos los patógenos de plantas recurren a diferentes formas o mecanismos de sobrevivencia que les permitan atravesar los períodos adversos entre un cultivo y el siguiente o entre una temporada vegetativa o reproductiva y la siguiente. La sobrevivencia de *Colletotrichum* spp. ha sido estudiada para diversos cultivos frutales y existen antecedentes que indican que este hongo sobrevive sobre la misma planta en frutos momificados, ramas muertas, entre las escamas de las yemas y

también en hojas en forma asintomática. En el cultivo del manzano, donde diferentes especies del género *Colletotrichum* causan dos enfermedades conocidas como podredumbre amarga y mancha foliar por *Glomerella*, este patógeno sobrevive en frutos momificados, ramas, tanto ramitas secas como vivas, especialmente en aquellas que cargaron fruta, y en yemas. Además, puede sobrevivir en hojas de manera asintomática (Casanova et al., 2016, Børve y Stensvand, 2017). En el caso del cerezo amargo, este patógeno sobrevive en las escamas de las yemas, momias y pedúnculos (Stensvand et al., 2017); mientras que en el cultivo del arándano *C. acutatum* sobrevive en ramas muertas, ramas que tuvieron fruta y yemas florales recién diferenciadas (Verma et al., 2007).

Algunos trabajos indican que, en diferentes regiones de producción, *Colletotrichum* spp. causantes de la antracnosis del olivo podrían sobrevivir sobre brotes, ramas, yemas y hojas además de los frutos momificados mencionados anteriormente (Sergeeva 2011, 2014, Talhinhos et al., 2011). Recientemente, mediante técnicas de biología molecular, se constató la presencia de *C. acutatum* s.s y *C. godetiae* a lo largo de todo el año en hojas tanto verdes como senescentes e incluso en frutos recién cuajados (Schena et al., 2017).

Conocer los sitios de sobrevivencia y su importancia relativa es fundamental a la hora de diseñar estrategias de manejo de cualquier enfermedad. La prevalencia de especies y el comportamiento de estas podrían variar de un sitio a otro influenciados por las condiciones agroecológicas de cada región productora, lo cual refleja la importancia de realizar estudios locales que permitan conocer con certeza los lugares de sobrevivencia de las poblaciones de *Colletotrichum* spp. en las condiciones de producción olivícola uruguayas.

### **1.3 ANTRACNOSIS DEL OLIVO EN URUGUAY**

El cultivo del olivo se ha desarrollado tradicionalmente en regiones mediterráneas, caracterizadas por clima relativamente seco. Contrariamente, las condiciones

agroecológicas de Uruguay con elevada pluviometría e inviernos moderados son predisponentes para el desarrollo de enfermedades fúngicas. La principal enfermedad que afecta al olivo en el país es la antracnosis y los primeros registros de esta se remontan al año 2007 cuando se realizó una prospección que abarcó a las principales zonas productoras. En esa prospección, la enfermedad fue detectada en todos los montes comerciales en producción en diferentes regiones del país y se observaron frutos afectados y momificados al momento de cosecha (Conde y Leoni, 2007). Además del clima conducente, la situación se ve agravada porque el cultivar Arbequina, considerado susceptible a esta enfermedad, es el más implantado (Moral et al., 2009, MGAP, 2020).

Como fue mencionado anteriormente, la especie predominante en Uruguay asociada a la antracnosis de olivo es *C. acutatum* s.s. (Moreira et al., 2021). En ese mismo trabajo, Moreira y colaboradores constatan que, en nuestras condiciones de producción, el atizonado de flores es uno de los principales síntomas asociados a la presencia de *Colletotrichum* spp en olivo, además de la típica podredumbre de fruto, ya mencionada.

Si bien hasta el momento no existen antecedentes de estudios epidemiológicos de esta enfermedad en Uruguay, es fácil deducir que el hongo ataca las flores al inicio de cada temporada, para luego pasarse a los frutos. El ataque a la flor constituye un daño directo, ya que las flores atacadas no producirán fruta, pero, además, las panículas afectadas constituyen una importante fuente de inóculo secundario. Es sabido también que la presencia de *Colletotrichum* spp. en flor se asocia a una mayor incidencia de infecciones latentes en fruto verde (Moral et al., 2009).

Durante la temporada 2017-2018, tras un invierno-primavera con abundantes precipitaciones y temperaturas templadas, se produjo un brote epidémico de antracnosis del olivo. Las mermas en la cosecha ascendieron a un 90 % del volumen de fruta esperado, situación que se vio agravada hacia la región este del país (no hay referencia).

Este trabajo pretende aportar conocimientos sobre cuáles son los sitios de sobrevivencia de *Colletotrichum* spp. a lo largo del ciclo anual del olivo, cuáles son sus fuentes de inóculo y su importancia relativa.

En el siguiente capítulo se presentan los resultados experimentales del estudio realizado durante dos temporadas, 2018-2019 y 2019-2020, en el cual se realizó un seguimiento de la presencia del patógeno en muestras extraídas mensualmente del campo. Estas se analizaron mediante dos metodologías diferentes: una de ellas consistió en el congelado de las muestras a -18 °C durante dos horas para, posteriormente, inducir el desarrollo del patógeno en condiciones de cámara húmeda durante al menos 30 días. En la segunda metodología empleada, muestras también obtenidas en forma mensual durante todo el año fueron procesadas para detectar y cuantificar el ADN de *Colletotrichum acutatum* s. s. utilizando la técnica de PCR en tiempo real. Finalmente, se presentan una discusión y conclusiones generales desprendidas de esta tesis.

**2. DETECTION AND QUANTIFICATION OF COLLETOTRICHUM SURVIVAL ON OLIVE TREE (OLEA EUROPAEA L.)**

Artículo publicado en *European Journal of Plant Pathology*.

Ferronato, B.; Ingold, A.; Moreira, V.; Bentancur, O.; Alaníz, S.; Mondino, P. (2023). Detection and quantification of *Colletotrichum* survival on olive tree (*Olea europaea* L.). EJPP. 10.1007/s10658-023-02686-z

Bárbara Ferronato<sup>1</sup>, Ana Ingold<sup>1</sup>, Victoria Moreira<sup>1</sup>, Oscar Bentancur<sup>2</sup>; Sandra Alaniz<sup>1</sup>, Pedro Mondino<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Protección Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

<sup>2</sup>Departamento de Biometría, Estadística y Computación. Facultad de Agronomía, Universidad de la Republica. EEMAC, Paysandú, Uruguay.

E-mail address: ferronato@fagro.edu.uy

## **Detección y cuantificación de la sobrevivencia de *Colletotrichum* en el olivo (*Olea europaea* L.)**

### **2.1 RESUMEN**

Durante las últimas dos décadas, ha habido un aumento notable en la producción de aceitunas en Uruguay. Sin embargo, el clima húmedo de Uruguay crea condiciones favorables para el desarrollo de la antracnosis de la aceituna, caracterizada por producir podredumbre de frutos y marchitez de flores, que son síntomas frecuentes y destructivos. Varias especies de *Colletotrichum* son responsables de la enfermedad, siendo *C. acutatum* sensu stricto (s.s) la más prevalente. Este estudio tuvo como objetivo analizar la sobrevivencia de *Colletotrichum* en un monte de olivos con antecedentes de alta incidencia de antracnosis. Durante dos años consecutivos, se recolectaron muestras mensuales de frutos, hojas y tejido leñosos de las partes aéreas del árbol de olivo. La presencia de estructuras de *Colletotrichum* spp. se constató mediante la instalación de cámara húmedas, y se cuantificó *C. acutatum* s.s. El estudio demostró que *Colletotrichum* puede sobrevivir en diferentes órganos del árbol de olivo, siendo los frutos momificados el principal sitio de sobrevivencia, seguido de las hojas y las ramas. Entre las hojas y los tejidos leñosos, se identificaron como sitios importantes de sobrevivencia las hojas amarillas, las hojas de ramas defoliadas, las ramas secas terminales y las ramas nuevas de aspecto sano. Los frutos momificados no siempre estuvieron presentes en el árbol a lo largo del año, y las hojas y ramas pueden servir como fuente de inóculo inicial para las infecciones primarias de flores y frutos en su ausencia.

**Palabras clave:** antracnosis, *Colletotrichum acutatum* s.s., *Olea europaea*, sobrevivencia, PCR en tiempo real

## 2.2 SUMMARY

Over the past two decades, there has been a marked increase in Uruguayan olive production. However, the humid climate of Uruguay creates favorable conditions for the development of olive anthracnose, characterized by fruit rots and blossom blight, which are frequent and destructive symptoms. Several species of *Colletotrichum* are responsible for the disease, with *C. acutatum* sensu stricto (s.s) being the most prevalent. This study aimed to analyze the survival of *Colletotrichum* in an olive orchard with a high history of olive anthracnose. For two consecutive years, samples of fruits, leaves, and woody organs were collected monthly from aerial parts of the olive tree. *Colletotrichum* spp. structures were recorded in a humid chamber, and *C. acutatum* s.s. was quantified. The study demonstrated that *Colletotrichum* can survive in different organs of the olive tree, with mummified fruit being the primary survival site, followed by leaves and branches. Among the leaf and woody organs, yellow leaves, leaves from defoliated branches, terminal dry branches, and healthy new branches were identified as important survival sites. Mummified fruits were not always present on the tree throughout the year, and leaves and branches can serve as the primary source of initial inoculum for infections of flowers and fruits in their absence.

**Key words:** anthracnose, *Colletotrichum acutatum* s.s., *Olea europaea*, overwinter, real-time PCR

## 2.3 INTRODUCTION

Olive crop was expanded from the traditional Mediterranean basin to new production areas such as Australia, South Africa, New Zealand, Argentina, Brazil, Peru and even Uruguay (Pereira et al. 2016). During the last twenty years, Uruguay has increased olive production, going from less than 1,000 hectares to the current 5900 hectares (DIEA 2021). Frequent rainfall (1.100 mm per year) and abundant high humid days are usual in Uruguay favoring fungal diseases development such as anthracnose caused by *Colletotrichum* spp., the main olive disease in this country (Leoni et al. 2018; Conde-Innamorato et al. 2019; Moreira et al. 2021).

Fruit rot is the typical symptom caused by OA. *Colletotrichum* spp. infects the fruit mostly in a mature state causing dark-brown lesion that can be covered by abundant salmon-colored conidia masses under high humidity conditions, leading to the typical 'soapy fruit'. The rot progresses until covering the entire fruit, dehydrating, and finally mummifying it. After mummification, fruits may fall to the ground or remain attached to the tree until the following growing season (Moral et al. 2009; Talhinhos et al. 2009; Sergeeva 2014; Chattaoui et al. 2016). In addition, infected fruits reduce oil quality, which is manifested in parameters such as high free acidity and peroxides, and general organoleptic low quality (Moral et al. 2014; Leoni et al. 2018; Romero et al. 2022).

Flowers can also be infected causing fruit set reduction or even collapsing the entire inflorescence, which is known as blossom blight (Sergeeva et al. 2008; Moral et al. 2009; Iliadi et al. 2018; Filoda et al. 2021). Symptoms are also observed in shoots and leaves ranging from necrosis to defoliation and eventually the death of the branches or reducing tree vigor (Talhinhos et al. 2005, 2011, 2018; Moral et al. 2009, 2014; Sergeeva 2014).

Anthracnose first record in Uruguay dates up to 2007 when it was detected in all commercial orchards with fruit production surveyed along the country for that year



(Conde and Leoni 2007). In addition to the predisposing climate, the situation is aggravated by the wide distribution of Arbequina cultivar (50% of planted area) considered as susceptible to anthracnose (Moral et al. 2009; Leoni et al. 2018).

Moreover, during the 2017/2018 season after a winter-spring with abundant rainfall and mild temperatures, olive anthracnose caused severe outbreak leading fruit losses of almost the total harvest expected for that year (Moreira et al. 2021). This event was more pronounced towards the eastern region of the country, where 80% of the olive production is concentrated (MGAP-DIEA 2021). *Colletotrichum acutatum* s.s was recently determined as the main specie causing anthracnose disease in Uruguay (70%). Other identified species were *C. nymphaeae*, *C. fioriniae*, *C. theobromicola* and *C. alienum* (Moreira et al. 2021).

All plant pathogens have different mechanism and sites for survival that allow them going through the adverse periods between one growing season and the next. Knowing these survival sites allow to elucidate the disease cycle and design management strategies. *Colletotrichum* spp. survival has been studied for several fruit crops indicating that this fungus survives mainly over the plant in different organs. On apple tree, *Colletotrichum* spp. survives in mummies, branches and in asymptomatic leaves (Casanova et al. 2016; Børve and Stensvand 2017), on cherry was found in buds scales, mummies, and peduncles (Stensvand et al. 2017) and on avocado on fresh and dry leaves, as well as green twigs (Sharma et al. 2017). On blueberry the species *C. acutatum* was found surviving on dead branches, branches that had fruit and newly differentiated flower buds (Verma et al. 2007) and on strawberry in leaves (Debode et al. 2009).

Studies about *Colletotrichum* spp. survival in olive tree are scarce and there is no consensus about which would be the main survival sites. As in other crops, mummified fruits are considered one of the main survival organs and the primary inoculum sources (Talhinhas et al. 2011, 2018; Cacciola et al. 2012; Moral and Trapero 2012). Shoots, branches, buds, and leaves also have been mentioned with

distinct importance in different olive regions such as Portugal and Australia (Sergeeva 2011, 2014; Talhinhos et al. 2011). Talhinhos et al. (2011) indicate that leaves have higher inoculum reservoir than branches and this inoculum decreases throughout the summer more significantly on leaves than on branches. This suggests that leaves can serve as short-term inoculum reservoirs and branches as long-term ones. Recently, using qPCR technique, the presence of *C. acutatum* s.s and *C. godetiae* was verified throughout the year in both green and senescent leaves and even in recently set fruits of olive tree (Schena et al. 2017).

Since the species prevalence vary from one region to other and pathogens behavior can be influenced by agroecological conditions, developing local studies to know where *Colletotrichum* survives, and which are the main primary inoculum source under local condition is crucial. Thus, in this study we aimed to determine and to categorize olive tree organs where *Colletotrichum* survives under field conditions in the eastern of Uruguay, the main olive growing region.

## **2.4 MATERIALS AND METHODS**

### **2.4.1 Olive organs sampled and environmental description**

Olive samples were collected from a 0.5 ha. commercial orchard of Arbequina cultivar with high anthracnose incidence history situated in eastern Uruguay, Rocha department, 19 de Abril locality (lat. 34°17'32.53"S long. 54° 3'1.69"W). Olive trees were established in 2007 in a high-density system of 300 plant/hectare. Samples of fruits, leaves and woody organs, including ten categories (Fig. 1) were selected from the areal part of the tree to be analyzed.

Environmental conditions during sample collection period are summarized in Table 1. Data was obtained from an automatic weather station (iMETOS® 3.3) located in the field where the experiment was carried out.



Fig. 1 Olive categories of fruits, leaves and woody organs sampled, NL: new leaf, LHB: leaf from healthy branch, LDB: leaf from defoliated branch, YL: yellow leaf, HNB: healthy new branch, HAB: healthy adult branch, TDB: terminal dry branch, DAB: defoliated adult branch, TB: trunk bark and MF: mummified fruit

#### **2.4.2 Colletotrichum survival detection**

Ten olive trees including those located in high, medium and lowlands of the orchard were selected. One sample per category was monthly collected in each tree from March 2018 to February 2020, completing a total of 10 samples per category and month. Collected material was individually packed in paper bags to be transported.

The emergence of typical *Colletotrichum* structures was forced freezing the samples at -18°C for 2 hours. Immediately, samples were individually placed in Petri dishes and maintained under humid chamber conditions at 24°C +/- 1°C with a photoperiod of 12 hours of near UV for 30 days.

Each sample was weekly examined to detect the presence of *Colletotrichum* spp. vegetative and/or reproductive structures such as mycelium, acervuli, setae or/and salmon-colored gelatinous conidia mass using a stereomicroscope (Olympus SZ61, Tokyo, Japan). When any of these structures were observed, typical *Colletotrichum* structure as septate mycelium and/or fusiform, aseptate and hyaline conidia of approximately 10 to 20 µm length were confirmed with microscope (Olympus CX23, Tokyo, Japan). For each evaluated date, the number of samples with presence of typical *Colletotrichum* spp. structures was recorded for each category and expressed as percentage.

#### **2.4.3 Colletotrichum survival quantification**

The olive orchard was divided into three blocks considering high, medium and lowlands and ten plants in each block were randomly selected. One sample per category was monthly collected in each tree from March 2019 to February 2020 completing a total of 10 samples per category and block per month. The ten samples per category and block were packed together in the same paper bags to be transported.

Real-time PCR was used for *C. acutatum* s.s. quantification, the predominant *Colletotrichum* specie causing olive anthracnose in Uruguay. For this, the ten olive samples per category and block grouped, were dehydrated with silica gel until constant weight and kept under -18 °C. For DNA extraction each composite sample was ground with a manual mortar using liquid nitrogen. A sub-sample of 50 mg was taken for DNA extraction using a commercial kit (Quick-DNA Fungal / Bacterial Miniprep Kit Zymo Reserach, USA) according to the manufacturer's instructions. A total of 30 composite samples were monthly analyzed.

For standard curve construction, *Colletotrichum acutatum* s.s. DNA from OL1 isolate belonging to the fungal culture collection at the Plant Protection Department, Faculty of Agronomy, University of the Republic, Uruguay (Moreira et al. 2021) was used. Isolate OL1 was grown on potato dextrose agar (PDA) (PDA, Oxoid Ltd., Hampshire, England) for one week in a growth chamber at 24°C. Genomic DNA was extracted using a commercial extraction kit (Quick-DNA Fungal / Bacterial Miniprep Kit ZYMO RESEARCH) according to the manufacturer's instructions. DNA extracted concentration was measured using Qbit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific). To build the standard curve, 4 serial dilutions of the extracted DNA were made 1 in 10 in a total volume of 20 µl. Each of the 4 dilutions was run in duplicate.

Real-time PCR was performed in a total reaction volume of 10 µl containing 5 µl of SensiFAST™ Probe No-ROX Kit, 0.8 µl of specific *Colletotrichum acutatum* s.s. Primers Acu-his-F/Acu-his-R, 0.1 µl of hydrolysis probe Acu-his-Probe (Macrogen, Inc) labeled with FAM at the 5' end and Black Hole Quencher (BHQ1) at the 3' (Schena et al. 2017), the remaining volume was completed with MQ water. Amplification and quantification were performed in a Rotor Gene-Q Qiagen equipment, including a first step at 95°C for 10 minutes and subsequently 40 cycles of 15 s at 95°C and 20 s at 61°C. Each sample was analyzed in duplicate. To calculate the amount of *C. acutatum* s.s. DNA per mg of dry matter (DM) of analyzed tissue into each category, the Ct values obtained, the Rxn concentrations and dry tissue weight analyzed were used.

#### **2.4.4 Statistical analysis**

Year, organ (leaf, wood, and mummy) and category into each organ effect on *Colletotrichum* spp. survival incidence was studied adjusting a generalized linear model assuming that the number of affected categories in relation to the total observed number had a binomial distribution. For survival *C. acutatum* s.s. quantification, a generalized linear model was fitted assuming a Gamma distribution. Means of significant effects were compared using the Tukey-Kramer test ( $P \leq 0.05$ ). For both analyses, the Glimmix procedure implemented in SAS package (SAS Institute, Cary, NC, 2020) was used.

### **2.5 RESULTS**

#### **2.5.1 Environmental description**

Mean monthly temperature registered during the first year of this study ranged between 8.18 to 23.9 °C (2018/19) and between 11.35 to 24.45 °C for the second year (2019/20) and maximum monthly temperature was between 14.31 to 29.92 °C and 15.95 to 30.11 °C for 2018/19 and 2019/20, respectively. Mean monthly relative humidity was from 75.29 to 88.68% and from 61.73 to 85.21 for 2018/219 and 2019/20, respectively and maximum monthly relative humidity ranged from 92.49 to 98.9% and from 80.95 to 98.98% for 2018/19 and 2019/20 respectively. Rainfall was recorded in all months of both years and the monthly accumulate ranged from 2.4 to 306 mm in 2018/19 and from 23.6 to 291.4 mm in 2019/20 and the annual accumulated rainfall raise 1410.4 mm during the first year and 1076.2 mm for the second year. Finally, the average of monthly days with rainfall was 14 days for 2018/19 and 7 days for 2019/20 (Table 1).

Table 1. Monthly average environmental conditions during the olive sample collection period from March 2018 to February 2020.

Year	Meteorological variable	Months											
		Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	Jan	Feb
2018/19	Mean Temp (°C)*	20.6	21.4	16.95	11.25	8.19	11.14	15.305	15.37	19.005	20.225	23.9	22.775
	Max Temp (°C)*	29.92	26.51	26.31	21.65	16.72	14.31	16.58	20.07	21.55	24.78	28.55	29.23
	Mean RH (%)*	76.64	76.14	85.72	84.16	81.1	88.68	87.2	87.26	79.19	75.29	77.93	76.45
	Max RH (%)*	94.4	93.67	96.98	95.99	92.49	97.96	98.9	98.72	97.15	97.2	98.68	98.22
	Accumulate Rainfall (mm)	129.4	119	76.4	72.8	149	141.6	85.6	41.2	2.4	224.4	306	62.6
	Days with rainfall (n°)**	13	18	18	16	20	22	22	10	8	19	5	1
2019/20	Mean Temp (°C)*	19.3	18.35	15.55	14.4	11.4	11.35	13.4	16.1	20.35	21.8	22.65	24.45
	Max Temp (°C)*	28.55	24.41	23.07	19.08	17.49	16.4	15.95	17.94	20.94	26.7	29.3	30.11
	Mean RH (%)*	65.74	80.64	73.54	85.21	80.97	61.73	79	75.48	82.84	74.22	66.64	no data
	Max RH (%)*	92.27	98.98	97.98	98.49	91.91	80.95	97.01	98.6	96.53	94.37	97.14	no data
	Accumulate Rainfall (mm)	27.2	29	124.4	72	94.8	75.6	90.2	291.4	111.6	80.2	56.2	23.6
	Days with rainfall (n°)**	6	6	6	13	9	9	7	13	5	2	1	1

(\*) Daily Average (\*\*) Accumulated rainfall starting from 0.2 mm)

### **2.5.2 Colletotrichum survival detection**

*Colletotrichum* structures were found in most organs evaluated during the two years, except for trunk bark (data not shown). *Colletotrichum* structures observed included salmon-colored gelatinous mass, black acervuli, grey mycelium and less frequently black setae. Typical *Colletotrichum* conidia and septate mycelium, were observed associated with these structures confirming the presence of this genera in the olive organs analyzed (Fig. 2).



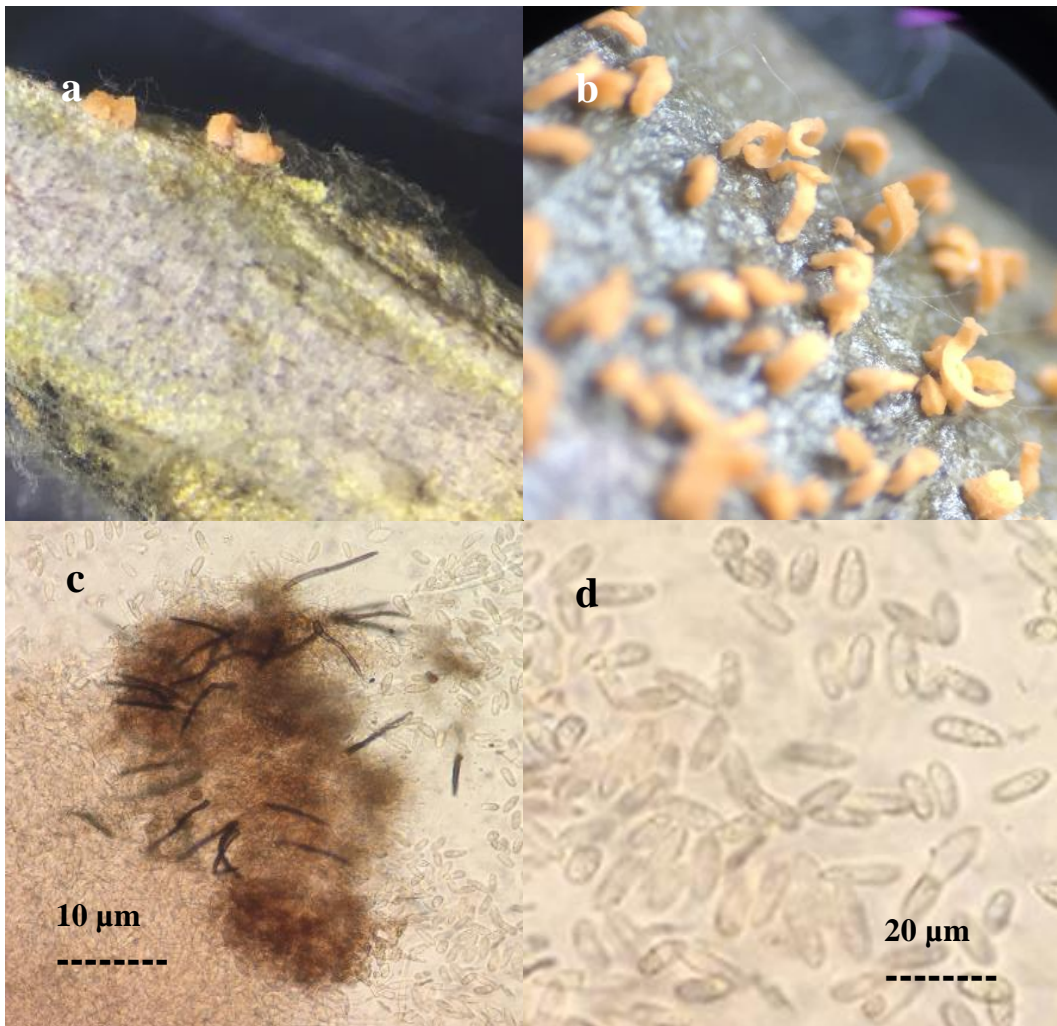


Fig. 2 *Colletotrichum* spp. structures observed in olive organ analyzed; (a and b) cirrus of salmon-colored gelatinous conidia and grey mycelium on wood (white arrow) and leaf; (c) acervuli with typical black setae and conidia (d) detail of aseptate, hyaline, and fusiform conidia of *Colletotrichum* spp.

According to statistical analysis no effect year occur ( $P= 0.055$ ) thus, data of the two years were combined, while a significant effect of organ (mummified fruit, wood and leaf) ( $P= < 0.0001$ ) and category within organ ( $P= < 0.0001$ ) was detected. Considering the three evaluated organs, the mummified fruit have significant higher incidence of *Colletotrichum* spp. than leaf, and leaf significant higher incidence than wood (Table 2). Within leaf, the categories with the highest significant incidence were leaf from defoliated branch (LDB) and yellow leaf (YL) followed by leaf from healthy branch (LHB). New leaf (NL) showed the significant lowest incidences within this category (Table 2). Meanwhile, for wood organ no significant differences were detected between the four evaluated categories (Table 2).

**Table 2** Means of *Colletotrichum* spp. survival detection (%) and *C. acutatum* s.s. survival quantification (ng/mgDM) for organs and categories into organs in an olive orchard with olive anthracnose history

Organs	Survival detection (%)	PCR Quantification (ng/mgDM)
Mummified fruit	46.2 A <sup>1</sup>	911.936 A
Leaf	19.9 B	0.01012 C
Wood	3.2 C	0.02898 B
Leaf categories		
LDB	42.5 A	0.006035 B
YL	33.7 AB	0.08879 A
LHB	20.9 B	0.004690 B
NL	5.0 C	0.004174 B
Wood categories		
TDB	13.6 A	0.6221 A
HNB	5.2 A	0.03873 B
HAB	1.4 A	0.01226 C
DAB	0.8 A	0.009045 C

LDB: leaf from defoliated branch, YL: yellow leaf, LHB: leaf from healthy branch, NL: new leaf, TBD: terminal dry branch, HNB: healthy new branch, HAB: healthy adult branch and DAB: defoliated adult branch, ng/mgDM: ng per mg of dray mater.

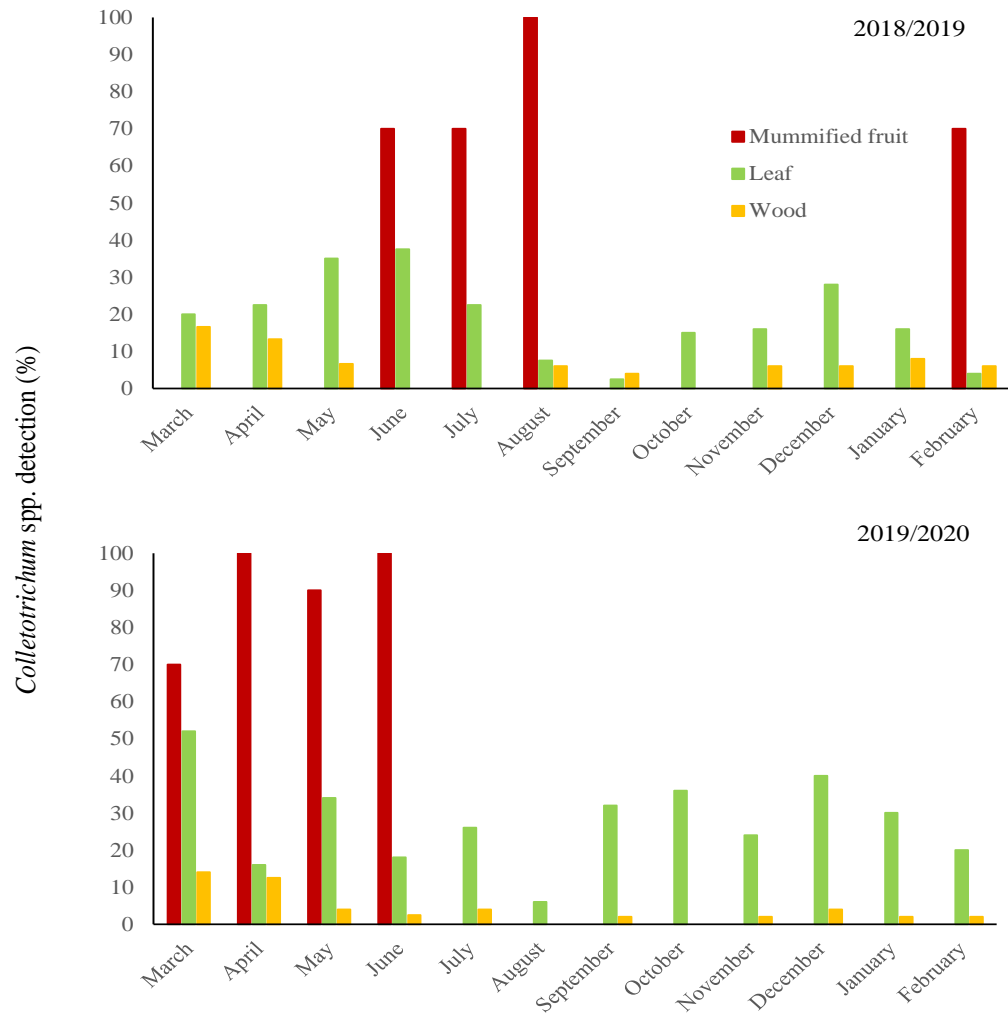
<sup>1</sup>In each column, mean values followed by the same letter is not significantly different according to Tukey-Kramer test at  $p \leq 0.05$ .

Within organs, mummified fruit survival detection includes 80 samples while leaf and wood survival detection include 960 samples each one. Mummified fruit quantification includes 40 samples, while leaf and wood quantification include a total of 480 sample each one.

Within categories, each one of the leaf and wood categories includes 240 samples each one for survival detection and 120 each one for quantification.

Considering *Colletotrichum* survival evolution distribution throughout the year, this pathogen was detected in all months during the two evaluated years (Fig. 3). Particularly in leaf, *Colletotrichum* spp. was always detected, and the incidence ranged from 4 to 52%. In wood, *Colletotrichum* spp. was detected in all months except in June, July, October of 2018 and August and October of 2019 and the

incidence ranged from 2 to 16.6%. Mummified fruit not always was present over the olive tree, this organ was collected mainly during fall and winter season and the incidence varies between 70 and 100%.



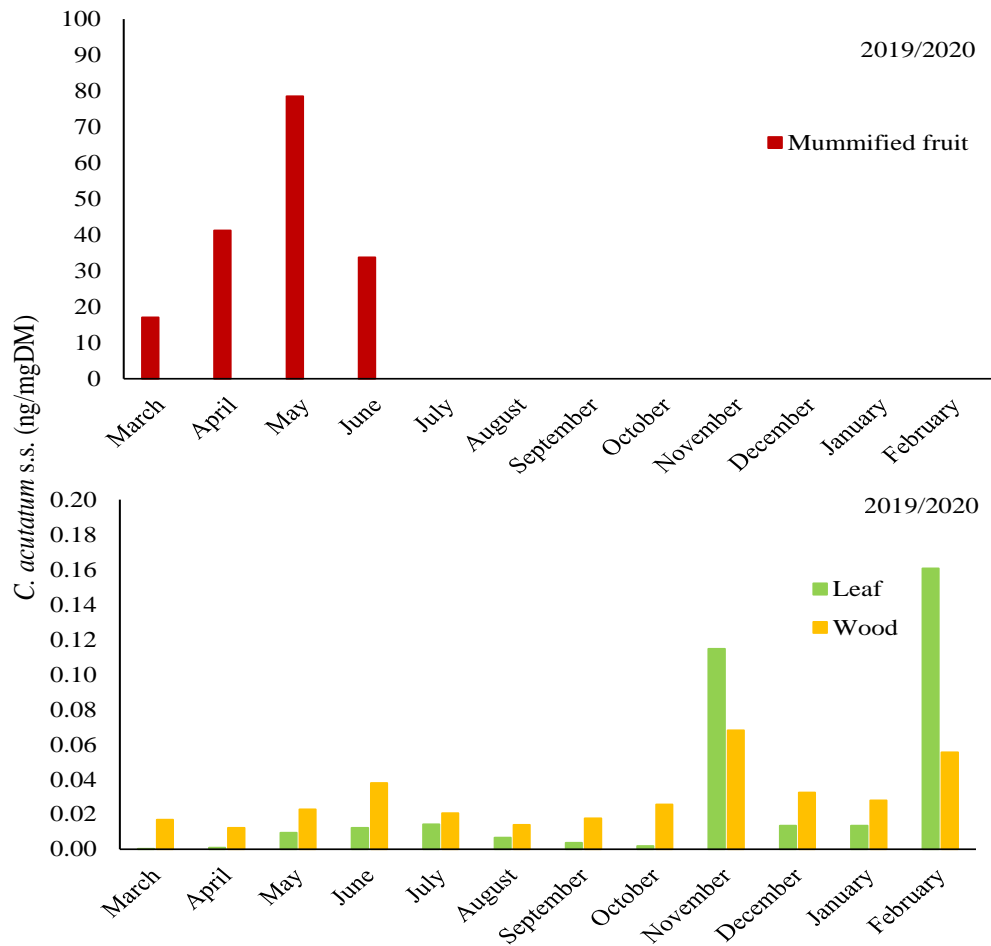
**Fig. 3** *Colletotrichum* spp. survival detection along the year expressed as the mean value per organ and evaluated month.

### 2.5.3 Colletotrichum survival quantification

*Colletotrichum acutatum* s.s. was quantified in all organs and categories evaluated. According to statistical analysis, no block effect occur ( $P > 0.1353$ ) while significant effect of organ (mummified fruit, wood and leaf) ( $P = < 0.0001$ ) and category within organ ( $P = < 0.0001$ ) was found.

Considering the three evaluated organs, mummified fruit presented significant higher ng/mgDM of *C. acutatum* s.s. than wood, and wood significant higher ng/mgDM of *C. acutatum* s.s. than leaf (Table 2). Within leaves categories, yellow leaf (YL) showed significant higher ng/mgDM of *C. acutatum* s.s. than the other three evaluated categories that no differed statistically among them (Table 2). For wood categories, terminal dry branch (TDB) showed the significant higher ng/mgDM of *C. acutatum* s.s. followed by healthy new branch (HNB). Finally, healthy adult branch (HAB) and defoliated adult branch (DAB) presented the lowest ng/mgDM of *C. acutatum* s.s. and no significant differences in ng/mgDM of *C. acutatum* s.s. between them (Table 2).

Regards annual *C. acutatum* s.s. quantification distribution, the pathogen was quantified in all months of the year, with higher ng/mgDM of the pathogen registered in the summer (Fig. 4). Wood quantification varied from 0.01224 to 0.06803 ng/mgDM, and leaf quantification varied from 0.000301 to 0.1606 ng/mgDM. Mummified fruits were found onto the olive tree during fall and its quantification varied from 17.1 to 78.55 ng/mgDM. For trunk samples, quantification varied between values below the detection limit and 0.02718 ng/mgDM (data not shown).



**Fig. 4** *Colletotrichum acutatum* s.s. quantification along the year expressed as mean value per organ and evaluated month, DM: dry matter.

## 2.6 DISCUSSION

Present research represents the first study under Uruguayan olive crop conditions in which *Colletotrichum* survival, the causal agent of olive anthracnose, are strongly

analyzed. Accordingly with ours results, this pathogen is able of survive on different host-organs over the olive tree along the year.

In congruence with previously studies (Talhinhas et al. 2011, 2018; Cacciola et al. 2012; Moral and Trapero 2012), mummified fruits are the main *Colletotrichum* survival sites and therefore, the most important source of primary inoculum for olive anthracnose development. During sample collection, mummified fruits were present on the olive tree mainly during fall and winter but absent in the other seasons as previously reported by Talhinhas et al. (2011). However, when present they exhibited the highest incidence of *Colletotrichum* spp. and substantially the highest ng/mgDM of *C. acutatum* s.s. in comparison with the other organs analyzed. Those fruits that were not harvested are the ones that fully develop anthracnose disease reaching the mummification stage. Then, many of them fall to the ground during postharvest period, but others remaining attached to the olive tree serving as *Colletotrichum* inoculum source.

*Colletotrichum* spp. detection and *C. acutatum* s.s. quantification on leaves and branches presented significantly lower incidences and less ng/mgDM than mummified fruit, respectively. However, leaves and branches organs are always present along the year assuring *Colletotrichum* survival from one season to the next and guaranteeing the initial inoculum for flower and fruit infection in absence of mummify fruits. In fact, Moral and Trapero (2012) indicate that infected leaves and shoots are the major inoculum source for anthracnose infection. In addition, a higher incidence surviving was found in leaves and wood during fall and spring season in comparison with summer and winter, simultaneously with flower development and fruit ripening, respectively, the two main olive organs affected by this pathogen in Uruguay (Moreira et al. 2021).

Regard to trunk bark, this tissue could be dismissed as source of *Colletotrichum* survival due to the null detection of *Colletotrichum* and low quantification of *C. acutatum* s.s. compared with other categories evaluated. Also, despite the

*Colletotrichum* survival on olive organ collected from the ground was initially included in this study, it was disesteemed due the lack or poor detection of *Colletotrichum* structures in this samples (data no show). Talhinhos et al. (2011) mention that *Colletotrichum* was only successfully isolated from mummified fruits present on trees but not from fallen mummified fruits. Apparently, soil temperature and moisture reduce the *Colletotrichum* conidia viability in the soil suggesting that mummified fruits that fall on the soil are not an important inoculum source for olive anthracnose (Moral and Trapero 2012; Talhinhos et al. 2018). A similar situation could be occurring with pruning branches and fallen leaves.

Considering the different categories of leaf and wood, leaf from defoliated branch, yellow leaf and terminal dry branch were found as the main surviving place for *Colletotrichum*. The terminal dry branch has previously been mentioned as an important surviving place for *Colletotrichum* as well as the leaves (Moral et al. 2009, Talhinhos et al. 2011, 2018), but in these studies the type of leaves was not discriminated. Schena et al. (2017) found that senescent leaves had more cells/mg of tissue of *C. acutaum* and *C. godetiae* than green leaves and in our study, we found that yellow leaf and leaf from defoliated branch are the most important *Colletotrichum* survival place beside leaves categories.

The survival of *Colletotrichum* spp. on distinct host-structures of different hosts has been studied with similarities and differences to the present study. Nevertheless, the form in that *Colletotrichum* survives and how this pathogen reaches the susceptible organs the next season, has been few explored. Moral and Trapero (2012) mention that *Colletotrichum* can develop secondary conidia or form acervuli in infected leaves and branches. In citrus, was demonstrated that *Colletotrichum* conidia are wash-splayed from infected flowers to vegetative tissues where appressoria and possibly quiescent infections are formed. During the next flowering, substances produced in the petals stimulate germination of appressoria to form mycelia and conidia on the surface that are splash-dispersed to flowers (Agostini and Timmer 1994; Zulfiqar et al. 1996; Timmer et al. 1998). A similar mechanism maybe occurs



in olive trees explaining the *Colletotrichum* survival on vegetative organs simultaneously with flower development. Nevertheless, further studies are necessary to clarify how exactly *Colletotrichum* survives on olive vegetative organs ensuring the presence of primary inoculum during blossoms and ripening.

In summary, in this study we demonstrate that *Colletotrichum* can survive in different organ over the tree with mummify fruit as the most important place followed by leaves and branches. Into leaves, yellow leaf, and leaf from defoliated branch and into wood, terminal dry branch and healthy new branch as the most important survival sites. The fact that this pathogen survives in green tissues makes it difficult to implement strategies to reduce the primary inoculum, therefore, disease management should be focused on to prevent the establishment of infections in susceptible tissues. For that, fungicides application to protect susceptible tissue should be employed in combination with cultural practices such as pruning to promote sunlight infiltration and air circulation. Also, use less susceptible cultivars and promote a balanced fertilization as well as well-drained soils should be implemented.

## **2.7 ACKNOWLEDGEMENT**

This study was supported by Agroland S.A. and Nuevo Manantial S.R.L.

## **2.8 DATA AVAILABILITY**

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request. The data that support the findings of this study are available from.

## **2.9 DECLARATIONS**

**Ethical approval** This article does not contain any studies requiring ethical approval.

**Conflict of interest** All authors have no conflict of interest

## 2.10 REFERENCES

1. Agostini JP and Timmer LW (1994) Population dynamics and survival of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* on citrus in Florida. *Phytopathology* 84(4) 420-425. <https://doi.org/10.1094/Phyto-84-420>
2. Børve J and Stensvand A (2017) *Colletotrichum acutatum* occurs asymptotically on apple leaves. *European Journal of Plant Pathology* 147(4) 943-948. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1050-3>
3. Cacciola SO, Faedda R, Sinatra F, Agosteo GE, Schena L, Frisullo S, Di San Lio GM (2012) Olive Anthracnose. *Journal of Plant Pathology* 29-44. <https://www.jstor.org/stable/45156006>
4. Casanova L, Hernández L, Alaniz S, Mondino P (2016) Sitios y estructuras de sobrevivencia de *Colletotrichum* spp. causante de la podredumbre amarga del manzano. *Agrociencia* 20:68-73. ISSN 2301-1548
5. Chattaoui M, Raya MC, Bouri M, Moral J, Pérez-Rodríguez M, Trapero A, DMalle M, Rhouma A (2016) Characterization of a *Colletotrichum* population causing Anthracnose disease on olive in northern Tunisia. *Journal of Applied Microbiology* 120 1368–1381. <https://doi.org/10.1111/jam.13096>.
6. Conde P and Leoni C (2007) Enfermedades del olivo en Uruguay Las Brujas, Canelones. Jornada de divulgación. Resultados experimentales en olivos. INIA. Serie de Actividades de Difusión N.º 512: 7-11.

7. Conde-Innamorato P, Arias-Sibillotte M, Villamil JJ, Bruzzone J, Bernaschina Y, Ferrari V, Zoppolo R, Villamil J, Leoni C (2019) It is feasible to produce olive oil in temperate humid climate regions. *Frontiers in Plant Science* 10: 1544. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01544>
8. Debode J, Van Hemelrijck W, Baeyen S, Creemers P, Heungens K, Maes M (2009) Quantitative detection and monitoring of *Colletotrichum acutatum* in strawberry leaves using real-time PCR. *Plant Pathology* 58(3) 504-514. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01987.x>
9. Filoda PF, Arellano ADV, Dallagnol LJ (2021) *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum nymphaeae* causing blossom blight and fruit anthracnose on olives in southern Brazil. *Eur J Plant Pathol* 161 993–998. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02372-y>
10. Leoni C, Bruzzone J, Villamil JJ, Martínez C, Montelongo MJ, Bentancur O, Conde-Innamorato P (2018) Percentage of anthracnose (*Colletotrichum acutatum* s.s.) acceptable in olives for the production of extra virgin olive oil. *Crop Protection* 108 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.02.013>
11. Iliadi MK, Tjamos EC, Antoniou PP, Tsitsigiannis DI. (2018) First report of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose on olives in Greece. *Plant Disease* 102(4) 820. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-17-1451-PDN>
12. López-Moral A, Agustí-Brisach C, Lovera M, Arquero O, Trapero A (2020) Almond anthracnose: Current knowledge and future perspectives. *Plants* 9:8 945. <https://doi.org/10.3390/plants9080945>
13. McKay SF, Shtienberg D, Sedgley M, Scott ES (2014) Anthracnose on almond in Australia: Disease progress and inoculum sources of *Colletotrichum acutatum*. *Eur. J. Plant Pathol* 139:773–783. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0431-8>.

14. MGAP-DIEA (2021)  
<https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2021/LIBRO%20ANUARIO%202021%20Web.pdf> (Accessed May 2022).
15. Moral J, de Oliveira R, Trapero A (2009) Elucidation of disease cycle of olive anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology* 99 548–556. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-5-0548>.
16. Moral J and Trapero A (2012) Mummified fruit as a source of inoculum and disease dynamics of olive anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. *Phytopathology* 102(10) 982-989. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-11-0343>
17. Moral J, Xavier C, Roca LF, Romero J, Moreda W, Trapero A (2014) La antracnosis del olivo y su efecto en la calidad del aceite. *Grasas y Aceites* 65 e028. <https://doi.org/10.3989/gya.110913>
18. Moreira V, Mondino P, Alaniz S (2021) Olive anthracnose caused by *Colletotrichum* in Uruguay: symptoms, species diversity and pathogenicity on flowers and fruits. *Eur J Plant Pathol* 160 663–681. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02274-z>
19. Pereira J, Bernal J, Martinelli L, Villamil JJ, Conde P (2016) Original olive genotypes found in Uruguay identified by morphological and molecular markers. *Acta Horticulturae* 1199 7-13. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1199.2>
20. Romero, J., Santa-Bárbara, A. E., Moral, J., Agustí-Brisach, C., Roca, L. F., & Trapero, A. (2022). Effect of latent and symptomatic infections by *Colletotrichum godetiae* on oil quality. *European Journal of Plant Pathology*, 163(3), 545-556. [https://doi.org/10.1016/S0048-4059\(81\)80010-0](https://doi.org/10.1016/S0048-4059(81)80010-0)

21. Schena L, Abdelfattah A, Mosca S, Li Destri Nicosia MG, Agosteo GE, Cacciola SO (2017) Quantitative detection of *Colletotrichum godetiae* and *C. acutatum* sensu stricto in the phyllosphere and carposphere of olive during four phenological phases. *European Journal of Plant Pathology* 149(2) 337-347. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-17-0133-R>
22. Sergeeva V, Spooner-Hart R, Nair NG (2008) First report of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* causing leaf spots of olives (*Olea europaea*) in Australia. *Australasian Plant Disease Notes* 3(1) 143-144. <https://doi.org/10.1007/BF03211271>
23. Sergeeva V (2014) The Role of Epidemiology Data in Developing Integrated Management of Anthracnose in Olives-a Review. VII International Symposium in Olive Growing. *Acta Horticulturae* 1057. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1057.19>
24. Sharma G, Maymon M, Freeman S (2017) Epidemiology, pathology and identification of *Colletotrichum* including a novel species associated with avocado (*Persea americana*) anthracnose in Israel. *ScientificReports* 7:1-16. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15946-w>
25. Stensvand A, Børve J, Talgø V (2017) Overwintering diseased plant parts and newly infected flowers and fruit as sources of inoculum for *Colletotrichum acutatum* in sour cherry. *Plant Disease* 101:7:1207-1213. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-16-1599-RE>
26. Talhinhos P, Sreenivasaprasad S, Neves-Martins J, Oliveira H (2005) Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6) 2987-2998. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.2987-2998.2005>

27. Talhinhos P, Neves-Martins J, Olivera H, Sreenivasaprasad S (2009) The distinctive population structure of *Colletotrichum* species associated with olive anthracnose in the Algarve region of Portugal reflects a host-pathogen diversity host post. FEMS Microbiology Letters. 296: 31-39. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01613.x>
28. Talhinhos P, Mota-Capitão C, Martins S, Ramos AP, Neves-Martins J, Guerra-Guimarães L, Oliveira H (2011) Epidemiology, histopathology and aetiology of olive anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in Portugal. Plant Pathology 60(3) 483-495. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02397.x>
29. Talhinhos P, Loureiro A, Oliveira H (2018) Olive anthracnose: a yield-and oil quality-degrading disease caused by several species of *Colletotrichum* that differ in virulence, host preference and geographical distribution. Molecular plant pathology 19(8) 1797-1807. <https://doi.org/10.1111/mpp.12676>
30. Timmer LW, Brown GE, Zitko SE (1998) The role of *Colletotrichum* spp. in postharvest anthracnose of citrus and survival of *C. acutatum* on fruit. Plant Dis. 82:415-418. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.4.415>
31. Verma N, MacDonald L, Punja ZK (2007) Environmental and host requirements for field infection of blueberry fruits by *Colletotrichum acutatum* in British Columbia. Plant Pathology 56(1) 107-113. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01450.x>
32. Zulfiqar M, Brlansky RH, Timmer LW (1996) Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. Mycologia 88:1121-128. <https://doi.org/10.2307/3760791>

### **3. DISCUSIÓN GENERAL**

La introducción de especies vegetales en zonas diferentes a las áreas tradicionales de producción constituye un desafío, ya que su éxito depende de la capacidad de estas de adaptarse a condiciones agroecológicas y productivas diferentes. En general, la expansión de cultivos hacia nuevas áreas ocurre a impulso de empresarios agrícolas que ven una oportunidad de inversión y de nuevos mercados. Es usual que esta expansión se adelante en el tiempo a la generación de conocimiento científico, por lo que suelen cometerse errores que provocan una serie de avances y retrocesos. Un ejemplo de esto es la introducción de variedades sin una previa evaluación de su comportamiento y adaptación a la nueva zona de producción.

La introducción y expansión comercial del cultivo del olivo en Uruguay no escapó a esa lógica y así fue como se introdujeron variedades sin haberse hecho estudios previos en profundidad acerca de su adaptabilidad a las características agroecológicas existentes en nuestro país.

Uruguay tiene un clima que se caracteriza por sus temperaturas moderadas, con una media anual de alrededor de 17 °C, aunque pueden alcanzarse los 30 °C en los meses de verano (diciembre a febrero) y descender hasta 5-10 °C en invierno (junio a agosto). La humedad relativa promedio varía entre 60 y 80 % durante todo el año. El promedio anual de precipitaciones es de, aproximadamente, 1.100 mm, con una distribución relativamente uniforme a lo largo del año. Comparado con el clima en la cuenca del Mediterráneo, lugar de origen del cultivo de olivo, las diferencias son notorias. El clima mediterráneo es más cálido y seco respecto al de Uruguay, con temperaturas promedio que oscilan entre 20 y 25 °C durante todo el año y con menor cantidad de precipitaciones, con una media anual que varía entre 300-800 mm. La humedad relativa también es inferior en el clima mediterráneo, con un promedio de alrededor del 50-60 %. (INUMET, s. f., WCRP, s. f., WWIS, s. f).

Este hecho generó una brecha entre la información y conocimiento disponible para el cultivo y la realidad productiva a la que se enfrenta Uruguay. Dada esta situación, el sector productivo comenzó a demandar información acerca del comportamiento de las variedades, su capacidad de adaptación y su potencial productivo en nuestras condiciones.

En respuesta, investigadores del INIA han desarrollado distintas líneas de trabajo en las que se ha evaluado la adaptación de una serie de cultivares para las condiciones del norte y del sur del país. Así es que Conde-Innamorato et al. (2019) realizaron un estudio pormenorizado en el que evaluaron la adaptabilidad del cultivo a las condiciones uruguayas de producción en términos de eficiencia productiva y calidad de los aceites obtenidos. Los autores llegaron a la conclusión de que es posible producir aceites de oliva virgen extra en nuestras condiciones agroecológicas. Fruto de ese trabajo se publica un *Catálogo de Cultivares de Olivo*, en donde se describe el comportamiento fenológico de los principales cultivares de olivo (Conde et al., 2019).

Además de concluir que la producción de olivos en Uruguay es viable, estos autores hacen referencia a que el manejo de la sanidad del cultivo se visualiza como una de las mayores limitantes debido a que nuestro clima es conducente al desarrollo de varias enfermedades. Las condiciones climáticas, especialmente las altas precipitaciones y alta humedad, favorecen el desarrollo de enfermedades, lo que facilita la ocurrencia de brotes epidémicos en algunos años. Además, en nuestra región, las enfermedades son un problema primario, por encima de las plagas, a diferencia de lo que ocurre en la zona del Mediterráneo, donde las plagas representan la mayor amenaza para el cultivo de olivos.

La principal característica que comparten los tres cultivares que ocupan mayor superficie en Uruguay (Arbequina, Coratina y Picual) es la precocidad en la entrada en producción. Probablemente, esta haya sido una de las características tenidas en cuenta a la hora de realizar la introducción. Sin embargo, no se encuentran registros



de estudios de prospección de variedades previos a la reintroducción del cultivo en el país. En el mismo catálogo, se detalla que Arbequina fue evaluada como muy sensible a antracnosis, tanto en fruta madura como en verde, y susceptible a enfermedades foliares; Coratina, susceptible a emplomado y antracnosis, y Picual, sensible a emplomado y antracnosis.

Esta última enfermedad, la antracnosis, causada por diferentes especies de hongos pertenecientes al género *Colletotrichum*, es la principal enfermedad del cultivo en el mundo (Cacciola et al., 2012) y es especialmente grave en nuestro país (Moreira et al., 2021, Moreira et al., 2022, Moreira et al., 2023).

La presente investigación representa el primer estudio sobre la sobrevivencia de *Colletotrichum* spp. en el cultivo del olivo para las condiciones de producción uruguayas. Los resultados obtenidos indican que este patógeno permanece sobre distintos órganos de la planta de un año al otro.

En concordancia con lo previamente reportado (Talhinhas et al., 2011, 2018, Cacciola et al., 2012, Moral y Trapero, 2012), se encontró que los frutos momificados son el principal sitio de sobrevivencia de *Colletotrichum* y, por tanto, la principal fuente de inóculo primario para el desarrollo de la antracnosis del olivo.

Para el período muestreado, los frutos momificados pudieron ser encontrados sobre el árbol en los meses de otoño-invierno, no así en los meses de primavera-verano tal como reportara Talhinhas et al. (2011). Sin embargo, en los momentos que pudieron ser encontrados exhibieron la mayor incidencia de *Colletotrichum* spp. y significativamente mayores cantidades ng/mgMS (materia seca) de *C. acutatum* s. s. en comparación con los restantes órganos analizados. Estos frutos, que no fueron cosechados durante el otoño y permanecieron sobre el árbol, son los que desarrollaron completamente la antracnosis y alcanzaron el punto de fruto momificado.

Posteriormente, varios de estos frutos cayeron al suelo durante la poscosecha mientras que otros, tal como fue mencionado, permanecieron sobre el árbol actuando como fuente de inóculo de *Colletotrichum*.

La detección de *Colletotrichum* spp. y la cuantificación de *C. acutatum* s.s. en hojas y en ramas mostraron incidencias y ng/mgMS significativamente menores respecto a los frutos momificados. Sin embargo, tanto hojas como ramas están presentes en el cultivo a lo largo de todo el año asegurando la sobrevivencia de *Colletotrichum* de una temporada a la siguiente, lo que garantiza la presencia de inóculo inicial para la infección de flores y frutos, independientemente de la presencia o ausencia de frutos momificados a campo.

En esta línea, Moral y Trapero (2012) indican que hojas y brotes son una importante fuente de inóculo para el desarrollo de infecciones de antracnosis al tiempo que una mayor incidencia de sobrevivencia del patógeno ha sido determinada tanto en hojas como en madera durante otoño y primavera respecto de verano e invierno, momentos que coinciden con el desarrollo de flor (primavera) y la madurez de fruto (otoño), los dos órganos mayormente afectados por *Colletotrichum* en Uruguay (Moreira et al., 2021).

En lo que hace a la corteza del tronco principal, este tejido podría ser desestimado como fuente de *Colletotrichum* debido a la no detección de *Colletotrichum* spp. y la baja cuantificación de *C. acutatum* s.s. en comparación con las otras categorías evaluadas. De la misma manera, si bien inicialmente fue incluido el estudio de la sobrevivencia de *Colletotrichum* en órganos colectados desde el suelo, estos fueron desestimados debido a la pobre o nula detección de estructuras de *Colletotrichum* spp. en estas muestras (datos no presentados). Talhinhos et al. (2011) mencionan que *Colletotrichum* pudo ser aislado con éxito de frutos muestreados sobre el árbol, pero no así de frutos momificados tomados del suelo. Aparentemente, las condiciones de temperatura y humedad de suelo reducen la viabilidad de los conidios de *Colletotrichum*, por lo que se desestima la importancia de estos como fuente de

inóculo para el desarrollo de la antracnosis del olivo (Moral y Trapero 2012, Talhinhos et al., 2018). Una situación similar a la descrita podría estar ocurriendo con las hojas y la madera producto de restos de poda muestreada desde el suelo.

Considerando las distintas categorías estudiadas dentro de los órganos hoja y madera, hojas provenientes de ramas defoliadas, hojas amarillas y ramas terminales secas fueron determinadas como los principales sitios de sobrevivencia de *Colletotrichum*. Las ramas secas terminales han sido mencionadas con anterioridad como un importante sitio de sobrevivencia, así como también las hojas (Moral et al., 2009, Talhinhos et al., 2011, 2018). Sin embargo, en estos estudios no se discriminó entre tipo de hojas. Schena et al. (2017) encontraron mayor cantidad de células de *C. acutatum* y *C. godetidae* por miligramo de hojas senescentes respecto de hojas verdes, mientras que en este estudio hemos encontrado que las hojas amarillas y las hojas provenientes de ramas defoliadas son los sitios de sobrevivencia de *Colletotrichum* de mayor importancia dentro de las categorías de hojas analizadas.

La sobrevivencia de *Colletotrichum* ha sido estudiada, con diferencias y similitudes con presente trabajo, para una amplia diversidad de estructuras y huéspedes (cultivos). Sin embargo, la forma en la que el patógeno sobrevive y las vías mediante las cuales alcanza los órganos susceptibles a la siguiente temporada han sido escasamente profundizadas. Moral y Trapero (2012) afirman que *Colletotrichum* puede desarrollar conidios secundarios o formar acérvulos en las hojas y ramas infectadas. En cítricos ha sido demostrado que los conidios de *Colletotrichum* son dispersados por salpicado de agua desde las flores infectadas hacia tejidos vegetativos, donde forman apresorios y probablemente desarrollan infecciones quiescentes. Durante la floración de la siguiente temporada de cultivo, sustancias producidas en los pétalos estimulan la germinación de los apresorios, se forma micelio y conidios en la superficie del tejido que serán salpicados hacia las flores (Agostini y Timmer, 1994, Zulfiqar et al., 1996, Timmer et al., 1998).

Un mecanismo similar al descrito quizá sea el que ocurre en los árboles de olivo, lo que explicaría cómo *Colletotrichum* sobrevive en órganos vegetativos de manera simultánea con el desarrollo de las flores. A pesar de esto, es necesario profundizar en cómo *Colletotrichum* sobrevive en los órganos vegetativos del olivo, ya que así es asegurada la presencia de inóculo primario durante la floración y durante la maduración de las aceitunas.

#### 4. CONCLUSIONES GENERALES

En este estudio se demostró que *Colletotrichum* puede sobrevivir sobre distintos órganos del olivo, siendo los frutos momificados el principal sitio seguido de hojas y ramas.

Dentro de las hojas, las categorías hoja de rama defoliada y hoja amarilla son observadas como principales sitios de sobrevivencia.

Dentro de las ramas, las categorías ramas terminales secas y ramas terminales sanas (verdes) han sido determinadas como principales sitios de sobrevivencia.

El hecho de que este patógeno sobreviva en tejido verde dificulta la implementación de estrategias de manejo que apunten a la reducción de inóculo primario, por lo que el manejo de la antracnosis del olivo debería enfocarse hacia la prevención del establecimiento de infecciones en los tejidos susceptibles.

La aplicación de fungicidas con el objetivo de proteger los tejidos susceptibles debe ser combinada con prácticas de control cultural, como ser la poda, para mejorar la aireación dentro de la copa del árbol y facilitar la llegada de los fungicidas a su interior.

En este mismo sentido, debería tenderse a fertilizaciones balanceadas, así como promover condiciones de buen drenaje de agua de los suelos.

También debería repensarse la implantación de cultivares altamente susceptibles, como ser Arbequina, que, en el caso de nuestro país, representa el 50 % del olivar.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- Ackermann MN, Gorga L. 2019. Situación de la cadena del olivo. En MGAP-DIEA Anuario 2019 (pp. 289-303). [En línea] Fecha de último acceso: 1 de junio, 2023. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/anuario-estadistico-diea-2019>
- Agostini JP, Timmer LW. 1994. Population dynamics and survival of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* on citrus in Florida. *Phytopathology* 84(4) 420-425. <https://doi.org/10.1094/Phyto-84-420>
- Børve J, Stensvand A. 2017. *Colletotrichum acutatum* occurs asymptotically on apple leaves. *European Journal of Plant Pathology* 147(4) 943-948. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1050-3>
- Cacciola SO, Faedda R, Sinatra F, Agosteo GE, Schena L, Frisullo S, Di San Lio GM. 2012. Olive Anthracnose. *Journal of Plant Pathology* 29-44. <https://www.jstor.org/stable/45156006>
- Cannon PF, Damm U, Johnston PR, Weir BS. 2012. *Colletotrichum* - current status and future directions. *Studies in Mycology* 2 15;73(1):181-213. doi: 10.3114/sim0014. PMID: 23136460; PMCID: PMC3458418.
- Casanova L, Hernández L, Alaniz S, Mondino P. 2016. Sitios y estructuras de sobrevivencia de *Colletotrichum* spp. causante de la podredumbre amarga del manzano. *Agrociencia* 20:68-73. ISSN 2301-1548
- COI. (Consejo Oleícola Internacional). [En línea] Fecha de último acceso: 2 de junio, 2023. 2022. Normas COI, métodos y guías. Disponible en: <https://www.internationaloliveoil.org/que-hacemos/unidad-de-quimica-y-normalizacion/normas-coi-metodos-y-guias/?lang=es>
- Conde P, Leoni C. 2007. Enfermedades del olivo en Uruguay Las Brujas, Canelones. Jornada de divulgación. Resultados experimentales en olivos. INIA. Serie de Actividades de Difusión N.º 512: 7-11.
- Conde P, Villamil JJ, Bruzzone J, Leoni C, Zoppolo R, Villamil J. (Eds.). 2019. Catálogo de cultivares de olivos 2019. Evaluados en INIA-Uruguay. Montevideo (UY): INIA. 73 p. (INIA Boletín de Divulgación; 117).

- Conde-Innamorato P, Arias-Sibillotte M, Villamil JJ, Bruzzone J, Bernaschina Y, Ferrari V, Zoppolo R, Villamil J, Leoni C. 2019. It is feasible to produce olive oil in temperate humid climate regions. *Frontiers in Plant Science* 10: 1544. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01544>
- Da Silva LL, Moreno HL, Correia HLN, Santana MF, de Queiroz MV. 2020. *Colletotrichum*: species complexes, lifestyle, and peculiarities of some sources of genetic variability. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 1891-1904. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10363-y>
- Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J, Foster GD. 2012. Top 10 Plant Pathogenic Bacteria and Fungi Molecular Genetics, Genomics and Evolution. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Damm U, Cannon PF, Woudenberg JHC, Crous PW. 2012a. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in mycology*, 73, 37-113. <https://doi.org/10.3114/sim0010>
- Damm U, Cannon PF, Woudenberg JHC, Johnston PR, Weir BS, Tan YP, Crous PW. 2012b. The *Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in mycology*, 73(1), 1-36. <https://doi.org/10.3114/sim0002>
- Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F, Martínez-González MA. 2013. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *New England Journal of Medicine*, 368(14), 1279-1290. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200303>
- FAO. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2023 [En línea] Fecha de último acceso: 15 de mayo, 2023. FAOSTAT. Disponible en: <https://www.fao.org/faostat/es/#data>
- Filoda PF, Arellano ADV, Dallagnol LJ. 2021. *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum nymphaeae* causing blossom blight and fruit anthracnose on olives in southern Brazil. *European Journal Plant Pathology* 161 993–998. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02372-y>

- Iliadi MK, Tjamos EC, Antoniou PP, Tsitsigiannis DI. 2018. First report of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose on olives in Greece. *Plant Disease* 102(4) 820. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-17-1451-PDN>
- INUMET. (s.f.). (Instituto Uruguayo de Meteorología.) Clima de Uruguay. [En línea] Fecha de último acceso: 8 de mayo, 2023. Disponible en: <https://www.meteorologia.gub.uy/clima-uruguay.html>.
- Khan A, Hsiang T. 2003. The infection process of *Colletotrichum graminicola* and relative aggressiveness on four turfgrass species. *Canadian Journal of Microbiology*, 49(7), 433-442. <https://doi.org/10.1139/w03-059>
- Leoni C, Bruzzone J, Villamil JJ, Martínez C, Montelongo MJ, Bentancur O, Conde-Innamorato P. 2018. Percentage of anthracnose (*Colletotrichum acutatum* s.s.) acceptable in olives for the production of extra virgin olive oil. *Crop Protection* 108 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.02.013>
- Lucena B, Manrique T, Méndez MA. 1997. La Olivicultura en el mundo y en España. Capítulo 1. D. Barranco, R. Fernández-Escobar y L. Rallo (eds.). *El cultivo del olivo*. Madrid. Ediciones Mundi-Prensa y Junta de Andalucía. 3-33.
- Materatski P, Varanda C, Carvalho T, Dias AB, Campos MD, Rei F, Félix MDR. 2018. Diversity of *Colletotrichum* species associated with olive anthracnose and new perspectives on controlling the disease in Portugal. *Agronomy*, 8(12), 301. <https://doi.org/10.3390/agronomy8120301>
- MGAP. (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca) 2020. Censo de productores de olivo. [En línea] Fecha de último acceso: 8 de mayo, 2023. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/estadisticas/censo-de-olivicultores>
- MGAP-DIEA. (Ministerio de ganadería, Agricultura y Pesca-Dirección de Estadística Agropecuaria). 2021. Anuario [En línea] Fecha de último acceso: 22 de mayo, 2023. Disponible en: <https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2021/LIBRO%20ANUARIO%202021%20Web.pdf>
- Moral J, de Oliveira R, Trapero A 2009. Elucidation of disease cycle of olive anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology* 99 548–556. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-5-0548>.



- Moral J, Jurado-Bello J, Sánchez MI, de Oliveira R, Trapero A. 2012. Effect of temperature, wetness duration, and planting density on olive anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. *Phytopathology*, 102(10), 974-981.
- Moral J, Trapero A. 2012. Mummified fruit as a source of inoculum and disease dynamics of olive anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. *Phytopathology* 102(10) 982-989. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-11-0343>
- Moral J, Xavier C, Roca LF, Romero J, Moreda W, Trapero A. 2014. La antracnosis del olivo y su efecto en la calidad del aceite. *Grasas y Aceites* 65 e028. <https://doi.org/10.3989/gya.110913>
- Moreira V, Carbone MJ, Mondino P, Alaniz S. 2023. *Colletotrichum* infections during flower development and fruit ripening in four olive cultivars. *Phytopathologia Mediterranea*.
- Moreira V, Ferronato B, de Benedetti F, González-Barrios P, Mondino P, Alaniz S. 2022. Incidence of *Colletotrichum* latent infections during olive fruit development under Uruguayan environmental conditions. *International Journal of Pest Management*. <https://doi.org/10.1080/09670874.2022.2119490>
- Moreira V, Mondino P, Alaniz S. 2021. Olive anthracnose caused by *Colletotrichum* in Uruguay: symptoms, species diversity and pathogenicity on flowers and fruits. *Eur J Plant Patholgy* 160 663–681. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02274-z>
- Münch S, Lingner U, Floss DS, Ludwig N, Sauer N, Deising HB. 2008. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *Journal of plant physiology*, 165(1), 41-51. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.06.008>
- Ntahimpera, N, Madden LV, Wilson LL. 1997. Effect of rain distribution alteration on splash dispersal of *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology*, 87(6), 649-655. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.6.649>
- Parras M. 2012. El plan de refuerzo de la competitividad del conglomerado agroindustrial olivícola de Uruguay 2012-2020. [En línea] Fecha de último acceso: 18 de julio, 2023. Disponible en: [https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/documentos/publicaciones/plan\\_conglomerado\\_olivicola\\_2012-2020.pdf](https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/documentos/publicaciones/plan_conglomerado_olivicola_2012-2020.pdf)

- Phillips P. 2015. “Mediterranean” Dietary Pattern for the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: Summaries of Nursing Care-Related Systematic Reviews From the Cochrane Library. *Journal of Cardiovascular Nursing*, 30(3), 188-189. <https://doi.org/10.1097/JCN.0000000000000182>
- Ranathunge NP, Mongkolporn, O, Ford R., Taylor PWJ. 2012. *Colletotrichum truncatum* pathosystem on *Capsicum* spp: infection, colonization and defence mechanisms. *Australasian Plant Pathology*, 41, 463-473. <https://doi.org/10.1007/s13313-012-0156-0>
- Romero J, Santa-Bárbara AE, Moral J, Agustí-Brisach, C, Roca LF, Trapero A. 2022. Effect of latent and symptomatic infections by *Colletotrichum godetiae* on oil quality. *European Journal of Plant Pathology*, 163(3), 545-556. [https://doi.org/10.1016/S0048-4059\(81\)80010-0](https://doi.org/10.1016/S0048-4059(81)80010-0)
- Schena L, Abdelfattah A, Mosca S, Li Destri Nicosia MG, Agosteo GE, Cacciola SO. 2017. Quantitative detection of *Colletotrichum godetiae* and *C. acutatum* sensu stricto in the phyllosphere and carposphere of olive during four phenological phases. *European Journal of Plant Pathology* 149(2) 337-347. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-17-0133-R>
- Schena L, Mosca S, Cacciola SO, Faedda R, Sanzani SM, Agosteo GE, Sergeeva V, Magnano G. 2014. Species of the *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. boninense* complexes associated with olive anthracnose. *Plant Pathology*, 63(2), 437-446. <https://doi.org/10.1111/ppa.12110>
- Sergeeva V, Spooner-Hart R, Nair NG. 2008. First report of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* causing leaf spots of olives (*Olea europaea*) in Australia. *Australasian Plant Disease Notes* 3(1) 143-144. <https://doi.org/10.1007/BF03211271>
- Sergeeva V. 2011. What is effective against anthracnose. *The Olive Press*, 3(16), 22-24.
- Sergeeva V. 2014. The Role of Epidemiology Data in Developing Integrated Management of Anthracnose in Olives-a Review. VII International Symposium in Olive Growing. *Acta Horticulturae* 1057. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1057.19>
- Silveira A, López S, Gándara J, Pereira J. 2012. Reseña Histórica del Cultivo de Olivo en Uruguay desde la Época Colonial hasta el presente. In VII International Symposium on olive growing. San Juan, Argentina.

- Stensvand A, Børve J, Talgø V. 2017. Overwintering diseased plant parts and newly infected flowers and fruit as sources of inoculum for *Colletotrichum acutatum* in sour cherry. *Plant Disease* 101:7:1207-1213. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-16-1599-RE>
- Talhinhas P, Loureiro A, Oliveira H. 2018. Olive anthracnose: a yield-and oil quality-degrading disease caused by several species of *Colletotrichum* that differ in virulence, host preference and geographical distribution. *Molecular plant pathology* 19(8) 1797-1807. <https://doi.org/10.1111/mpp.12676>
- Talhinhas P, Mota-Capitão C, Martins S, Ramos AP, Neves-Martins J, Guerra-Guimarães L, Oliveira H. 2011. Epidemiology, histopathology and aetiology of olive anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in Portugal. *Plant Pathology* 60(3) 483-495. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02397.x>
- Talhinhas P, Neves-Martins J, Olivera H, Sreenivasaprasad S. 2009. The distinctive population structure of *Colletotrichum* species associated with olive anthracnose in the Algarve region of Portugal reflects a host-pathogen diversity hostpost. *FEMS Microbiology Letters*. 296: 31-39. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01613.x>
- Talhinhas P, Sreenivasaprasad S, Neves-Martins J, Oliveira H. 2005. Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6) 2987-2998. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.2987-2998.2005>
- Tapia F, Astoga M, Ibacache A, Martínez L, Sierra C, Quiroz C, Larraín P, Riveros F. 2003. Manual del cultivo del Olivo. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, La Serena. Chile. Boletín INIA N° 101. ISSN 0717-4829
- Tapia F, Selles G, Fichet T. 2012. Following Olive Footprints in Chile. In Luque (Ed.), *Following Olive Footprints (Olea europaea L.): Cultivation and Culture, Folklore and History, Traditions and Uses* (pp. 446). Cordoba-Spain
- Timmer LW, Brown GE, Zitko SE. 1998. The role of *Colletotrichum* spp. in postharvest anthracnose of citrus and survival of *C. acutatum* on fruit. *Plant Disease*. 82:415-418. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.4.415>

- Trapero A, Blanco MA. 2008. "Enfermedades". D. Barranco, R. Fernández-Escobar y L. Rallo (eds.). El cultivo del olivo. Madrid. Ediciones Mundi-Prensa y Junta de Andalucía. 595-656.
- Trapero A, Roca LF, Moral J, Trapero C, López-Escudero FJ. 2009. Las enfermedades y su manejo en el olivar ecológico. [En línea] Fecha de último acceso: 10 de julio, 2023. Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Juan-Moral-5/publication/275891078\\_CAPITULO\\_7\\_LAS\\_ENFERMEDADES\\_Y\\_SU\\_MANEJO\\_EN\\_EL\\_OLIVAR\\_ECOLOGICO/links/5548e980cf205bce7abfc99/CAPITULO-7-LAS-ENFERMEDADES-Y-SU-MANEJO-EN-EL-OLIVAR-ECOLOGICO.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Juan-Moral-5/publication/275891078_CAPITULO_7_LAS_ENFERMEDADES_Y_SU_MANEJO_EN_EL_OLIVAR_ECOLOGICO/links/5548e980cf205bce7abfc99/CAPITULO-7-LAS-ENFERMEDADES-Y-SU-MANEJO-EN-EL-OLIVAR-ECOLOGICO.pdf)
- Trapero Casas A. 2003. El Antracnosis o Aceituna jabonosa en el cultivo del olivo. [En línea] Fecha de último acceso: 11 de julio, 2023. Disponible en: [http://www.mapa.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf\\_vrural/Vrural\\_2003\\_168\\_46\\_50.pdf](http://www.mapa.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_vrural/Vrural_2003_168_46_50.pdf)
- Verma N, MacDonald L, Punja ZK. 2007. Environmental and host requirements for field infection of blueberry fruits by *Colletotrichum acutatum* in British Columbia. Plant Pathology 56(1) 107-113. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01450.x>
- Villamil J. 2009. La Olivicultura en el Uruguay. [En línea]. Consultado 7 mayo 2023. Disponible en: <http://www.inia.org.uy/estaciones/ttres/actividades/Villamil.pdf>
- WCRP. (s.f.). (World Climate Research Programme. Mediterranean climate). [En línea] Fecha de último acceso: 8 de mayo, 2023. Disponible en: <https://www.wcrp-climate.org/mediterranean-climate>.
- Weir BS, Johnston PR, Damm U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in mycology*, 73, 115-180. <https://doi.org/10.3114/sim0011>
- WWIS. (s.f.). (World Weather Information Service. Climate data for selected locations). [En línea] Fecha de último acceso: 10 de julio, 2023. Disponible en: <https://worldweather.wmo.int/en/home.html>.
- Zulfiqar M, Brlansky RH, Timmer LW. 1996. Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. *Mycologia* 88:1121-128. <https://doi.org/10.2307/3760791>