



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Contribución al conocimiento del emplomado del olivo en Uruguay

Ing. Agr. (MSc.) Pamela Lombardo

Doctora en Ciencias Agrarias

Abril, 2025

Contribución al conocimiento del emplomado del olivo en Uruguay

Ing. Agr. (MSc.) Pamela Lombardo

Doctora en Ciencias Agrarias

Abril, 2025

Tesis aprobada por el tribunal integrado por la Dra (Ing. Agr.) Mercedes Arias (presidenta), Dr. Carlos Agustí-Brisach (vocal) y la Dra. (Ing. Agr.) Paula Conde (vocal) el 8 de abril de 2025. Autora: Ing. Agr. (MSc.) Pamela Lombardo. Director: Dr. (Ing. Agr.) Pedro Mondino. Codirectora: Dra. (Ing. Agr.) Sandra Alaníz.

Agradecimientos

A mis tutores, Pedro y Sandra por su orientación, dedicación, consejos y apoyo en todo el proceso de elaboración de este trabajo de la tesis, y al GD de Fitopatología por su colaboración, en especial a las colegas Victoria, Bárbara y Elisa.

Agradezco a los miembros del tribunal, a Mercedes, Paula y Carlos por haber aceptado formar parte del mismo, por su interés y tiempo dedicado a este trabajo.

Agradezco a la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) y a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por la financiación de parte de la tesis de doctorado a través del siguiente proyecto de investigación y de la beca:

- Proyecto CSIC *Iniciación a la investigación* (INI-2017): «Identificación, caracterización y estudio epidemiológico del Emplomado del olivo en Uruguay». Abril 2018-marzo 2020.
- Beca ANII para estudios de posgrados nacionales: POS_NAC_2017_1_141615. Abril 2018-marzo 2021.

A INIA Las Brujas, a Paula, Diana, Yesica y Valentina, y en especial a Carolina Leoni por aceptarme como su pasante, por su disposición y consejos en todo momento.

A los integrantes de la empresa Olivares Salteños, Carlos Franchi, Matías Ferrari y a Ana C. Lucas, por permitirme realizar los ensayos de campo en su establecimiento y por su amable disposición.

Al personal de la Unidad de Posgrados y Educación Permanente de la Facultad de Agronomía, Udelar, por estar siempre dispuestas a responder mis consultas y por su buena predisposición.

A mi familia, por su amor incondicional, su apoyo constante y por ser mi refugio y sostén en cada etapa de este camino.

A todos muchas gracias.

Tabla de contenido

	Página
Página de aprobación.....	III
Agradecimientos	IV
Resumen.....	VIII
Summary	IX
<u>1. Introducción</u>	<u>1</u>
1.1. Contexto de la olivicultura en el mundo y en Uruguay.....	1
1.2. Principales enfermedades del olivo	7
1.3. Emplomado del olivo.....	10
<u>1.3.1. Sintomatología.....</u>	<u>10</u>
<u>1.3.2. Agente causal.....</u>	<u>14</u>
<u>1.3.3. Características morfológicas del patógeno</u>	<u>15</u>
<u>1.3.4. Ciclo de vida y epidemiología</u>	<u>18</u>
<u>1.3.5. Susceptibilidad varietal.....</u>	<u>21</u>
<u>1.3.6. Manejo de la enfermedad</u>	<u>24</u>
1.4. Emplomado del olivo en Uruguay.....	25
1.5. Hipótesis y objetivos	27
<u>1.5.1. Hipótesis del trabajo</u>	<u>27</u>
<u>1.5.2. Objetivo general</u>	<u>27</u>
<u>1.5.3. Objetivos específicos</u>	<u>27</u>
1.6. Estructura de la tesis	28
<u>2. Mancha foliar por Cercospora del olivo en Uruguay</u>	<u>29</u>
2.1. Resumen	29
2.2. Summary	30
2.3. Introduction	31
2.4. Materials and methods.....	32
<u>2.4.1. Field symptoms and fungal isolates.....</u>	<u>32</u>
<u>2.4.2. Morphological characterization of isolates.....</u>	<u>33</u>
<u>2.4.3. Effects of temperature on isolate mycelium growth.....</u>	<u>33</u>
<u>2.4.4. Molecular characterization of isolates</u>	<u>36</u>

2.4.4.1. DNA extraction, PCR analysis and sequencing.....	36
2.4.4.2. Phylogenetic analyses	37
2.4.5. <u>Characterization of infection under field conditions</u>	40
2.5. Results.....	41
2.5.1. <u>Field symptoms and fungal isolates</u>	41
2.5.2. <u>Morfological characterization of isolates</u>	43
2.5.3. <u>Effects of temperature on mycelial growth</u>	44
2.5.4. <u>Phylogenetic analyses</u>	45
2.5.5. <u>Characterization of infection under field conditions</u>	48
2.6. Discussion	50
2.7. Literature cited	52
<u>3. Mancha foliar por Cercospora en olivo: producción de inóculo y momento de las infecciones a lo largo del año</u>	<u>56</u>
3.1. Resumen	56
3.2. Summary	57
3.3. Introduction	58
3.4. Materials and methods.....	60
3.4.1. <u>Evolution of inoculum production throughout the year</u>	60
3.4.2. <u>Identification of field infection periods.</u>	60
3.4.3. <u>Meteorological variables</u>	61
3.4.4. <u>Statistical analysis</u>	62
3.5. Results.....	62
3.5.1. <u>Evolution of inoculum production throughout the year</u>	62
3.5.2. <u>Identification of field infection periods</u>	68
3.6. Discussion	69
3.7. References	73
<u>4. Eficiencia de diferentes fungicidas en el control de <i>Pseudocercospora cladosporioides</i>, agente causal de la mancha foliar por <i>Cercospora</i> del olivo en Uruguay</u>.....	<u>76</u>
4.1. Resumen	76
4.2. Summary	77

4.3. Introducción.....	78
4.4. Materiales y métodos.....	81
<u>4.4.1. Aislados fúngicos</u>	<u>81</u>
<u>4.4.2. Fungicidas.....</u>	<u>81</u>
<u>4.4.3. Ensayo de inhibición del crecimiento micelial.....</u>	<u>83</u>
<u>4.4.4. Análisis de datos.....</u>	<u>84</u>
4.5. Resultados	84
4.6. Discusión.....	89
4.7. Referencias	92
<u>5. Discusión general.....</u>	<u>99</u>
<u>6. Conclusiones</u>	<u>101</u>
<u>7. Bibliografía</u>	<u>102</u>

Resumen

La mancha foliar por *Cercospora* (CLS) es una de las enfermedades fúngicas más importantes en el olivo en Uruguay, ya que causa defoliación severa y afecta la calidad del aceite. Este trabajo presenta una serie de estudios que buscan generar conocimientos locales sobre esta enfermedad, abarcando su etiología, aspectos epidemiológicos y métodos de control. Se recolectaron aislados de *Pseudocercospora cladosporioides* a partir de hojas de olivo con síntomas de CLS en diferentes zonas olivareras del país. La identificación mediante características fenotípicas y análisis filogenéticos confirmó que esta especie es la única causante de la CLS en Uruguay. Se identificaron tres morfotipos de colonia en agar papa dextrosa, con conidios de longitud media entre 65,7 y 101,8 μm y anchura entre 4,3 y 5,0 μm . La temperatura óptima media de crecimiento fue de 21,5 °C, con un rango de 19,2 °C a 24,8 °C. En ensayos de campo, se determinó la dinámica anual de producción de conidios a través de muestreos mensuales de hojas, se observó dos picos de esporulación: a finales de primavera hasta principios de verano y en otoño, con menor producción en invierno. También a campo, se expusieron brotes de forma secuencial a lo largo del año para identificar los momentos de infección. Se detectaron infecciones durante todo el año, con un descenso significativo al inicio de la primavera. Se encontró que las temperaturas entre 20 °C y 25 °C y una humedad relativa de 80-95 % fueron las variables que mejor se correlacionaron con la producción de esporas. El desarrollo de la enfermedad se estudió mediante inoculaciones artificiales en campo, con aparición de los primeros síntomas de CLS a partir de los cinco meses. También se evaluó la susceptibilidad de *P. cladosporioides* a fungicidas mediante ensayos *in vitro*. Los fungicidas cúpricos mostraron una eficacia inhibitoria moderada sin diferencias significativas entre ellos. Entre los fungicidas de contacto, el mancozeb fue el más eficaz, superando al ziram y captan. Las estrobilurinas (trifloxystrobin, piraclostrobin y azoxystrobin) y los triazoles (difeconazol, tebuconazol y propiconazol) fueron altamente efectivos, sin diferencias significativas entre ellos.

Palabras clave: cv. arbequina, etiología, epidemiología, control, *Olea europaea*, *Pseudocercospora cladosporioides*

Contribution to the knowledge of Cercospora leaf spot on olive trees in Uruguay

Summary

Cercospora leaf spot (CLS) is one of the most important fungal diseases of olive trees in Uruguay, causing severe defoliation and affecting oil quality. This work presents a series of studies aimed at generating local knowledge on this disease, covering its aetiology, epidemiological aspects and control methods. Isolates of *Pseudocercospora cladosporioides* were collected from olive leaves with CLS symptoms in different olive-growing areas of the country. Identification by phenotypic characteristics and phylogenetic analysis confirmed that this species is the only one causing CLS in Uruguay. Three colony morphotypes were identified on potato dextrose agar, with conidia of mean length between 65.7 and 101.8 μm and width between 4.3 and 5.0 μm . The mean optimum growth temperature was 21.5 °C, with a range of 19.2 to 24.8 °C. In field trials, the annual dynamics of conidial production were determined by monthly leaf sampling, showing two sporulation peaks: late spring to early summer and autumn, with lower production in winter. Also in the field, shoots were exposed sequentially throughout the year to identify times of infection. Infections were detected throughout the year, with a significant decline in early spring. The correlation between meteorological factors and spore production and infections was evaluated, finding that temperatures between 20 and 25°C and a relative humidity of 80-95% were the best correlating variables. Disease development was studied by artificial inoculations in the field, with the first symptoms of CLS appearing after 5 months. Susceptibility of *P. cladosporioides* to fungicides was also assessed by in vitro assays. Cupric fungicides showed moderate inhibitory efficacy with no significant differences between them. Among the contact fungicides, mancozeb was the most effective, outperforming ziram and captan. The strobilurins (trifloxystrobin, pyraclostrobin and azoxystrobin) and the triazoles (difenoconazole, tebuconazole and propiconazole) were highly effective with no significant differences between them.

Keywords: cv. arbequina, etiology, epidemiology, control, *Olea europaea*, *Pseudocercospora cladosporioides*

1. Introducción

1.1. Contexto de la olivicultura en el mundo y en Uruguay

El olivo (*Olea europaea* L.) es una de las especies vegetales más antiguas cultivadas por el ser humano. Es un árbol extremadamente longevo, con una esperanza de vida de aproximadamente 500 años y tolerante al estrés por sequía (Rhizopoulou, 2007). Su cultivo se originó hace unos 6000 años en el valle del río Jordán, en la región del Mediterráneo oriental y Asia menor, actualmente parte de Irán, Palestina y Siria (Lucena et al., 2017; Rhizopoulou, 2007). Los fenicios extendieron el cultivo del olivo a Grecia, el norte de África, Italia y la península ibérica alrededor del 600 a. C., y luego se desarrolló ampliamente en todos los países de la cuenca mediterránea (Lucena et al., 2017).

En el siglo XVI, tras la llegada de los europeos a América, la olivicultura se expandió a México, California (EE. UU.), Perú, Chile y Argentina, y se convirtió en una de las primeras especies vegetales llevadas al Nuevo Mundo, junto con la vid y el trigo (Caballero, 2013; Lucena et al., 2017; Tapia et al., 2003). Durante el siglo XX, el cultivo continuó expandiéndose a lugares tan distantes como Australia, China y Brasil (Lucena et al., 2017).

Actualmente, el olivo se cultiva en todo el mundo entre los paralelos 30° y 45° de latitud en ambos hemisferios (Lucena et al., 2017). Está presente en más de cuarenta países, cubriendo 10,9 millones de hectáreas en 2022 (FAOSTAT, 2024), bajo condiciones climáticas muy variadas, desde zonas desérticas hasta climas húmedos (Lucena et al., 2017). Los diez principales países productores de oliva concentran el 93,7 % de la superficie global del cultivo, ubicándose en la cuenca del Mediterráneo y próximo oriente, con España liderando la producción mundial de aceitunas (tabla 1) (FAOSTAT, 2024).

Tabla 1

Indicadores sobre la producción mundial de oliva para el año 2022.

Ranking	País	Área cosechada (ha) ¹	% área total	Producción (t)	Rendimiento (t ha ⁻¹) ²
1	España	2.635.280	24,07	3.940.070	1,50
2	Túnez	1.799.251	16,43	1.200.000	0,67
3	Marruecos	1.201.308	10,97	1.968.111	1,64
4	Italia	1.076.520	9,83	2.160.400	2,01
5	Turquía	901.126	8,23	2.976.000	3,30
6	Grecia ³	846.660	7,73	2.878.644	3,38
7	Rep. Árabe Siria	676.338	6,18	990.948	1,47
8	Argelia	457.609	4,18	822.974	1,80
9	Portugal	379.570	3,47	791.660	2,09
10	Libia	220.009	2,01	143.410	0,65
11	Argentina	129.528	1,18	356.301	2,75
12	Egipto	112.851	1,03	1.137.076	10,08
13	Líbano	63.938	0,58	138.893	2,17
14	Jordania	57.770	0,53	167.372	2,90
15	Palestina	54.091	0,49	79.761	1,47
16	Albania	49.476	0,45	157.710	3,19
17	Australia	41.426	0,38	101.320	2,45
18	Israel	33.700	0,31	138.000	4,09
19	Arabia Saudita	32.222	0,29	388.200	12,05
20	Perú	26.579	0,24	226.942	8,54
21	Irán	24.397	0,22	114.599	4,70
22	Chile	21.141	0,19	128.963	6,10
23	Croacia	19.900	0,18	40.130	2,02
24	Francia	17.180	0,16	21.930	1,28
25	EE. UU.	13.759	0,13	63.230	4,60
26	Chipre	9.990	0,09	21.140	2,12
27	México	9.478	0,09	34.163	3,60
28	Iraq	7.545	0,07	31.511	4,18
29	Azerbaiyán	6.014	0,05	3.172	0,53
30	Uruguay ⁴	5.638	0,05	12.932	2,29
31	El Salvador	5.573	0,05	11.224	2,01
32	Macedonia del Norte	5.486	0,05	11.866	2,16
33	Brasil	3.103	0,03	4.588	1,48
-	Otros	4.556	0,04	14.204	4,66
TOTAL		10.948.524	100	21.278.512	3,46

¹ Fuente: FAOSTAT (2024) (<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>); ² rendimiento = (producción/área cosechada); ³ Grecia: producción y rendimientos son estimados a partir de los últimos años; ⁴ MGAP-DIEA (2023) (https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/documentos/noticias/Comunicado_final.pdf)

En América, Argentina es el principal país en superficie cultivada con 129.528 ha y un rendimiento de 2.75 t ha⁻¹, ubicándose justo por debajo de los diez primeros del mundo. Uruguay ocupa el lugar número treinta en el ranking de área cosechada (FAOSTAT, 2024), priorizando la calidad sobre el rendimiento (Sánchez et al., 2022).

El auge y la expansión actuales del cultivo a nivel mundial se deben a la creciente valorización de las características nutritivas del aceite de oliva virgen (Silveira et al., 2012) y sus beneficios para la salud humana (Gavahian et al., 2019; Román et al., 2019). Este aceite, reconocido por su aroma delicado y único, se consume sin refinamiento y se destaca por su alto contenido de grasas insaturadas (85 %), elemento clave en la dieta (Rhizopoulou, 2007). En los últimos años, la producción de aceitunas ha aumentado gracias al desarrollo de olivares modernos, la intensificación del cultivo y la expansión a nuevas áreas de producción en América, Asia y Oceanía (Lucena et al., 2017).

En Uruguay, el cultivo de olivo destinado a la producción de aceite de oliva virgen extra (AOVE) es relativamente reciente. Sin embargo, la introducción del olivo en nuestro país data de 1780, con la llegada de los inmigrantes a Montevideo (Conde et al., 2019a; Pereira, 2015). En la década de 1930, se registró la primera actividad olivarera dedicada a la extracción de aceite de oliva virgen. Entre las décadas de 1940 y 1960, se establecieron nuevas explotaciones en los departamentos de Salto, Paysandú y Río Negro, lo que alcanzó un total de mil hectáreas (Parras Rosa, 2012; Pereira, 2015).

A partir de 1960, la elaboración de aceites vegetales de semillas oleaginosas, de menor costo de producción, hizo que la olivicultura perdiera relevancia (Silveira et al., 2012). Para 1980, la mayoría de las explotaciones olivareras habían sido abandonadas (Pereira, 2015). Sin embargo, desde el 2002 se ha iniciado una nueva etapa de

expansión del área plantada con olivo, caracterizada por plantaciones modernas y almazaras de alta tecnología (Conde et al., 2019a).

Los principales factores que impulsaron estas nuevas plantaciones fueron las buenas perspectivas económicas del olivar a escala global, la disponibilidad de medios relativamente económicos para la preparación del terreno y la precoz fructificación y rápido crecimiento de los árboles en las condiciones agroambientales de Uruguay (Villamil, 2013). Actualmente, el olivo ocupa el segundo lugar en superficie plantada entre los frutales, después de los cítricos, con una superficie total en producción de 5.927 ha (5.638 ha de superficie efectiva) (MGAP-DIEA, 2023). Predomina el olivar intensivo, con un marco de plantación de entre 7×5 o 6×4 metros y una densidad promedio de 291 plantas por hectárea (MGAP-DIEA, 2023; Parras Rosa, 2012).

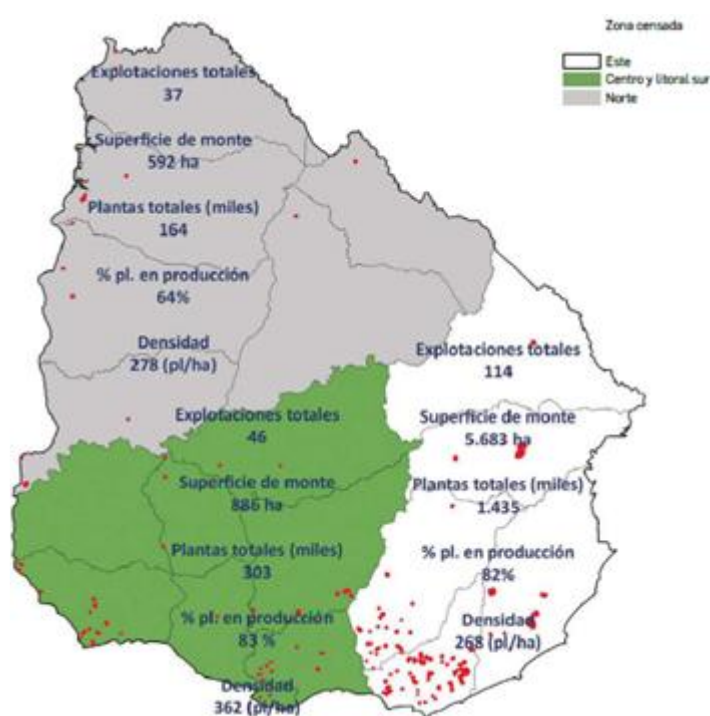


Figura 1

Distribución geográfica de las explotaciones productivas, superficie efectiva, plantas totales de olivo y densidad de plantación (MGAP-DIEA, 2023).

Las principales zonas de producción se ubican en los departamentos de Maldonado, Rocha, Lavalleja, Treinta y Tres, Florida, Colonia, Canelones y Salto, con una concentración del 80 % de la superficie en la zona este del país (figura 1) (MGAP-DIEA, 2023). La mayoría de las plantaciones son jóvenes y el 92 % de las explotaciones se realiza en secano (Parras Rosa, 2012). Un desafío importante para la olivicultura uruguaya es el exceso de agua, ya que el olivo no tolera suelos con alta humedad. La abundante pluviometría, alta humedad relativa, inviernos moderados y veranos cálidos que caracterizan el clima uruguayo favorecen el desarrollo de enfermedades en los olivares (Conde et al., 2013; Parras Rosa, 2012).

En la implantación de los nuevos olivares se utilizaron materiales certificados provenientes de España, Italia, Israel y Argentina (Conde et al., 2019a). Las variedades se seleccionaron en función de su potencial genético y su adaptación a las condiciones agroecológicas y climáticas del país (Villamil y Conde, 2013). Cuatro variedades predominan, ocupando el 89 % de la superficie cultivada: arbequina con el 48 %, coratina con el 21 %, picual y frantoio con el 11 % (MGAP-DIEA, 2023).

Arbequina, de origen español, es una variedad de bajo vigor, con copa globosa y cerrada. Se adapta bien a distintas zonas olivareras del país debido a su bajo requerimiento de frío invernal (Conde et al., 2019b). Es precoz en su producción y poco alternante (Villamil y Conde, 2013), pero es auto-incompatible, por lo que se recomienda incluir polinizadores (Riella et al., 2022; Sánchez-Estrada y Cuevas, 2018). Sus frutos pequeños dificultan la cosecha mecánica, sin embargo, su aceite es de buena calidad y estabilidad, cosechándose con un índice de madurez de 2,5 (Villamil y Conde, 2013). En Uruguay, arbequina es susceptible al repilo y al emplomado y muy sensible a aceituna jabonosa (Conde et al., 2019b, Moreira et al., 2021; 2023).

Coratina es una variedad italiana de doble propósito que se caracteriza por su rápido crecimiento y vigor medio. Es precoz en producción y tiene una elevada productividad, aunque es alternante y parcialmente autofértil. Sus frutos, de tamaño variable y maduración tardía, presentan un elevado rendimiento graso y sabor frutado, amargo y

picante, con un alto contenido de polifenoles (Villamil y Conde, 2013). Coratina es resistente al frío, pero susceptible a la tuberculosis, al emplomado y a la aceituna jabonosa (Conde et al., 2019b; Moreira et al., 2023; Villamil y Conde, 2013).

Picual es otra variedad española de doble propósito que es vigorosa y de rápida entrada en producción, muy productiva pero alternante (Villamil y Conde, 2013) y auto-incompatible, siendo dependiente de la polinización cruzada (Díaz et al., 2006). Se adapta bien tanto en el sur como en el norte del país. Su fruto, de tamaño medio y terminado en punta, ofrece un elevado rendimiento graso y un aceite de buena estabilidad, con alto contenido de ácido oleico. Es una variedad rústica, adaptada a bajas temperaturas y excesos de humedad, pero sensible a la sequía (Villamil y Conde, 2013). En Uruguay, picual es susceptible al repilo, al emplomado y a la aceituna jabonosa (Conde et al., 2019b; Moreira et al., 2023).

Frantoio, originaria de la Toscana, es la variedad más importante en Italia (Villamil y Conde, 2013). Es muy vigorosa, con una copa amplia y densa. Tiene un alto requerimiento de frío, lo que presenta problemas de adaptación en el norte del país (Conde et al., 2019b). Presenta elevada fructificación, aunque alternante (Villamil y Conde, 2013) y es auto-incompatible (Mariotti et al., 2021). Su entrada en producción es más lenta que las otras variedades, con una maduración tardía y escalonada. Sus frutos son de tamaño medio y alargados, y su aceite tiene alto contenido de polifenoles. Se adapta a diferentes condiciones de suelo, pero es sensible a las bajas temperaturas (Villamil y Conde, 2013). Frantoio presenta buena sanidad de hoja y frutos (Conde et al., 2019b; Moreira et al., 2023).

La mayor parte de la producción de aceitunas en Uruguay se destina a la obtención de aceites (99 %) (MGAP-DIEA, 2023). Los AOVE uruguayos han ganado reconocimiento internacional por su excelencia e inocuidad (Conde et al., 2019a; Mattos, 2021).

1.2. Principales enfermedades del olivo

El olivo ha prosperado tradicionalmente en regiones de clima mediterráneo, con veranos secos y luminosos, donde la incidencia de enfermedades fúngicas y bacterianas es relativamente baja (Conde et al., 2013). En estas regiones, los olivares han mantenido una diversidad genética que contribuye a un equilibrio natural con los patógenos, lo que crea un ecosistema menos vulnerable (Trapero et al., 2017).

Sin embargo, cuando este equilibrio se altera, pueden producirse ataques severos y pérdidas significativas. La olivicultura moderna, con su uniformidad varietal, altas densidades de plantación, uso de variedades sensibles en climas húmedos y plantaciones en suelos inadecuados, ha contribuido a romper este equilibrio (Trapero et al., 2017). Además, las condiciones climáticas favorables para ciertas enfermedades, exacerbadas por el cambio climático, han incrementado las pérdidas en los olivares, lo que afecta la producción e incluso compromete la vida de los árboles.

El olivo es susceptible a numerosos patógenos, con más de cincuenta enfermedades identificadas hasta la fecha, muchas de ellas específicas de esta especie. Entre las principales enfermedades que afectan a los olivares se encuentran las enfermedades foliares denominadas *repilo* y *emplomado*, ocasionadas por *Venturia oleaginea* y *Pseudocercospora cladosporioides* respectivamente; la antracnosis ocasionada por hongos del género *Colletotrichum* y la verticilosis ocasionada por *Verticillium dahliae*, este último se trata de un hongo que coloniza el sistema vascular de la planta. En cuanto a las enfermedades bacterianas, se destacan la tuberculosis del olivo ocasionada por *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* y el síndrome del decaimiento rápido del olivo ocasionado por *Xylella fastidiosa*. A pesar de su importancia, el conocimiento científico sobre estas patologías sigue siendo limitado (Trapero et al., 2017).

En Uruguay, el rápido crecimiento del sector olivícola en las últimas dos décadas ha generado una alta demanda de conocimientos necesarios para manejar el cultivo bajo las condiciones agroclimáticas locales (Parras Rosa, 2012). Ante la falta de investigaciones locales, se suele recurrir a información de otras regiones, pero, en este caso, extrapolar estos datos puede conducir a error debido a las diferencias climáticas

y de comportamiento de las cepas de la región. Por lo tanto, es esencial desarrollar conocimientos locales sobre las principales enfermedades del olivo para gestionar adecuadamente la sanidad del cultivo, producir aceites de alta calidad y minimizar el impacto ambiental (Montelongo et al., 2011).

Las primeras investigaciones sobre las enfermedades del olivo en Uruguay (tabla 2) se han llevado adelante por en el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) y la Facultad de Agronomía de la Udelar. Estas han determinado que las principales enfermedades que afectan la olivicultura uruguaya son las manchas foliares (emplomado y repilo) y la aceituna jabonosa (Conde y Leoni, 2007; Conde et al., 2013). Una vez identificadas las principales enfermedades, las investigaciones se centraron en la identificación de los patógenos, sus características epidemiológicas y su manejo. En este contexto es que se desarrollaron el proyecto *Identificación, caracterización y estudio epidemiológico del emplomado del olivo en Uruguay* (CSIC INI-2017) y esta tesis doctoral.

Tabla 2

Principales enfermedades del olivo y referencias de investigación nacional.

Enfermedad Agente causal	Órgano afectado	Importancia relativa ¹	Referencias
Aceituna jabonosa o antracnosis <i>Colletotrichum</i> spp.	Inflorescencias ramas y frutos	Alta	Conde y Leoni (2007); Conde et al. (2013); Leoni et al. (2013, 2015, 2016, 2018); Ferronato et al. (2023); Montelongo et al. (2011, 2013); Moreira et al. (2021, 2022, 2023)
Repilo o sarna del olivo <i>Venturia oleaginea</i>	Hojas y frutos	Alta	Conde y Leoni (2007); Conde et al. (2013); Leoni et al. (2013); Bernaschina et al. (2015, 2017, 2019, 2020)
Emplomado o cercosporiosis <i>Pseudocercospora cladosporioides</i>	Hojas y frutos	Alta	Conde y Leoni (2007); Conde et al. (2013); Leoni et al. (2013)
Fumagina <i>Aureobasidium</i> spp. <i>Capnodium</i> spp., <i>Limacinula</i> spp.	Hojas	Media	Conde et al. (2013); Leoni et al. (2013)
Cancros en madera <i>Botryosphaeria</i> spp.	Ramas	Baja a media	Conde et al. (2013); Leoni et al., (2013); Hernández et al. (2022); Montelongo et al. (2010)
Podredumbres <i>Phytophthora</i> spp.	Raíz y cuello	Baja a media	Conde et al. (2013); Leoni et al., (2013); Montelongo et al. (2010)
Fusariosis <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. solani</i>	Raíz	Baja	Conde et al. (2013); Leoni et al. (2013); Montelongo et al. (2010)
Verticilosis <i>Verticillium dahliae</i>	Sistema vascular	Baja	Conde y Leoni (2007); Conde et al. (2013); Leoni et al. (2013)
Tuberculosis <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>Savastanoi</i>	Brotes, ramas y tronco	Baja	Conde y Leoni (2007); Conde et al. (2013); Leoni et al. (2013)

¹ Fuente: Conde et al. (2013) y Leoni y Bernaschina (2021).

1.3. Emplomado del olivo

La enfermedad denominada *emplomado del olivo*, o también conocida como *repilo plumizo* en España, *piombatura dell'olivo* en Italia, *Cercospora leaf spot* (CLS) en inglés, o simplemente *cercosporiosis del olivo*, es una de las enfermedades más importantes que afecta a este cultivo en todo el mundo (Agustí-Brisach et al., 2016; Ávila et al., 2004a; 2005; Del Moral y Medina, 1985; Nigro et al., 2003; Pappas, 1993). Aunque ataca preferentemente a las hojas, también ha sido encontrada en ramas, frutos, pecíolos de hojas y pedúnculos de frutos (Agustí-Brisach et al., 2016; Ávila et al., 2004a; Del Moral y Medina, 1985; Nigro y Ferrara, 2011; Pappas, 1993).

La cercosporiosis del olivo provoca la caída anticipada de las hojas enfermas y, en casos de fuertes infecciones, cuando prevalecen las condiciones de clima húmedo, ocasiona severas defoliaciones (Agustí-Brisach et al., 2016; Ávila et al., 2004a; Pappas, 1993). La reducción de la actividad fotosintética impacta no solamente en los rendimientos de la temporada, sino que, al disminuir la acumulación de reservas, produce un debilitamiento generalizado del árbol, lo que compromete las futuras cosechas (Ávila et al., 2004b). Estudios sobre la defoliación precoz de las plantas han demostrado que puede provocar pérdidas de hasta un 20 % de la producción del año siguiente (Ricciolini y Rizzo, 2010).

El daño directo en fruta no suele observarse todos los años, pero, en años favorables para el desarrollo de la enfermedad, puede afectar el 100 % de las aceitunas, y deteriora la calidad del aceite al aumentar su acidez (Ávila et al., 2004; Ávila y Trapero, 2010; Del Moral y Medina, 1985). Los frutos verdes con síntomas, destinados para consumo de mesa, deben ser descartados por ser inadecuados para su presentación (Sarasola, 1951).

1.3.1. Sintomatología

Las hojas infectadas inicialmente no se diferencian de las sanas, excepto por la presencia de manchas de bordes difusos en el envés, de coloración oliváceo oscuro o gris plumizo, producto de fructificaciones del hongo (figura 2a y b) (Ávila et al.,

2004a; Del Moral y Medina, 1985; Pappas, 1993; Sarasola, 1951). Estas manchas se distribuyen principalmente a lo largo de los márgenes de la cara inferior de la hoja y a menudo en solo una mitad, ya que el hongo presenta cierta dificultad para traspasar la nervadura central (Nigro y Ferrara, 2011). Los primeros síntomas visibles en el haz de las hojas son áreas de color verde claro que luego se convierten en manchas cloróticas de bordes difusos (figura 2c) (Ávila et al., 2004a; Pappas, 1993). Estos síntomas se manifiestan después de un período de incubación relativamente largo (Ávila et al., 2020; Pappas, 1993; Trapero et al., 2017). En variedades muy susceptibles, la clorosis y necrosis son más notorias (Ávila et al., 2004b; Trapero et al., 2017) y pueden confundirse la necrosis marginal y apical de las hojas infectadas con la causada por deficiencias de potasio (Trapero et al., 2011).

Tanto las hojas jóvenes (<1 año) como las maduras pueden infectarse y presentar síntomas (Ávila et al., 2020; Ávila y Trapero, 2010; Nigro et al., 2002; Sarasola, 1951). Sin embargo, los síntomas se detectan principalmente en las hojas maduras (Agustí-Brisach et al., 2016; Ávila et al., 2004ab; Ávila y Trapero, 2010; Nigro et al., 2002; Sarasola, 1951). En algunos casos, pueden observarse a simple vista estructuras negras parecidas a esclerocios (seudoesclerocios) en el envés de la hoja (figura 2e) (Pappas, 1993). La mayoría de las hojas infectadas terminan cayendo al suelo y deja las ramitas deshojadas, lo cual constituye el principal daño de esta enfermedad (Del Moral y Medina, 1985; Pappas, 1993). La mayor incidencia y defoliación ocurre principalmente en las ramas inferiores del árbol y en la parte interna de la copa (figura 2d) (Ávila et al., 2020; Pappas, 1993; Trapero et al., 2017).

En los frutos, este hongo produce lesiones que desmerecen su calidad tanto para consumo como para la producción de aceite, ya que aumenta su acidez (Ávila et al., 2004; Sergeeva et al., 2008). Los síntomas en frutos varían entre cultivares y durante las diferentes fases de desarrollo del fruto (Nigro y Ferrara, 2011; Nigro et al., 2003; Trapero et al., 2017; Sergeeva y Spooner-Hart, 2009). Por ejemplo, Nigro y Ferrara (2011) describen que, en el cv. coratina, los síntomas de cercosporiosis en aceitunas en estado de envero se presentan como manchas irregulares y deprimidas de 1-4 mm, de color marrón oscuro, con una textura corrugada similar al cuero y rodeadas por un

halo verde pálido. En frutos maduros, las lesiones se desarrollan y forman cráteres de 2-7 mm rodeados de un halo amarillo pálido que a menudo convergen. En el cv. frantoio, los frutos infectados en estado de envero presentan manchas de color marrón-rojizo, ligeramente deprimidas, de 3-4 mm, a veces rodeadas por un halo verde. Las drupas maduras del cv. leccino exhiben áreas levemente hundidas, arrugadas y a menudo blandas, de 5-10 mm, con manchas subepidérmicas más oscuras y de textura suberosa en la pulpa.

En general, los síntomas de CLS en aceitunas verdes muestran manchas irregulares de color púrpura, ocre o marrón oscuro que se deprimen ligeramente (figura 2f) (Pappas, 1993; Sarasola, 1951; Trapero et al., 2017). Al madurar el fruto, las lesiones crecen y adquieren tonalidades grisáceas o azuladas (Pappas, 1993; Trapero et al., 2017). En algunos casos, se puede observar un halo que rodea la zona infectada, de color marrón claro, amarillo pálido o verde, y las manchas pueden fusionarse (Pappas, 1993; Sarasola, 1951). Los frutos afectados no maduran correctamente, pueden caer o llegar a momificarse (Trapero et al., 2017). En condiciones de alta humedad, aparecen en las lesiones puntos negros, apenas perceptibles, constituidos por masas estromáticas del patógeno que emergen rompiendo la epidermis y producen conidióforos y conidios (Nigro y Ferrara, 2011; Pappas, 1993; Trapero et al., 2017).

Aunque *P. cladosporioides* afecta principalmente a las hojas y frutos, en años favorables para la enfermedad, también ha sido encontrado en ramitas, pecíolos de hojas y pedúnculos (Agustí-Brisach et al., 2016; Ávila et al., 2004a; Del Moral y Medina, 1985; Nigro y Ferrara, 2011; Pappas, 1993). Las infecciones en pecíolos y pedúnculos producen manchas de color gris claro, tonalidad menos intensa que las producidas por el repilo o sarna del olivo (*Fusicladium oleagineum/Spilocaea oleagina*), pero suelen confundirse fácilmente (Nigro y Ferrara, 2011; Ricciolini y Rizzo, 2010). Normalmente, estas infecciones producen la caída prematura de hojas y frutas (Nigro y Ferrara, 2011). En ramitas jóvenes, en estado herbáceo, los síntomas pueden aparecer como manchas de color grisáceo o ennegrecidas de diversas formas y tamaños (Nigro y Ferrara, 2011; Ricciolini y Rizzo, 2010).

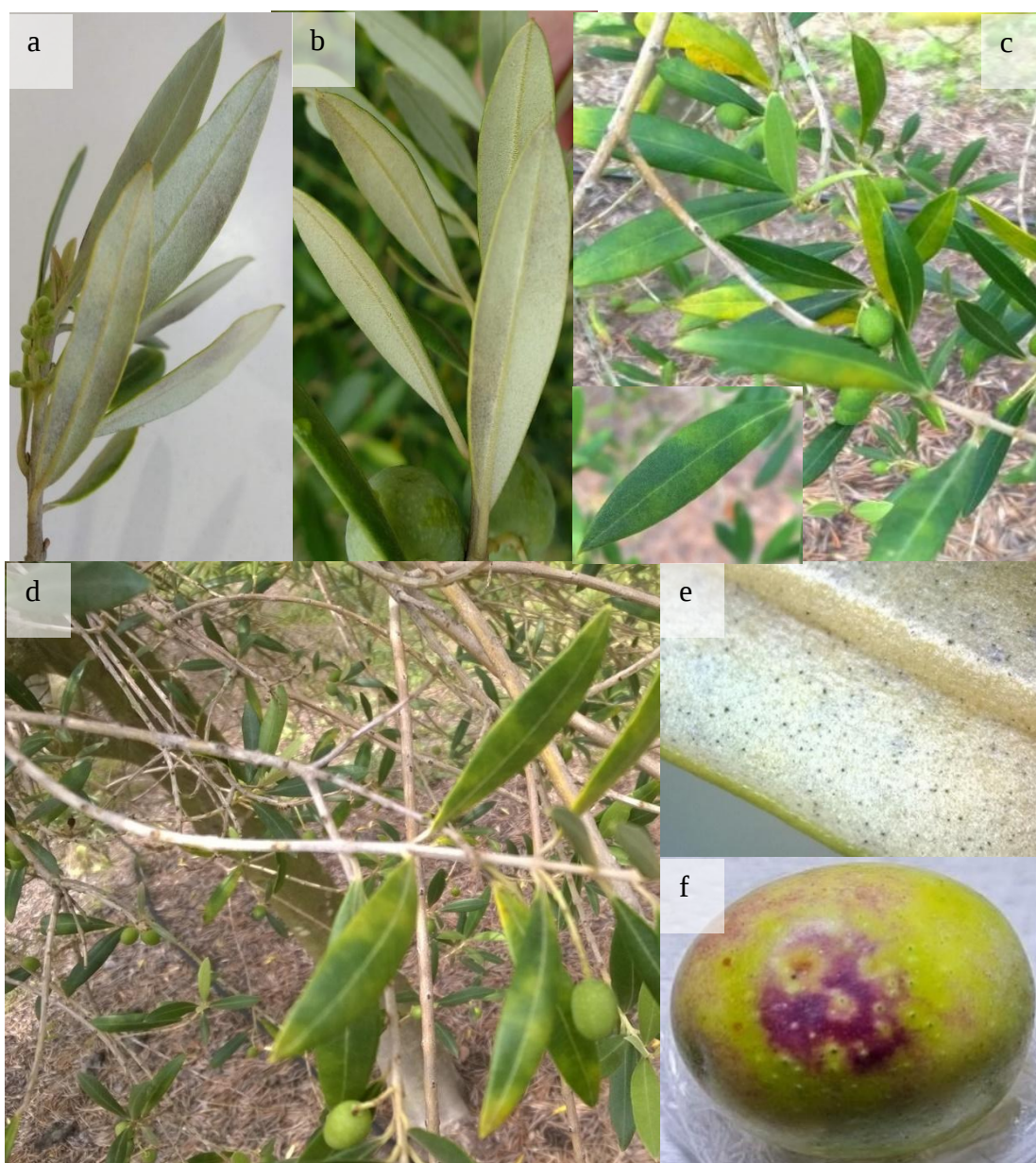


Figura 2

Síntomas de emplomado del olivo, causado por *Pseudocercospora cladosporioides*: *a* y *b*. manchas de color gris plumizo en el envés de las hojas, *c*. áreas de color verde claro a cloróticas en el haz de las hojas, *d*. defoliación severa en ramas inferiores del cv. arbequina, *e*. estructuras negras, seudoesclerocios y *f*. frutos con síntomas y estructuras reproductivas del hongo.

1.3.2. Agente causal

El causante del emplomado del olivo ha sido atribuido al hongo *Pseudocercospora cladosporioides* (Sacc.) Braum (sinónimos: *Mycocentrospora cladosporioides*, *Cercospora cladosporioides*) (Ávila et al., 2005; Braun, 1993; Nigro et al., 2003; Pappas, 1993). A este hongo se le conoce únicamente su estado asexual, ya que aún no se ha encontrado su teleomorfo (Ávila et al., 2004a; Nigro et al., 2011). En general, las especies de *Pseudocercospora* tienen morfologías sexuales similares a *Mycosphaerella*, pero representan un género distinto dentro de las *Mycosphaerellaceae* (*Mycosphaerellaceae*, *Dothideomycetes*) (Groenewald et al., 2024).

Las especies de *Pseudocercospora* son en su mayoría específicas de su hospedero (Crous et al., 2013; Groenewald et al., 2024; Silva et al., 2016). Este género se considera monofilético debido a que todos los organismos que lo componen han evolucionado a partir de una población ancestral (Groenewald et al., 2024; Nakashima et al., 2016). La especie *P. cladosporioides* está asociada exclusivamente a *Olea europaea* (Ávila et al., 2004a; Nigro y Ferrara, 2011; Pappas, 1993).

El género *Pseudocercospora* es tan amplio que incluye más de 1.500 especies descritas (Crous et al., 2013). La identificación de las especies dentro de este género debe realizarse con base en el análisis de secuencias de ADN. La región *ITS* (*Internal Transcribed Spacer*), comúnmente utilizada en la identificación de hongos, solo puede diferenciar el 17 % de las especies de *Pseudocercospora* (Crous et al., 2013), por lo que es necesario recurrir al análisis de otros genes, como *ACT* (*Actina*) o *EF-1 α* (*factor de elongación 1-alfa*), para realizar una identificación más precisa de las especies (Crous et al., 2013; Silva et al., 2016). Las regiones génicas *ITS*, *ACT* y *CAL* (calmodulina) han sido las más utilizadas para la identificación molecular de la población de aislados de *P. cladosporioides* en España (Ávila et al., 2005).

Resultados de una colección de doscientos aislados de *P. cladosporioides*, provenientes de hojas y frutos de diferentes áreas olivareras de Italia, Grecia y Albania, mostraron que la mayor variabilidad genética intraespecífica provenía de las muestras

de hojas en comparación con las de frutas (Nigro et al., 2011). Sin embargo, los datos filogenéticos de los aislados españoles de *P. cladosporioides* mostraron una baja diversidad genética, lo que indica que la población es muy homogénea (Ávila et al., 2005). Esto apoya la hipótesis de que este patógeno presenta una reproducción exclusivamente asexual (Ávila y Trapero, 2010). La variabilidad genética y el tamaño de la población son factores importantes, ya que determinan la mayor o menor capacidad de los patógenos de plantas de adaptarse a entornos cambiantes (Ávila et al., 2005).

1.3.3. Características morfológicas del patógeno

Pseudocercospora cladosporioides crece muy lentamente en medio de cultivo, desarrolla colonias de color gris a gris-oliváceo, aterciopeladas, eruptivas (rugosa), densas, con micelio aéreo moderado y margen lineal y regular (sin ondulaciones ni proyecciones) (figura 3a y b) (Ávila et al., 2004a, 2005; Pappas, 1993; Sarasola, 1951). En el reverso, las colonias muestran un color gris-oliváceo a gris hierro (figura 3c) (Ávila et al., 2005). Este hongo presenta dos tipos de micelios, uno con hifas delgadas y otro con hifas gruesas (figura 3d y e) (Agustí-Brisach et al., 2016; Ávila et al., 2005, 2020). El rango de crecimiento micelial diario de las colonias varía entre 0,41 y 1,02 mm por día a temperatura de 21 °C (Ávila et al., 2020). Datos similares fueron observados por Pappas (1993), con un crecimiento de 0,5 mm día⁻¹ a 22 °C. El patrón de crecimiento micelial varía con la temperatura, resultando ser el otoño una época muy favorable para su desarrollo en condiciones de clima mediterráneo (Ávila et al., 2004a).

La producción de conidios por este patógeno, en medios artificiales, es muy rara o nula (Ávila et al., 2004a, 2020; Pappas, 1993). La escasa o nula esporulación en medios de cultivo de las especies de *Cercospora* y de *Pseudocercospora* es un problema al momento de realizar inoculaciones artificiales (Chand et al., 2013; Sarpkaya y Erkilic, 2020; Uppala et al., 2019).

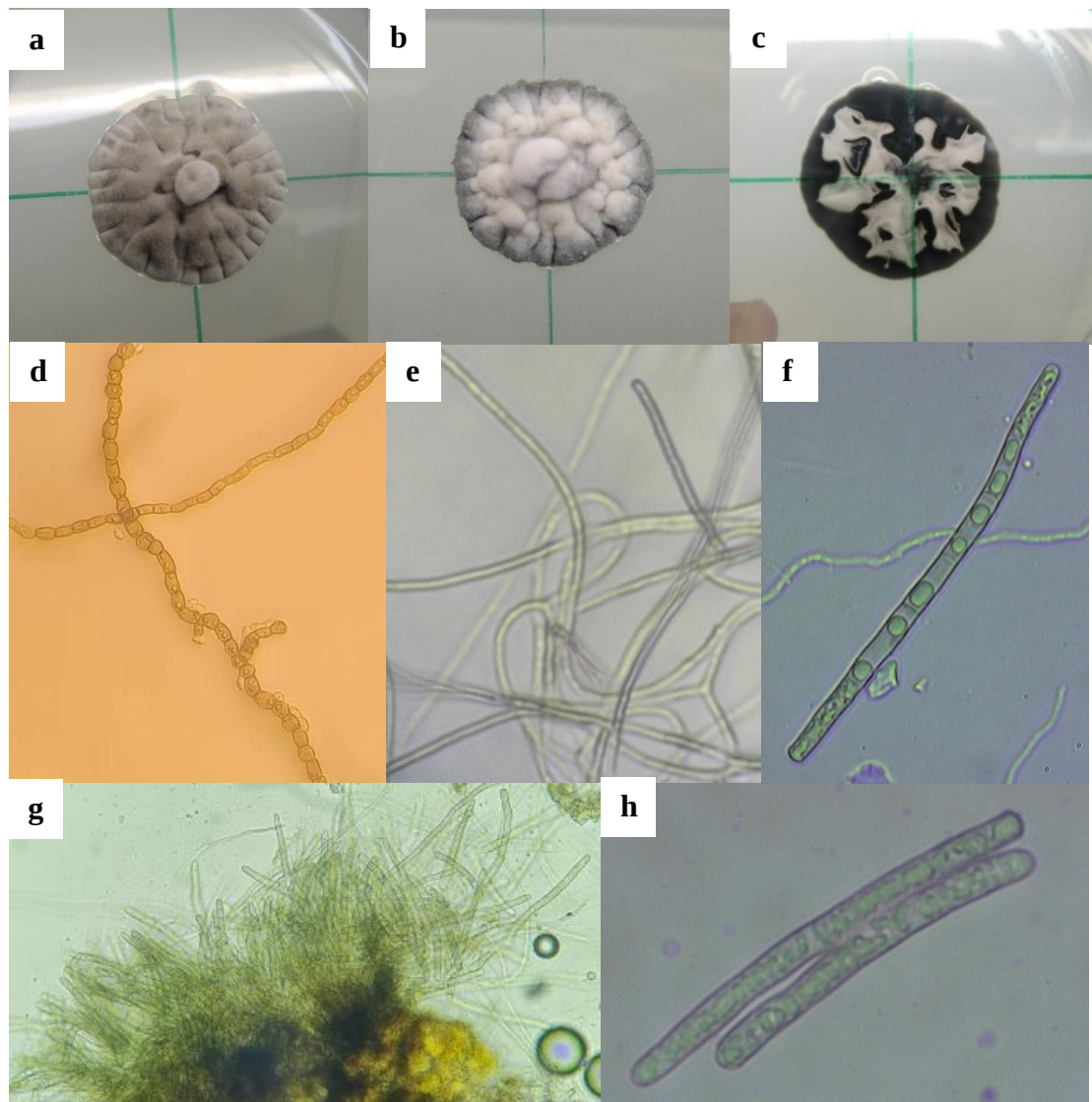


Figura 3

Colonias de *Pseudocercospora cladosporioides* en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) a 21 °C en oscuridad durante cuarenta días: *a* y *b*. cara superior; *c*. cara inferior; *d* y *e*. micelios con hifas delgadas y gruesas; *f*. conidios; *g*. conidiomas y *h*. conidios anastomosados.

Las características morfológicas de los conidiomas, incluyendo la pigmentación, septación y grosor de la pared, así como la longitud, el ancho, forma y el tipo de cicatriz conidial, tienen importancia taxonómica y son utilizadas para la delimitación de especies dentro del género (Crous et al., 2013). Las esporas se forman sobre

conidióforos de color marrón, rectos o ligeramente curvados (figura 3f y g), que emergen de un estroma basal más oscuro en las hojas y frutos afectados (Ávila et al., 2004a). Los conidios se caracterizan por ser solitarios, lisos, de color marrón pálido o marrón-oliváceos, alargados, subcilíndricos, rectos o ligeramente curvados, con muchas vacuolas, septados, con el extremo apical redondeado y la base truncada a subtruncada (Agustí-Brisach et al., 2016; Ávila et al., 2004a, 2005; Braun, 1993; Del Moral y Medina, 1985; McKenzie, 1990; Nigro et al., 2003; Pappas, 1993; Sarasola, 1951). Estas propiedades hacen que sean fácilmente confundidos con fragmentos de micelio (Pappas, 1993).

Existe una gran disparidad en las dimensiones y el número de tabiques de los conidios encontrados por distintos autores, con medidas que oscilan desde 25 hasta 95 μm de largo por 3 a 5,5 μm de ancho y de 1 a 9 septos (Ávila et al., 2004a, 2005, 2020; Del Moral y Medina, 1985; Henricot et al., 2009; McKenzie, 1990; Nigro y Ferrara, 2011; Pappas, 1993; Sarasola, 1951; Sergeeva et al., 2008; Triki y Rhouma, 2008). Estas diferencias no parecen estar relacionadas con el origen geográfico o varietal. Podrían deberse a factores como el origen de las esporas (medios de cultivo artificiales, hojas, frutos) (Sarasola, 1951), el estado de madurez de los conidios al momento del muestreo (Ávila et al., 2020) o las condiciones ambientales. Se ha observado que las zonas húmedas favorecen la formación de fructificaciones más largas (Pappas, 1993).

Otra característica de este hongo es que el micelio, los conidióforos y los conidios suelen presentar anastomosis entre sí y genera, en el caso de los conidios, una forma similar a una letra hache (figura 3h) (Sarasola, 1951).

En condiciones adversas, se han observado estructuras de resistencias, cuerpos esclerociales oscuros y clamidosporas bicelulares, denominadas *cuerpos diplodiformes* (Ávila et al., 2004; Del Moral y Medina, 1985). Estas estructuras a menudo se localizan bajo los tricomas (pelos estrellados de las hojas) y permiten al hongo sobrevivir a períodos adversos (Nigro y Ferrara, 2011).

1.3.4. Ciclo de vida y epidemiología

El ciclo y la epidemiología de la enfermedad denominada *emplomado* se conocen escasamente (Agustí-Brisach et al., 2016; Ávila et al., 2004; Trapero et al., 2017; Pappas, 1993). La duración del ciclo y el desarrollo de *P. cladosporioides* dependen de las condiciones de humedad, temperatura, localización geográfica y características del suelo (Agustí-Brisach et al., 2016; Ávila y Trapero, 2010).

Las infecciones son más severas en plantaciones de alta densidad con poca aireación y a menudo se limitan a la parte baja de los árboles (Agustí-Brisach et al., 2016; Ávila y Trapero, 2010; Nigro y Ferrara, 2011; Pappas, 1993). Esto es debido al microclima más húmedo y a la mayor abundancia de inóculo en esa zona, ya que está más cercana a las hojas caídas en el suelo (Agustí-Brisach et al., 2016; Pappas, 1993). Estas hojas podrían desempeñar un papel crucial en la supervivencia del hongo, actuando como fuente inóculo primario cuando las condiciones ambientales son favorables (Agustí-Brisach et al., 2016; Pappas, 1993; Riveros, 2003; Trapero et al., 2011). Durante esta fase saprófita, *P. cladosporioides* produce una gran cantidad de esporas, por lo que se recomienda eliminar hojas (Riveros, 2003). Sin embargo, estas esporas pierden su viabilidad en poco tiempo si no se dan las condiciones óptimas para su dispersión, lo que reduce el riesgo de nuevas infecciones (Ávila y Trapero, 2010). No obstante, otros autores no han podido confirmar la existencia de una fase saprófita de este hongo en el suelo (Nigro y Ferrara, 2011).

Por otro lado, se ha observado que la severidad de la enfermedad varía según la estación del año en función de la temperatura, la humedad relativa y de las precipitaciones (Agustí-Brisach et al., 2016). Resultados de estudios a campo mostraron que *P. cladosporioides* puede estar activo durante todo el año (Nigro y Ferrara, 2011), pero con una alta presencia en octubre (otoño, hemisferio norte (HN)) (Abdelfattah et al., 2015).

En la cuenca mediterránea, la epidemia se inicia en otoño, cuando ocurren los primeros síntomas de la enfermedad, y se extiende hasta principios de primavera (Agustí-Brisach et al., 2016; Ávila y Trapero, 2010) coincidiendo con la temporada de lluvias,

humedad relativa superior a 80 % y temperaturas medias entre 10 y 20-25 °C (Agustí-Brisach et al., 2016; Nigro y Ferrara, 2011; Trapero et al., 2011). La mayor cantidad de infecciones ocurre en diciembre y enero (invierno, HN), mientras que un segundo período de infecciones, de menor importancia, ocurre en primavera (Agustí-Brisach et al., 2016). En la fruta, se ha observado que las infecciones son cada vez más frecuentes y dañinas (Ricciolini y Rizzo, 2010), desarrollándose la enfermedad mayoritariamente en el período previo a la cosecha y bajo condiciones de clima templado y húmedo (Nigro y Ferrara, 2011; Pappas, 1993; Sergeeva y Spooner-Hart, 2009).

El proceso de infección comienza cuando el conidio germina y penetra por el estoma. Inicialmente, el patógeno mantiene una relación biotrófica, obteniendo nutrientes del apoplasto. Luego coloniza los tejidos foliares y, bajo condiciones favorables, como lluvia o alta humedad, las estructuras reproductivas (estromas con conidióforos y conidios) emergen a través de la epidermis y liberan conidios que dan lugar a nuevas infecciones (Ávila y Trapero, 2010) (figura 4). Experimentalmente, se determinó que es otoño la época preferida del hongo para su multiplicación, esporulando a temperaturas de entre 12 y 28 °C (Del Moral y Medina, 1985; Nigro y Ferrara, 2011; Ricciolini y Rizzo, 2010). Las temperaturas altas restringen la germinación y crecimiento de las esporas, por lo que la enfermedad se inactiva durante veranos cálidos y secos (Sergeeva y Spooner-Hart, 2009).

La dispersión a corta distancia (de hoja a hoja) se da por medio de conidios o trozos de micelio, favorecida por el salpicado de gotas de lluvia o por el viento (Agustí-Brisach et al., 2016; Ávila y Trapero, 2010). Particularmente, las lluvias juegan un rol importante en el transporte de los conidios desde las hojas enfermas a las sanas (Sergeeva y Spooner-Hart, 2009).

El período de incubación de las infecciones, es decir, el tiempo que ocurre entre el establecimiento de la infección y la aparición de los síntomas, es largo y muy variable, desde cuatro a cinco meses sobre hojas jóvenes (Ávila et al., 2004b; Nigro et al., 2002) hasta diez u once meses (Agustí-Brisach et al., 2016; Ávila et al., 2020). Es por esta razón, y teniendo en cuenta que las hojas sanas de olivo pueden durar de tres a cuatro

años (Del Moral y Medina, 1985), que los síntomas de la enfermedad se observan principalmente en hojas maduras, aunque la infección ocurra en hojas jóvenes (<1 año) (Agustí-Brisach et al., 2016). Sin embargo, Riveros (2003) menciona que el período de incubación puede ser de tan solo cuatro a quince semanas (1-3,5 meses). Incluso en árboles jóvenes de olivo inoculados artificialmente y mantenidos en condiciones controladas se han observado síntomas en hojas después de 13-15 días (Triki y Rhouma, 2008; Henricot et al., 2009) y al mes desde la inoculación (Ávila et al., 2020). *Pseudocercospora cladosporioides* también puede permanecer durante largos períodos de tiempo en las hojas del árbol como infecciones latentes (Agustí-Brisach et al., 2016; Triki y Rhouma, 2008).

Las hojas afectadas caen gradualmente a medida que se desarrolla la enfermedad (Agustí-Brisach et al., 2016), observándose la mayor caída en verano con el aumento de las temperaturas (Triki y Rhouma, 2008). Esta defoliación coincide con el período de maduración de los frutos, lo cual origina el debilitamiento de los árboles y afecta el rendimiento y la calidad de la cosecha (Agustí-Brisach et al., 2016). Por otro lado, la caída abundante de frutos ocurre previo a la cosecha, lo que podría deberse a infecciones ocurridas en el pedúnculo o a la producción de toxinas por parte del hongo (Nigro y Ferrara, 2011).

La forma de sobrevivencia de este patógeno a las condiciones adversas es formando estructuras de resistencias como seudoesclerocios o clamidosporas bicelulares (Agustí-Brisach et al., 2016; Ávila et al., 2004a; Nigro y Ferrara, 2011; Pappas, 1993). Estas últimas son estructuras de resistencia que se desarrollan en zonas con inviernos severos (Del Moral y Medina, 1985) o pueden formarse durante el verano, en ambientes desfavorables como baja humedad y altas temperaturas (Ávila y Trapero, 2010; Nigro y Ferrara, 2011).

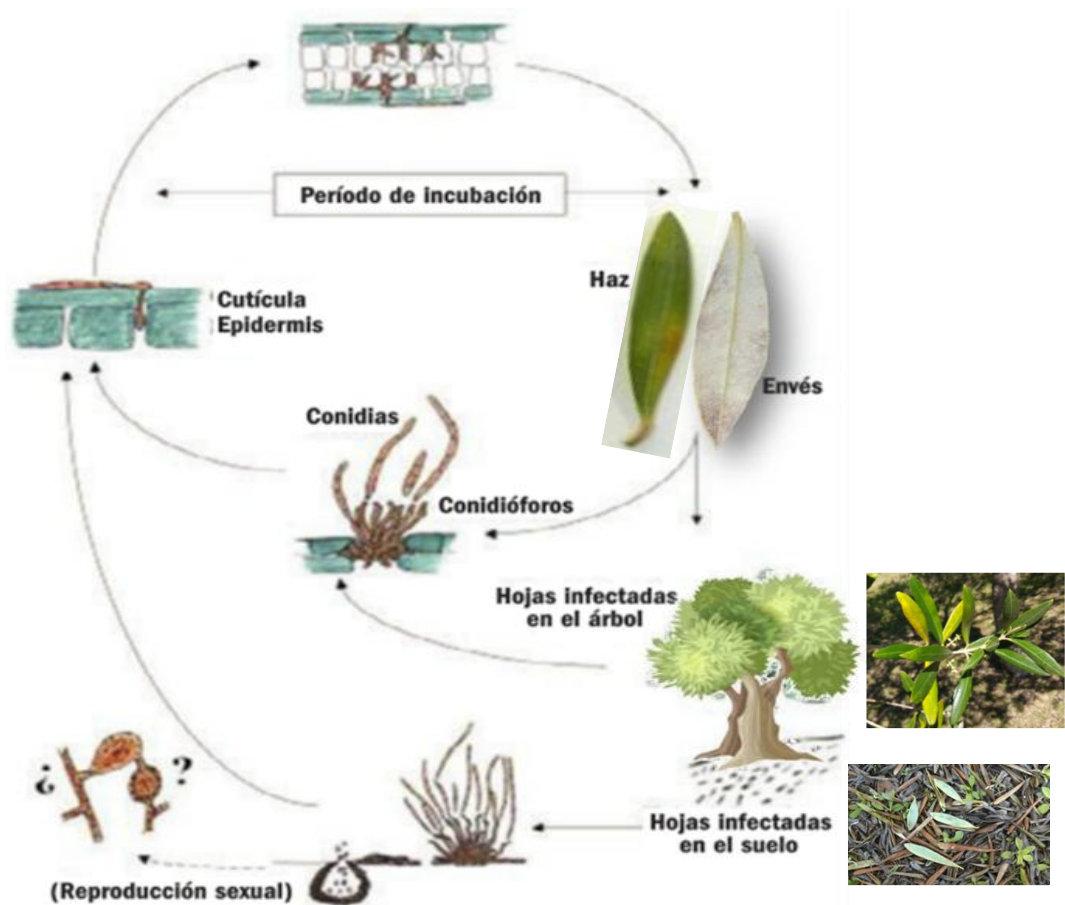


Figura 4

Ciclo biológico de *Pseudocercospora.cladosporioides* (adaptado de Trapero y Blanco, 2008).

1.3.5. Susceptibilidad varietal

Existen grandes diferencias en la susceptibilidad a *P. cladosporioides* entre los cultivares de olivo (Ávila et al., 2004a). Sin embargo, la información disponible sobre la susceptibilidad varietal al emplomado es en muchos casos contradictoria (tabla 3) (Del Moral y Medina, 1985; Nigro et al., 2003; Trapero et al., 2011). Estas discrepancias pueden deberse a una incorrecta identificación del material vegetal, diferencias de virulencia entre distintas poblaciones de los patógenos, comportamiento de los clones del cultivar, condiciones ambientales y manejo del cultivo (Moral et al., 2005; Trapero et al., 2011). En años en que las condiciones son favorables para la

ocurrencia de epidemias, en mayor o menor grado casi todos los cultivares de olivo han resultado ser susceptibles al emplomado del olivo (Ávila y Trapero, 2010; Trapero et al., 2017). Por lo tanto, la severidad a campo está muy condicionada por las variables climáticas, lo que resulta en una gran variabilidad interanual (Moral et al., 2005).

Para obtener resultados fiables y reproducibles, las evaluaciones de los genotipos de olivo por su resistencia a las enfermedades deben ser evaluados siguiendo una metodología de inoculaciones artificiales en condiciones controladas (Moral et al., 2015; Trapero et al., 2011). Por otra parte, aún no se ha desarrollado una metodología que permita diferenciar las hojas infectadas por *P. cladosporioides* de aquellas con síntomas naturales de senescencia (Moral et al., 2005, Moral et al., 2015). A su vez, y debido al largo período de incubación que presenta esta enfermedad (Ávila et al., 2020; Moral et al., 2015), las evaluaciones de resistencia a este patógeno se han realizado en condiciones de campo (Moral et al., 2005; Moral et al., 2015).

En concreto, los resultados disponibles indican que arbequina, coratina y picual son moderadamente susceptiblea, mientras que frantoio es susceptible (Agustí-Brisach et al., 2016; Moral et al., 2015). Sin embargo, el comportamiento de esas mismas variedades en las condiciones agroclimáticas de Uruguay es diferente: arbequina, coratina y picual son susceptibles, y frantoio, moderadamente susceptible (tabla 3) (Conde et al., 2019b). Situaciones similares ya se han observado con otros cultivares, por ejemplo, carolea, que fue introducido en Montenegro, fue altamente susceptible, mientras que en su lugar de origen es prácticamente inmune (Nigro y Ferrara, 2011).

Tabla 3

Susceptibilidad de cultivares al emplomado del olivo.

Cultivar	Origen	Sanidad ¹	Grado ²	Referencias
Arbequina	España	Media	R	Ávila y Trapero (2010); Moral et al. (2005)
			M	Agustí-Brisach et al. (2016); Ávila et al. (2004b); Moral et al. (2015)
			S	Conde et al. (2019b)
Coratina	Italia	Media	M	Agustí-Brisach et al. (2016); Ávila et al. (2004b)
			S	Ávila y Trapero (2010); Conde et al. (2019); Nigro y Ferrara (2011)
Picual	España	Media	R	Ávila y Trapero (2010); Moral et al. (2005)
			M	Agustí-Brisach et al. (2016); Ávila et al. (2004b); Moral et al. (2015)
			S	Conde et al. (2019b)
Frantoio	Italia	Muy alta	M	Conde et al. (2019b); Zora (1994)
			S	Agustí-Brisach et al. (2016); Moral et al. (2005); Moral et al. (2015); Nigro y Ferrara (2011)
			AS	Ávila et al. (2004b); Ávila y Trapero (2010)
Koroneiki	Grecia	Muy alta	M	Conde et al. (2019b)
			S	Moral et al. (2005)
Leccino	Italia	Media	M	Agustí-Brisach et al. (2016); Ávila et al. (2004b); Moral et al. (2005)
			S	Ávila y Trapero (2010); Conde et al. (2019b); Nigro et al. (2003)
Manzanilla de Sevilla	España	Baja	R	Ávila y Trapero (2010); Moral et al. (2005)
			M	Agustí-Brisach et al. (2016); Ávila et al. (2004b)
			S	Conde et al. (2019b)
Pendolino	Italia	Muy Alta	M	Conde et al. (2019b); Zora (1994)
			S	Nigro y Ferrara (2011)
Picholine	Francia	Alta	M	Conde et al. (2019b)
			S	Ávila y Trapero (2010); Moral et al. (2005); Nigro y Ferrara (2011); Zora (1994)

¹ Sanidad general de la planta según Conde et al. (2019b); ² grado de susceptibilidad/resistencia: AS = altamente susceptible, S = susceptible, M = moderadamente susceptible, R = resistente.

1.3.6. Manejo de la enfermedad

Las enfermedades fúngicas foliares y de fruta causan graves pérdidas de rendimiento en la mayoría de las zonas oliveras del mundo (Nigro et al., 2018). El manejo de las enfermedades es un punto clave en la producción de aceites de calidad y se debe tener en cuenta en las decisiones que se tomen a lo largo del cultivo (Trapero et al., 2011). Un manejo integrado de las enfermedades del olivo involucra principalmente las prácticas culturales, el uso de cultivares resistentes y la aplicación de fungicidas (Nigro y Ferrara, 2011).

La utilización de variedades resistentes es el método más económico, efectivo y respetuoso con el medioambiente para el control de las enfermedades (Trapero et al., 2011). La información sobre la resistencia o susceptibilidad varietal al emplumado es reducida y contradictoria debido a que se basa en datos de campo (Ávila et al., 2004b). Sin embargo, en años muy favorables a las epidemias, todos los cultivares han resultado susceptibles en mayor o menor grado (Agustí-Brisach et al., 2016; Ávila y Trapero, 2010).

La aplicación foliar de fungicidas, especialmente compuestos cúpricos o en mezcla con fungicidas penetrantes, es una estrategia común para proteger de micosis foliares (Ávila y Trapero, 2010; Roca et al., 2007a, 2007b, 2007c, 2017). Sin embargo, el uso de fungicidas está limitado debido a los residuos que pueden dejar en los frutos y aceites (Moral et al., 2014, 2018).

Tradicionalmente el emplumado se controlaba con las mismas aplicaciones que se realizaban para controlar el repilo del olivo. Sin embargo, en años favorables para la cercosporiosis del olivo, los tratamientos químicos efectivos para *V. oleaginea* resultaban ineficaces contra *P. cladosporioides* (Nigro et al., 2002; Trapero et al., 2017) debido a que los picos de incidencia de ambas enfermedades son diferentes y las aplicaciones realizadas para una de ellas no era adecuada para la otra (Ricciolini y Rizzo, 2010).

En experimentos sobre la inhibición del crecimiento micelial, se observó que tanto los compuestos cúpricos como los protectores orgánicos utilizados mostraron un efecto variable, lo que dio un amplio rango de valores de la CE_{50} (2,7 a $> 600 \text{ mg L}^{-1}$) (Romero et al., 2020). En cuanto a la inhibición de la germinación de los conidios, piraclostrobin en mezcla con boscalid, kresoxim-metil, benomil y sulfato de cobre, fueron los más efectivos (Romero et al., 2020). Los fungicidas sistémicos benzimidazoles y las estrobilurinas fueron altamente efectivos para inhibir el crecimiento micelial y la germinación de conidios, incluso a muy bajas dosis (Agustí-Brisach et al., 2016; Romero et al., 2020). En ensayos a campo, las aplicaciones de mezclas de cobre con estrobilurinas, o únicamente estrobilurinas, mostraron una disminución significativa de la enfermedad (Agustí-Brisach et al., 2016; Romero et al., 2020). Estos productos aplicados en los períodos de infección de primavera y otoño, cuando las condiciones son favorables, previenen o mantienen bajos los niveles del emplomado (Agustí-Brisach et al., 2016).

Por otro lado, se ha demostrado *in vitro* que los fungicidas cúpricos tienen acción fungistática sobre *P. cladosporioides*, al comprobarse que el patógeno no fue eliminado ni con concentraciones de cobre cinco veces mayores (1500 ppm) a las usadas en ensayos de campo (Nigro y Ferrara, 2011). Además, los compuestos protectores por sí solos, como los productos a base de cobre, no son eficaces contra infecciones latentes o inactivas (Nigro et al., 2018), característica relevante de esta enfermedad.

1.4. Emplomado del olivo en Uruguay

En nuestro país y hasta el momento, solo se ha reconocido al patógeno por simple observación de sus esporas y micelio asociados a hojas de olivo con síntomas, pero no se ha identificado con certeza al patógeno causante de esta enfermedad. En otras regiones productoras de olivos, se ha confirmado la asociación entre *Pseudocercospora cladosporioides* y esta enfermedad (Chliyah et al., 2014; Farr y Rossman, 2021). Aunque es esperable que sea la misma especie la que está presente en nuestro país, es necesario corroborarlo. Esto es debido a que se han encontrado

distintas especies de *Pseudocercospora* sobre el mismo hospedero en diferentes continentes (Groenewald et al., 2024). Actualmente, la forma más rápida y precisa para la identificación de especies es el análisis filogenético de diferentes regiones génicas.

Por otro lado, y a pesar de que es una de las tres enfermedades de mayor importancia en las condiciones de producción de Uruguay (Conde et al., 2013), tampoco se conocen los factores que favorecen el desarrollo de las cepas de este patógeno que habitan en nuestro país, ni aspectos del ciclo, de la epidemiología o del control del emplumado del olivo. Además, el traslado de conocimientos generados en otras regiones de producción se ve limitado debido a que nuestras condiciones agroclimáticas difieren completamente. Es por estas razones que es sumamente importante comenzar a generar nuestros propios conocimientos a través de estudios con poblaciones locales del patógeno y bajo las condiciones agroclimáticas húmedas de nuestro país.

Para incluir medidas de control químico efectivas en un manejo integrado, es fundamental conocer la sensibilidad de las poblaciones de *P. cladosporioides* a los fungicidas. Por otra parte, dado que los tratamientos son mayormente preventivos para la cercosporiosis del olivo, es crucial identificar los períodos del año en que ocurren las infecciones para ser cubiertos por las aplicaciones (Agustí-Brisach et al., 2016; Roca et al., 2007a, 2007b, 2007c; 2017; Romero et al., 2020).

Hasta este momento en Uruguay existe solo cuatro fungicidas registrados para el control de *P. cladosporioides* en olivos, todos ellos son formulaciones a base de Cu (oxicloruro de Cu y óxido cuproso), por lo cual es necesario realizar estudios sobre la sensibilidad de las poblaciones de aislados de este patógeno a diferentes fungicidas.

1.5. Hipótesis y objetivos

1.5.1. Hipótesis del trabajo

- *Pseudocercospora cladosporioides* es el patógeno responsable de ocasionar el emplomado del olivo en Uruguay.
- Los aislados uruguayos del patógeno presentan similares características morfológicas y culturales que los de otras regiones del mundo.
- La producción de inóculo en hojas a nivel de campo y los períodos de infección varían a lo largo del año y se corresponden entre ellos.
- Al igual que en la cuenca mediterránea, el período de incubación de las infecciones en las condiciones agroclimáticas de Uruguay es largo (meses).
- Existen diferencias en la sensibilidad entre los aislados de *Pseudocercospora cladosporioides* a diferentes formulaciones de fungicidas.

1.5.2. Objetivo general

Generar conocimientos sobre el emplomado del olivo a nivel local que contribuyan al desarrollo de un sistema de manejo integrado en Uruguay.

1.5.3. Objetivos específicos

1. Identificar o verificar que el agente causal del emplomado del olivo en Uruguay es *Pseudocercospora cladosporioides*.
2. Caracterizar morfológica y culturalmente una colección de aislados monospóricos causantes del emplomado de olivo en Uruguay.
3. Determinar los momentos de producción de conidios de *Pseudocercospora cladosporioides* a lo largo del año en condiciones de campo.
4. Conocer cuáles son los períodos del año en que *Pseudocercospora cladosporioides* causa infección en las hojas.
5. Determinar la sensibilidad de la colección de aislados de *Pseudocercospora cladosporioides* a diferentes fungicidas.

1.6. Estructura de la tesis

El capítulo 1 incluye una revisión general de la temática estudiada en esta tesis de doctorado.

El capítulo 2 desarrolla los objetivos específicos 1 y 2, cuyos resultados están publicados en Lombardo, P., Leoni, C., Alaníz, S. y Mondino, P. (2023). Cercospora leaf spot of olive in Uruguay. *Phytopathologia Mediterranea*, 62(3), 413-426 (<https://doi.org/10.36253/phyto-14675>).

El capítulo 3 incluye los objetivos específicos 3 y 4 y sus resultados están publicados en Lombardo, P., Paredes, J. A., Pugliese, B. D., González-Barrios, P., Alaniz, S. y Mondino, P. (2024). Cercospora Leaf Spot of Olive: inoculum productions and infections timing throughout the year. *International Journal of Pest Management*, 71(1)1-9 (<https://doi.org/10.1080/09670874.2024.2388173>).

El capítulo 4 se centra en el objetivo específico 5 y corresponde al trabajo titulado *Evaluación de la eficacia de diferentes fungicidas en el control de Pseudocercospora cladosporioides, agente causal de la mancha foliar por cercospora del olivo en Uruguay*, que se encuentra en fase de redacción.

El capítulo 5 presenta la discusión general de todos los estudios realizados.

En el capítulo 6 se expresan las conclusiones de esta tesis de doctorado.

2. Mancha foliar por Cercospora del olivo en Uruguay

2.1. Resumen

La mancha foliar por *Cercospora* (CLS) del olivo es una importante enfermedad fúngica en Uruguay que causa una severa defoliación temprana. Se obtuvieron aislamientos fúngicos de hojas de olivo con síntomas típicos de CLS de olivares uruguayos. Los aislados se identificaron con base en características fenotípicas y análisis de secuencias de ADN. Se caracterizaron los procesos de infección en condiciones de campo. Los análisis filogenéticos confirmaron que *Pseudocercospora cladosporioides* es el agente causal de CLS en Uruguay. Se observaron tres morfologías de colonias en los aislados que crecieron en agar papa dextrosa. La longitud media de los conidios osciló entre 65,7 y 101,8 μm , y su anchura, entre 4,3 y 5,0 μm . La temperatura media óptima de crecimiento fue de 21,5 °C (rango de 19,2 a 24,8 °C). En condiciones de campo, los síntomas iniciales de CLS en las hojas se observaron cinco meses después de la inoculación de las plantas del cv. arbequina, lo que confirma el largo período de incubación de la enfermedad. Este estudio muestra que CLS es una de las enfermedades más prevalentes y destructivas del olivo en Uruguay y enfatiza la importancia de realizar más investigaciones para desarrollar un manejo eficiente de esta enfermedad.

Palabras clave: cv. arbequina, etiología, *Olea europaea*, *Pseudocercospora cladosporioides*

Cercospora leaf spot of olive in Uruguay

2.2. Summary

Cercospora Leaf Spot (CLS) of olive is an important fungal disease in Uruguay, causing severe early defoliation. Fungal isolates were obtained from olive leaves with typical CLS symptoms from Uruguayan orchards. The isolates were identified based on phenotypic characteristics and DNA sequence analyses. Infection processes under field conditions were characterized. Phylogenetic analyses confirmed that *Pseudocercospora cladosporioides* is the causal agent of CLS in Uruguay. Three colony morphologies were observed for isolates growing on potato dextrose agar. Mean conidium length ranged from 65.7 to 101.8 µm, and widths from 4.3 to 5.0 µm. Mean optimum growth temperature was 21.5 °C (range 19.2 to 24.8 °C). Under field conditions, initial CLS symptoms on leaves were observed 5 months after inoculation of cv. Arbequina plants, confirming the disease's lengthy incubation period. This study shows that CLS as one of the most prevalent and destructive olive diseases in Uruguay, and emphasizes the importance of further research to develop efficient management of this disease.

Keywords: cv. Arbequina, etiology, *Olea europaea*, *Pseudocercospora cladosporioides*.

2.3. Introduction

Olive (*Olea europaea* subsp. *europaea* L.) is an important fruit crop in Uruguay, covering around 5,900 ha. The most commonly planted olive cultivars are Arbequina (48%), Coratina (21%), Picual (11%), and Frantoio (11%) (MGAP-DIEA, 2020). The Uruguayan climate is characterized by frequent high humidity days and abundant rainfall, favouring development of fungal leaf and fruit diseases of olive (Conde et al., 2019).

Cercospora leaf spot (CLS) is an endemic and severe olive disease (Del Moral and Medina, 1985) that is widely distributed in most olive-growing areas, causing severe losses during wet years in susceptible cultivars (Trapero et al., 2017). However, in the Mediterranean basin region where most olive production is concentrated, little research has focused on this disease. In that region, CLS is considered as less severe than other olive diseases, such as anthracnose or olive scab (Garrido et al., 2022).

CLS causes severe “early leaf drop” defoliation of olive trees. Affected leaves have diffuse and chlorotic areas on the adaxial surfaces which evolve necrotically, and leaden-grey areas on the abaxial surfaces due to the presence of conidia. Host petioles, peduncles (Ávila et al., 2004; Agustí-Brisach et al., 2016), and young twigs can also be affected, where blackened spots of different shapes and sizes can be observed (Nigro and Ferrara, 2011; Pappas, 1993). Olive fruit can also be affected, and symptoms vary from brown, sunken areas of a few millimetres diam. on green olives to more extensive areas with pale yellow haloes on ripening fruit. Severe symptoms cause decreases in fruit quality and oil production, due to fruit drop, increased acidity, and reduced oil yields (Ávila et al., 2020; Romero et al., 2020; Trapero et al., 2017).

The causal agent of CLS is the fungus *Pseudocercospora cladosporioides*, which is characterized by slow growth in culture media and little or no production of conidia (Ávila et al., 2004, 2005, 2020; Nigro and Ferrara, 2011; Pappas, 1993). Conidia of the fungus are produced in dark brown stromatic conidiomata, which arise in clusters through the host stomata or directly through the epidermis on the underside of infected leaves (Ávila et al., 2004). Conidia are pale brown, straight or slightly curved, rounded

at the apices and truncated at the bases, with variable dimensions and numbers of septa (Ávila et al., 2004; Braun, 1993; Del Moral and Medina, 1985; McKenzie, 1990; Nigro and Ferrara, 2011; Sarasola, 1951; Sergeeva et al., 2008). Little is known of the CLS disease cycle, except that the main inoculum source is affected leaves that remain attached to tree, and that the disease incubation period is long (up to 11 months) (Ávila et al., 2004, 2020; Agustí-Brisach et al., 2016; Sergeeva and Spooner-Hart, 2009; Trapero et al., 2017).

In Uruguay, Conde et al. (2013) found that CLS was one of the main foliar diseases affecting olive trees. However, farmers often lack awareness of this disease mistaking CLS for other foliar diseases such as olive scab or anthracnose, as well as symptoms caused by abiotic factors. Developing local knowledge of CLS is urgent to elucidate aspects of the disease that facilitate understanding the interactions between host plants, the pathogen, and the environment, and to develop effective control strategies. For this reason, the research outlined in this paper aimed to characterize the causal agent of CLS of olive in Uruguay using morphological and molecular analyses, and to characterize the infections process under field conditions.

2.4. Materials and methods

2.4.1. Field symptoms and fungal isolates

Between 2017 and 2018, a survey was conducted in 18 olive orchards situated in six departments located in the north (Salto), south (Colonia, Canelones, and Montevideo) and east (Maldonado and Rocha) of Uruguay (Table 2.1.). The cultivars sampled were Arbequina, Arbosana, Coratina, Leccino, Manzanilla de Sevilla, Pendolino, Picholine, and Seggianese. In each orchard, symptoms attributable to CLS were carefully observed, and five to ten leaves with typical CLS symptoms were collected from different trees and used for pathogen isolations. From each leaf, the sporulating lesion was hydrated with 300 μ L of sterile distilled water (SDW), and 100 μ L of the conidium suspension were dispersed in each of 90 mm diam. Petri plates containing water agar (WA) amended with 0.4 g L⁻¹ of streptomycin sulphate (Sigma-Aldrich). After incubation for 24 h at 20°C in darkness, germinated conidia were transferred to a Potato

Dextrose Agar (PDA, Oxoid Ltd.) and maintained under the same incubation conditions. A single monoconidial isolate was selected from each leaf sample.

The isolates were conserved in 15% glycerol at -80°C, and deposited at the fungal culture collection of the Department of Plant Protection, Faculty of Agronomy, University of the Republic, Uruguay.

2.4.2. Morphological characterization of isolates

Monosporic isolates were grown on PDA at 20°C, in darkness. After 30 d, the isolates were grouped in morphotypes according to colony appearance, shape, and colour. Monosporic isolates growing on Cornmeal Agar (CMA) in the same conditions were used for conidium characterization. Lengths, widths, and the numbers of septa from 20 conidia per isolate were assessed using a Dino Capture 2.0 digital imaging camera (Dino-Eye AM4023X) on an Eclipse E100Led microscope (Nikon Corp.) at ×400 magnification. Data of conidium lengths, widths, length/width ratios, and numbers of septa were subjected to analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test (at $P = 0.05$) was used to compare the mean conidium values. These analyses were conducted using the RStudio v. 2023.06.1-524 program (<https://dailies.rstudio.com/version/2023.06.1+524/>).

2.4.3. Effects of temperature on isolate mycelium growth

Agar plugs (5 mm diam.) from the outer edges of 15-d-old cultures of isolates were transferred to the centres of the fresh PDA plates. The plates were then incubated in darkness at different temperatures from 0°C to 35°C at 5°C increments. For each combination of isolate and temperature, three replicates plates were used, and the experiment was performed twice. After 30 d, each colony diameter was measured along two perpendicular axes, using a digital calliper (IP54; Truper Tools). These colony dimensions were averaged, and the radial growing rate (mm day⁻¹) was calculated.

Table 2.1. Location details and Genbank accession numbers for Uruguayan *Pseudocercospora cladosporioides* isolates obtained from olive leaves, and identified in this study.

Isolate	Orchard	Cultivar ^a	Department, Locality	Morphotype ^b	GenBank Accession No.		
					ACT	CAL	ITS
E07	1	Arbequina	Salto, Olivares Salteños	a	ON442427	ON442509	ON442468
E10	1	Arbequina	Salto, Olivares Salteños	a	ON442428	ON442510	ON442469
E12	2	Arbequina	Salto, Olivares Salteños	a	ON442429	ON442511	ON442470
E15	2	Arbequina	Salto, Olivares Salteños	a	ON442430	ON442512	ON442471
E19	3	n/d	Salto, Punta de Valentín	c	ON442431	ON442513	ON442472
E20	3	n/d	Salto, Punta de Valentín	a	ON442432	ON442514	ON442473
E23	3	n/d	Salto, Punta de Valentín	a	ON442433	ON442515	ON442474
E25	4	n/d	Salto, Punta de Valentín	a	ON442434	ON442516	ON442475
E27	4	n/d	Salto, Punta de Valentín	a	ON442435	ON442517	ON442476
E29	4	n/d	Salto, Punta de Valentín	a	ON442436	ON442518	ON442477
E31	5	Arbequina	Rocha, Nuevo Manantiales	a	ON442437	ON442519	ON442478
E33	5	Arbequina	Rocha, Nuevo Manantiales	a	ON442438	ON442520	ON442479
E35	6	Coratina	Rocha, Nuevo Manantiales	a	ON442439	ON442521	ON442480
E37	6	Coratina	Rocha, Nuevo Manantiales	a	ON442440	ON442522	ON442481
E39	6	Coratina	Rocha, Nuevo Manantiales	b	ON442441	ON442523	ON442482
E40	6	Coratina	Rocha, Nuevo Manantiales	c	ON442442	ON442524	ON442483
E43	7	Manzanilla	Maldonado, Agroland	a	ON442443	ON442525	ON442484
E48	8	Leccino	Maldonado, Agroland	c	ON442444	ON442526	ON442485
E49	9	Coratina	Maldonado, Agroland	a	ON442445	ON442527	ON442486

E50	9	Coratina	Maldonado, Agroland	a	ON442446	ON442528	ON442487
E51	9	Coratina	Maldonado, Agroland	a	ON442447	ON442529	ON442488
E52	9	Coratina	Maldonado, Agroland	a	ON442448	ON442530	ON442489
E53	10	Arbequina	Maldonado, Agroland	a	ON442449	ON442531	ON442490
E58	11	Arbequina	Montevideo, ARU	a	ON442450	ON442532	ON442491
E59	11	Arbequina	Montevideo, ARU	c	ON442451	ON442533	ON442492
E60	11	Arbequina	Montevideo, ARU	a	ON442452	ON442534	ON442493
E66	12	Pendolino	Montevideo, ARU	a	ON442453	ON442535	ON442494
E68	12	Pendolino	Montevideo, ARU	a	ON442454	ON442536	ON442495
E69	12	Pendolino	Montevideo, ARU	a	ON442455	ON442537	ON442496
E70	13	Leccino	Canelones, INIA Las Brujas	b	ON442456	ON442538	ON442497
E71	13	Leccino	Canelones, INIA Las Brujas	b	ON442457	ON442539	ON442498
E72	14	Picholine	Canelones, INIA Las Brujas	a	ON442458	ON442540	ON442499
E73	15	Seggianese	Canelones, INIA Las Brujas	a	ON442459	ON442541	ON442500
E74	15	Seggianese	Canelones, INIA Las Brujas	b	ON442460	ON442542	ON442501
E76	16	n/d	Montevideo, FAgro	a	ON442461	ON442543	ON442502
E77	16	n/d	Montevideo, FAgro	a	ON442462	ON442544	ON442503
E78	17	Arbequina	Colonia, San Pedro	a	ON442463	ON442545	ON442504
E79	17	Arbequina	Colonia, San Pedro	c	ON442464	ON442546	ON442505
E82	18	Arbozana	Colonia, Astilleros	a	ON442465	ON442547	ON442506
E83	18	Arbozana	Colonia, Astilleros	a	ON442466	ON442548	ON442507
E85	15	Seggianese	Canelones, INIA Las Brujas	a	ON442467	ON442549	ON442508

^a n/d: not determined; ^b Morphotype: a, grey and rough; b, whitish and rough; c, grey olivaceous and smooth.

To examine fluctuations in mycelial growth rates across different temperatures for each isolate, a non-linear data adjustment method was employed, using the Generalized Analytis Beta model (Hau and Kranz, 1990; López-Moral et al., 2017). Subsequently, the optimum growth temperature (T_{opt}) was determined using the formula $T_{opt} = [(a \times T_{max}) + (b \times T_{min})] / (a + b)$ and the corresponding maximum growth rate (MGR) was calculated using the equation $Y = d \times (T - T_{min})^a \times (T_{max} - T)^b$. Data analyses were conducted using Statistix 10 (Analytical Software, 2013). Ten representative isolates were selected according to geographic origin, optimum growth temperature, and daily radial growth rate at the optimum temperature, according to non-linear model results, and subjected to ANOVA analysis. Tukey's test (at $P = 0.05$) was used to compare the mean growth rates. These analyses were carried out using the RStudio v. 2023.06.1-524 program.

2.4.4. Molecular characterization of isolates

2.4.4.1. DNA extraction, PCR analysis and sequencing

DNA was extracted from the mycelium of each monosporic isolate following the protocol of Paolocci et al. (1999). Three genomic regions of each isolate were amplified, including the *ITS* region (*ITS*), using ITS1/ITS4 primers (White et al., 1990), portions of *actin* (*ACT*), using ACT-512F/ACT-783R primers (Carbone and Kohn, 1999), and *calmodulin* (*CAL*), using CAL-228F/CAL-737R primers (Carbone and Kohn, 1999) (Table 2.2.).

Each PCR reaction contained 1× PCR buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.4 mM of each dNTP, 0.4 μM of each primer, 0.5 U of DNA polymerase (Bioron), and 1 μL of template DNA. The PCR reactions were each adjusted to a final volume of 20 μL with MQ water. The amplifications were carried out on a MultiGene™ Mini thermal cycler (Labnet International Inc.). The PCR program consisted on an initial step of 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 57°C for *ITS*, and 52°C for *ACT* and *CAL* for 30 s, and elongation at 72°C for 45 s. The final extension was at 72 °C for 10 min. PCR products were analyzed on 1.5% agarose gels stained with GelRed™, and were visualized in a transilluminator under UV light. A

GeneRuler 100-bp DNA ladder plus (Thermo) was used as the molecular weight marker. PCR products were purified and sequenced at the Pasteur Institute, Montevideo, Uruguay.

Table 2.2. Details of primers used in this study for amplification and sequencing.

Locus	Primer	Sequence (5'- 3')	Orientation	Annealing	Reference
<i>ITS</i>	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Forward	57°C for 30s	White et al. (1990)
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Reverse		
<i>ACT</i>	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	Forward	52°C for 30s	Carbone & Kohn (1999)
	ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	Reverse		
<i>CAL</i>	CAL-228F	GAGTTCAAGGAGGCCTTCTC CC	Forward	52°C for 30s	
	CAL-737R	CATCTTTCTGGCCATCATGG	Reverse		

2.4.4.2. Phylogenetic analyses

The sequences of each gene region were aligned using ClustalW, available within the MEGA v. 11.0.11 program (Tamura et al., 2021). The sequences were compared with those deposited in NCBI GenBank nucleotide database (www.ncbi.nlm.nih.gov) using the BLAST source. Sequences of phylogenetically related species of *P. cladosporioides* (including the epitype, CBS 117482) of the *Pseudocercospora* phylogenetic analysis Clade 14 (Crous et al., 2013) were obtained from GenBank and incorporated into the alignments (Table 2.3.).

Phylogenetic analyses were carried out separately for each *ITS*, *ACT*, and *CAL* region, and a multi-locus alignment was built using Concatenate Sequence Alignments available within the MEGA v. 11.0.11 program. Phylogenetic trees were constructed using Bayesian Inference (BI) with the MrBayes v. 3.2.7 program, and Maximum Likelihood (ML) with the RAxML v. 8.2.12 program, implemented in CIPRES Science Gateway v. 3.3 (<http://www.phylo.org/>).

Table 2.3. GenBank sequences used in this study for phylogenetic analyses of representative fungal isolates.

Species ^a	Strain ^{a,b}	Host	Origin country	Collector	GenBank Accession N° ^c		
					ITS	ACT	CAL
<i>Cercospora soja</i>	CBS 132615 = CPC 11353	<i>Glycine soja</i>	South Korea	H.D. Shin	JX143659	JX143173	JX142927
<i>Pseudocercospora araliae</i>	CPC 10154	<i>Aralia elata</i>	South Korea	H.D. Shin	GU269652	GU320360	-
<i>P. araliae</i>	MUCC 873	<i>Aralia elata</i>	Japan	T. Kobayashi & Nakashima	GU269653	GU320361	-
<i>P. balsaminae</i>	CBS 131882 = CPC 10044	<i>Impatiens textorian</i>	South Korea	H.D. Shin	GU269660	GU320367	-
<i>P. boehmeriigena</i>	CPC 2524 = COAD 1562	<i>Bohemia nivea</i>	Brazil	R.W. Barreto	KT290152	KT313507	-
<i>P. cladosporioides</i>	CBS 113866	<i>Olea europaea</i>	Spain	A. Ávila et al.	AY438252	AY438244	AY438261
<i>P. cladosporioides</i>	CBS 113867	<i>Olea europaea</i>	Spain	A. Ávila et al.	AY438254	AY438246	AY438263
<i>P. cladosporioides</i>	CBS 114079	<i>Olea europaea</i>	Spain	A. Ávila et al.	AY438249	AY438241	AY438258
<i>P. cladosporioides</i>	CBS 117482 = CPC 10913	<i>Olea europaea</i>	Tunisia	P.W. Crous	GU269678	GU320383	DQ008124
<i>P. crocea</i>	CBS 126004 = CPC 11668	<i>Pilea hamaoi</i>	South Korea	H.D. Shin	GU269792	GU320493	-
<i>P. dendrobii</i>	MUCC 596	<i>Dendrobium sp.</i>	Japan	C. Nakashima & Motohashi	GU269696	GU320401	-
<i>P. dianellae</i>	CBS 117746	<i>Dianella caerulea</i>	New Zealand	C.F. Hill	GU269695	GU320400	-
<i>P. eucalyptorum</i>	CBS 110777 = CPC 16 = CMW 5228	<i>Eucalyptus nitens</i>	South Africa	P.W. Crous	AF309598	KF903406	KF902621
<i>P. eucalyptorum</i>	CPC 12406 = CBS 132029	<i>Eucalyptus globulus</i>	Australia	I. Smith	GU269793	GU320494	KF902616
<i>P. gracilis</i>	CBS 111189 = CPC 1315	<i>Eucalyptus urophylla</i>	Indonesia	M.J. Wingfield	DQ302960	JX902137	JX901572

<i>P. gracilis</i>	CBS 242.94 = CPC 729	<i>Eucalyptus urophylla</i>	Indonesia	P.W. Crous	DQ267582	DQ147616	-
<i>P. humulicola</i>	CBS 131585 = CPC 11358	<i>Humulus scandens</i>	South Korea	H.D. Shin	GU269723	GU320427	-
<i>P. humulicola</i>	CBS 131883 = CPC 10049	<i>Humulus scandens</i>	South Korea	H.D. Shin	GU269724	JQ325018	-
<i>P. jussiaeae</i>	CBS 132117 = CPC 14625	<i>Ludwigia prostrata</i>	South Korea	H.D. Shin	JQ324977	JQ325020	-
<i>P. lythri</i>	CBS 132115 = CPC 14588	<i>Lythrum salicaria</i>	South Korea	H.D. Shin	GU269742	GU320444	-
<i>P. lythri</i>	MUCC 865	<i>Lythrum salicaria</i>	Japan	I. Araki & M. Harada	GU269743	GU320445	-
<i>P. nephrolepidis</i>	CBS 119121	<i>Nephrolepis auriculata</i>	Taiwan	R. Kirschner	GU269751	GU320453	-
<i>P. plectranthi</i>	CBS 131586 = CPC 11462	<i>Plectranthus</i> sp.	South Korea	H.D. Shin	GU269791	GU320492	-
<i>P. pouzolziae</i>	CBS 122280	<i>Gonostegia hirta</i>	Taiwan	R. Kirschner	GU269761	GU320462	-
<i>P. profuse</i>	CBS 132306 = CPC 10055	<i>Acalypha australis</i>	South Korea	H.D. Shin	GU269762	GU320463	-
<i>P. profuse</i>	CPC 10042	<i>Acalypha australis</i>	South Korea	H.D. Shin	GU269787	GU320488	-
<i>P. rhabdothamni</i>	CBS 114872	<i>Rhabdothamnus solandri</i>	New Zealand	M. Fletcher	GU269768	GU320471	-
<i>P. robusta</i>	CBS 111175 = CPC 1269 = CMW 5151	<i>Eucalyptus robur</i>	Malaysia	M.J. Wingfield	AY309597	DQ147617	JX901579
<i>P. rumohrae</i>	CBS 117747	<i>Marattia salicina</i>	New Zealand	C.F. Hill	GU269774	GU320477	-
<i>Pseudocercospora</i> sp.	CPC 10058	<i>Potentilla kleiniana</i>	South Korea	H.D. Shin	JQ324979	JQ325022	-

^a Ex-epitype or holotype species and strain are indicated in bold font. ^b CBS: Culture collection of the Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, The Netherlands; CMW: Culture collection of the Forestry and Agricultural Biotechnology Institute (FABI) of the University of Pretoria, Pretoria, South Africa; COAD: Coleção Octavio de Almeida Drumond, housed at the Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil; CPC: Culture collection of Pedro Crous, housed at the Westerdijk Institute; MUCC (in TSU): Culture Collection, Laboratory of Plant Pathology, Mie University, Tsu, Mie Prefecture, Japan. ^c ITS: internal transcribed spacers; ACT: actin; CAL: calmodulin.

For BI phylogenetic analyses, the best-fit model of each gene region in each genus was selected, according to the corrected Akaike information criteria (cAIC) in MEGA v. 11.0.11, and Jukes Cantor (JC) resulted as the best model for the three gene regions. Four Marko Chain Monte Carlo (MCMC) chains were run simultaneously starting from a random tree to 10 million generations. Trees were sampled every 1000 generations, and the first 2500 were discarded as the burn-in phase of each analysis. Posterior probabilities were determined from a majority-rule consensus tree generated with the remaining 7500 trees. For the ML analyses, a Generalized Time-Reversible with Gamma correction (GTR + GAMMA) nucleotide substitution model and 1000 bootstrap iterations were indicated. The other parameters were used as default settings. Sequences generated in this research were deposited in the GenBank (Table 2.1.).

2.4.5. Characterization of infection under field conditions

To determine the period between inoculation and the onset of visible symptoms, field inoculations were carried out. Two experiments were carried out in 2021, one during autumn, the other in spring. The experiments were conducted on 15-year-old cv. Arbequina olive trees in an experimental orchard at the INIA Las Brujas Agricultural Research Station, Canelones, Uruguay (34°40'S, 56°20'W).

Inoculum used was from naturally infected olive leaves, following the methods outlined by Ávila et al. (2020). The inoculum was collected from two orchards situated in Rincón del Colorado, Canelones, one of which contained 'Frantoio' olive trees and the other contained cv. Arbequina trees. To obtain each conidium suspension, 150 leaves with sporulating lesions were placed in an Erlenmeyer flask containing 100 mL of sterile distilled water (SDW) plus a drop of Tween 20. The flask was then shaken for 1 h to dislodge the conidia, and the resulting suspension was filtered through sterile gauze. The concentration of conidia was then adjusted to 1.5×10^5 conidia mL⁻¹, using haematocytometer assessments. To check conidium germination, an aliquot from each suspension was plated on water agar, and germination was evaluated after 24 h. Conidium suspensions with germination greater than 75% were used for inoculations.

Three 15-year-old cv. Arbequina trees were randomly chosen from the experimental orchard. Within each tree, four new shoots were selected, positioned, respectively, in the north (N), south (S), east (E), or west (W) quadrants of the tree, with each shoot containing approx. ten leaves. The shoots were sprayed with conidium suspension until runoff. To establish the baseline level of latent infections at the beginning of the experiment, an additional four shoots in each of the same trees and quadrants were inoculated with SDW plus Tween 20 as experimental controls. Each individual shoot was subsequently enclosed within a white non-textile cloth bag until the conclusion of the experiment, to prevent further natural infections caused by *P. cladosporioides*.

Monthly evaluations were carried out during 1 year after inoculations, to determine the presence or absence of symptoms related to CLS on each leaf of the inoculated and control treatments. Presence of characteristic *P. cladosporioides* conidia was also assessed using microscope examinations.

2.5. Results

2.5.1. Field symptoms and fungal isolates

Typical symptoms of CLS were observed in all the surveyed commercial olive groves. Leaf spots were observed mainly in adult leaves in the middle to lower parts of each tree. On the upper surfaces of the affected leaves, the spots were greenish-yellow to yellow with diffuse edges (Figure 2.1. a), and some leaves completely yellow or with necrotic areas. On the undersides of the leaves, grey areas of fungal sporulation were observed (Figure 2.1. b), consisting of typical conidiophores and conidia of *P. cladosporioides* (Figure 2.1. f and g). Fungal sporulation was often observed before symptoms, especially in Frantoio and Picual cultivars, and severe defoliation was often present (Figure 2.1. c).

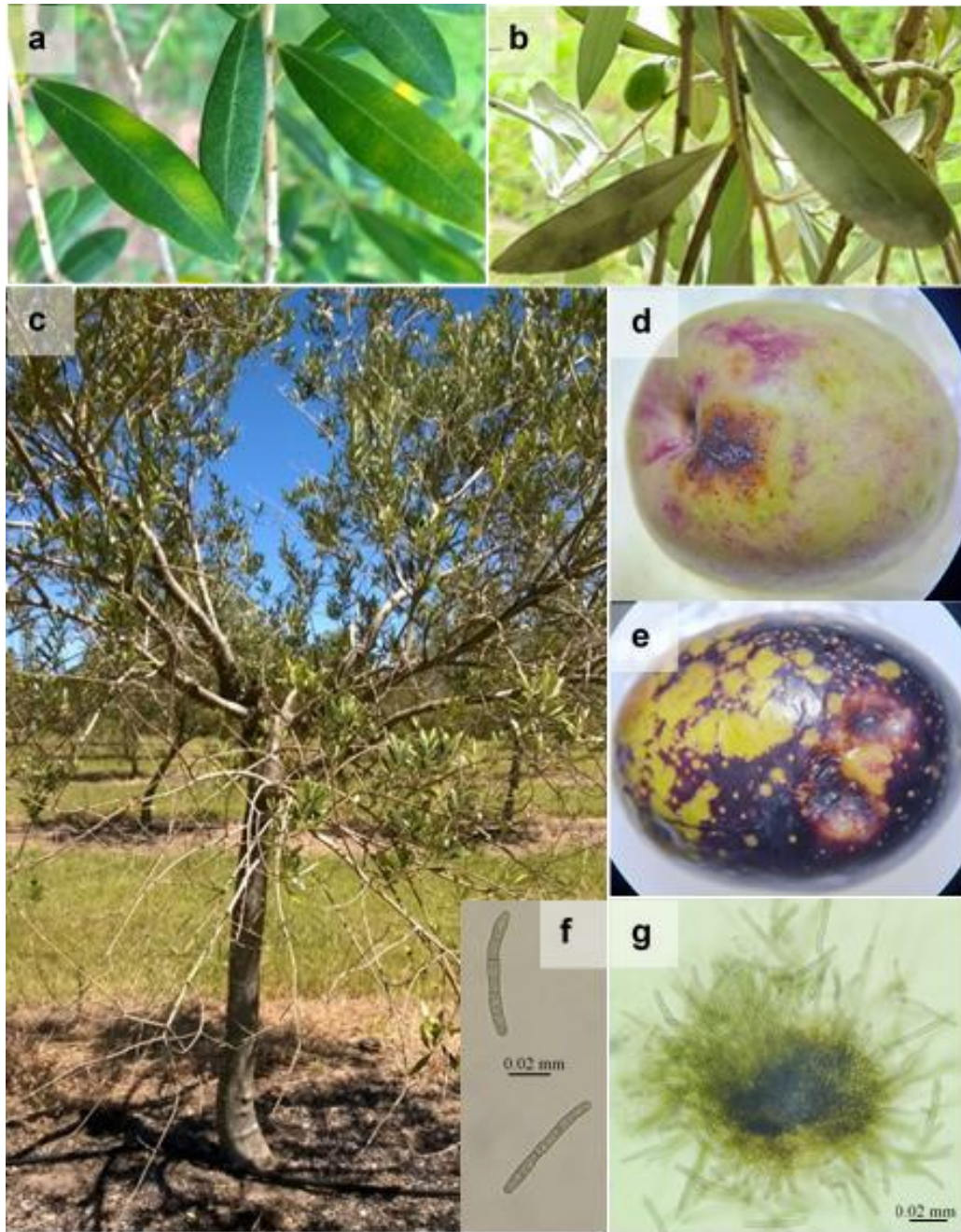


Figure 2.1. Symptoms of CLS on the olive tree caused by *Pseudocercospora cladosporioides*. **a:** chlorotic spots on the adaxial surface of the leaves and **b:** leaden grey areas on the abaxial side due to fructifications of the fungus; **c:** olive trees with severe defoliation; **d** and **e:** fruits with CLS symptoms and reproductive structures of the fungus; **f:** conidia and **g:** conidioma of *Ps. cladosporioides*.

No symptoms were observed on olive fruit during the two years of survey, so no isolates were derived from fruit. Only during August 2022 in one southern orchard (Canelones department) were typical symptoms of CLS observed on unharvested ‘Coratina’ olives 5 months after conventional harvest. Affected olives had irregular purple or light brown spots that progressed into depressed greyish-brown areas. A binocular magnifying glass and microscope examinations (Figure 2.1. d and e) showed typical conidiomata and conidia of *P. cladosporioides*.

A total of 41 monosporic isolates were obtained from leaves exhibiting CLS symptoms, sourced from the 18 olive orchards, as indicated in Table 2.1.

2.5.2. Morfological characterization of isolates

The isolates exhibited typical morphological characteristics of *P. cladosporioides*. After 15 d incubation at 20°C, the colonies had smooth and well-defined margins, and moderate aerial mycelium. The colonies were smoke-grey to pale olivaceous-grey, with iron-grey reverse sides.

The colonies were of three morphotypes, based on colour and appearance. Thirty-two isolates were of morphotype a (Figure 2.2. a), with grey rough colonies with multiple folds. Four isolates were of morphotype b (Figure 2.2. b), which had light grey to white cottony colonies also with multiple folds. Morphotype c (five isolates; Figure 2.2. c) had smooth olive to grey colonies (Table 2.1.). In all three groups, the colonies were iron-grey on the reverse sides.

Among all the total isolates examined, only eight had sparse conidium production on CMA, while none produced conidia on PDA. Presence or absence of conidia was not different between the three morphotypes. Conidia were single on each conidiophore, and were light brown. They were subcylindrical with subtruncate basal cells and obtuse apical terminal cells. The conidia ranged from 41 to 133 µm in length (mean = 83.7 µm), and from 4 to 6 µm in width (mean = 4.7 µm), and had average length to width ratio of 18.1 µm. Number of transverse septa in the conidia was from two to eight (Table 2.4.).

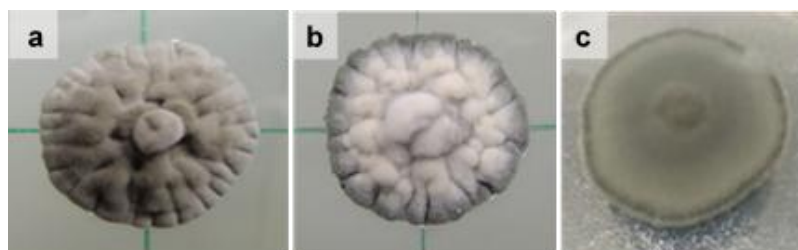


Figure 2.2. Morphological aspect of the tree morphotype of *Pseudocercospora cladosporioides* colonies growing in PDA culture medium during 15 days at 20°C in darkness. The three morphotypes are: **a:** grey and rough; **b:** whitish and rough and **c:** grey olivaceous and smooth.

Table 2.4. Morphological characteristics of conidia of eight representative *Pseudocercospora cladosporioides* isolates on corn meal agar.

Isolate	colony morphologies	Mean conidium dimensions (µm) ^a			Septa
		length (l)	width (w)	ratio l/w	
E19	c	101.8 ± 3.69 a	4.4 ± 0.10 bc	23.1 ± 0.85 a	5.6 ± 0.25ab
E10	a	94.9 ± 5.83 ab	4.9 ± 0.15 a	19.5 ± 1.35 abc	6.9 ± 0.39 a
E20	a	90.1 ± 3.69 ab	4.4 ± 0.10 bc	20.7 ± 0.85 ab	5.3 ± 0.23 b
E50	a	87.1 ± 3.69 ab	4.9 ± 0.10 a	17.8 ± 0.85 bc	4.8 ± 0.25 b
E74	b	81.2 ± 3.69 bc	4.9 ± 0.10 a	16.7 ± 0.85 cd	4.7 ± 0.24 b
E33	a	80.1 ± 3.69 bc	4.3 ± 0.10 c	18.6 ± 0.85 bc	4.6 ± 0.23 bc
E71	b	75.4 ± 3.69 bc	5.0 ± 0.10 a	15.2 ± 0.85 cd	4.5 ± 0.23 bc
E12	a	65.7 ± 3.69 c	4.9 ± 0.10 a	13.5 ± 0.85 d	3.6 ± 0.24 c
Average		83.7 ± 3.95	4.7 ± 0.11	18.2 ± 0.91	4.8 ± 0.26

^a The values are means for 20 conidia, ± standard errors. Means in a column followed by the same letter do not differ ($P = 0.05$) according to Tukey's test.

2.5.3. Effects of temperature on mycelial growth

Based on the non-linear adjustment estimated according the generalized Analytis Beta model, the optimum mycelial growth temperature for the 41 isolates ranged from 19.2 to 24.8 °C, with an average of 21.5°C. The average mycelial growth at 5°C was 0.011 mm day⁻¹, and no isolate grew at 35°C (Figure 2.3.). Statistical analyses conducted for the ten isolates showed differences in optimal growth temperatures and maximum daily radial growth rates. Isolate E35 had the highest optimum growth temperature (24.8°C) which was greater than the other isolates, except for isolate E73 (23.9°C),

while isolate E68 had the lowest optimum growth temperature (19.2°C). For daily radial growth rates at the optimum temperatures (Table 2.5.), isolates E19 and E40 had the greatest (respectively, 0.399 and 0.374 mmday⁻¹), while growth rate for isolate E76 was the least (0.231 mm day⁻¹).

Table 2.5. Mean temperatures and daily mycelium growth rates for ten representative isolates of ten *Pseudocercospora cladosporioides* isolates. The isolates were grown on PDA at 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 or 35 °C in darkness for 30 d.

Isolate	Analytis Beta model ^a			Temperature (°C) ^b			Growth rates ^c (mm day-1)
	<i>R</i> ²	<i>a</i>	<i>b</i>	Optimum	Minimum	Maximum	
E35	0.9570	1.98	0.42	24.8 a ^d	1.0	30.1	0.288 bc
E73	0.9969	2.69	0.79	23.9 ab	2.0	30.3	0.286 bc
E07	0.9995	3.18	1.29	22.4 bc	0.0	31.5	0.282 bc
E53	0.9998	1.37	0.69	21.6 cd	4.5	30.0	0.270 c
E82	0.9888	2.14	1.03	21.1 cde	1.5	30.5	0.285 bc
E40	0.9954	3.30	1.64	20.5 cde	3.5	30.2	0.374 a
E78	0.9968	0.82	0.74	20.5 de	9.5	30.3	0.281 bc
E76	0.9982	1.58	1.22	20.2 de	4.9	32.0	0.231 d
E19	0.9612	3.08	1.74	20.2 de	1.0	31.0	0.399 a
E68	0.9953	2.67	1.63	19.2 e	1.5	30.0	0.315 b

^a Analytis Beta model, where *R*² = coefficient of determination, and *a* and *b* = coefficients of regression.

^b For each isolate, temperature average growth rates were adjusted to the regression curve to optimum growth temperature. ^c Growth rates at the optimum temperature. ^d Means in each column followed by the same letter do not differ (*P* = 0.05), according to Tukey's test.

2.5.4. Phylogenetic analyses

Preliminary identification based on BLAST search of *ITS*, *ACT*, and *CAL* gene regions, showed high similarity (99 to 100%) of all 41 isolates with the *P. cladosporioides* fungal sequences available in the GenBank Database, including the ex-epitype. The individual sequence datasets showed no significant conflicts in tree topology, indicating that the three genes could be combined. The multiple locus data matrix contained 71 taxa (41 from this study) and 933 characters, including gaps (*ITS* 1 - 462, *ACT* 463 - 655, and *CAL* 656 - 933), of which 75 were parsimony informative.

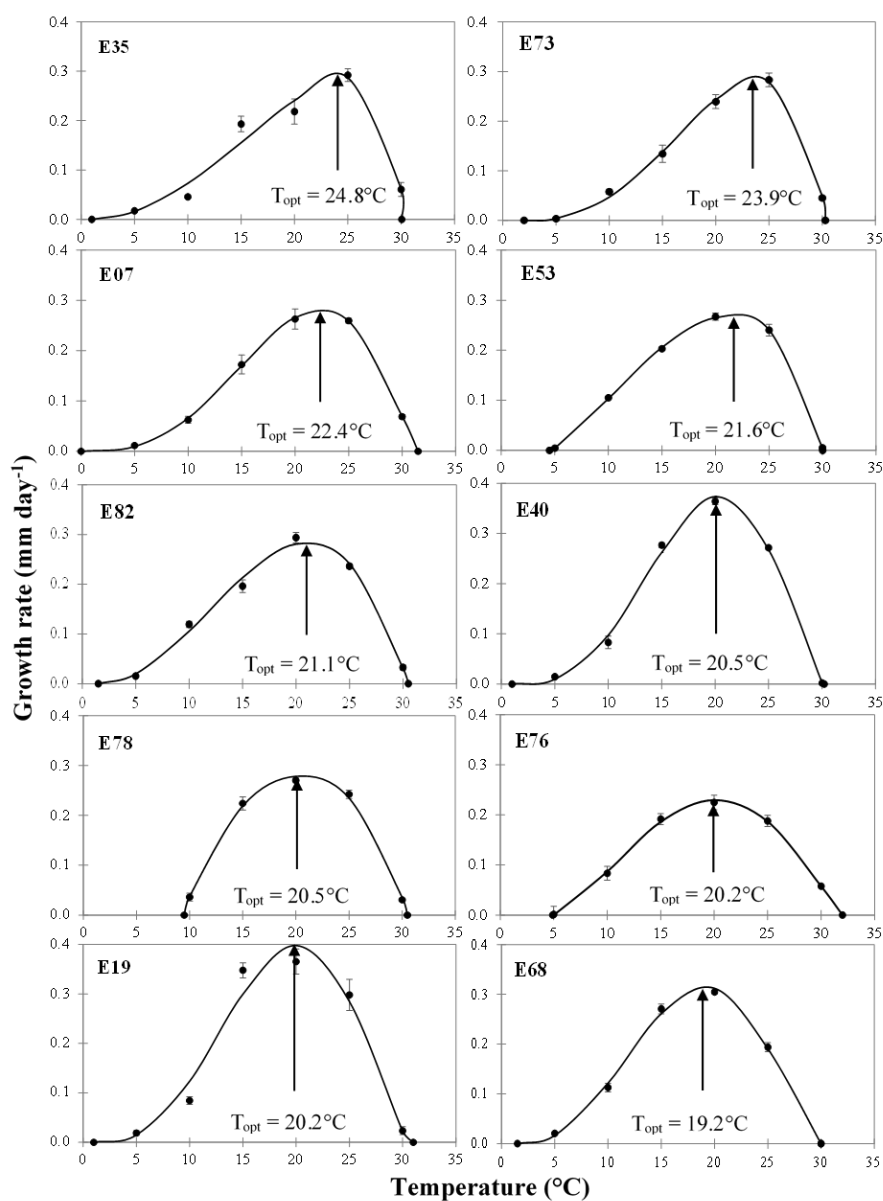


Figure 2.3. Effect of temperature on mycelial growth rate of a selection of ten *Pseudocercospora cladosporioides* isolates. The isolates were selected according to geographic origin, optimal growth temperature, and daily radial growth rate at the optimum temperature. Isolates were grown on PDA at 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 and 35 °C in darkness for 30 days. For each isolate, average growth rates versus temperature were fitted to a nonlinear regression curve using the Analytis Beta model. Data points are the means of two experiments with three replicates per isolate. Vertical bars are standard errors of the mean.

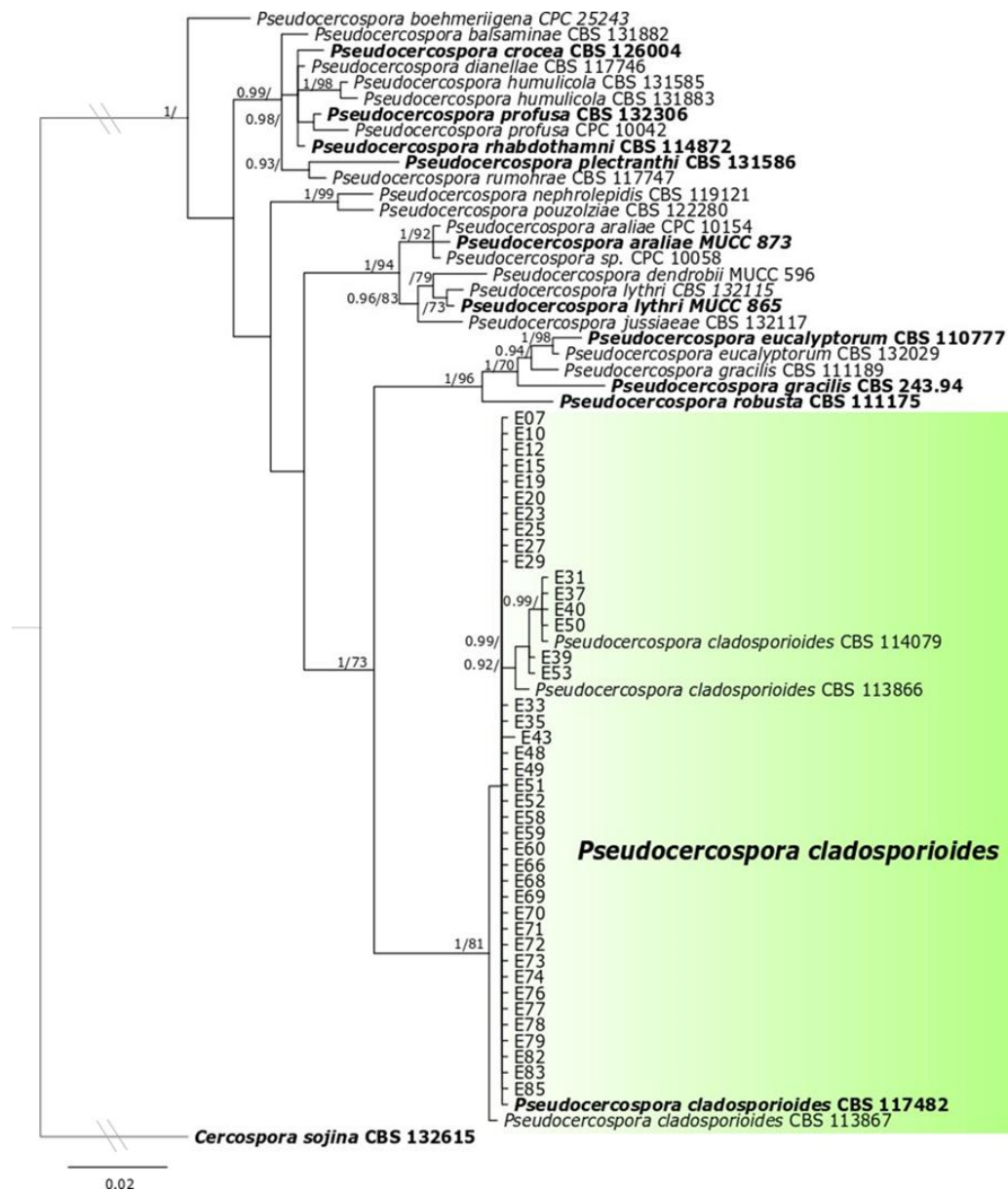


Figure 2.4. Bayesian inference phylogenetic tree built using the concatenated sequences of the *ITS*, *ACT* and *CAL* genomic regions of 41 Uruguayan isolates obtained from olive leaves with typical *Cercospora* leaf spot disease and sequences obtained from GenBank (ex-type and epi-type strains indicated in bold). *Cercospora sojina* CBS 132615 was used as an outgroup. Bootstrap support values of posterior probability (PP) and Maximum Likelihood (ML) higher than 0.90 and 70%, are shown at the nodes (PP/ML), respectively. Double hash marks indicate branch lengths shortened at least 2-fold to facilitate visualization. The scale bar represents the estimated number of substitutions per site.

The tree topologies inferred from BI and ML analyses were consistent with each other. The BI trees are presented, with the support node values of both phylogenetic methods utilized (Figure 2.4.). The 41 Uruguayan isolates grouped in a separate and robust clade (BI/ML: 1/81) with *P. cladosporioides* isolates, including the ex-epitype (CBS 117482), confirming their identity to this species.

2.5.5. Characterization of infection under field conditions

After 5 or 6 months from leaf inoculation, depending on whether this was conducted during autumn or spring, initial symptoms or signs of CLS became apparent in the leaves of inoculated cv. Arbequina plants. In autumn, disease incidence in the inoculated leaves reached 86%. while in spring this reached 91%. The non-inoculated control leaves had 8% infection in both seasons (Figure 2.5.).

Initially, the infected leaves were indistinguishable from healthy leaves. However, on the undersides of the infected leaves, distinct leaden-coloured areas began to emerge. Subsequently, yellowish and chlorotic regions appeared on the upper leaf surfaces, corresponding to the leaden underside zones. Microscopic examinations confirmed the presence of characteristic *P. cladosporioides* conidia within the leaden-grey areas on the abaxial surfaces of the inoculated leaves.

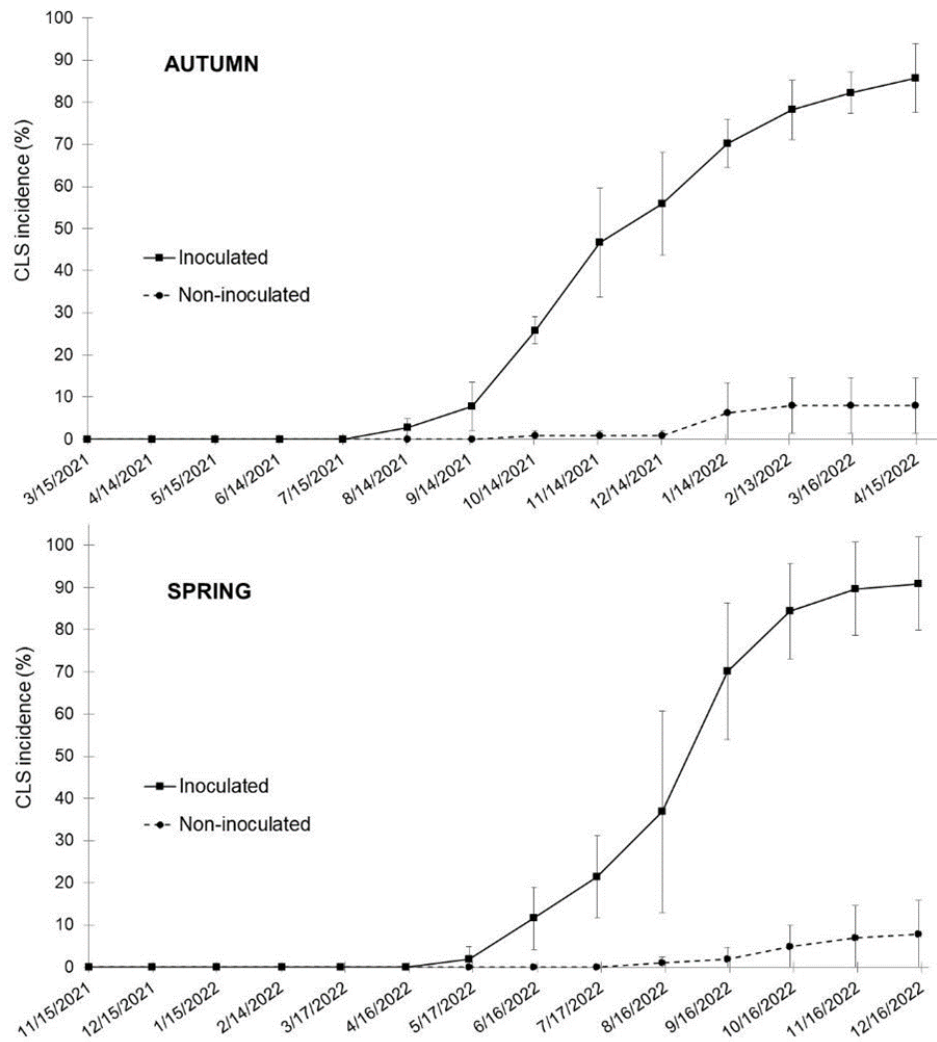


Figure 2.5. Development of Cercospora Leaf Spot symptoms in 15-year-old olive trees of the Arbequina cultivar inoculated in autumn (03/15/2021) and spring (11/15/2021) (Southern Hemisphere) with a conidial suspension of 1.5×10^5 conidia.ml⁻¹ of *Pseudocercospora cladosporioides* and evaluated monthly for 13 months.

2.6. Discussion

Typical CLS symptoms were observed in all of the commercial olive groves surveyed in different areas of Uruguay. This confirms that CLS is a prevalent disease in Uruguayan olive production, as previously described by Conde et al. (2013). The generally humid Uruguayan conditions and the susceptibility to CLS of the olive cultivars planted in this country probably account for this finding. Consequently, CLS can be considered as an endemic disease in Uruguay, as has been reported in Spain (Del Moral and Medina, 1985) and Italy (Nigro et al., 2002).

While typical leaf spot, characterised by greenish-yellow to yellow spots with fuzzy edges on upper leaf surfaces, was mainly observed on older leaves (older than 8 months), this symptom was also present on young leaves (4 to 5 months), as was also documented by Nigro et al. (2002) and is consistent with the description of Trapero et al. (2017). In addition, presence of pathogen structures (*Pseudocercospora* conidia and conidiomata) was verified on the undersides of the leaves, producing leaden grey colouration. As reported by other researchers, the first pathogen signs can anticipate appearance of symptoms on the leaves (Nigro and Ferrara, 2011; Pappas, 1993), as was observed in the present study in Frantoio and Picual cultivars.

The low incidence of CLS symptoms on olive fruit has classified CLS as a foliar disease (Abdelfattah et al., 2015; Pappas, 1993). However, the present study has shown that CLS symptoms on fruit were observed exclusively in one unharvested orchard 5 months after the usual olive harvest date. During autumn, the low to moderate temperatures (10-20°C) accompanied by humid and rainy periods, probably gave favourable conditions for CLS development (Ávila et al., 2020; Giménez and Castaño, 2013). In addition, in Uruguay olive fruits are usually harvested early, between maturity indices of 1 and 2.5, which prioritizes oil quality over yields (Sánchez et al., 2022) and restricts CLS symptom development.

As occurs in Spain (Ávila et al., 2005), the present research showed that *P. cladosporioides* was the sole causal agent of CLS in Uruguay. Multilocus phylogenetic analysis grouped the Uruguayan isolates with the ex-epitype strain of *P.*

cladosporioides (CBS 117482), in a well-defined and separate clade to other *Pseudocercospora* species.

Conidium shape, size and number of transverse septae are the most important characters for morphological identification of species of *Pseudocercospora* (Ávila et al., 2004). The Uruguayan isolates showed little or no sporulation on different artificial media, with only a few isolates producing a few conidia on CMA. This low or nil production of conidia in culture has been previously reported (Ávila et al., 2004, 2020; Pappas, 1993). In the present study, some conidia were longer than those previously reported for this species (Ávila et al., 2004; Del Moral and Medina, 1985; McKenzie, 1990; Pappas, 1993; Sarasola, 1951; Sergeeva et al., 2008). According to Sarasola (1951), these differences can be a consequence of the origins (leaves, fruits, or artificial culture media) of the conidia. The variability of reproductive structures may also be due to the development state of conidia and to environmental conditions (Ávila et al., 2020). For example, Pappas (1993) mentioned that formation of large fructifications occurred in humid areas.

Optimum temperatures for mycelium growth varied for the different *P. cladosporioides* from 19.2 to 24.8°C, and maximum colony growth rate was from 0.231 to 0.399 mm day⁻¹. The optimum temperature average for the 41 isolates was 21.5°C. These parameters were similar to those reported by Ávila et al. (2020) and Pappas (1993), who respectively reported optimum growth temperature for this fungus of 21°C and 22°C. Adaptability of the pathogen to grow in a wide range of temperatures allows it to develop in different environments.

The initial CLS symptoms on field-inoculated cv. Arbequina leaves were visible after 5 to 6 months in spring and autumn, and 11 months after the date of inoculations, infections incidence of approx. 80% was recorded. These results confirm the long incubation period of *P. cladosporioides* under field conditions (Ávila et al., 2020; Del Moral and Medina, 1985; Trapero et al., 2017). CLS symptoms in non-inoculated leaves can also originate from periods preceding inoculations, and these pose

challenges for determining if asymptomatic leaves are healthy or are undergoing incubation periods required by this pathogen.

In conclusion, this study has confirmed the wide distribution of CLS in the olive growing regions of Uruguay, and has indicated that *P. cladosporioides* is the causal agent of this disease in this country. Further research should prioritize comprehensive examination of the CLS disease cycle, including determination of the specific periods during which infections occur throughout each year. Additionally, understanding the evolution of inoculum production over time and developing a method to detect latent or asymptomatic infections would be valuable. Evaluating the effectiveness of fungicides for control of CLS and identifying the optimal timing for their application is also important. Assessing susceptibility or resistance of locally cultivated cultivars under specific environmental conditions is also likely to provide important knowledge to assist management of this disease.

2.7. Literature cited

- Abdelfattah, A, Li Destri Nicosia MG, Cacciola SO, Droby S, Schena L. (2015). Metabarcoding analysis of fungal diversity in the Phyllosphere and Carposphere of olive (*Olea europaea*). *PLoS ONE*, 10: e0131069. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131069>
- Agustí-Brisach C., Romero J., Ávila A., Raya M.C., Roca L.F., Trapero A., 2016. Bases para la gestión integrada del emplomado del olivo. *Vida Rural, Especial Olivar* 40-48.
- Ávila A., Benali A., Trapero Casas A., 2004. Variabilidad morfológica y cultural de *Pseudocercospora cladosporioides*, agente del emplomado del olivo. *Boletín de Sanidad Vegetal - Plagas* 30: 369-384. https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_plagas%2FBSVP-30-02-369-384.pdf
- Ávila A., Groenewald J.Z., Trapero A., Crous P.W., 2005. Characterisation and epitypification of *Pseudocercospora cladosporioides*, the causal organism of Cercospora leaf spot of olives. *Mycological Research* 109(8): 881-888. <https://doi.org/10.1017/S0953756205003503>

- Ávila A., Romero J., Agustí-Brisach C., Abdellatif B., Roca L.F., Trapero A., 2020. Phenotypic and pathogenic characterization of *Pseudocercospora cladosporioides*, the causal agent of Cercospora leaf spot of olives. *European Journal of Plant Pathology* 156: 45-65. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01861-5>
- Braun U., 1993. Taxonomic notes on some species of the Cercospora complex (III). *Mycotaxon* 48: 275-298.
- Carbone I., Kohn L.M., 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553-556. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061051>
- Conde P., Arias M., Villamil J.J., Bruzzone J., Bernaschina Y., ... 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>
- Conde P., Montelongo M.J., Leoni C., 2013. Enfermedades del Olivo. In: *Aceites de Oliva: de la Planta al Consumidor*, Vol 1 (M.A. Grompone, J. Villamil, ed.), INIA, Montevideo, 183-214.
- Crous P.W., Braun U., Hunter G.C., Wingfield M.J., Verkley G.J.M., ... Groenewald J.Z., 2013. Phylogenetic lineages in *Pseudocercospora*. *Studies in Mycology* 75: 37-114. <https://doi.org/10.3114/sim0005>
- Del Moral J., Medina D., 1985. El “repilo plumizo” del olivo causado por *Cercospora cladosporioides* Sacc., enfermedad presente en España. *Boletín de Servicio de Plagas* 11: 31-36. Available at: https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_plagas%2FBSVP-11-01-031-035.pdf Accessed November 16, 2022.
- Garrido A., Fernández-González M., Cortiñas Rodríguez J.A., Carrera L., González-Fernández E., ... Rodríguez-Rajo F.J., 2022. Fungal phytopathogenic spore first assessment in an olive orchard of Northwestern Spain. *Agronomy* 12: 246. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020246>
- Giménez A., Castaño J.P., 2013. Características agroclimáticas del Uruguay. In: *Aceites de Oliva: de la Planta al Consumidor*, Vol 1 (M.A. Grompone, J. Villamil, ed.), INIA, Montevideo, Uruguay 37-50.

- Hau B., Kranz J. 1990. Mathematics and statistics for analyses in epidemiology. In: *Epidemics of Plant Diseases* (J. Kranz, ed.), Springer International Publishing, Berlin, Germany, 12-52.
- López-Moral A., Raya-Ortega M.C., Agustí-Brisach C., Roca L.F., Lovera M., ... Trapero A. 2017. Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing almond anthracnose in Spain. *Plant Disease* 101: 2034-2045. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-07-0318-RE>
- McKenzie E.H.C., 1990. New plant disease records in New Zealand: Miscellaneous fungal pathogens II. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 18: 65-73. <https://doi.org/10.1080/01140671.1990.10428073>
- MGAP-DIEA, 2020. Censo de productores de olivos 2020. Serie Trabajos Especiales 364: 46. Available at: https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/2021-03/PUBLICACION_Olivos2020_Final.pdf Accessed November 16, 2022.
- Nigro F., Ferrara M., 2011. Olive cercosporiosis. In: *Olive Diseases and Disorders* (L. Scherna, G.E. Agosteo, S.O. Cacciola, ed.), India Transworld Research Network, 247-258.
- Nigro F., Ippolito A., Gallone P., Romanazzi G., Carmignano P., Laccone G., 2002. Cercosporiosis of olive in Apulia and Attempts to control the disease. *Acta Horticulturae* 586: 773-776. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.586.167>
- Paolocci F., Rubini A., Granetti B., Arcioni S., 1999. Rapid molecular approach for reliable identification of *Tuber* spp. ectomycorrhizae. *FEMS Microbiology Ecology* 28: 23-30 <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00557.x>
- Pappas A.C., 1993. *Mycocentrospora cladosporioides* on olive in Greece. *Bulletin OEPP/EPPO* 23: 405-409 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1993.tb01344.x>
- Romero J., Ávila A., Agustí-Brisach C., Roca L.F., Trapero A., 2020. Evaluation of fungicides and management strategies against cercospora leaf spot of olive Caused by *Pseudocercospora cladosporioides*. *Agronomy* 10: 271. <https://doi.org/10.3390/agronomy10020271>
- RStudio v. 2023.06.1-524 (<https://dailies.rstudio.com/version/2023.06.1+524/>).

- Sánchez B., Mastrogiovanni M., Santos M., Petingi S., Conde P., ... Rubbo H., 2022. Detection of nitro-conjugated linoleic acid and nitro-oleic acid in virgin olive oil under gastric conditions: relationship to cultivar, fruit ripening, and polyphenol content. *ACS Food Science & Technology* 2: 673-681. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.1c00477>
- Sarasola A.A., 1951. A new disease of Olive in Argentina caused by *Cercospora cladosporioides* Sacc. *Revista de la Facultad de Agronomía*, Universidad Nacional de La Plata 28: 41-47.
- Sergeeva V., Braun U., Spooner-Hart R., Nair N., 2008. First report of *Pseudocercospora cladosporioides* on olive (*Olea europaea*) berries in Australia. *Australasian Plant Disease Notes* 3: 24. <https://doi.org/10.1071/DN08010>
- Sergeeva V., Spooner-Hart R., 2009. Anthracnose and Cercosporiose on olives in Australia: an update. *Australian & New Zealand Olivegrower and Processor* 65: 31-34. Available at: https://olivediseases.com/wp-content/uploads/2015/02/vera_anthraxnosecercosporiose.pdf Accessed November 16, 2022
- Tamura K., Stecher G., Kumar S., 2021. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38: 3022-3027.
- Trapero A., López F.J., Blanco M.A., 2017. Enfermedades. In: *El Cultivo del Olivo*. (D. Barranco, R. Fernández-Escobar, L. Rallo, ed.), Mundi-Prensa, Madrid, Spain, 733-798.
- White T.J., Bruns T.D., Lee S., Taylor J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols- A guide to methods and applications* (M.A. Innes, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White, eds.), Academic Press, London, 315-322.

3. Mancha foliar por Cercospora en olivo: producción de inóculo y momento de las infecciones a lo largo del año

3.1. Resumen

La mancha foliar por Cercospora del olivo, causada por *Pseudocercospora cladosporioides*, es una de las enfermedades foliares de mayor impacto en la producción de olivo. Durante dos años consecutivos, investigamos la variación temporal de la producción de inóculo y el momento de las infecciones foliares a lo largo del año en el cultivar arbequina ubicado en el noroeste de Uruguay. Adicionalmente, examinamos la influencia de las variables meteorológicas tanto en la producción de inóculo como en la ocurrencia de infecciones. Se identificaron dos períodos caracterizados por una producción sustancialmente mayor de esporas, uno durante fines de primavera a principios de verano y el otro durante el otoño, ambos favorecidos por temperaturas de 20-25 °C y humedad relativa entre 80 y 95 %. La menor producción se registró en invierno, lo que se explica por los frecuentes días con temperaturas inferiores a 10 °C. Las infecciones se produjeron a lo largo de todo el año, con un descenso significativo durante el inicio de la primavera, probablemente debido a una baja disponibilidad de esporas en el campo y a la menor susceptibilidad de las hojas jóvenes a ser infectadas. Estos resultados ayudarán a los cultivadores a diseñar estrategias de gestión eficaces centradas en los períodos de mayor producción de inóculo, especialmente en otoño, cuando las infecciones son más abundantes.

Palabras clave: *Olea europaea*, *Pseudocercospora cladosporioides*, producción de conidios, incidencia de la infección, condiciones ambientales

Cercospora Leaf Spot of Olive: Inoculum Production and Infections Timing throughout the Year

3.2. Summary

Cercospora leaf spot (CLS), caused by *Pseudocercospora cladosporioides*, is one of the most significant foliar diseases impacting olive production. Over two consecutive years, we investigated the temporal variation of inoculum production and the timing of foliar infections throughout the year on the Arbequina cultivar located in the northwest of Uruguay. Additionally, we examined the influence of meteorological variables in both inoculum production and the occurrence of infections. Two periods characterized by substantially higher spore production were identified, one during late spring to early summer and the other during autumn, both favored by temperatures of 20-25°C and relative humidity between 80 and 95%. The lowest production was registered in winter explained by frequent days with temperatures below 10°C. Infections occurred throughout the year, with a significant decrease during the early spring, probably due to a low spore available in the field and the less susceptibility of young leaves to be infected. These findings will help growers design effective management strategies focusing on the highest inoculum production periods, especially in autumn when the infections are more abundant.

Keywords: *Olea europea*; *Pseudocercospora cladosporioides*; conidia production, infection incidence, environmental conditions

3.3. Introduction

Cercospora leaf spot (CLS) is one of the most important foliar diseases affecting commercial olive production worldwide. This disease has been reported exclusively on *Olea europea* (Ávila et al., 2004; Nigro et al., 2003; Pappas, 1993) and all cultivars are susceptible or moderately susceptible (Trapero et al., 2017). Recently, it was confirmed that *Pseudocercospora cladosporioides* is the pathogen associated with this disease in Uruguay (Lombardo et al., 2023). This pathogen causes irregular light green to yellow spots on the upper surface of the leaves. At the same time, the underside exhibits patches of lead-grey colour due to the presence of conidioma and conidia (Figure 3.1.). Eventually, the leaves fall off the tree, resulting in severe defoliation and significant economic losses. This occurs due to the reduced photosynthetic area and weakened vigour of the infected trees. Moreover, this fungus inflicts lesions on the fruits, causing delayed ripening, reduced yield, and decreased oil quality (Ávila et al. 2020; Lombardo et al. 2023; Trapero et al., 2017).

Pseudocercospora cladosporioides was first described in 1886 in Italy (Saccardo, 1886). However, there is little work on the epidemiological characteristics of CLS worldwide (Trapero et al., 2017). In regions with a temperate climate, this pathogen can remain active throughout the year (Nigro and Ferrara, 2011). Also, the main factors favoring infections by *P. cladosporioides* are abundant rainfall, stressed plants, and varietal susceptibility (Agustí-Brisach et al., 2016; Moral et al. 2005; Nigro et al., 2002, 2003).

Moreover, CLS infections are more severe in high-density plantations and in the lower part of the tree due to the more humid microclimate and the greater abundance of conidia (Agustí-Brisach et al., 2016; Ávila et al., 2004; Nigro et al., 2002). This lower part of the tree is in proximity to fallen leaves on the ground, which could act as an additional inoculum source (Agustí-Brisach et al., 2016). Cercospora leaf spot is characterized by its long incubation period, whereby infected leaves can persist for several months without exhibiting visible symptoms. (Agustí-Brisach et al., 2016; Ávila et al., 2020; Lombardo et al., 2023).



Figure 3.1. Symptoms of CLS on the olive tree, cv Arbequina, caused by *Pseudocercospora cladosporioides*. **a.** chlorotic spot on the adaxial surface of the leaves; **b.** leaden grey areas on the abaxial side due to fructifications of the fungus; **c.** olive branches with severe defoliations.

The scarcity of epidemiological studies in the Atlantic region of South America is exacerbated by the significant differences between the humid climate conditions of Uruguayan olive production and the traditional olive-growing region of the Mediterranean. In the Mediterranean basin region, the most favorable climatic conditions for infections occur from late summer to winter. This period coincides with the occurrence of warm to cool temperatures and the onset of rainfall (Abd-Elmabod et al., 2017). Therefore, to improve the management of olive CLS in the orchards, it is crucial to generate epidemiological insights into the disease behavior under local humid and template to warm weather conditions. Thus, this study aims to determine

the temporal variations of inoculum production and the timing of foliar infections under the field conditions, throughout the year. Furthermore, we examine the influence of various meteorological variables on both inoculum production and infections occurrence.

3.4. Materials and methods

3.4.1. Evolution of inoculum production throughout the year

During two consecutive years (2017 to 2019), leaves with CLS symptoms were monthly collected from a commercial orchard of a 6-year-old Arbequina cultivar with history of CLS located in the northwest of Uruguay (31°19'20"S 57°50'01"W). Each month, three samples of 50 symptomatic leaves were collected from ten randomly selected trees. The severity of the symptoms on the sampled leaves was rated as 2 or higher on the empirical scale used by Nigro et al. (2002). Leaves were placed in 30 ml of sterile distilled water containing 0.1% tween 20 to facilitate spores release. The removal of spores was carried out by vigorous agitation for five minutes in a vortex. The *P. cladosporioides* spore concentration was estimated using a Neubauer counter and expressed as the average number of conidia per leaf.

3.4.2. Identification of field infection periods.

The infection periods were studied in the same commercial orchard as in the previous trial and during a similar period, except that the experiment started one month later in the second year due to a delay in tree bud break (September 2017 to August 2018, and October 2018 to September 2019). The methodology was based on the Páez Wallberg (2011) with modifications. The trial consisted of covering the branches of the last spring flush with white non-textile cloth bags to prevent the occurrence of natural *P. cladosporioides* infections. Each bag covered five apical nodes of one branch without visible CLS symptoms. All branches were covered on September 1st 2017, and October 1st 2018, respectively. Subgroups of 10 covered branches were disbursed sequentially for one month and then re-bagged generating 12 “infection periods”

throughout the year (total branches = 120). A group of 10 branches remained bagged throughout the trial and were used as a closed control (CC).

The experimental design consisted of five Completely Randomized Blocks, each containing three trees in the same row. Each exposure period (12 months) and the CC included two branches per block (North and South orientation of every plant, totaling 10 branches per treatment).

Branches from each exposure period were cut six months after re-bagged, and the presence of *P. cladoporioides* infections was evaluated in the laboratory under a microscope verifying the presence of conidia. The CC was evaluated six months after the beginning of each evaluation period (year). Disease incidence per branch was calculated using the following formula: $\text{Incidence (\%)} = (\text{N}^\circ \text{ of diseased leaves} / \text{Total N}^\circ \text{ of leaves examined}) \times 100$. For the analysis, the disease incidence registered in the CC was subtracted from the disease incidence recorded in each exposed period.

3.4.3. Meteorological variables

Meteorological variables data were recorded from a meteorological station situated at the National Research Institute of Agriculture (INIA) Salto Grande (<http://www.inia.uy/gras/Clima/Banco-datos-agroclimatico>) situated 7.8 km from the olive field orchard where the trial was conducted and contrasted with the monthly production of *P. cladosporioides* conidia and infection incidence. The data considered were minimum temperature (Tmn), mean temperature (Tme), maximum temperature (Tmx), minimum relative air humidity (RHmn), mean relative air humidity (RHme), maximum relative air humidity (RHmx), and accumulated rainfall (AR).

Based on previous studies (Ávila et al., 2020; Lombardo et al., 2023; Nigro and Ferrara, 2011) we established a total of 20 indicators to be evaluated based on the favorable environmental conditions for *P. cladosporioides* development. These indicators were average daily temperature between 20 and 25°C, minimum daily temperature < 10°C, maximum daily temperature between 30 and 35°C, average relative humidity (RHme < 70%, RHme > 70%, RHme 60-70%), minimum relative

humidity (RHmn < 50%, RHmn > 50%, RHmn 30-50%, RHmn < 70%), high relative humidity (RHmx < 95%, RHmx > 95%, RHmx 80-95%, RHmx 80-100%) and accumulated rain (AR < 1 mm, AR > 1 mm). The value of each indicator was estimated considering the number of days per month in which each of the favorable environmental conditions occurred alone or a combination of them.

3.4.4. Statistical analysis

Analyses of variance were conducted to evaluate the conidia production and infection occurrence on a monthly, seasonally, and yearly basis. Tukey's test ($P = 0,05$) was used to compare mean values.

Pearson correlations analyses were used to identify meteorological variables and indices associated with conidia production and infections occurrence with the 'corr_coef' function from the 'metan' R package (Olivoto and Dal'Col Lúcio, 2020). The meteorological variable data were subjected to a comparison using the normal T-test, which was previously checked for normality using the Shapiro test. In instances where the data series did not meet the criteria for normality, the Wilcoxon signed-rank test was employed. All statistical analyses were performed according to the guidelines of the software RStudio v. 2023.06.1-524.

3.5. Results

3.5.1. Evolution of inoculum production throughout the year

During the two years of the trial, *P. cladosporioides* consistently produced conidia on diseased leaves throughout the year. The average annual spore production exhibited a notably higher quantity in the first year (10,647 conidia per leaf) compared to the second year (7,883 conidia per leaf). On each year, analysis of conidia production per season indicates a significantly lower abundance during winter in both evaluated years ($P = 0.05$) (Figure 3.2.). The monthly conidia production analysis identified two periods characterized by substantially higher spore production compared to the rest of the year. One period spanned from late spring to early summer (October-January), and

the other covered the autumn months (March-May). Notably, April 2018 exhibited significantly higher spores production compared to other months ($P = 0.05$), with an average of 31,640 conidia per leaf (Figure 3.3.).

Meteorological conditions exhibited variations between the two assessed years, particularly concerning Accumulated Rainfall and Relative Air Humidity variables (Figure 3.4.). In the first year, the total accumulated rainfall was 1384 mm, whereas in the second year, it reached 1709 mm. In the first year, the highest rainfall occurred during the autumn season, totaling 532 mm, while in the second year, it peaked in the summer with 680 mm. Furthermore, significant variations were observed in mean and minimum Relative Air Humidity (RHme and RHmn) between the two years and within the same seasons (Table 3.1.). In the first year, RHme and RHmn during summer and autumn were significantly lower than in the second year. Although the minimum temperatures remained similar in both years, the mean and maximum temperatures were higher during summer and autumn in the first year compared to those in the second year. However, the opposite happened in the winter months.

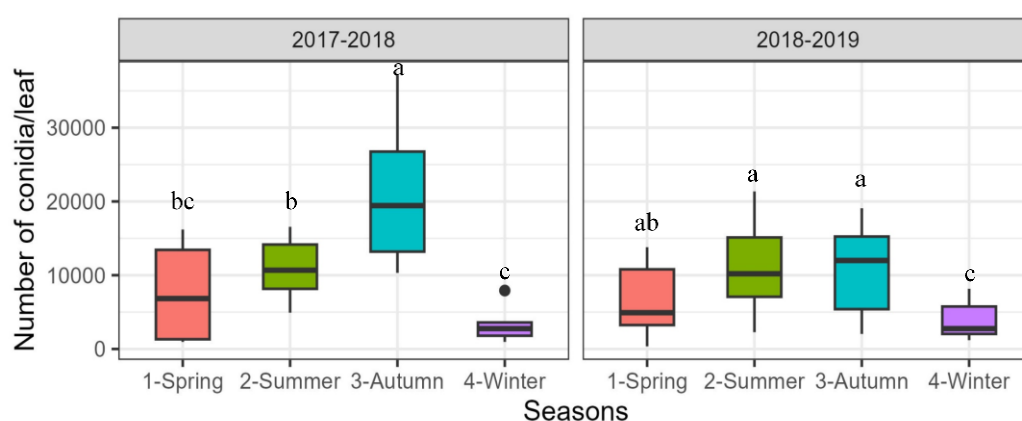


Figure 3.2. Seasonal mean production of *Pseudocercospora cladosporioides* conidia per leaf on olive trees of a commercial orchard of Arbequina cultivar during the two years of the trial. Vertical bars indicate standard deviations. Within each year, season values followed by the same letter indicate no statistically significant differences according to Tukey test ($P = 0.05$).

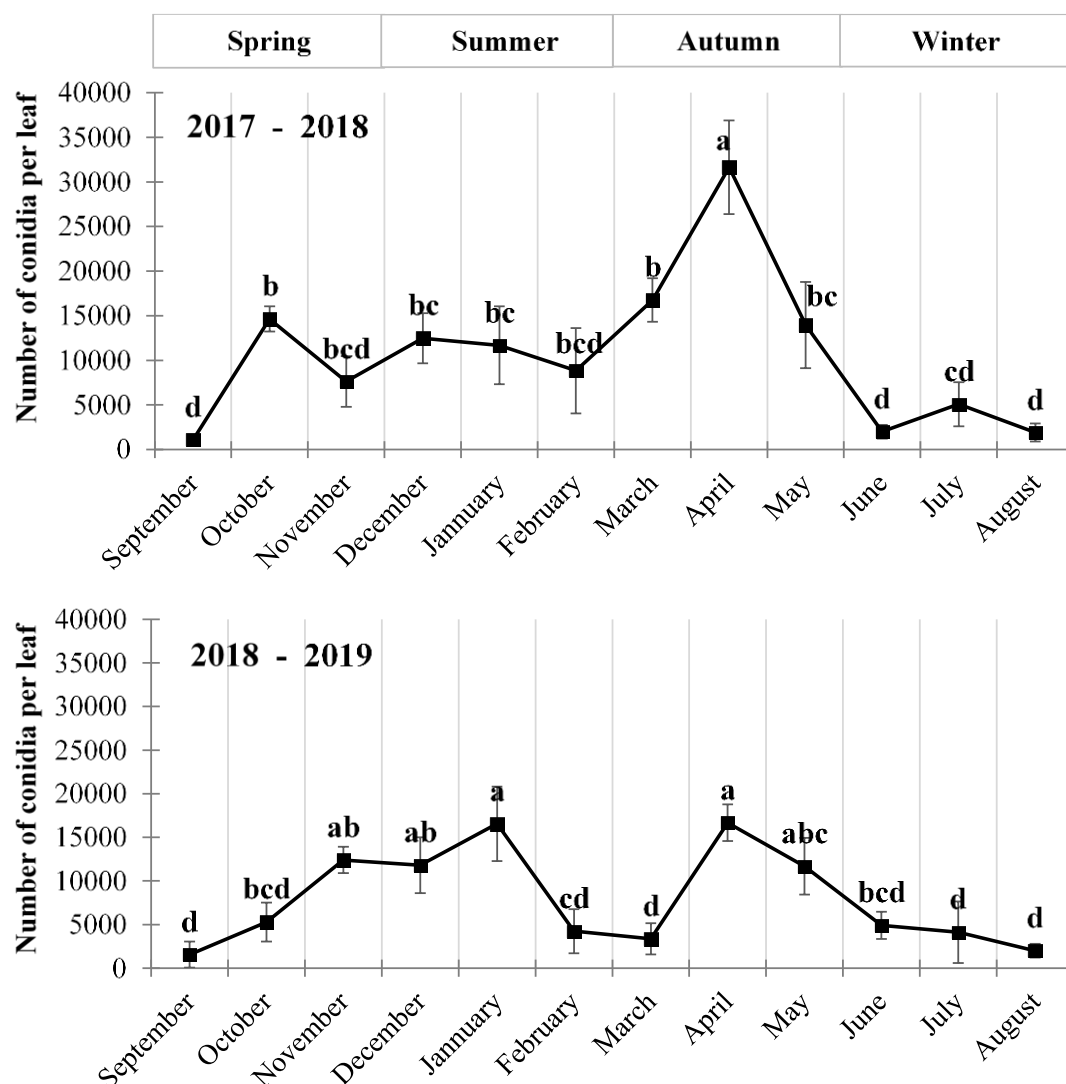


Figure 3.3. Monthly mean production of *Pseudocercospora cladosporioides* conidia per leaf on olive trees of a commercial orchard of Arbequina cultivar during the two years of the trial. Vertical bars indicate standard deviations. Within each year, monthly values followed by the same letter indicate no statistically significant differences according to Tukey test ($P = 0.05$).

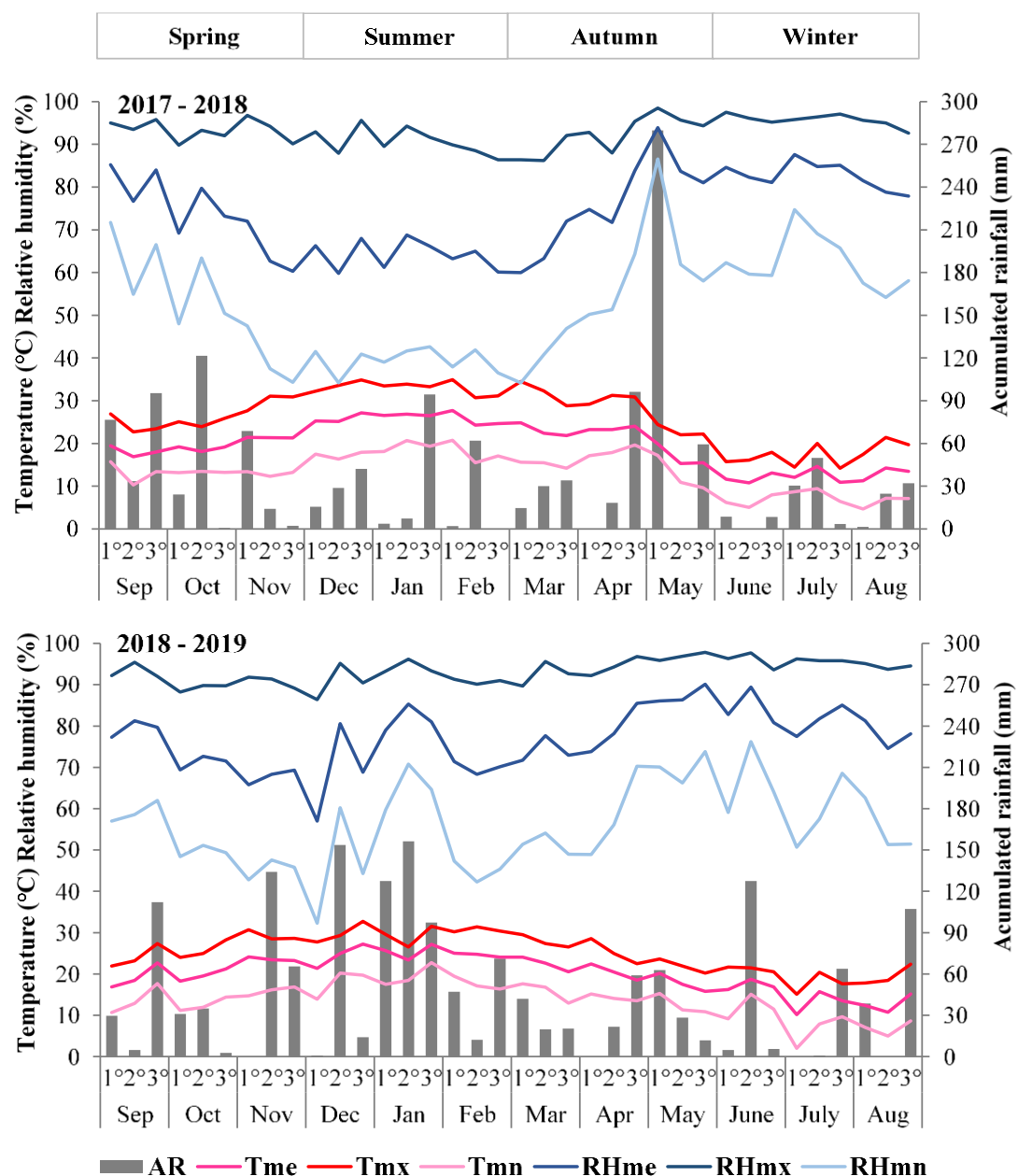


Figure 3.4. Meteorological variables data registered from September 2017 to August 2019 in a meteorological station situated in the National Research Institute of Agriculture (INIA) Salto Grande located 7.8 km from the olive orchard experiment. Average temperature (Tme = mean, Tmx = maximum, Tmn = minimum), relative humidity (RHme = mean, RHmx = maximum, RHmn = minimum) and accumulated rainfall (AR) every 10 days are presented.

Table 3.1. Means of the meteorological variables recorded by season and year during the two years of the trial.

Year ^b	Season	AR ^c (mm)	Means ^a					
			Temperature (°C) ^d			Relative Humidity (%) ^e		
			Tme	Tmx	Tmn	RHme	RHmx	RHmn
1	Spring	437 a	19.4 b	26.4 a	13.1 a	73.7 a	93.4 a	52.4 a
2	Spring	415 a	20.9 a	26.3 a	14.1 a	72.8 a	91.1 b	50.0 a
1	Summer	256 a	26.0 a	33.1 a	18.1 a	64.3 b	90.7 a	39.1 b
2	Summer	680 a	24.8 b	29.9 b	18.4 a	73.5 a	91.9 a	50.7 a
1	Autumn	532 a	21.1 a	28.4 a	15.3 a	76.0 b	92.2 b	53.5 b
2	Autumn	266 a	20.2 b	25.0 b	14.2 a	80.3 a	94.7 a	60.0 a
1	Winter	159 a	12.4 b	17.5 b	7.0 a	82.6 a	95.7 a	61.7 a
2	Winter	348 a	14.4 a	19.5 a	8.4 a	81.3 a	95.4 a	60.2 a
1	2017 - 2018	1384 A	19.8 A	26.3 A	13.4 A	74.2 B	93.0 A	51.7 B
2	2018 - 2019	1709 A	20.1 A	25.2 B	13.8 A	77.0 A	93.3 A	55.2 A

^a Means in a column for each year followed by the same letter do not differ according to normal T-test ($P = 0.05$). ^b Year 1 = period from September 2017 to August 2018, Year 2 = period from September 2018 to August 2019. ^c AR = Accumulated rainfall by season and by year; ^d Temperature: Tme = mean, Tmx = maximum, Tmn = minimum; ^e Relative humidity: RHme = mean, RHmx = maximum, RHmn = minimum.

Significant correlations (Pearson's correlation) were identified between conidia production per leaf and temperature, relative humidity ($P < 0.001$), and most of the 20 indicators analyzed ($P < 0.01$ or $P < 0.001$). However, no correlation was observed with accumulated precipitation (Table 3.2.). Thirteen indicators showed positive correlation, with Tme 20-25 °C indicator alone or combined with RHmx between 80% and 95% presenting the high values (0.60) and five indicators showed negative correlation, with Tmn < 10°C having the highest value (0.60).

Table 3.2. Pearson correlations between monthly conidia production and meteorological variables and environmental indicators for *Pseudocercospora cladosporioides*.

Variables	Mean ^a	Pearson's Correlation	P-value
RR (mm)	130.7	0.09	ns
Tme (°C)	20.1	0.56	< 0.001
Tmn (°C)	13.6	0.53	< 0.001
Tmx (°C)	25.8	0.55	< 0.001
RHme (%)	75.4	-0.41	< 0.001
RHmn (%)	54.0	-0.39	< 0.001
RHmx (%)	93.0	-0.46	< 0.001
Index ^b	Mean	Pearson's Correlation	P-value
AR < 1 mm	2.5	-0.30	<0.05
AR > 1 mm	6.5	0.12	ns
Tme 20 - 25 °C	11.1	0.66	< 0.001
Tmn < 10 °C	7.3	-0.60	< 0.001
Tmx 30 - 35 °C	7.4	0.56	< 0.001
RHme < 70 %	10.2	0.44	< 0.001
RHme > 70 %	19.8	-0.45	< 0.001
RHme 60 - 70 %	7.8	0.55	< 0.001
RHmn < 50 %	14.3	0.41	< 0.001
RHmn > 50 %	16.1	-0.42	< 0.001
RHmn 30 - 50 %	13.0	0.42	< 0.001
RHmn < 70 %	24.7	0.37	< 0.01
RHmx < 95 %	16.9	0.45	< 0.001
RHmx > 95 %	13.1	-0.45	< 0.001
RHmx 80 - 95 %	17.5	0.42	< 0.001
RHmx 80 - 100 %	28.6	0.09	ns
Tme 20-25 °C × RHme 60 -70%	3.0	0.57	<0.001
Tme 20-25 °C × RHmn < 70 %	8.6	0.67	<0.001
Tme 20-25 °C × RHmx < 95 %	6.8	0.68	<0.001
Tme 20-25 °C × RHmx 80 - 95%	6.4	0.60	<0.001

^aMonthly average elaborated for the period from September 2017 to August 2019, temperature (mean = Tme, maximum = Tmx, minimum = Tmn), relative humidity (mean = RHme, maximum = RH mx, minimum = RHmn) and accumulated rainfall (AR). ^b Each index corresponds to the sum of days with a certain amount of AR or T or RH indicated, within the 30 days prior to sampling.

3.5.2. Identification of field infection periods

In both years of the trial, CLS infections were detected in leaves of all treatments, except in those whose branches were exposed during the October month (Figure 3.5.). Comparing the two years, the mean incidence of CLS infections increased 22% from the first to the second year, with the most substantial rises during autumn and winter, reaching up to 34% and 33%, respectively, compared to the preceding year.

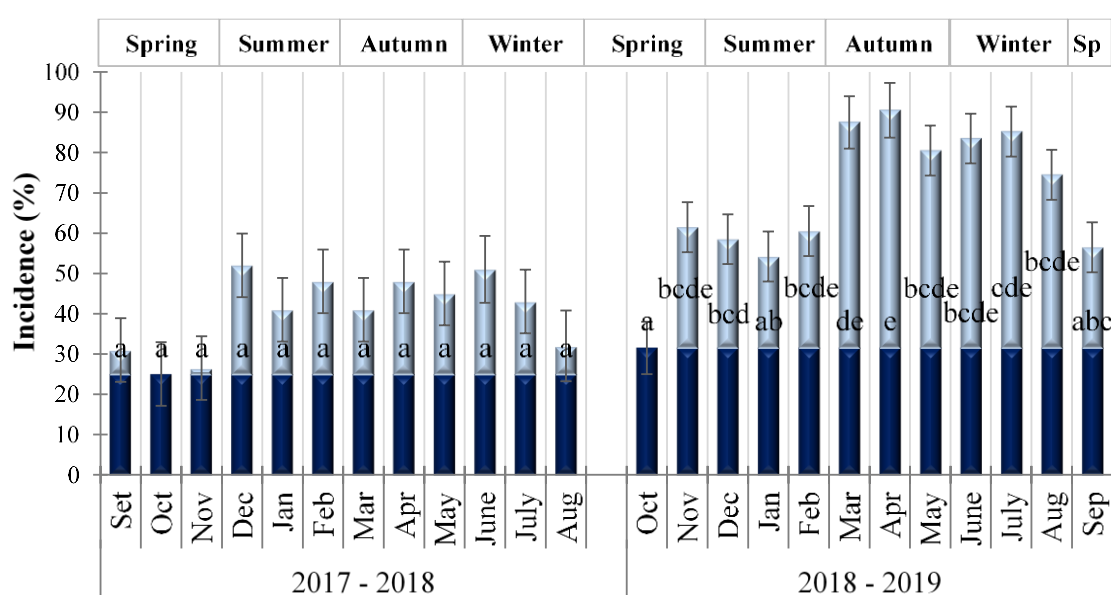


Figure 3.5. Incidence of *Cercospora* leaf disease infection caused by *Pseudocercospora cladosporioides* on olive trees of a commercial orchard of Arbequina cultivar for each exposure period (months) during the two years of the trial. Dark blue bars represent the initial infection level (closed control). Bars followed by the same letter within year do not differ significantly according to Tukey's test ($P = 0.05$).

Table 3.3. Season mean of incidence of *Cercospora* leaf spot disease infection.

Season	Incidence (%) ^a	
	2017 - 2018	2018 - 2019
Spring	1 ± 4.5 b	13 ± 7.0 c
Summer	22 ± 4.5 a	27 ± 5.6 bc
Autumn	20 ± 4.5 a	54 ± 5.8 a
Winter	17 ± 4.7 ab	50 ± 5.6 ab
Yearly	15 ± 4.1 B	36 ± 4.1 A

^a Values represent the means of 30 branches per season ± standard errors. Means in the column followed by the same letter do not differ significantly according to Tukey's test ($P = 0.05$).

During the first year, no significant differences ($P = 0.05$) were observed in the percentage of CLS infections between the twelve exposure periods (Figure 3.5.). However, when seasons were compared, CLS infections were substantially lower during spring (1%) compared to the rest of the seasons being significantly different from summer (22%) and autumn (20%) (Table 3.3.). In the second year, spring remained as the season with the lowest number of CLS infections (13 %) and was statistically different from autumn (54%) and winter (50%).

No significant Pearson's correlations were found between the percentage of CLS infections and temperature, relative humidity, cumulative rainfall values or the 20 analyzed indicators.

3.6. Discussion

To our knowledge, this study is the first to examine the epidemiological behavior of CLS disease caused by *P. cladosporioides* under humid climate conditions. Specifically, during two consecutive years, we quantified the monthly conidia production and the timing of foliar infections throughout the year under field conditions in a commercial orchard with history of CLS set out with Arbequina cultivar, the most planted in Uruguay (Conde et al., 2019).

Our findings confirm that *P. cladosporioides* produces conidia year-round, consistent with previous research by Nigro and Ferrara (2011) and Abdelfattah et al. (2015). However, the number of conidia produced varied throughout the year, with two periods of higher production observed. One between late spring and early summer and the other during autumn. These results can be mainly explained by the effect of temperature. The temperatures required for conidial production by this fungus range from 12 to 28°C (Del Moral and Medina, 1985; Nigro and Ferrara, 2011), with autumn being the preferred season for its multiplication (Del Moral and Medina, 1985). In the region where this study was conducted, temperatures within this range occur during spring and fall. In contrast, temperatures outside this range are observed in summer, with higher temperatures, and in winter, with lower temperatures (see Table 3.1.).

Monthly conidia production exhibited a significant positive correlation with those months presenting a higher number of days characterized by temperatures between 20 to 25°C, as well as with a higher number of days with maximum Relative Humidity between 80-95%. These conditions typically occur during the months from late spring to early summer and during autumn in the area where this study was conducted (Giménez and Castaño, 2013). Also, conidial production during winter was negatively correlated with minimum temperatures below 10°C. This result suggests that conidia production decreases significantly during cold weather when minimum temperatures are below 10°C.

Prior research has demonstrated that the optimal mycelial growth for local strains of *P. cladosporioides* occurs at temperatures between 19 and 25°C. Conversely, temperatures below 10°C significantly reduce their development (Lombardo et al., 2023). Although the temperatures that favour mycelial growth do not necessarily have to be the same as those that favour the conidia production, our results suggest a possible correlation between them. There seems to be a coincidence between the conditions that promote the physiological development of the pathogen and its sporulation.

Interestingly, when we examined the infection patterns of *P. cladosporioides*, we found that infections occur throughout the year, but with an important decrease during the spring months. Specifically, during early spring (September and October), when the tree begins to sprout, the infections were low or null. This aligns with Del Moral and Medina (1985), who mention that young leaves (during the initial developing phase) do not appear to be attacked. This suggests that young leaves would be less susceptible to infected, which would also be contributing to this lower number of infections during the spring. However, further studies would be needed to confirm these hypotheses. As the leaves develop, the infections increase, reaching their highest levels in autumn and winter.

Also, the decrease in infections during the spring seems to align with the decline in spore production during winter and early spring. In addition, a large part of the leaves infected during the previous summer or autumn usually fall to the ground during the winter and early spring, reducing the total inoculum in the canopies, which probably also contributes to reducing the count of these infections.

Regarding the precipitation effect, during the two-year evaluation period, rainfall varied from normal (1384 mm) to abundant (1709 mm), exceeding the average annual values (1300 to 1400 mm) for the northwestern region of Uruguay (Giménez and Castaño, 2013). Despite this variation, no correlation was observed between accumulated rainfall and spore production. This lack of correlation may be attributed to the even distribution of rainfall throughout the year in Uruguay, contrasting with the pronounced seasonality in the Mediterranean basin (Ávila et al., 2004; Trapero et al., 2017). However, it was noted that spore production was higher in the first year compared to the second year. Conversely, the second year exhibited a significantly higher percentage incidence of infected leaves (see Table 3.3.). This suggests that infections occur only when the inoculum encounters favorable conditions. In the first year, the pathogen found favorable conditions for spore production, but not all spores were able to infect. Instead, in the second year, despite producing fewer spores, the spores found favorable conditions, resulting in a greater number of infections.

Another possible explanation for the greater occurrence of infections in the second year is that the fallen diseased leaves found favourable conditions to act as a source of inoculum. This is supported by Agustí-Brisach et al. (2016) and Pappas (1993) who reported that fallen diseased leaves can serve as a primary inoculum source when environmental conditions are favourable. For example, it is known that rain serves as the primary dispersal route for conidia (Ávila et al. 2004) and it is well-established that abundant rainfall is one of the major factors favoring infections (Agustí-Brisach et al., 2016; Ávila et al., 2004; Del Moral and Medina, 1985; Nigro et al., 2002). As previously mentioned, rainfall in the second year was 23% higher. However, more research is needed to understand how different factors and their combinations influence the various stages of disease development.

In summary, this study provides valuable information of olive CLS epidemiology in Uruguay, characterized by humid and temperate to warm weather conditions. Specifically, we demonstrate that *P. cladoporioides* produces spores throughout the year, with higher production from late spring to early summer and during autumn. Sporulation is favored by temperatures between 20-25°C and relative humidity of 80-95%, while temperatures below 10°C, which usually occur in winter, are unfavorable for spore production. Furthermore, we found that infection by this pathogen occurs year-round, but significantly decreases in early spring. These findings will help growers to design effective management strategies, focusing on the highest inoculum production periods, especially in autumn when the infections are more abundant. Nevertheless, future studies will be developed to assist CLS management, such as natural compound or fungicide evaluations or resistance of locally cultivated cultivars.

3.7. References

- Abdelfattah, A., Li Destri Nicosia, M.G., Cacciola, S.O., Droby y S., Schena, L. (2015). Metabarcoding Analysis of Fungal Diversity in the Phyllosphere and Carposphere of Olive (*Olea europaea*). *PLoS ONE*, 10(7), e0131069. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131069>
- Abd-Elmabod, S.K., Jordán, A., Fleskens, L., Phillips, J.D., Muñoz-Rojas, M., van der Ploeg, M., Anaya-Romero, M., El-Ashry, S., y de la Rosa, D. (2017). Chapter 7. Modeling agricultural suitability along soil transects under current conditions and improved scenario of soil factors. En: Pereira, P., Brevik, E.C., Muñoz-Rojas, M. y Miller BA (eds.) *Soil mapping and process modeling for sustainable land use management*. Elsevier. (pp. 193-219). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805200-6.00007-4>
- Agustí-Brisach C, Romero J, Ávila A, Raya MC, Roca LF, Trapero A. 2016. Bases para la gestión integrada del emplomado del olivo. *Vida Rural*, 40-48. https://www.researchgate.net/profile/Agusti-Brisach-Carlos/publication/309463052_El_emplomado_del_olivo_Bases_para_su_gestion_integrada/links/58119ae608aef2ef97b2dff9/El-emplomado-del-olivo-Bases-para-su-gestion-integrada.pdf
- Ávila, A., Benali, A. y Trapero, A. (2004a). Variabilidad morfológica y cultural de *Pseudocercospora cladosporioides*, agente del emplomado del olivo. *Boletín de Sanidad Vegetal y Plagas*, 30, 369-384. https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_plagas%2FBSVP-30-02-369-384.pdf
- Ávila, A., Romero, J., Agustí-Brisach, C., Abdellatif, B., Roca, L.F. y Trapero A., (2020). Phenotypic and pathogenic characterization of *Pseudocercospora cladosporioides*, the causal agent of Cercospora leaf spot of olives. *European Journal of Plant Pathology*, 156, 45-65. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01861-5>
- Conde, P., Arias, M., Villamil, J.J., Bruzzone, J., Bernaschina, Y., Ferrari, V., Zoppolo, R., Villamil, J. y Leoni, C. (2019). It is feasible to produce olive oil in

- temperate humid climate regions. *Frontiers in Plant Science*, 10, e1544.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01544>
- Del Moral J. and Medina D. 1985. El “repilo plumizo” del olivo causado por *Cercospora cladosporioides* Sacc., enfermedad presente en España. *Boletín de Servicio de Plagas* 11, 31-36. https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_plagas%2FBSVP-11-01-031-035.pdf
- Giménez, A. y Caastaño, J.P. (2013). Características agroclimáticas del Uruguay. En M.A. Grompone y J. Villamil (coord.), *Aceites de Oliva: de la Planta al Consumidor* (vol. 1). (pp. 37-50). INIA, Montevideo.
- Lombardo, P., Leoni, C., Alaniz, S. y Mondino, P. (2023). Cercospora leaf spot of olive in Uruguay. *Phytopatología Mediterranea* 62(3), 413-426.
<https://doi.org/10.36253/phyto-14675>
- Moral, J., Ávila, A., López-Doncel, L.M., Alsalimiya, M., Oliveira, R., Gutiérrez, F., Navarro N., Bouhmidi, K., Bernali, A., Roca, L.F. y Trapero, A. 2005. Resistencia a los repilos de distintas variedades de olivo. *Vida Rural*, 208, 34-40.
https://www.researchgate.net/publication/39746048_Resistencia_a_los_repilos_de_distintas_variedades_de_olivo
- Nigro, F. y Ferrara, M. (2011). Olive cercosporiosis. En L. Scherna, G.E. Agosteo y S.O. Cacciola (eds.), *Olive Diseases and Disorders* (pp. 247-258). India Transworld Research Network.
- Nigro, F., Gallone, P. y Ippolito, A. (2003). La cercosporiosis o “piombatura” dell’olivo. *Informatore Fitopatologico, Speciale difesa olivo*, 12, 13-16.
- Nigro, F., Ippolito, A., Gallone, P., Romanazzi, G., Carmignano, P. y Laccone G. (2002). Cercosporiosis of olive in Apulia and Attempts to control the disease. *Acta Horticulturae*, 586, 773-776.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.586.167>
- Olivoto, T. y Dal'Col Lúcio, A. (2020). Metan: An R package for multi-environment trial analysis. *Methods in Ecology and Evolution*, 11, 783-789.
<https://doi.org/10.1111/2041-210X.13384>

- Páez Wallberg, P.A. (2011). *Estudio epidemiológico del repilo del olivo causado por Fusicladium oleagineum*. [trabajo final de grado y maestría, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile]. <https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/112793/Tesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Pappas, A.C. (1993). *Mycocentrospora cladosporioides* on olive in Greece. *Bulletin OEPP/EPPO*, 23, 405-409. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1993.tb01344.x>
- Saccardo, P.A. (1886). Hyphomycetes. *Sylloge Fungorum*, 4, 471.
- Trapero, A., López, F.J. y Blanco, M.A. (2017). Enfermedades. En D. Barranco, R. Fernández-Escobar y L. Rallo (eds.). *El Cultivo del Olivo* (7ª ed., pp. 733-798). Mundi-Prensa, Madrid.

4. Eficiencia de diferentes fungicidas en el control de *Pseudocercospora cladosporioides*, agente causal de la mancha foliar por *Cercospora* del olivo en Uruguay

4.1. Resumen

El emplumado del olivo, causado por *Pseudocercospora cladosporioides*, es una de las principales enfermedades foliares que afectan al olivar. En Uruguay, las condiciones climáticas favorecen el desarrollo de esta patología. El objetivo del presente estudio fue determinar la sensibilidad de un grupo representativo de aislados de *P. cladosporioides* a diferentes fungicidas comerciales. Se evaluaron catorce productos formulados, entre ellos compuestos a base de cobre, ditiocarbamatos, ftalimidas, guanidinas, estrobilurinas y triazoles. Se llevaron a cabo ensayos *in vitro* para evaluar la inhibición del crecimiento micelial en medio de agar papa dextrosa suplementado con concentraciones crecientes de cada fungicida. Las concentraciones finales de los ingredientes activos (i. a.) fueron 0,1, 1, 10 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para estrobilurinas y triazoles; 50, 150, 300 y 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para mancozeb, ziram, captan y dodine y 125, 250, 500 y 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cobre metálico para los fungicidas cúpricos. Las placas se incubaron en oscuridad a 21 °C durante treinta días, midiendo el diámetro de las colonias para calcular la tasa de crecimiento (mm día^{-1}) y determinar la CE_{50} . Los fungicidas cúpricos presentaron una eficiencia inhibitoria moderada y mostraron comportamientos similares entre sí. Entre los fungicidas de contacto, el mancozeb causó la mayor inhibición, significativamente superior a la de ziram y captan, mientras que el dodine no se diferenció estadísticamente del mancozeb en su capacidad inhibitoria. Los resultados indican que los fungicidas más eficaces pertenecen a los grupos de las estrobilurinas y los triazoles, los cuales mostraron una alta eficacia inhibitoria sin diferencias significativas entre ellos. Estos hallazgos proporcionan una base sólida para la selección de fungicidas para evaluar en condiciones de campo; por lo tanto, es necesario optimizar las dosis y los momentos de aplicación.

Palabras clave: fungicidas cúpricos, ditiocarbamatos, estrobilurinas, triazoles, resistencia

Efficacy of different fungicides in the control of *Pseudocercospora cladosporioides*, causal agent of Cercospora leaf spot in olive tree in Uruguay

4.2. Summary

Olive leaf spot, caused by *Pseudocercospora cladosporioides*, is one of the primary foliar diseases affecting olive groves. In Uruguay, climatic conditions favor the development of the disease. This study aimed to determine the sensitivity of a representative group of *P. cladosporioides* isolates to various commercial fungicides. Fourteen formulated products were evaluated, including copper-based compounds, dithiocarbamates, phthalimides, guanidines, strobilurins and triazoles. In vitro assays were conducted to assess the inhibition of mycelial growth on potato dextrose agar (PDA) medium supplemented with increasing concentrations of each fungicide. The final concentrations of the active ingredients (a.i.) were as follows: 0.1, 1, 10 and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for strobilurins and triazoles; 50, 150, 300 and 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for mancozeb, ziram, captan and dodine and 125, 250, 500, and 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of metallic copper for the copper-based fungicides. The plates were incubated in the dark at 21 °C for 30 days and colony diameters were measured to calculate the growth rate (mm day^{-1}) and determine the EC_{50} . Copper fungicides demonstrated moderate inhibitory efficiency, with similar effects across the copper compounds. Among the contact fungicides, mancozeb showed the greatest inhibition, significantly higher than that of ziram and captan, while dodine did not differ statistically from mancozeb in its inhibitory capacity. The findings indicate that the most effective fungicides are from the strobilurin and triazole groups, both of which showed high inhibitory efficacy with no significant differences between them. These results provide a solid foundation for selecting fungicides to be further evaluated under field conditions, with a need to optimize application doses and timing.

Keywords: copper fungicides, dithiocarbamates, strobilurins, triazoles, resistance

4.3. Introducción

En Uruguay, el cultivo de olivo se ha consolidado como uno de los principales cultivos frutícolas del país, ocupando 5.638 hectáreas efectivas. El principal destino de la olivicultura es la producción de aceite de oliva virgen extra (AOVE) (MGAP-DIEA, 2023). Uno de los retos más significativos del rubro olivos es lograr implementar un manejo sostenible de las enfermedades (Romero et al., 2017). En nuestro país, el clima se caracteriza por su abundante pluviometría sin estacionalidad (1200 mm al año) y alta humedad asociada a temperaturas moderadas, lo que favorece el desarrollo de enfermedades foliares, como la mancha foliar por *Cercospora* (CLS) (Conde et al., 2019, Lombardo et al., 2024). En consecuencia, el manejo de las enfermedades es crucial en la producción de frutos y aceites de calidad (Roca et al., 2007a, 2007c).

La mancha foliar por cercospora causada por *Pseudocercospora cladosporioides* es una de las enfermedades más graves que afecta al cultivo de olivo en el mundo (Agustí-Brisach et al., 2016; Ávila et al., 2020; Conde et al., 2013; Lombardo et al., 2023; 2024). Los síntomas de CLS se observan principalmente en hojas adultas y consisten en manchas de color amarillo verdoso a amarillo con bordes difusos en el haz de las hojas y de color plomizo en el envés (Trapero et al., 2017; Lombardo et al., 2023). CLS provoca una severa defoliación de los árboles, lo que genera importantes pérdidas económicas al reducir el área fotosintética y el vigor de los árboles afectados (Agustí-Brisach et al., 2016). Además, puede afectar los frutos, retrasar su maduración y deteriorar la calidad del aceite al aumentar su acidez (Agustí-Brisach et al., 2016; Ávila et al., 2004).

El manejo integrado de las enfermedades del olivo es el principal desafío que enfrenta la producción de aceites de alta calidad (Nigro y Ferrara, 2011; Trapero et al., 2011). La principal herramienta utilizada para controlar las micosis foliares es la aplicación de fungicidas (Nigro et al., 2018; Pappas, 1993; Roca et al., 2007a, 2007b, 2007c, 2017; Trapero et al., 2011).

En general, la cercosporiosis del olivo se controla con las mismas aplicaciones de fungicidas realizadas para controlar el repilo del olivo (*Venturia oleaginea*). Sin

embargo, en años favorables para la enfermedad, los tratamientos químicos utilizados para controlar a *V. oleaginea* no son suficientes para controlar a *P. cladosporioides* (Nigro et al., 2018; Nigro y Ferrara, 2011; Roca et al. 2007c; Trapero et al., 2017).

Los fungicidas cúpricos son los más utilizados en la olivicultura (Nigro et al., 2018; Roca et al., 2007a, 2017; Pappas, 1993; Trapero et al., 2011). Esto es debido a su bajo costo, eficiencia en la inhibición de la germinación de conidios, amplio espectro contra hongos y bacterias patógenos y baja toxicidad para los olivos (Nigro et al., 2018; Roca et al., 2007a, 2007c, 2017; Romero et al., 2020). Además, debido a su acción multisitio, tienen bajo riesgo de generar resistencia en las poblaciones de hongos. Por otra parte, estos fungicidas pueden aplicarse después de la floración sin que sus residuos aparezcan en el aceite (Moral et al., 2014). No obstante, se considera necesario encontrar alternativas al cobre, debido a que su uso a largo plazo conduce a la acumulación de cobre en los suelos, con efectos adversos para el medioambiente (Nigro et al., 2018; Roca et al., 2007a, 2007c; Romero et al., 2020). Para minimizar su uso, se recomienda seguir estrategias de manejo integrado que incluyan la rotación de fungicidas y la utilización de otros métodos de control (Agustí-Brisach et al., 2016; Manicom y Schoeman, 2008; Nigro et al., 2018; Romero et al., 2020).

Los fungicidas de contacto, como los ditiocarbamatos (DTC) (mancozeb y ziram) y las ftalamidas (captan y folpet), se destacan por su amplio espectro de acción, al igual que los cúpricos, y por tener múltiples sitios de acción; por lo que, hasta el momento, no se han detectado problemas de resistencia (Campanale et al., 2023; FRAF, 2024; Roca et al., 2010). Los ditiocarbamatos presentan baja solubilidad en agua, lo que dificulta su lavado, y frecuentemente sus residuos son detectados en muestras vegetales (Campanale et al., 2023). Por esta razón, estos fungicidas no son recomendados para su uso después del cuajado de los frutos, ya que sus residuos pueden ser detectados en el aceite (Moral et al., 2014, 2018).

Por otro lado, los fungicidas penetrantes pertenecientes a los grupos químicos benzimidazoles (metil benzimidazoles carbamatos, MBC), estrobilurinas (inhibidores fuera de la quinona, QoI) y triazoles (inhibidores de la biosíntesis del ergosterol (IBE)

han mostrado ser efectivos para inhibir el crecimiento micelial de *P. cladosporioides* o reducir su incidencia en ensayos de campo (Nigro et al., 2018; Romero et al., 2020).

Las estrobilurinas y los triazoles son dos grupos químicos muy eficaces para controlar un amplio espectro de patógenos y son extensamente utilizados en los cultivos (FRAC, 2024; Lee y Kim, 2022; Wyenandt, 2020). Sin embargo, ambos grupos químicos (QoI e IBE) presentan sitios de acción muy específicos, lo que los hace susceptibles al desarrollo de resistencia por parte de los hongos ante su uso continuo (FRAC, 2024; García-Munguía et al., 2022; Lee y Kim, 2022; Wyenandt, 2020).

La resistencia a los fungicidas debe ser tomada en cuenta al momento de implementar estrategias de manejo de las enfermedades. En diversas regiones se ha constatado la existencia de poblaciones del género *Pseudocercospora* (*P. fijiensis*, *P. enmusae*, *P. musae*, *P. pancratii*, *P. rubi*) resistentes a fungicidas de los grupos de las estrobilurinas e IBE (Balaga et al., 2022; Brito et al., 2020; Ceresini et al., 2024; Chong et al., 2021; Diaz-Trujillo et al., 2018; García-Munguía et al., 2022; Martínez-Bolaños et al., 2012; Oliveira et al., 2022; Oliver et al., 2023). Sin embargo, el uso de fungicidas penetrantes es clave para controlar infecciones latentes, especialmente cuando las condiciones ambientales son favorables para las enfermedades (Nigro et al., 2018). Por esta razón es necesario implementar estrategias de manejo integrado y realizar monitoreos continuos de la sensibilidad de la población del patógeno.

A pesar de que la mancha foliar por *Cercospora* es de gran importancia (Lombardo et al., 2024), hasta el momento no se han realizado estudios de evaluación de la eficacia de los diferentes fungicidas para controlar a *P. cladosporioides* en Uruguay. El objetivo del presente trabajo fue determinar la sensibilidad *in vitro* de un grupo representativo de aislados de *P. cladosporioides* a catorce formulados comerciales, incluyendo fungicidas pertenecientes a diferentes grupos químicos.

4.4. Materiales y métodos

4.4.1. Aislados fúngicos

Se seleccionaron dieciocho aislados monospóricos de la colección uruguaya de *P. cladosporioides*. Todos los aislados fueron obtenidos de hojas de olivos con síntomas típicos de CLS, durante las temporadas 2017 y 2018, incluyendo aislados provenientes de diferentes cultivares y zonas de producción (tabla 1). Los aislados se mantuvieron conservados como discos de micelio en glicerol al 15 % a -80 °C en la colección de hongos del Departamento de Protección Vegetal, Facultad de Agronomía de Salto, Universidad de la República (Udelar), Uruguay (Lombardo et al., 2023). Cada aislado seleccionado se transfirió a placas con medio PDA y se incubó a 21 ± 2 °C en oscuridad durante quince días.

4.4.2. Fungicidas

Se evaluaron catorce formulados comerciales, incluyendo productos a base de cobre (sulfato cálcico de cobre (caldo bordelés), oxiclورو de cobre, óxido cuproso), ditiocarbamatos (mancozeb, ziram), ftalamidas (captan), guanidinas (dodine), estrobilurinas (azoxystrobin, kresoxim-metil, pyraclostrobin, trifloxystrobin) e IBE (difeconazol, propiconazol, tebuconazol) (tabla 2). Los fungicidas se seleccionaron con base en su disponibilidad en el mercado y en los antecedentes encontrados en la bibliografía de su uso para el control de enfermedades del olivo (Moral et al., 2018; Nigro et al., 2018; Romero et al., 2020; Moreira et al., 2024).

Tabla 1

Aislados uruguayos de *Pseudocercospora cladosporioides* seleccionados para realizar el ensayo de inhibición del crecimiento micelial.

Aislados	Morfo-tipo ¹	Origen geográfico departamento/localidad	WGS84 ²	Cultivar
E07	a	Salto, Olivares Salteños	S 31°19'19"	Arbequina
E12	a		W 57°50'01"	Arbequina
E19	c	Salto, Puntas de Valentín	S 31°32'55"	n/d
E20	a		W 57°10'28"	
E27	a			
E31	a	Rocha, Nuevo Manantiales	S 34°16'26"	Arbequina
E33	a		W 54°04'12"	Arbequina
E40	c			Coratina
E43	a	Maldonado, Agroland	S 34°37'24"	Manzanilla
E48	c		W 54°36'56"	Leccino
E52	a			Coratina
E60	a	Montevideo, ARU	S 34°43'00"	Arbequina
E66	a		W 56°16'00"	Pendolino
E70	b	Canelones, INIA Las Brujas	S 34°40'05"	Leccino
E74	b		W 56°20'37"	Seggianese
E76	a	Montevideo, Fagro	S 34°50'14" W 56°13'40"	n/d
E78	a	Colonia, San Pedro	S 34°21'05" W 57°47'50"	Arbequina
E82	a	Colonia, Astilleros	S 34°21'30" W 57°30'09"	Arbosana

¹ Morfotipo: *a* = gris y rugoso, *b* = blanquecino y rugoso y *c* = gris oliváceo y liso.

² Sistema Geodésico Mundial 1984 (WGS84): coordenadas mundiales.

Tabla 2

Características y concentraciones de los fungicidas seleccionados.

Grupo químico (FRAC) ¹	Ingrediente activo	Nombre comercial	Compañía	Formulación ²
Inorgánico (M1)	Sulfato cálcico de cobre (Cu)	Bordeles	Agro Regional	74 % WP (Cu 20 %)
	Oxicloruro de Cu	Oxicloruro Cu	Agro Regional	85 % WP (Cu 50 %)
	Óxido cuproso	Cuproxido 75	Agro Regional	75 % WP (Cu 75 %)
Ditiocarba-mato (M3)	Mancozeb	Mancozeb	Agro Regional	80 % WP
	Ziram	Ziram	Tafirel	80 % DG
F-talimida (M4)	Captan	Captan 80	Agro Regional	80 % DG
Guanidina (U12)	Dodine	Dodin Flo	Agro Regional	40 % 410 g L ⁻¹ CS
Estrobilurinas Qol ³ (11)	Azoxistrobin *	Mirador 25	Lanafil S. A.	22,9 % 250 g L ⁻¹ CS
	Piraclostrobin *	Comet	Basf	23,8 % 250 g L ⁻¹ EC
	Kresoxim-metil	Ardent 50	Lanafil S. A.	46,2 % 500 g L ⁻¹ CS
	Trifloxistrobin *	Flint 50	Bayer	50 % WG
Triazoles IBE ⁴ (3)	Difenoconazol	Score 250	Syngenta	24 % 250 g L ⁻¹ EC
	Tebuconazol *	Tebuzate 43	La Forja S. A.	39,1 % 430 g L ⁻¹ CS
	Propiconazol *	Quick 250	Saudu	25,5 % 250 g L ⁻¹ EC

¹ Números asignados por el Fungicide Resistance Action Committee (FRAC, 2024) según los diferentes modos de acción (<http://www.frac.info/>). ² Formulación: porcentaje en peso y contenido en volumen, WP = polvo mojable, WG = granulado dispersable en agua, CS = suspensión concentrada, EC = concentrado emulsionable; ³ QoI = inhibidores fuera de la quinona; ⁴ IBE = inhibidores de la biosíntesis del ergosterol; * resistencia conocida en especies de *Pseudocercospora*.

4.4.3. Ensayo de inhibición del crecimiento micelial

Se prepararon soluciones madre de cada fungicida en agua destilada estéril (ADE). Posteriormente, se añadieron volúmenes apropiados de cada fungicida al medio de agar papa dextrosa (APD) estéril, mantenido a 45 °C. Las concentraciones finales de los ingredientes activos (i. a.) fueron las siguientes: 0,1, 1, 10 y 100 µg.mL⁻¹ para las estrobilurinas y los triazoles; 50, 150, 300 y 600 µg.mL⁻¹ para mancozeb, ziram, captan y dodine y 125, 250, 500, y 1000 µg.mL⁻¹ de cobre metálico para los fungicidas a base de cobre.

Discos de micelio de 3,7 mm de diámetro obtenidos de los márgenes de colonias de *P. cladosporioides* con crecimiento activo de veinte días de edad se transfirieron al centro de cada placa enmendada con fungicida. Se realizaron tres repeticiones por aislado, fungicida y concentración. Como controles se sembraron placas de PDA estéril sin fungicida. Las placas se incubaron a $21 \pm 1,5$ °C en oscuridad. Después de treinta días se midieron dos diámetros perpendiculares de cada colonia y se calculó el promedio, para ello se utilizó un calibre electrónico digital (Vernier Caliper. CALDI-6MP, TRUPER®).

4.4.4. Análisis de datos

Para evaluar la sensibilidad *in vitro* de los aislados a cada fungicida, se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial para cada combinación de aislado, fungicida y concentración, en comparación con el control. La inhibición se determinó utilizando la siguiente fórmula: *inhibición del crecimiento (%) = [(R tratamiento / R control) × 100]*, donde R corresponde al radio de la colonia. Luego, los datos obtenidos se analizaron mediante una regresión probit, graficando los valores obtenidos de inhibición de crecimiento micelial frente a los valores logarítmicos ($\log_{10}$) de las concentraciones del fungicida. A partir de la regresión probit ajustada (Finney, 1952), se calculó la concentración efectiva que inhibe el 50 % del crecimiento micelial (CE₅₀).

Posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA) a los valores de CE₅₀ obtenidos para cada combinación de aislamiento-fungicida-concentración. Las medias se compararon mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, a un nivel de significancia de $P < 0,05$, debido a que no cumplían con los criterios de normalidad. El análisis estadístico se realizó utilizando el software InfoStat, versión 2020e (www.infostat.com.ar).

4.5. Resultados

Se observaron diferencias significativas entre los fungicidas evaluados en su capacidad para inhibir el crecimiento micelial de los aislados de *P. cladosporioides* (tabla 3). Los

fungicidas cúpricos (oxicloruro de cobre, óxido cuproso y sulfato cálcico de cobre) inhibieron de manera similar el crecimiento micelial de los aislados de *P. cladosporioides*. Las EC₅₀ de estos fungicidas se situaron en un rango de 39 a 296 mg.L⁻¹ (tabla 3., figura 1A).

En cuanto a los fungicidas de contacto evaluados (mancozeb, ziram y captan), el mancozeb mostró un mejor desempeño, se diferenció estadísticamente de los otros dos (tabla 3, figura 1B).

Respecto a la eficiencia del dodine, este fungicida presentó una capacidad inhibitoria del crecimiento micelial similar a la de los ditiocarbamatos, sin diferenciarse estadísticamente del mancozeb ni del ziram, a pesar de ser un fungicida con acción translaminar. Aunque el dodine mostró una mayor capacidad inhibitoria, no se diferenció estadísticamente del sulfato cálcico de cobre (caldo bordelés) ni del captan.

En el análisis de los fungicidas del grupo de los triazoles, los tres productos evaluados fueron altamente eficientes para inhibir significativamente el crecimiento micelial (tabla 3, figura 1D). Los tres principios activos evaluados exhibieron un comportamiento similar, sin diferencias estadísticas entre ellos.

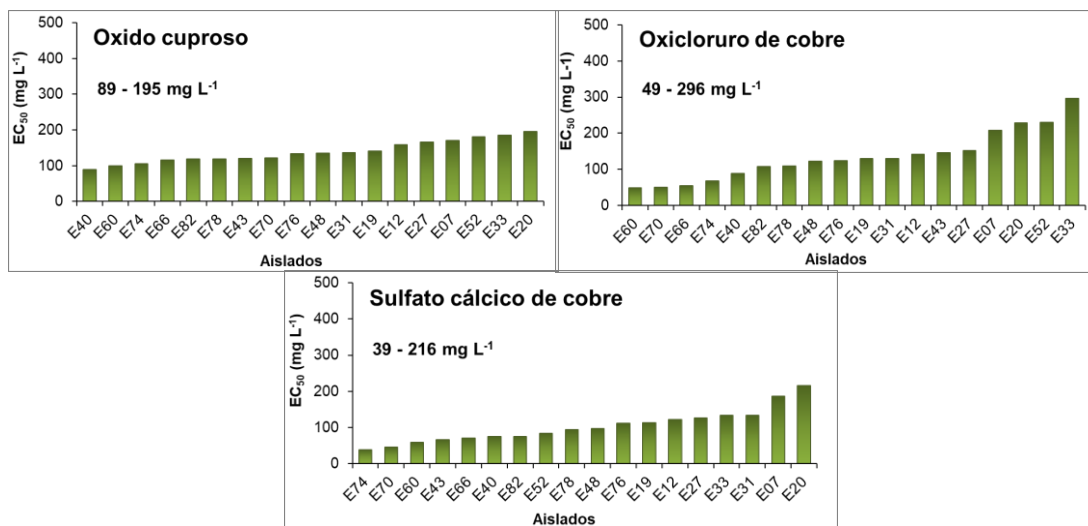
Por otro lado, los fungicidas del grupo de las estrobilurinas mostraron una elevada capacidad inhibitoria. Dentro de este grupo, se detectaron diferencias significativas: el trifloxistrobin presentó la mayor capacidad inhibitoria, sin diferenciarse del piraclostrobin. Ambos fungicidas se diferenciaron estadísticamente del kresoxim-metil, que mostró la menor inhibición (tabla 3, figura 1C).

Tabla 3Inhibición del crecimiento micelial de *P. cladosporioides* por diferentes fungicidas.

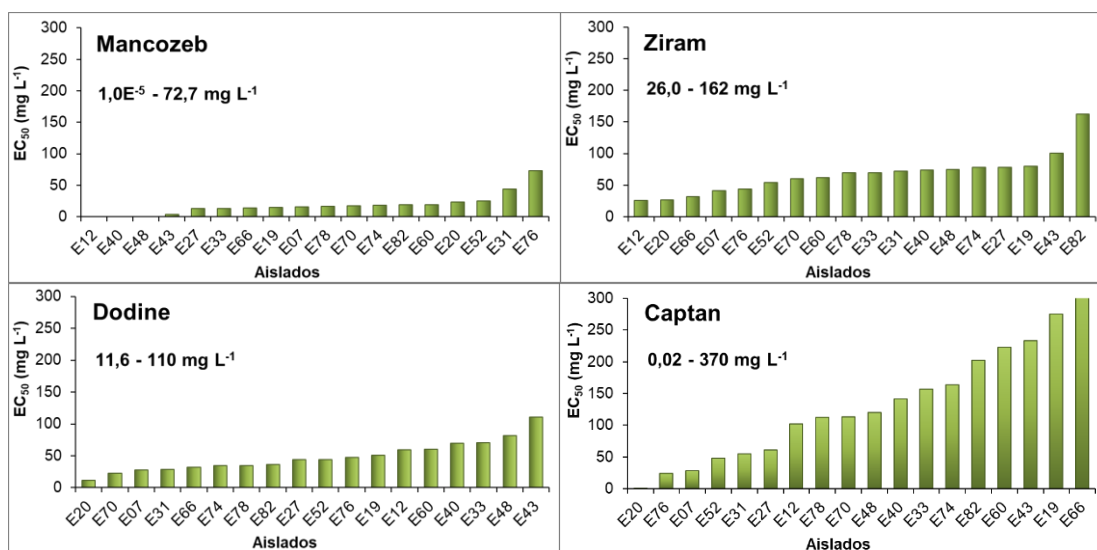
Grupo químico	Ingrediente activo	Inhibición del crecimiento micelial			
		EC ₅₀ ^{1,2} ± SD		Rango EC ₅₀	
Estrobilurina	Trifloxistrobin	3,8E ⁻⁴	± 8,8E ⁻⁴	a	2,3E ⁻¹⁵ -0,003
Triazoles	Difenoconazol	0,07	± 0,10	ab	8,6E ⁻⁴ -0,39
Estrobilurina	Piraclostrobin	0,14	± 0,20	abc	2,3E ⁻⁵ -0,62
Triazoles	Tebuconazol	0,28	± 0,27	bcd	0,04-1,21
Triazoles	Propiconazol	0,34	± 0,21	bcd	0,07-0,81
Estrobilurina	Azoxistrobin	0,49	± 0,36	cd	0,15-1,21
Estrobilurina	Kresoxim-metil	4,92	± 10,4	d	0,003-44,0 (E07 > 1000)
Ditiocarbamato	Mancozeb	18,22	± 17,3	de	1,0E ⁻⁵ -72,7
Guanidina	Dodine	48,06	± 24,1	ef	11,6-110,3
Ditiocarbamato	Ziram	66,72	± 31,5	fg	26,0-162,2
Cúprico	Sulfato cálcico de cobre	102,67	± 46,4	fg	39,0-216,3
F-talimida	Captan	135,06	± 97,5	fg	0,02-369,8
Cúprico	Oxicloruro de cobre	135,28	± 68,1	g	49,2-295,9
Cúprico	Óxido cuproso	138,44	± 31,1	g	89,2-195,4

¹ Medias con la misma letra no difieren significativamente según la prueba de Kruskal-Wallis, $P = 0,05$; ² EC₅₀: concentración efectiva (mg L⁻¹) que inhibe el 50 % del crecimiento micelial.

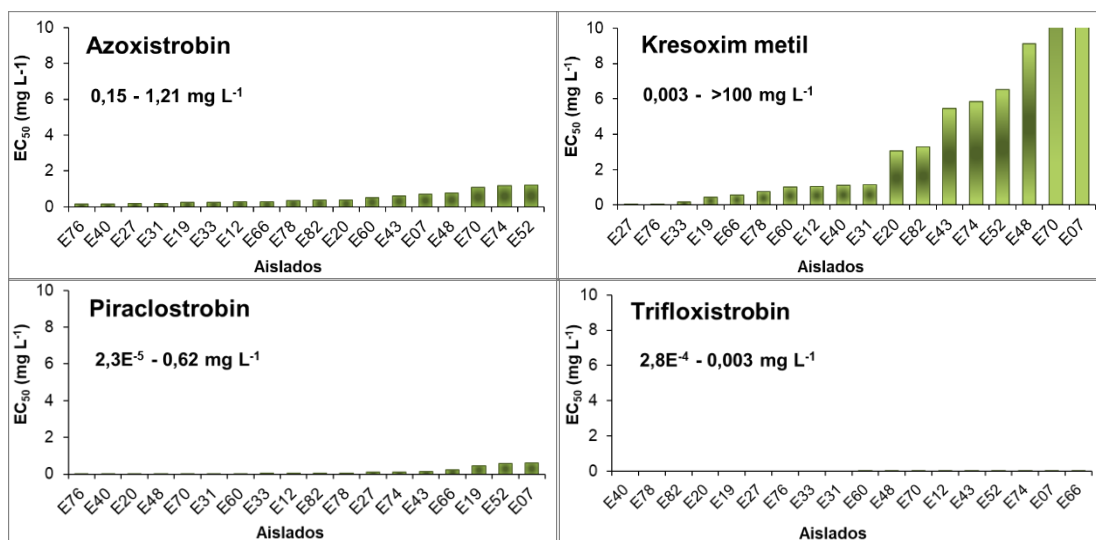
A. Fungicidas cúpricos



B. Fungicidas de contacto y dodine



C. Estrobilurinas



D. Triazoles

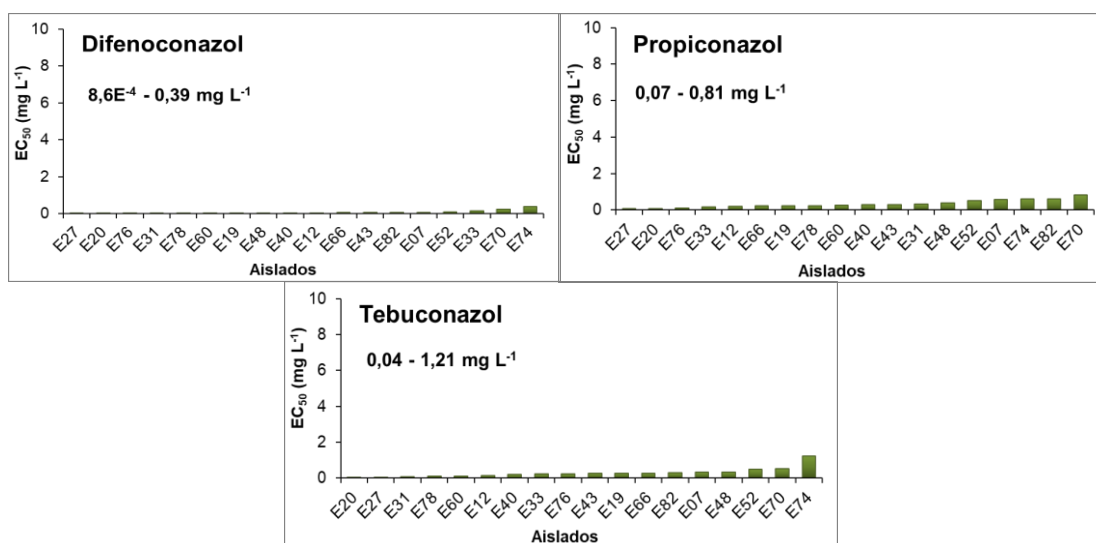


Figura 1

Sensibilidad de los 18 aislados uruguayos de *Pseudocercospora cladosporioides* a diferentes fungicidas. Las barras muestran los valores de la Concentración Efectiva 50 (EC₅₀) obtenidos en ensayos *in vitro* de inhibición del crecimiento micelial.

4.6. Discusión

La cercosporiosis del olivo en Uruguay es una de las enfermedades foliares de mayor importancia que afecta los rendimientos, así como la calidad del aceite elaborado por frutos afectados. Su importancia se ve exacerbada por las condiciones ambientales favorables de nuestro país (Conde et al., 2013; Giménez y Castaño, 2013). En trabajos previos (Lombardo et al., 2024) se comprobó que, en nuestras condiciones de producción, *P. cladosporioides* produce conidios a lo largo del año con dos períodos de alta producción ubicados uno a fin de primavera-inicio de verano y otro en el otoño. En segundo lugar, se demostró que las infecciones por *P. cladosporioides* también ocurren a lo largo de todo el año con un descenso significativo al inicio de la primavera (septiembre-octubre) (Lombardo et al., 2024). Estos antecedentes confirman la necesidad de proteger los tejidos verdes del ataque del patógeno a lo largo del año, en particular durante la primavera-verano y el otoño.

Al igual que en otras regiones olivareras del mundo, la protección de los olivos frente a la cercosporiosis se logra mediante la aplicación de fungicidas. Sin embargo, debido a que el olivo es un cultivo emergente en nuestro país, no existen estudios previos sobre la sensibilidad de las poblaciones locales del patógeno a los diferentes principios activos. En este trabajo se realizó el primer estudio de la sensibilidad de la población local de *P. cladosporioides* a diversos fungicidas con potencial para su control. Se evaluó la sensibilidad de dieciocho aislados representativos de *P. cladosporioides* de diferentes regiones olivareras del país (Lombardo et al., 2023) a catorce fungicidas de distintos grupos químicos mediante ensayos *in vitro* de inhibición del crecimiento micelial.

Los fungicidas cúpricos mostraron una eficiencia inhibitoria moderada, con un comportamiento similar entre ellos. Estos resultados coinciden con estudios previos que mostraron las bajas tasas de inhibición micelial del oxiclورو de cobre, óxido cuproso y sulfato cálcico de cobre en el control de *P. cladosporioides* (Romero et al., 2020). Sin embargo, en ensayos a campo, el oxiclورو de cobre demostró ser efectivo en el control de la cercosporiosis del olivo tanto cuando se aplicó solo como en

combinación con otros fungicidas, ya sean de contacto o sistémicos. Asimismo, mostró eficacia cuando se utilizó en diferentes momentos del ciclo del cultivo, como durante la brotación vegetativa o en la etapa de fructificación, y hasta en el cambio de color de las aceitunas (envero) (Nigro et al., 2018).

Nuestros resultados están en concordancia con estudios previos realizados *in vitro* que han demostrado que los fungicidas cúpricos ejercen una actividad fungistática más que fungicida sobre *P. cladosporioides* (Nigro y Ferrara, 2011) y que estos fungicidas de contacto no son efectivos para controlar infecciones ya establecidas (Nigro et al., 2018). Sin embargo, son los únicos fungicidas que se pueden aplicar después de la floración sin que sus residuos aparezcan en el aceite (Moral et al., 2014; Roca et al., 2007a). El mayor inconveniente de los fungicidas cúpricos radica en que tienden a acumularse en el suelo y causan efectos adversos para el medioambiente, por lo que se procura reducir su uso (Nigro et al., 2018; Roca et al., 2007a, 2007c; Romero et al., 2020).

Entre los fungicidas de contacto, el mancozeb presentó el mejor comportamiento inhibitorio, significativamente superior al ziram y el captan, por lo que podría ser utilizado para prevenir infecciones producidas por *P. cladosporioides*. Este resultado coincide con trabajos previos que destacan la mayor eficacia de mancozeb sobre el captan (Romero et al., 2020). Por otra parte, en evaluaciones a campo, el comportamiento del mancozeb en combinación con fungicidas cúpricos, azufrados o sistémicos, redujo significativamente la incidencia de la cercosporiosis del olivo (Nigro et al., 2018).

En cuanto al dodine, perteneciente al grupo de las guanidinas, no se diferenció estadísticamente del mancozeb inhibiendo el crecimiento micelial. Este fungicida presenta la capacidad de actuar de forma translaminar (FRAC, 2024). Esta característica permitiría usarlo tanto para prevenir infecciones como para curar infecciones latentes.

Los fungicidas pertenecientes al grupo de las estrobilurinas, trifloxystrobin, piraclostrobin y azoxistrobin, fueron altamente eficaces para inhibir el crecimiento

micelial de los aislados de *P. cladosporioides*. De ellos, existe el antecedente de evaluación del piraclostrobin en ensayos a campo utilizando Cabrio, un formulado comercial de BASF, que inhibió significativamente el crecimiento micelial de *P. cladosporioides* (Nigro et al., 2018). Aunque no hemos encontrado antecedentes de evaluación de la eficiencia de los otros principios activos, existen estudios previos en los que se evalúan formulados que los contienen en mezclas con otros fungicidas.

Así es que el piraclostrobin, en formulación con boscalid (Bellis, BASF), inhibió eficazmente el crecimiento micelial de *P. cladosporioides* (Romero et al., 2020). En cuanto al trifloxistrobin, existe el antecedente de evaluación en ensayos a campo de un formulado comercial que incluye al trifloxistrobin en combinación con el tebuconazole (Flint, Max®) que redujo significativamente la cercosporiosis, en un esquema de aplicaciones intercaladas o combinadas con mancozeb, cobre o azufre (Thiopeon®) (Nigro et al., 2018).

No hemos podido encontrar antecedentes de evaluación del azoxistrobin para el control de la cercosporiosis del olivo. Sin embargo, existen antecedentes que demuestran su efectividad en el control de cercosporiosis en otros cultivos (Carmona et al., 2011; Manicom y Schoeman, 2008; Silva et al., 2021; Willis y Duvenhage, 2003).

Las estrobilurinas son conocidas por su alto riesgo de generar resistencia, debido a que actúan sobre un sitio de acción específico del hongo (FRAC, 2024), lo que subraya la importancia de monitorear la evolución de la sensibilidad en la población del patógeno. Además, existen antecedentes de resistencia de otras especies del género de *Pseudocercospora* a varias estrobilurinas (azoxistrobin, piraclostrobin y trifloxistrobin) (Oliveira et al., 2022; Oliver et al., 2023).

En cuanto a los triazoles (difeconazol, tebuconazol y propiconazol), todos mostraron alta eficacia inhibitoria, sin encontrarse diferencias significativas entre ellos. Resultados similares fueron obtenidos por Romero et al. (2020) al evaluar la eficacia del difenoconazol *in vitro* contra *P. cladosporioides*. Sarpkaya y Erkiliç (2020) obtuvieron un control efectivo de la germinación de los conidios de *P. pastacina*

utilizando propiconazol y difenoconazol. Es importante tener en cuenta que, al igual que las estrobilurinas, los triazoles presentan alto riesgo de desarrollar resistencia en las poblaciones de patógenos. Esto se debe a que estos fungicidas sistémicos presentan sitios de acción específicos en el hongo (FRAC, 2024). Este riesgo ha sido documentado para otras especies de *Pseudocercospora* (Balaga et al., 2022; Brito et al., 2020; Diaz-Trujillo et al., 2018; Martínez-Bolaños et al., 2012).

Este trabajo permitió conocer a qué principios activos es sensible la población local de *P. cladosporioides*. Esta información servirá de base para la selección de fungicidas para evaluar en condiciones de campo, siendo necesario optimizar dosis y momentos de aplicación. La incorporación del uso de fungicidas en estrategias de manejo integrado debe tener en cuenta la eficiencia de los fungicidas disponibles y la necesidad de minimizar el uso de fungicidas de alto riesgo de generar resistencia.

4.7. Referencias

- Agustí-Brisach, C., Romero, J., Ávila, A., Raya, M. C., Roca, L. F. y Trapero, A. (2016). Bases para la gestión integrada del emplomado del olivo. *Vida Rural, Especial Olivar*, 40-48. <https://uplactedraolivar.com/bases-para-la-gestion-integrada-del-emplomado-del-olivo/>
- Ávila, A., Benali, A. y Trapero, A. (2004). Variabilidad morfológica y cultural de *Pseudocercospora cladosporioides*, agente del emplomado del olivo. *Boletín de Sanidad Vegetal y Plagas*, 30, 369-384. https://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/2427/Trapero_Casas_15.pdf?sequence=1&isAllowed=y ; <https://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/2427>
- Ávila, A., Romero, J., Agustí-Brisach, C., Abdellatif, B., Roca, L. F. y Trapero, A. (2020). Phenotypic and pathogenic characterization of *Pseudocercospora cladosporioides*, the causal agent of Cercospora leaf spot of olives. *European Journal of Plant Pathology*, 156, 45-65. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01861-5>
- Balaga, K. M. B., Rey, J. D. y Dacones, L. S. (2022). Genetic basis of pathogen establishment and fungicide resistance of phylogenetically related

- Pseudocercospora* spp. through comparative genomics. *Philippine Journal of Science*, 151(5), 1857-1876.
https://philjournalsci.dost.gov.ph/images/pdf/pjs_pdf/vol151no5/genetic_basis_of_pathogen_establishment_and_fungicide_resistance.pdf
- Brito, F. S. D., Santos, J. R. P., Azevedo, V. C. R., Peixoto, Y. S., De Oliveira, S. A., Ferreira, C. F., Haddad, F., Amorim, E. P., Fraaije, B. y Miller, R. N. G. (2020). Genetic diversity and azole fungicide sensitivity in *Pseudocercospora musae* field populations in Brazil. *Frontiers in Microbiology*, 11, e-99.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00099>
- Carmona, M., Gally, M., Sautua, F., Abello, A. y López, P. (2011). Uso de mezclas de azoxistrobina y triazoles para controlar enfermedades de fin de ciclo de la soja. *Summa Phytopathologica*, 37(2), 134-139. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052011000200009>
- Campanale, C., Triozzi, M., Ragonese, A., Losacco, D. y Massarelli, C. (2023). Dithiocarbamates: Properties, Methodological Approaches and Challenges to Their Control. *Toxics*, 11(10), 851. <https://doi.org/10.3390/toxics11100851>
- Ceresini, P. C., Silva, T. C., Vicentini, S. N. C., Leite, R. P. Jr., Moreira, S. I., Castro-Rios, K., Garces-Fiallos, F. R., Krug, L. D., Santos de Moura, S., Gomes da Silva, A., De Paiva Custódio, A. A., May de Mio, L. L., De Godoy Gasparoto, M. C., Portalanza, D. y De Jesus, W. C. Jr. (2024). Strategies for managing fungicide resistance in the Brazilian tropical agroecosystem: Safeguarding food safety, health, and the environmental quality. *Tropical Plant Pathology*, 49, 36-70. <https://doi.org/10.1007/s40858-023-00632-2>
- Chong, P., Essoh, J. N., Arango Isaza, R. E., Keizer, P., Stergiopoulos, I., Seidl, M. F., Guzman, M., Sandoval, J., Verweij, P. E., Scalliet, G., Sierotzski, H., De Lapeyre de Bellaire, L., Crous, P. W., Carlier, J., Cros, S., Meijer, H. J. G., Peralta, E. L. y Kema, G. H. J. (2021). A world-wide analysis of reduced sensitivity to DMI fungicides in the banana pathogen *Pseudocercospora fijiensis*. *Pest Management Science*, 77(7), 3273-3288.
<https://doi.org/10.1002/ps.6372>

- Conde, P., Arias, M., Villamil, J. J., Bruzzone, J., Bernaschina, Y., Ferrari, V., Zoppolo, R., Villamil, J. y Leoni, C. (2019). It is feasible to produce olive oil in temperate humid climate regions. *Frontiers in Plant Science*, 10, e1544. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01544>
- Conde, P., Montelongo, M. y Leoni, C. (2013). Enfermedades del Olivo. En M. A. Grompone y J. Villamil (coords.), *Aceites de oliva: de la planta al consumidor* (vol. 1, pp. 183-214). INIA.
- Diaz-Trujillo, C., Chong, P., Stergiopoulos, I., Cordovez, V., Guzman, M., De Wit, P. J. G. M., Meijer, H. J. G., Scalliet, G., Sierotzki, H., Peralta L. E., Arango Isaza, R. E. y Kema, G. H. J. (2018). A new mechanism for reduced sensitivity to demethylation-inhibitor fungicides in the fungal banana black Sigatoka pathogen *Pseudocercospora fijiensis*. *Molecular Plant Pathology*, 19(6), 1491-1503. <https://doi.org/10.1111/mpp.12637>
- Finney, D. J. (1952). *Probit Analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve*. (2.^a ed.). Cambridge University Press. <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-the-institute-of-actuaries/article/abs/probit-analysis-by-d-j-finney-ma-scd-2nd-ed-pp-xiv-318-cambridge-university-press-1952-35s/6A77C4EDFD67D3FD9269C796BCB74A0E>
- Fungicide Resistance Action Committee (FRAC). (2024). FRAC Code List: Fungal control agents sorted by cross-resistance pattern and mode of action. <https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2024.pdf>
- Giménez, A. y Castaño, J. P. (2013). Características agroclimáticas del Uruguay. En M. A. Grompone y J. Villamil (coords.), *Aceites de oliva: de la planta al consumidor* (vol. 1, pp. 37-50). INIA.
- Lee, J. y Kim, Y. (2022). Strobilurin fungicides activate plant defense against viral and bacterial infections and improve plant vigor. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 129, 1031-1040. <https://doi.org/10.1007/s41348-022-00629-0>

- Lombardo, P., Leoni, C., Alaniz, S. y Mondino, P. (2023). Cercospora leaf spot of olive in Uruguay. *Phytopathologia Mediterranea*, 62(3), 413-426. <https://doi.org/10.36253/phyto-14675>
- Lombardo, P., Paredes, J. A., Pugliese B. D., González, P., Alaniz, S. y Mondino, P. (2024). Cercospora leaf spot of olive: inoculum production and infections timing throughout the year. *International Journal of Pest Management*, 71(1)1-9. <https://doi.org/10.1080/09670874.2024.2388173>
- Lucena, B., Manrique, T. y Méndez, M. A. (2017). La olivicultura en el mundo y en España. En D. Barranco, R. Fernández-Escobar y L. Rallo (eds.), *El cultivo del olivo* (2.^a ed., pp. 1-33). Mundi-Prensa.
- Manicom, B. Q. y Schoeman, M. H. (2008). Fungicides for *Pseudocercospora* control on avocados: A review, a trial and observations. *South African Avocado Growers' Association Yearbook*, 31, 37-43. https://www.avocadosource.com/Journals/SAAGA/SAAGA_2008/SAAGA_2008_31_PGS_37-43_Manicom.pdf
- Martínez-Bolaños, L., Téliz-Ortiz, D., Rodríguez-Maciel, C., Mora-Aguilera, A., Nieto-Ángel, D., Cortéz-Flores, J. I., Mejía-Sánchez, D., Nava-Díaz, C. y Silva-Aguayo, G. (2012). Resistencia a fungicidas en poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* del sureste mexicano. *Agrociencia*, 46(7), 707-717. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952012000700006&lng=es&tlng=es
- Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca-Oficina de Estadísticas Agropecuarias (MGAP-DIEA). (2023). *Censo nacional de olivos 2023*. https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/documentos/noticias/Comunicado_final.pdf (<https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiaZTA3MTQ5ZGYtMTMxMi00NTdhLTg3NTctNGRhM2MzZGY0MjY5IiwidCI6IjdhYWU1OTQyLWU4YjYtNDg5YS04NDRkLTU0OTVhZjRkMzYxZSJ9&pageName=ReportSection>)
- Moral, J., Agustí-Brisach, C., Agalliu, G., De Oliveira, R., Pérez-Rodríguez, M., Roca, L. F., Romero, J. y Trapero, A. (2018). Preliminary selection and evaluation of fungicides and natural compounds to control olive anthracnose caused by

- Colletotrichum species. *Crop Protection*, 114, 167-176.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.08.033>
- Moral, J., Xavier, C., Roca, L. F., 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, M. J., Ferronato, B., Mondino, P. y Alaniz, S. (2024). Role of fungicides to control blossom blight and fruit rot the main symptoms of olive anthracnose in Uruguay. *International Journal of Pest Management*, 71(1), 24-41. <https://doi.org/10.1080/09670874.2024.2388158>
- Nigro, F., Antelmi, I. y Sion, V. (2018). Integrated control of aerial fungal diseases of olive. *Acta Horticulturae*, 1199, 327-332. 10.17660/ActaHortic.2018.1199.51.
- Nigro, F. y Ferrara, M. (2011). Olive cercosporiosis. En L. Scherna, G. E. Agosteo y S. O. Cacciola (eds.), *Olive Diseases and Disorders* (pp. 247-258). India Transworld Research Network.
- Oliveira, T. Y. K., Silva, T. C., Moreira, S. I., Christiano, F. S. Jr., Gasparoto, M. C. G., Fraaije, B. A. y Ceresini, P. C. (2022). Evidence of resistance to QoI fungicides in contemporary populations of *Mycosphaerella fijiensis*, *M. musicola* and *M. thailandica* from banana plantations in Southeastern Brazil. *Agronomy*, 12(12), 2952. <https://doi.org/10.3390/agronomy12122952>
- Oliver, J. E., Lewis, K. J., Aktaruzzaman, Md. y Ali, Md. E. (2023). First report of resistance to pyraclostrobin in *Pseudocercospora* spp. From blackberry (*Rubus fruticosus*) in Georgia, United States. *Plant Health Progress*, 24(3), 394-396.
<https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHP-12-22-0127-BR>
- Pappas, A. C. (1993). *Mycocentrospora cladosporioides* on olive in Greece. *Bulletin OEPP/EPPO*, 23(3), 405-409. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1993.tb01344.x>
- Roca, L. F, Moral, J., Viruega, J. R., Ávila, A., Oliveira, R. y Trapero, A. (2007a). Copper fungicides in the control of olive diseases. *Olea*, 26, 48-50.
https://www.researchgate.net/publication/284371685_Copper_fungicides_in_the_control_of_olive_diseases

- Roca, L., Viruega, J. R., Ávila, A., Oliveira, R., Marchal, F., Moral, J. y Trapero, A. (2007b). Los fungicidas cúpricos en el control de las enfermedades del olivo. *Vida Rural*, 256, 52-56. https://www.researchgate.net/publication/309761862_Los_fungicidas_cupricos_en_el_control_de_las_enfermedades_del_olivo
- Roca, L., Viruega, J. R., Ávila, A., Oliveira, R. y Trapero, A. (2007c). Los fungicidas cúpricos en el control de las enfermedades del olivo. En Fundación para la promoción y el desarrollo del olivar y el aceite de oliva (ed.), *El aceite de oliva: actas del XII Symposium Científico-Técnico, Expoliva 2005*. <https://books.google.com.uy/books?id=oyJQQwAACAAJ> o <https://studylib.es/doc/5325538/los-productos-c%C3%BApricos-en-el-control-de-las-enfermedades-...>
- Roca, L. F., Viruega, J. R., Ávila, A., Moral, J., Marchal, F., Romero, J., Agustí, C. y Trapero, A. (2017, 25-27 de enero). *El cobre: materia activa básica en el control de las enfermedades del olivo*. 14 Symposium Sanidad Vegetal: hacia el cambio, Sevilla (pp. 233-239). https://www.researchgate.net/publication/317004250_EL_COBRE_MATERIA_ACTIVA_BASICAS_EN_EL_CONTROL_DE_LAS_ENFERMEDADES_DE_L_OLIVO
- Roca, L. F., Viruega, J. R., Ávila, A., Moral, J., Marchal, F., Romero, J., Agustí, C. y Trapero, A. (2010). Métodos culturales, químicos y biológicos de control del repilo. *Vida Rural*, 1, 38-42. https://www.researchgate.net/publication/322992291_Metodos_culturales_quimicos_y_biologicos_de_control_del_Repilo
- Romero, J., Roca, L. F., Agustí-Brisach, C., Moral, J. y Trapero, A. (2017). Estrategias de control químico de enfermedades aéreas del olivo. *Agricultura*, 1010, 768-776. <https://uplcedraolivar.com/estrategias-de-control-quimico-de-enfermedades-aereas-del-olivo/>
- Romero, J., Ávila, A., Agustí-Brisach, C., Roca, L. F. y Trapero, A. (2020). Evaluation of fungicides and management strategies against cercospora leaf spot of olive Caused by *Pseudocercospora cladosporioides*. *Agronomy*, 10, artículo e271. <https://doi.org/10.3390/agronomy10020271>

- Sarpkaya, K. y Erkılıç, A. (2020). Studies on biology, epidemiology and control of *Pseudocercospora pistacina* in pistachio. *Acta Horticulturae*, 1269, 33-40
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2020.1269.5>
- Silva, T. S., Da Fonseca, L. F., Yamada, J. K. y Pontes, N.de C. (2021). Flutriafol and azoxystrobin: An efficient combination to control fungal leaf diseases in corn crops. *Crop Protection*, 140, 105394.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105394>
- Trapero, A., López, F. J. y Blanco, M. A. (2017). Enfermedades. En D. Barranco, R. Fernández-Escobar y L. Rallo (eds.), *El cultivo del olivo* (7.^a ed., pp. 733-798). Mundi-Prensa.
- Trapero, A., Roca, L. F., Moral, J., Trapero, C., López, F. J. (2011). Capítulo 7: Las enfermedades y su manejo en el olivar ecológico. En Junta de Andalucía (eds.), *El olivar ecológico*. (pp. 209-256).
<https://www.researchgate.net/publication/275891078>
- Willis, A. y Duvenhage, J. A. (2003). Evaluation of alternative fungicides for control of *Cercospora* spot on ‘Fuerte’. Proceedings V World Avocado Congress (Actas V Congreso Mundial del Aguacate, pp. 579-583).
https://www.avocadosource.com/WAC5/Papers/WAC5_p579.pdf
- Wyenandt, A. (2020, January 20). Understanding The Differences Between FRAC Group 11 and FRAC Group 3 Fungicides. *Plant & Pest Advisory*. <https://plant-pest-advisory.rutgers.edu/understanding-the-strobilurin-fungicides-frac-group-11-2015-2/>

5. Discusión general

En el presente estudio, se confirmó que la cercosporiosis del olivo es una enfermedad ampliamente distribuida y prevalente en los olivares comerciales de las distintas zonas olivareras de Uruguay, siendo *Pseudocercospora cladosporioides* el único patógeno asociado a esta enfermedad en el país. El análisis filogenético multilocus demostró que los aislados uruguayos pertenecen a un clado bien definido que agrupa con la cepa ex-epitipo de *P. cladosporioides*, distinguiéndolos de otras especies del género *Pseudocercospora*. Este hallazgo es coherente con estudios en otras regiones, olivareras como España, donde se ha observado la misma asociación exclusiva del patógeno con la enfermedad (Ávila et al., 2005).

Nuestro trabajo es pionero en investigar el comportamiento epidemiológico de la cercosporiosis del olivo en regiones de clima húmedo, clima característico de Uruguay. Durante dos años consecutivos, evaluamos la producción de conidios y los períodos de infección foliar en condiciones de campo. Los resultados revelaron que *P. cladosporioides* produce conidios durante todo el año, aunque con dos picos de producción más marcados: uno entre finales de primavera - principios de verano y otro en otoño. La esporulación se correlacionó positivamente con los períodos de temperaturas entre 20 y 25 °C y alta humedad relativa (80-95 %), condiciones que predominan en los momentos de mayor actividad infecciosa. En contraste, el invierno, con temperaturas inferiores a 10 °C, resulta desfavorable para la producción de esporas. Estos resultados son consistentes con previas investigaciones, en las cuales confirman que esta enfermedad está presente en el campo todo el año (Nigro y Ferrara, 2011; Abdelfattah et al., 2015), y que el rango de temperaturas favorable para la producción de conidios es entre 12-28 °C (Del Moral y Medina, 1985; Nigro y Ferrara, 2011). Estos datos resultan cruciales para los productores, ya que permitirán orientar las estrategias de manejo hacia los períodos críticos de producción de inóculo, en particular el otoño, cuando la incidencia de infecciones es más alta.

En cuanto al control químico de la cercosporiosis, el estudio representa la primera evaluación de la sensibilidad de las poblaciones locales de *P. cladosporioides* a

diferentes fungicidas en Uruguay, un aspecto hasta ahora no explorado en este cultivo emergente en el sistema agrario uruguayo. Se trabajó con una muestra representativa de 18 aislados provenientes de diversas zonas oliveras país y se determinó su sensibilidad a 14 fungicidas pertenecientes a diferentes grupos químicos mediante ensayos *in vitro* de inhibición del crecimiento micelial.

Los resultados mostraron que los fungicidas cúpricos presentan una eficacia inhibitoria moderada y sin diferencias significativas entre ellos. Entre los fungicidas de contacto, el mancozeb se destacó como el más eficaz, superando significativamente a otros, como el ziram y el captan, lo que lo ubica como una opción viable para la prevención de infecciones por *P. cladosporioides*. En el grupo de las guanidinas, el dodine mostró una eficacia similar al mancozeb, mientras que las estrobilurinas (trifloxystrobin, piraclostrobin y azoxistrobin) y los triazoles (difeconazol, tebuconazol y propiconazol) resultaron altamente efectivos, sin diferencias significativas entre ellos. Resultados similares fueron obtenidos por Romero et al. (2020) y Nigro et al. (2018), quienes evaluaron la eficacia de diferentes fungicidas sobre el crecimiento micelial en ensayos *in vitro* y/o a campo. En ambos trabajos, los fungicidas de contacto, como los cúpricos, ditiocarbamatos y ftalamidas, mostraron una menor tasa de inhibición en comparación con las estrobilurinas y triazoles, en condiciones de campo sin embargo estos fungicidas protectores tienen un efecto marcado sobre la germinación de los conidios. Además, estos fungicidas podrían integrarse en un esquema de aplicaciones intercaladas o combinadas de diferentes principios activos reduciendo significativamente la cercosporiosis del olivo (Nigro et al., 2018).

Este conjunto de información constituye una base sólida para la futura selección de fungicidas a evaluar en condiciones de campo, debiéndose optimizar las dosis y los momentos de aplicación. Asimismo, estos hallazgos subrayan la importancia de integrar el uso de fungicidas dentro de un enfoque de manejo integrado, priorizando aquellos con eficacia comprobada y minimizando el uso de fungicidas que presenten alto riesgo de generar resistencia. Esto contribuirá a una protección sanitaria más sostenible y adaptada a las condiciones del país, beneficiando tanto la producción del olivo como la preservación del ambiente.

6. Conclusiones

- La mancha foliar por *Cercospora*, es una enfermedad prevalente en las diferentes zonas olivícolas de Uruguay, con un impacto significativo en la producción de aceitunas.
- *Pseudocercospora cladosporioides* es la única especie causante de la CLS en Uruguay.
- La producción de conidios sobre las plantas de olivo ocurre durante todo el año observándose dos picos de esporulación, uno a finales de primavera a principios de verano y otro en otoño, mientras que la menor producción ocurre en invierno.
- Las variables meteorológicas que mejor correlacionan con la producción de conidios son las temperaturas entre 20 y 25 °C y humedades relativas de entre 80 a 95 %. Mientras que las temperaturas menores a 10 °C correlacionan negativamente con la producción de conidios.
- Las infecciones de *P. cladosporioides* en condiciones de campo ocurren durante todo el año, con un descenso significativo al inicio de la primavera.
- Los primeros síntomas de CLS en condiciones de campo aparecen a partir de los 5 meses de ocurridas las infecciones.
- Los fungicidas cúpricos mostraron una eficacia inhibitoria moderada sin diferencias significativas entre ellos.
- Entre los fungicidas de contacto, el mancozeb fue el más eficaz, superando al ziram y captan, mientras que el fungicida dodine presentó una eficacia similar al mancozeb.
- Los fungicidas del grupo de las estrobilurinas (trifloxystrobin, piraclostrobin y azoxystrobin) y de los triazoles (difeconazol, tebuconazol y propiconazol) fueron altamente efectivos sin diferencias significativas entre ellos.

7. Bibliografía

- Abdelfattah, A., Li Destri Nicosia, M. G., Cacciola, S. O., Droby, S. y Schena, L. (2015). Metabarcoding analysis of fungal diversity in the Phyllosphere and Carposphere of olive (*Olea europaea*). *PLoS ONE*, 10(7), artículo e0131069. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131069>
- Agustí-Brisach, C., Romero, J., Ávila, A., Raya, M. C., Roca, L. F. y Trapero, A. (2016). Bases para la gestión integrada del emplomado del olivo. *Vida Rural, Especial Olivar*, 40-48. <https://uplantedraolivar.com/bases-para-la-gestion-integrada-del-emplomado-del-olivo/>
- Ávila, A., Benali, A. y Trapero, A. (2004a). Variabilidad morfológica y cultural de *Pseudocercospora cladosporioides*, agente del emplomado del olivo. *Boletín de Sanidad Vegetal y Plagas*, 30, 369-384. https://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/2427/Trapero_Casas_15.pdf?sequence=1&isAllowed=y; <https://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/2427>
- Ávila, A., Benali, A. y Trapero, A. (2004b). El emplomado del olivo, una grave enfermedad poco conocida. *Vida Rural*, 198, 32-36. https://helvia.uco.es/bitstream/handle/10396/2430/Trapero_Casas_18.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Ávila, A., Groenewald, J. Z., Trapero, A. y Crous, P. W. (2005). Characterisation and epitypification of *Pseudocercospora cladosporioides*, the causal organism of Cercospora leaf spot of olives. *Mycological Research*, 109(8), 881-888. <https://doi.org/10.1017/S0953756205003503>
- Ávila, A. y Trapero, A. (2010). El emplomado del olivo y del acebuche. *Junta de Andalucía*. https://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/portal/documents/20151/449530/emplomado_olivo.pdf
- Ávila, A., Romero, J., Agustí-Brisach, C., Abdellatif, B., Roca, L. F. y Trapero, A. (2020). Phenotypic and pathogenic characterization of *Pseudocercospora cladosporioides*, the causal agent of Cercospora leaf spot of olives. *European*

- Journal of Plant Pathology*, 156, 45-65. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01861-5>
- Bernaschina, Y., Alaniz, S. y Leoni, C. (2015, 28 de octubre). *Validación de escalas de severidad para evaluar el Repilo del olivo (Fusicladium oleagineum)*. Jornada de divulgación. Resultados experimentales en olivo. Serie de actividades de difusión N° 754, INIA Las Brujas.
- Bernaschina, Y., Alaniz, S. y Leoni, C. (2017). El repilo, una de las principales enfermedades del olivo. *Revista INIA*, 49, 33-37.
- Bernaschina, Y., Alaniz, S., Conde, P. y Leoni, C. (2019). Response of Olive (*Olea europaea*) cultivars against *Venturia oleaginea* causing olive scab in Uruguay. *Agrociencia Uruguay*, 23(1), 1-9. [10.31285/AGRO.23.1.13](https://doi.org/10.31285/AGRO.23.1.13)
- Bernaschina, Y., Leoni, C. y Alaniz, S. (2020). Genetic diversity evidence a mixed reproduction mode in *Venturia oleaginea* populations in Uruguay. *Journal of Plant Pathology*, 102, 123-133. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00396-2>
- Braun, U. (1993). Taxonomic notes in some species of the *Cercospora* complex (III). *Mycotaxon*, 48, 275-298. https://www.researchgate.net/publication/270769015_Taxonomic_notes_on_some_species_of_the_Cercospora_complex_III
- Caballero, J. M. (2013). La olivicultura en Iberoamérica. En M. A. Grompone y J. Villamil (coord.), *Aceites de oliva: de la planta al consumidor* (vol. 1, pp. 15-35). INIA.
- Chliyah, M., Touati, J., Selmaoui, K., Ouazzani Touhami, A., Filali-Maltouf, A., El Modafar, C., Moukhli, A., Benkirane, R. y Douira, A. (2014). Bibliographic inventory of the olive tree (*Olea europaea* L.) fungal diseases in the world. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 2(3), 46-79. <https://www.ijpab.com/form/2014%20Volume%202,%20issue%205/IJPAB-2014-2-5-46-79.pdf>
- Conde, P., Arias, M., Villamil, J. J., Bruzzone, J., Bernaschina, Y., Ferrari, V., Zoppolo, R., Villamil, J. y Leoni, C. (2019a). It is feasible to produce olive oil in temperate humid climate regions. *Frontiers in Plant Science*, 10, artículo e1544. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01544>

- Conde, P. y Leoni, C. (2007, 5 de octubre). *Enfermedades del olivo en Uruguay*. Jornada de divulgación. Resultados experimentales en olivos. INIA.
- Conde, P., Montelongo, M. y Leoni, C. (2013). Enfermedades del Olivo. En M. A. Grompone y J. Villamil (coords.), *Aceites de oliva: de la planta al consumidor* (vol. 1, pp. 183-214). INIA.
- Conde, P., Villamil, J. J., Bruzzone, J., Leoni, C., Zoppolo, R. y Villamil, J. (2019b). *Catálogo de cultivares de olivos*. INIA.
- Crous, P. W., Braun, U., Hunter, G. C., Wingfield, M. J., Verkley, G. J. M., Shin, H. D., Nakashima, C. y Groenewald, J. Z. (2013). Phylogenetic lineages in *Pseudocercospora*. *Studies in Mycology*, 75, 37-114.
<https://doi.org/10.3114/sim0005>
- Del Moral, J. y Medina, D. (1985). El «repilo plumizo» del olivo causado por *Cercospora cladosporioides* Sacc., enfermedad presente en España. *Boletín de Servicio de Plagas*, 11, 31-36.
https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_plagas%2FBSVP-11-01-031-035.pdf
- Díaz, A., Martín, A., Rallo, P., Barranco, D. Y De la Rosa, R. (2006). Self-incompatibility of ‘Arbequina’ and ‘Picual’ olive assessed by SSR markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 131(2), 250-255.
- Farr, D. F. y Rossman, A. Y. (2021, 15 de febrero). Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>
- Ferronato, B., Ingold, A., Moreira, V., Bentancur, O., Alaníz, S. y Mondino, P. (2023). Detection and quantification of *Colletotrichum* survival on olive tree (*Olea europaea* L.). *European Journal of Plant Pathology*, 167(1), 77-87.
<https://doi.org/10.1007/s10658-023-02686-z>
- García-Munguía, A. M., García-Munguía, A., Acosta-Ramos, M., García-Munguía, O., Orozco-Santos, M., Ibarra-Juárez, L. A. y García-Munguía, C. A. (2022). Sensibilidad in vitro de *Pseudocercospora fijiensis* (morelet) a los fungicidas sistémicos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 45(1), 117-125.
<https://doi.org/10.35196/rfm.2022.1.117>

- Gavahian, M., Khaneghah, A. M., Lorenzo, J. M., Munekata, P. E. S., Garcia-Mantrana, I., Collado, M. C., Meléndez-Martínez, A. J. y Barba, F. J. (2019). Health benefits of olive oil and its components: Impacts on gut microbiota antioxidant activities, and prevention of noncommunicable diseases. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 220-227. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.008>
- Groenewald, J. Z., Chen, Y. Y., Zhang, Y., Roux, J., Shin, H. -D., Shivas, R. G., Summerell, B. A., Braun, U., Alfenas, A. C., Ujat, A. H., Nakashima, C. y Crous, P. W. (2024). Species diversity in *Pseudocercospora*. *Fungal Systematics and Evolution*, 13(1), 29-89. <https://doi.org/10.3114/fuse.2024.13.03>
- Hernández, L., Mondino, P. y Alaniz, S. (2022). Diversity of *Botryosphaeriaceae* species causing stem canker and fruit rot in olive trees in Uruguay. *Journal of Phytopathology*, 170(4), 264-277. <https://doi.org/10.1111/jph.13078>
- Henricot, B., Gorton, C., Denton, J. y Denton, G. (2009). *Pseudocercospora cladosporioides*, the cause of leaf spot on olive, a pathogen new to the United Kingdom. *Plant Pathology*, 58(4), 803-803. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02079.x>
- Leoni, C. y Bernaschina, Y. (2021). Plagas y enfermedades del olivar. *Olivae*, 128, 31-34. https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/documentos/noticias/OLIVAE128-spanish-b4e5ah_compressed.pdf
- Leoni, C., Bruzzone, J., Villamil, J. J., Martínez, C., Montelongo, M. J., Bentacur, O. y Conde, 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>
- Leoni, C., Conde, P., Bruzzone, J., Martínez, C., Villamil, J. J., Brianchi, D., Ashfield, R. (2016). Ante una nueva zafra olivícola, ¿cómo nos preparamos para manejar la aceituna jabonosa? *Revista INIA*, 46, 34-37. <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/6160/1/Rev.INIA-2016-No46-p.34-37.pdf>

- Leoni, C., Conde, P., Paullier, J., Montelongo, M. J. y Mondino, P. (2013). *Manual para la identificación de las principales enfermedades y plagas del olivo*. INIA. <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/1009/1/18429280114124520.pdf>
- Leoni, C., Villamil, J. J., Martinelli, L., Fredes, A., Bruzzzone, J., Martínez, C., Montelongo, M. J. y Conde, P. (2015, 28 de octubre). ¿Cómo afecta la incidencia de «aceituna jabonosa» (ocasionada por *Colletotrichum spp.*) la calidad del aceite? INIA Las Brujas. <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/9892/1/ad-754.-p.38-42.pdf>
- Lombardo, P., Leoni, C., Alaníz, S. y Mondino, P. (2023). Cercospora leaf spot of olive in Uruguay. *Phytopathologia Mediterranea*, 62(3), 413-426. <https://doi.org/10.36253/phyto-14675>
- Lombardo, P., Paredes, J. A., Pugliese, B. D., González-Barrios, P., Alaníz, S. y Mondino, P. (2024). Cercospora Leaf Spot of Olive: inoculum productions and infections timing throughout the year. *International Journal of Pest Management*, 1-9. <https://doi.org/10.1080/09670874.2024.2388173>
- Mariotti, R., Pandolfi, S., De Cauwer, I., Saumitou-Laprade, P., Vernet, P., Rossi, M., Baglivo, F., Baldoni, L. y Mousavi, S. (2021). Diallelic self-incompatibility is the main determinant of fertilization patterns in olive orchards. *Evolutionary Applicationes*, 14, 983-995. <https://doi.org/10.1111/eva.13175>
- Mattos, F. (2021). Prólogo. *Olivae*, 128, 6-6. <https://www.internationaloliveoil.org/olivae-128-welcome-uruguay/?lang=es>
- McKenzie, E. H. C. (1990). New plant disease records in New Zealand: miscellaneous fungal pathogens II. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 18(1), 65-73. <https://doi.org/10.1080/01140671.1990.10428073>
- Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca-Oficina de Estadísticas Agropecuarias (MGAP-DIEA). (2023). *Censo nacional de olivos 2023*. https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/documentos/noticias/Comunicado_final.pdf

<https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiaZTA3MTQ5ZGYtMTMxMi00NTdhLTg3NTctNGRhM2MzZGY0MjY5IiwidCI6IjdhYWU1OTQyLWU4YjYtNDg5YS04NDRkLTU0OTVhZjRkMzYxZSJ9&pageName=ReportSection>

- Montelongo, M. J., Silvera, E., Alaniz, S., Scattolini, A. y González, P. (2010). *Agentes bióticos asociados a síntomas en olivo (Olea europaea L.) en Uruguay*. Jornada de divulgación: resultados experimentales en olivos. INIA. <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/2410/1/18429121210210356.pdf>
- Montelongo, M. J., Hernández, L., Casanova, L., Alaniz, S. y Conde, P. (2011, 21 de octubre). *Avances en el proyecto caracterización de Colletotrichum spp. causante de la aceituna jabonosa en Uruguay*. Jornada anual de divulgación de resultados experimentales en olivos. INIA. <http://www.inia.org.uy/online/site/978334I1.php>
- Montelongo, M. J., Hernández, L., Casanova, L. y Conde, P. (2013). *Aceituna jabonosa en Uruguay*. Jornada de divulgación. Resultados experimentales en olivos. Serie de actividad de difusión N° 721, INIA. http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/AD_721.pdf
- Moral, J., Alsalimiya, M., Roca, L. F., Díez, C. M., León, L., De la Rosa, R., Barranco, D., Rallo, L. y Trapero, A. (2015). Relative susceptibility of new olive cultivars to *Spilocaea oleagina*, *Colletotrichum acutatum*, and *Pseudocercospora cladosporioides*. *Plant Disease*, 99(1), 58-64. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-14-0355-RE>
- Moral, J., Agustí-Brisach, C., Agalliu, G., De Oliveira, R., Pérez-Rodríguez, M., Roca, L. F., Romero, J. y Trapero, A. (2018). Preliminary selection and evaluation of fungicides and natural compounds to control olive anthracnose caused by *Colletotrichum* species. *Crop Protection*, 114, 167-176. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.08.033>
- Moral, J., Ávila, A., López-Doncel, L. M., Alsalimiya, M., Oliveira, R., Gutiérrez, F., Navarro N., Bouhmidi, K., Bernali, A., Roca, L. F. y Trapero, A. (2005). Resistencia a los repilos de distintas variedades de olivo. *Vida Rural*, 208, 34-40.

https://www.researchgate.net/publication/39746048_Resistencia_a_los_repilos_de_distintas_variedades_de_olivo

- Moral, J., Xavier, C., Roca, L. F., Romero, J., Moreda, W. y Trapero, A. (2014). La antracnosis del olivo y su efecto en la calidad del aceite. *Grasas y Aceites*, 65(2), e028. <https://doi.org/10.3989/gya.110913>
- Moreira, V., Mondino, P. y Alaniz, S. (2021). Olive anthracnose caused by *Colletotrichum* in Uruguay: symptoms, species diversity and flowers and fruits pathogenicity. *European Journal Plant Pathology*, 160, 663-68. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02274-z>
- Moreira, V., Ferronato, B., De Benedetti, F., González-Barrios, P., Mondino, P. y Alaniz, S. (2022). Incidence of *Colletotrichum* latent infections during olive fruit development under Uruguayan environmental conditions. *International Journal of Pest Management*, 68, 286-294. <https://doi.org/10.1080/09670874.2022.2119490>
- Moreira, V., Carbone, M. J., Mondino, P. y Alaniz, S. (2023). *Colletotrichum* infections during flower development and fruit ripening in four olive cultivars. *Phytopathologia Mediterranea*, 62(1), 35-46. 10.36253/phyto-14087
- Nakashima, C., Motohashi, K., Chen, C. Y., Groenewald, J. Z. y Crous, P. W. (2016). Species diversity of *Pseudocercospora* from Far East Asia. *Mycological Progress*, 15, 1093-1117. <https://doi.org/10.1007/s11557-016-1231-7>
- Nigro, F., Antelmi, I. y Sion, V. (2018). Integrated control of aerial fungal diseases of olive. *Acta Horticulturae*, 1199, 327-332. 10.17660/ActaHortic.2018.1199.51.
- Nigro, F. y Ferrara, M. (2011). Olive cercosporiosis. En L. Scherna, G. E. Agosteo y S. O. Cacciola (eds.), *Olive Diseases and Disorders* (pp. 247-258). India Transworld Research Network.
- Nigro, F., Gallone, P. e Ippolito, A. (2003). La cercosporiosis o «piombatura» dell'olivo. *Informatore Fitopatologico, Speciale difesa olivo*, 12, 13-16.
- Nigro, F., Ippolito, A., Gallone, P., Romanazzi, G., Carmignano, P. y Laccone G. (2002). Cercosporiosis of olive in Apulia and Attempts to control the disease. *Acta Horticulturae*, 586, 773-776. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.586.167>

- Pappas, A. C. (1993). *Mycocentrospora cladosporioides* on olive in Greece. *Bulletin OEPP/EPPO*, 23, 405-409. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1993.tb01344.x>
- Parras Rosa, M. (2012, 1 de enero). El plan de refuerzo de la competitividad del conglomerado agroindustrial olivícola de Uruguay 2012 – 2020. <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/plan-estrategico-conglomerado-olivicola-2012-2020>
- Pereira, J. (2015). Historia de la olivicultura en Uruguay. *Plantae*, 1, 11-14. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2909.2564>
https://www.researchgate.net/publication/282670570_Historia_de_la_olivicultura_en_Uruguay?channel=doi&linkId=5617d62a08ae3253ad5d2228&showFulltext=true
- Rhizopoulou, S. (2007). *Olea europaea* L. a botanical contribution to culture. *American-Eurasian Journal Agricultural & Environmental Sciences*, 2(4), 382-387.
<https://s3.amazonaws.com/publicationslist.org/data/sophia.rhizopoulou/ref-8/olea%20europaea.pdf>
- Ricciolini, M. y Rizzo, D. (2010). Malattie fungine. En M. Ricciolini y D. Rizzo (eds.), *Avversità dell'olivo e strategie di difesa in Toscana* (pp. 177-183). ARSIA.
https://agroambiente.info.regione.toscana.it/agro18/sites/default/files/Difesa%20integrata%20olivo_0.pdf
- Riella, V., Borges, A., Arias-Sibillotte, M., Speroni, G., y Speranza, P. (2022). The effective pollination period of the olive cultivar 'Arbequina' (*Olea europaea* L.) in a non-traditional production region. *South African Journal of Botany*, 151, 246-254.
- Riveros, F. (2003). Enfermedades. En F. Tapia, M. Astorga, A. Ibacache, L. Martínez, C. Sierra, C. Quiroz, P. Larraín y F. Riveros (eds.), *Manual del cultivo del olivo* (pp. 111-122). Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Intihuasi. <https://www.scribd.com/doc/49172794/manual-cultivo-del-olivo>

- Roca, L., Moral, J., Viruega, J. R., Ávila, A., Oliveira, R., y Trapero, A. (2007a). Copper fungicides in the control of olive diseases. *Olea*, 26, 48-50. https://www.researchgate.net/publication/284371685_Copper_fungicides_in_the_control_of_olive_diseases
- Roca, L., Viruega, J. R., Ávila, A., Oliveira, R., Marchal, F., Moral, J. y Trapero, A. (2007b). Los fungicidas cúpricos en el control de las enfermedades del olivo. *Vida Rural*, 256, 52-56. https://www.researchgate.net/publication/309761862_Los_fungicidas_cupricos_en_el_control_de_las_enfermedades_del_olivo
- Roca, L., Viruega, J. R., Ávila, A., Oliveira, R. y Trapero, A. (2007c). Los fungicidas cúpricos en el control de las enfermedades del olivo. En Fundación para la promoción y el desarrollo del olivar y el aceite de oliva (ed.), *El aceite de oliva: actas del XII Simposium Científico-Técnico, Expoliva 2005*. <https://books.google.com.uy/books?id=oyJQQwAACAAJ> o <https://studylib.es/doc/5325538/los-productos-c%C3%BApricos-en-el-control-de-las-enfermedades-...>
- Roca, L., Viruega, J. R., Ávila, A., Moral, J., Marchal, F., Romero, J., Agustí, C. y Trapero, A. (2017, 25-27 de enero). *El cobre: materia activa básica en el control de las enfermedades del olivo*. 14 Symposium Sanidad Vegetal: hacia el cambio, Sevilla, pp. 233-239. https://www.researchgate.net/publication/317004250_EL_COBRE_MATERIA_ACTIVIA BASICA EN EL CONTROL DE LAS ENFERMEDADES DEL OLIVO
- Román, G. C., Jackson, R. E., Reis, J., Román, A. N., Toledo, J. B. y Toledo, E. (2019). Extra-virgen olive oil for potential prevention of Alzheimer disease. *Revue Neurologique*, 175(10), 705-723. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2019.07.017>
- Romero, J., Ávila, A., Agustí-Brisach, C., Roca, L. F. y Trapero, A. (2020). Evaluation of fungicides and management strategies against cercospora leaf spot of olive caused by *Pseudocercospora cladosporioides*. *Agronomy*, 10, artículo e271. <https://doi.org/10.3390/agronomy10020271>
- Sánchez-Estrada, A. Y Cuevas, J. (2018). ‘Arbequina’ olive is self-incompatible. *Scientia Horticulturae*, 230, 55-55.

- Sánchez, B., Mastrogiovanni, M., Santos, M., Petingi S., Conde P., Arias, M., Ibañez, F., Trostchansky, A. y Rubbo, H. (2022). Detection of nitro-conjugated linoleic acid and nitro-oleic acid in virgin olive oil under gastric conditions: relationship to cultivar, fruit ripening, and polyphenol content. *ACS Food Science & Technology*, 2(4), 673-681. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.1c00477>
- Sarasola, A. A. (1951). Nueva enfermedad del olivo en la Argentina causada por *Cercospora cladosporioides* Sacc. *Revista de la Facultad de Agronomía*, XXVIII, 41-47. Ministerio de Educación, Universidad Nacional de la Ciudad Eva Perón. <http://revista-vieja.agro.unlp.edu.ar/index.php/revagro/%20article/view/2126/1736>
- Sergeeva, V., Braun, U., Spooner-Hart, R. y Nair N. (2008). First report of *Pseudocercospora cladosporioides* on olive (*Olea europaea*) berries in Australia. *Australasian Plant Disease Notes*, 3(1), 24. <https://doi.org/10.1071/DN08010>
- Sergeeva, V. y Spooner-Hart, R. (2009). Anthracnose and Cercosporiose on olives in Australia: an update. *Australian & New Zealand Olivegrower and Processor*, 65, 31-34.
- Silva, M., Barreto, R. W., Pereira, O. L., Freitas, N. M., Groenewald, J. Z. y Crous, P. W. (2016). Exploring fungal mega-diversity: *Pseudocercospora* from Brazil. *Persoonia*, 37, 142-172. <https://doi.org/10.3767/003158516X691078>
- Silveira, A., López, S., Gándara, J. y Pereira, J. (2012, 25-29 de setiembre). *Reseña histórica del cultivo de olivo en Uruguay desde la época colonial hasta el presente* [contribución]. VII International Symposium on olive growing, San Juan. https://www.researchgate.net/publication/262897274_Resena_Historica_del_Cultivo_de_Olivo_en_Uruguay_desde_la_Epoca_Colonial_hasta_el_presente/citations
- Tapia, F., Astorga, M., Ibacache, A., Martínez, L., Sierra, C., Quiroz, C., Larraín, P. y Riveros, F. (2003). *Manual del cultivo del olivo*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Intihuasi. <https://www.scribd.com/doc/49172794/manual-cultivo-del-olivo>

- Trapero, A. y Blanco, M. A. (2008). Enfermedades. En D. Barranco, R. Fernández-Escobar y L. Rallo (eds.), *El cultivo del olivo* (6.ª ed., pp. 595-656). Coedición Junta de Andalucía - Mundi-Prensa.
- Trapero, A., López, F. J. y Blanco, M. A. (2017). Enfermedades. En D. Barranco, R. Fernández-Escobar y L. Rallo (eds.), *El cultivo del olivo* (7.ª ed., pp. 733-798). Mundi-Prensa.
- Trapero, A., Roca, L. F., Moral, J., Trapero, C. y López, F. J. (2011). Las enfermedades y su manejo en el olivar ecológico. En Junta de Andalucía (ed.), *El olivar ecológico* (pp. 209-256). <https://www.researchgate.net/publication/275891078>
- Triki, M. y Rhouma, A. (2008). First report of *Pseudocercospora cladosporioides*, the causal agent of Cercospora leaf spot of olive trees, in Tunisia. *Phytopathologia Mediterranea*, 47(3), 262-265. <https://oajournals.fupress.net/index.php/pm/article/view/5256/5254>
- Villamil, J. (2013). Plantación de olivos. En M. A. Grompone y J. Villamil (coords.), *Aceites de oliva: de la planta al consumidor* (vol. 1, pp. 75-89). INIA.
- Villamil, J. y Conde, P. (2013). Variedades. En M. A. Grompone y J. Villamil (coords.), *Aceites de oliva: de la planta al consumidor* (vol. 1, pp. 51-74). INIA.
- Zora, V. (1994). Susceptibility of some olive tree cultivars in Montenegro to *Cercospora cladosporioides* Sacc (*Olea europea* L.). *Acta Horticulturae* 356, 386-389. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1994.356.82>