

## Iniciadores específicos para detectar las especies de *Colletotrichum* causantes de la antracnosis de los olivos

M. P. MARTÍN, F. GARCÍA-FIGUERES, A. TRAPERO

*Colletotrichum acutatum* y *C. gloeosporioides* son los agentes causantes de la antracnosis de los olivos en España. En este trabajo se presentan los iniciadores específicos diseñados que, junto con el iniciador general ITS4, permiten discriminar a ambas especies mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

M.P. MARTÍN. Real Jardín Botánico, C.S.I.C., Plaza de Murillo 2, 28014 Madrid.

F. GARCÍA-FIGUERES. Unitat Sanitat Vegetal, Servei de Sanitat Agrària, Via Circulació Nord, Tram VI, Cant. C/3, Zona Franca, 08040 Barcelona.

A. TRAPERO. Departamento de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba, Apartado 32048, 14080 Córdoba.

**Palabras clave:** *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides*, *Gloeosporium olivarum*, *Olea europaea*, antracnosis, aceituna jabonosa, ITS rDNA. PCR.

### INTRODUCCIÓN

La "Aceituna jabonosa", conocida también con los nombres de antracnosis, lepra, vivillo o momificado, es una grave enfermedad del olivo (*Olea europaea* L.) en muchas regiones olivareras del mundo en las que se cultivan variedades susceptibles (GRANITI y LAVIOLA, 1981). El efecto principal sobre el huésped es la podredumbre de las aceitunas, asociada con una notable pérdida de peso y su caída prematura, lo que origina aceites de elevada acidez y pésima calidad ("aceites colorados") (ANDRÉS, 1991).

Tradicionalmente, el agente causal de esta enfermedad se ha identificado como *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. et Sacc. (= *Gloeosporium olivarum* Alm.), y su teleomorfo *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. et Schrenk se ha observado sólo una vez en el cultivo de un aislamiento procedente de la India (MUGNAI *et al.*, 1993).

Recientemente, la especie *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds (telomorfo: *Glomerella acutata*) ha sido también identificada como agente causal de la antracnosis del olivo en China (MARGARITA *et al.*, 1986), India (MUGNAI *et al.*, 1993), España (MARTÍN y GARCÍA-FIGUERES, 1999; Figs. 1 y 2) e Italia (AGOSTEO *et al.*, 2000).

En España, los ataques de esta enfermedad se han localizado exclusivamente en las aceitunas (MATEO-SAGASTA, 1968; ANDRÉS, 1991; GARCÍA-FIGUERES, 1998). Sin embargo, en otros países, como Italia y Portugal, también se han observado intensas defoliaciones asociadas con infecciones de hojas y ramas (GRANITI *et al.*, 1993). En las graves epidemias de Aceituna jabonosa registradas en los últimos años (1997-2000) en Andalucía, los olivos afectados mostraron, además de los síntomas característicos de podredumbre y momificado de las aceitunas, una intensa defoliación y desecación apical de las



Fig. 1.—Síntomas de antracnosis en olivo.

ramas (TRAPERO *et al.*, 1998; TRAPERO y BLANCO, 2001). En estas epidemias, casi todos los aislamientos de *Colletotrichum* obtenidos de aceitunas, pedúnculos, hojas y ramas de olivos afectados fueron identificados como *Colletotrichum* sp. y tan solo una pequeña proporción de los aislamientos (3.7%) se identificaron como *C. gloeosporioides* en base a sus características morfológicas (BOUHIDI, 1999).

La identificación de *C. acutatum* como agente causal de la antracnosis del olivo añade nuevos interrogantes sobre esta enfermedad, como el origen de dichos aislamientos, o bien, su papel en el desarrollo de la en-

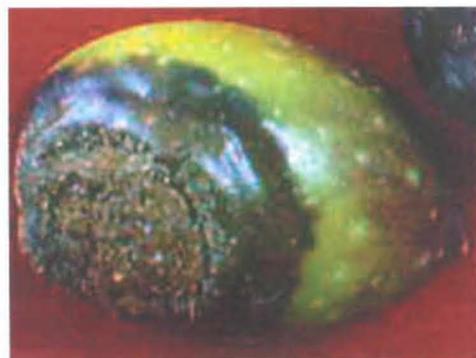


Fig. 2.—Detalle de aceituna infectada por el agente causal de la aceituna jabonosa *Colletotrichum acetatum*.

fermedad. En este sentido, investigaciones recientes han puesto de manifiesto una clara diferencia de virulencia entre ambas especies, *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*, en diferentes variedades de olivo, resultando más virulenta *C. acutatum* atendiendo al porcentaje de aceitunas afectadas, aunque no se observaron diferencias en cuanto a la superficie colonizada por aceituna infectada (GARCÍA-FIGUERES *et al.*, 2000). OLIVEIRA y TRAPERO (2001) han demostrado que las diferencias de virulencia entre *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* están determinadas por la temperatura. Así, *C. acutatum* resultó más virulento que *C. gloeosporioides* a altas temperaturas (25, 30°C); mientras que el efecto contrario se observó para temperaturas iguales o inferiores a 20°C.

El presente trabajo forma parte de un estudio sobre la caracterización de aislamientos de *Colletotrichum* causantes de la antracnosis del olivo y su principal objetivo es ensayar los iniciadores específicos ya publicados (MILLS *et al.*, 1992; MILLS *et al.*, 1994; SREENIVASAPRASAD *et al.*, 1996) para valorar su efectividad en detectar e identificar *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* a partir de extracciones de aceitunas con síntomas de antracnosis; así como diseñar nuevos iniciadores que fueran más eficientes.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material

Se han utilizado las extracciones de DNA de las colecciones mencionadas en MARTÍN & GARCÍA-FIGUERES (1999) conservadas en la Unidad de Sanidad Vegetal (Barcelona) y se han efectuado nuevos aislamientos de DNA de 13 colecciones procedentes de Córdoba (Tabla I).

### Identificación

Para la identificación de las nuevas colecciones se han seguido los protocolos

Tabla 1.—Origen de los aislamientos de *Colletotrichum* sp. (CORCOL-01 a CORCOL-13)

Código aislamiento	Identificación previa	Origen geográfico	Hospedante	Identificación molecular
CORCOL-01	<i>Colletotrichum</i> sp.	Almodóvar, Córdoba, S	<i>Olea europaea</i> (pedúnculo)	<i>C. acutatum</i>
CORCOL-02	<i>C.</i> sp.	Almodóvar, Córdoba, S	<i>Olea europaea</i> (tallo)	<i>C. acutatum</i>
CORCOL-03	<i>C.</i> sp.	Sta. Cruz, Córdoba, S	<i>Olea europaea</i> (pedúnculo)	<i>C. acutatum</i>
CORCOL-04	<i>C.</i> sp.	Sta. Cruz, Córdoba, S	<i>Olea europaea</i> (pedúnculo)	<i>C. acutatum</i>
CORCOL-05	<i>C.</i> sp.	Sta. Cruz, Córdoba, S	<i>Olea europaea</i> (pedúnculo)	<i>C. acutatum</i>
CORCOL-06	<i>C.</i> sp.	Antequera, Málaga, S	<i>Olea europaea</i> (pedúnculo)	<i>C. acutatum</i>
CORCOL-07	<i>C.</i> sp.	Montilla, Córdoba, S	<i>Olea europaea</i> (fruto)	<i>C. acutatum</i>
CORCOL-08	<i>C.</i> sp.	Villavista, Córdoba, S	<i>Olea europaea</i> (fruto)	<i>C. acutatum</i>
CORCOL-09	<i>C.</i> sp.	Rute, Córdoba, S	<i>Olea europaea</i> (fruto)	<i>C. acutatum</i>
CORCOL-10	<i>C.</i> sp.	Rute, Córdoba, S	<i>Olea europaea</i> (fruto)	<i>C. acutatum</i>
CORCOL-11	<i>C.</i> sp.	Rute, Córdoba, S	<i>Olea europaea</i> (tallo)	<i>C. acutatum</i>
CORCOL-12	<i>C.</i> sp.	Rute, Córdoba, S	<i>Olea europaea</i> (pedúnculo)	<i>C. acutatum</i>
CORCOL-13	<i>C.</i> sp.	?	<i>Olea europaea</i> (fruto)	<i>C. acutatum</i>

descritos en MARTÍN y GARCÍA-FIGUERES (1999) que se describen brevemente a continuación.

Los aislamientos se realizaron en tres medios: a) PDA (ADSA micro, ref. 1-438), b) Czapek-Dox (BIOLIFE S.r.l., code 1360) y c) el medio CHM (Hidrólisis de la Caseína) preparado de acuerdo con PATERSON y BRIDGE (1994) que permite a las 72 h determinar la actividad proteolítica.

La identidad de los aislamientos se confirmó por PCR-RFLP de las regiones ITS y la subunidad 5.8S del rDNA. Para ello se realizaron extracciones de DNA a partir de 20 mg de micelio fresco en PDA mediante EZNA Fungi DNA miniprepkit (Omega Biotek) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, pero sin incluir B-mercaptoctanol en el tampón de extracción. Las amplificaciones se llevaron a cabo con Ready-to-Go® PCR Beads (Amersham-Pharmacia) y el par de iniciadores ITS1F (GARDES & BRUNS, 1993) e ITS4 (WHITE et al., 1990) en un termociclador Techne (Progene). Alícuotas de los amplímeros (5 µl) se sometieron por separado a digestión enzimática (2 unidades para un volumen total de 20 µl) con *Alu* I (Promega), *Hae* III, *Msp* I y *Taq* I (GeneCRAFT).

### Iniciadores específicos

Se ensayaron los iniciadores específicos Gglnt de MILLS et al. (1992) para detectar *C.*

*gloeosporioides*, y los iniciadores Calnt1 y Calnt2 descritos en MILLS et al. (1994), SRE-ENIVASAPRASAD et al. (1996) para *C. acutatum*. Basándonos en las secuencias obtenidas del Banco Genético (EMBL), así como de las publicadas en MARTÍN y GARCÍA-FIGUERES (1999), se diseñaron los iniciadores COL-1 (5'..cgg gca ggg gaa gcc tet c..3') y COL-2 (5'..aag cct ctc gcg ggc etc ccc t..3').

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Techne (Progene), mediante el protocolo estándar y por reacciones individuales con Ready-to-Go® Beads siguiendo las condiciones de amplificación mencionadas en MARTÍN y GARCÍA-FIGUERES (1999). En cada amplificación se incluyeron controles negativos (agua estéril).

Los productos de amplificación se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.2-2% (SERVA en tampón 1 x TAE durante 30 min a 5V cm<sup>-1</sup>. EL DNA se tiñó con bromuro de etidio presente en los geles (0.4 µg ml<sup>-1</sup>). La longitud de los amplímeros se estimó por comparación con un marcador de peso molecular conocido (kb ladder, Gibco BRL).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Identificación

Todas las colecciones mencionadas en la Tabla 1 procedentes de Córdoba y Málaga

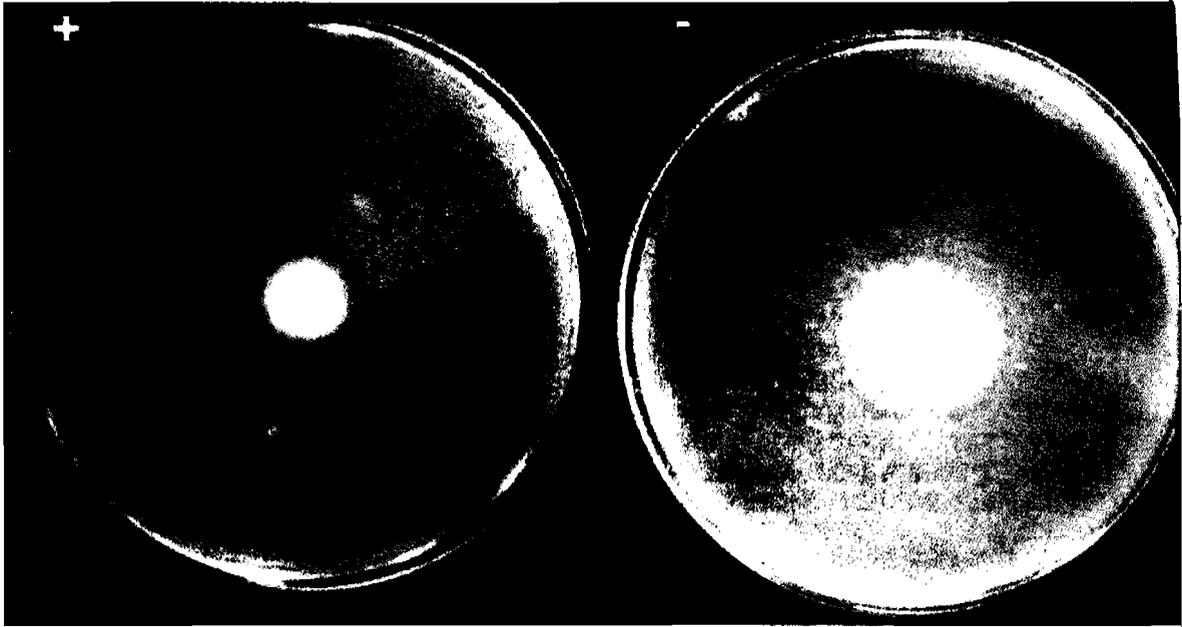


Fig. 3.—Test de hidrólisis de la caseína (medio CHM). Izquierda positivo: la colonia de *Colletotrichum acutatum* produce un zona clara a las 72-96 horas de crecimiento. Derecha negativo: la colonia de *C. gloeosporioides* no produce ningunana zona clara.

presentaron unos caracteres de cultivo y una tasa de crecimiento en PDA y Czapek similar a la cepa de referencia de *C. acutatum* mencionada en MARTÍN y GARCÍA-FIGUERES (1999). También fueron positivas al test de Hidrólisis de la Caseína (Fig. 3). Aunque, en general, los aislamientos de olivos con aceituna jabonosa se han identificado como *C. gloeosporioides*, sobre la base de sus caracteres morfológicos, en la descripción original de *Gloeosporium olivaru*, aparecen conidios con un extremo agudo, que corresponden más a los del tipo de *C. acutatum* que a los de *C. gloeosporioides*.

Los patrones de PCR-RFLP, de los productos obtenidos con los iniciadores ITS1F/ITS4 de los aislamientos mencionados en la Tabla I, fueron idénticos a los visualizados en MARTÍN y GARCÍA-FIGUERES (1999) para la cepa de referencia de *C. acutatum*. Sin embargo, CACCIOLA *et al.* (2001) señalan que los aislamientos causantes de la antracnosis del olivo en varias regiones oli-

vareras italianas constituyen un grupo genéticamente distinto de *C. acutatum* y de *C. gloeosporioides*.

#### Iniciadores específicos CaInt1 y CaInt2

En los primeros ensayos con los iniciadores específicos para *C. acutatum* de MILLS *et al.* (1994) y SREENIVASAPRASAD *et al.* (1996), el par de iniciadores CaInt1/ITS-4 dió mejores resultados (Fig 4, arriba) que el par CaInt2/ITS4 (Fig. 4, abajo); ya que con este último, aparecían bandas inespecíficas, tanto de las extracciones que se habían identificado previamente como *C. gloeosporioides* (GLOCOL-4 aislamiento de *Citrus aurantium*) como de los controles negativos.

En posteriores ensayos, con los iniciadores CaInt1/ITS-4 se obtuvieron muy buenas amplificaciones de todos los aislamientos identificados previamente como *C. acutatum*

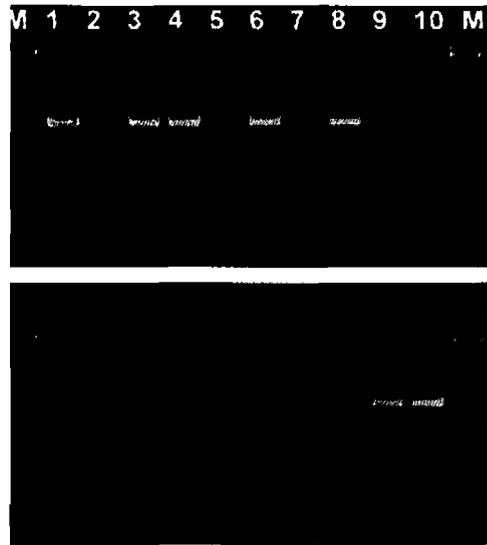


Fig. 4.—Amplificaciones con los iniciadores CalNT-1/ITS-4 (arriba) y CalNT-2/ITS-4 (abajo). M: Marcador de peso molecular. 1: *C. gloeosporioides* (GLOCOL-4). 2: *C. acutatum* (GLOCOL-9). 3-4: Controles negativos. 5: *C. acutatum* (SPCOL-2). Las abreviaturas de las cepas de acuerdo con Martín y García-Figueroa (1999).

Fig. 5.—Amplificaciones con los iniciadores CalNT-1/ITS-4 (arriba) y COL-1/ITS-4 (abajo). M: Marcador de peso molecular. 1: *C. acutatum* de referencia (ACUCOL-R). 2: *C. gloeosporioides* de referencia (GLOCOL-R). 3: *C. acutatum* (GLOCOL-07). 4: *C. acutatum* (GLOCOL-06). 5: *C. acutatum* (SPCOL-1). 6: *C. acutatum* (GLOCOL-10). 7: *C. gloeosporioides* (GLOCOL-08.1). 8: *C. acutatum* (GLOCOL-08.2). 9: *C. acutatum* (CORCOL-07). 10: *C. acutatum* CORCOL-03. Las abreviaturas de las cepas de acuerdo con Martín y García-Figueroa (1999) y la Tabla 1.

(Fig. 5, carriles 1,3,4,6,8,9 y 10); sin embargo, se visualizaron bandas menos intensas en las amplificaciones procedentes de extracciones identificadas como *C. gloeosporioides*, incluida la de la cepa de referencia (Fig. 5, carril 2).

**Iniciadores específicos COL-1 y COL-2**

Los iniciadores específicos diseñados en este trabajo para *C. acutatum* (COL-1 y COL-2) presentaron también un grado de especificidad distinto. A partir de las muestras ensayadas, COL-1/ITS-4 permitió discriminar *C. acutatum* (Fig. 6 arriba, carril 1 y 2) de los aislamientos identificados como *C. gloeosporioides* (Fig. 6 arriba, carril 3 y 4) y *C. fragariae* (Fig. 6 arriba,

carril 5). En cambio, con COL-2/ITS-4 se obtuvo, por ejemplo una buena amplificación del aislamiento de *C. acutatum* de referencia (Fig. 6 abajo, carril 2), pero también se visualizaron amplificaciones inespecíficas de los controles negativos debido, probablemente, a hibridaciones entre los iniciadores.

En los posteriores ensayos se eligió el par de iniciadores COL-1/ITS-4 (Fig. 7 abajo); ya que, aunque de algunas extracciones identificadas anteriormente como *C. acutatum*, y aisladas de fresas, no se obtuvieron muy buenas amplificaciones (Fig. 7, carril 5), nunca se visualizaron amplificaciones a partir de los aislamientos de *C. gloeosporioides* (Fig. 7 abajo, carril 2) ni de otras es-

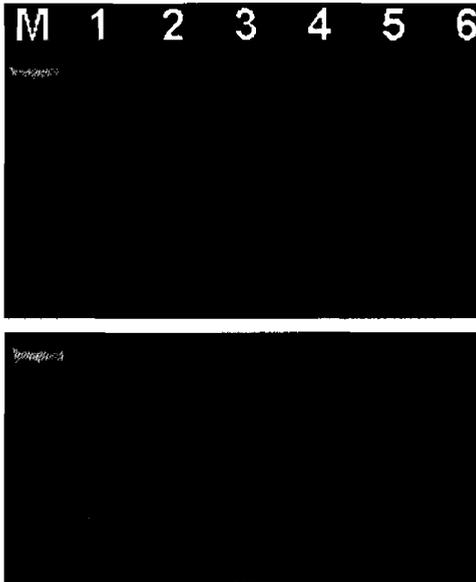


Fig. 6.—Amplificaciones con los iniciadores COL-1/ITS4 (arriba) y COL-2/ITS4 (abajo). M: Marcador de peso molecular. 1: *C. acutatum* (GLOCOL-1). 2: *C. acutatum* de referencia (ACUCOL-R). 3: *C. gloeosporioides* de referencia (GLOCOL-R). 4: *C. fragariae* de referencia (FRACOL-R). 5: *Colletotrichum* sp. (SPCOL-4). 6: control negativo. Las abreviaturas de las cepas de acuerdo con Martín y García-Figueres (1999).

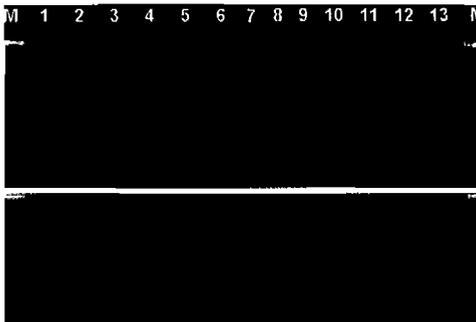


Fig. 7.—Amplificaciones con los iniciadores CgINT-1/ITS-4 (arriba) y COL-1/ITS-4 (abajo). M: Marcador de peso molecular. 1: *C. acutatum* (GLOCOL-03). 2: *C. acutatum* (GLOCOL-05). 3: *C. acutatum* (SPCOL-02). 4: *C. acutatum* (GLOCOL-02). 5: *C. gloeosporioides* (GLOCOL-04). 6: *C. gloeosporioides* (GLOCOL-16). 7: *Colletotrichum* sp. (GLOCOL-12). 8: *C. coccodes* (COCCOL-01). 9: *C. crassipes* (CRACOL-1). 10: *C. trichellum* (TRICOL-1). 11: *C. gloeosporioides* (GLOCOL-08.1). 12: *C. acutatum* (GLOCOL-08.2). 13: control negativo). Las abreviaturas de las cepas de acuerdo con Martín y García-Figueres (1999).

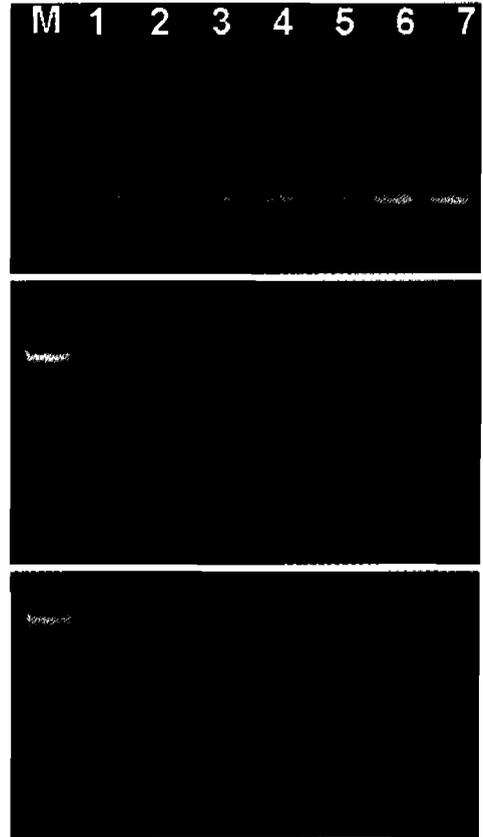


Fig. 8.—Amplificaciones con los iniciadores ITS-1F/ITS4 (arriba). CgINT-1/ITS-4 (centro) y COL-1/ITS4 (abajo). M: Marcador de peso molecular. 1-7 cepas de *C. acutatum* mencionadas en la Tabla 1 (CORCOL-01 a CORCOL-07).

pecies de *Colletotrichum*, como *C. coccodes* (Fig. 7, carril 8), *C. crassipes* (Fig. 7, carril 9) y *C. trichellum* (Fig. 7, carril 10), ni de los controles negativos.

### Iniciadores CgINT-1

El par de iniciadores CgInt1/ITS4 permitió detectar a *C. gloeosporioides* (Fig. 7 arriba, carril 5,6 y 11) de las extracciones no amplificadas con COL-1/ITS-4 (Fig. 7, abajo, carril 5, 6 y 11).

Los pares de iniciadores CgInt1/ITS4 y COL-1/ITS-4 resultaron muy efectivos in-

cluso para detectar y discriminar entre las dos especies aisladas de una misma aceituna (Fig. 7, carril 11: *C. gloeosporioides*; carril 12: *C. acutatum*), así como de las extracciones directas de aceitunas (dato no mostrado).

Tal y como muestra la Fig. 8, para la detección e identificación de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* con un grado de fiabilidad del 100%, de las aceitunas con síntomas de antracnosis se aconseja efectuar tres amplificaciones por separado. Una con los iniciadores generales ITS1-F/ITS-4 para confirmar que tenemos DNA del hongo en la extracción, y dos posteriores con los específicos CgInt1/ITS4 para identificar a *C. gloeosporioides* y COL-

1/ITS-4 o Calnt1/ITS4 para detectar a *C. acutatum*.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos sinceramente el inestimable trabajo en el suministro de muestras por parte de los técnicos de las Agrupaciones de Defensa Vegetal del olivo en las comarcas del Baix Ebre y Montsià en Catalunya. Las investigaciones sobre las epidemias de antracnosis en Andalucía han sido financiadas por los proyectos AGL96-1082 y AGL2000-1725 de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT).

## ABSTRACT

MARTÍN, M. P., GARCÍA-FIGUERES, F., TRAPERO, A. 2001: Iniciadores específicos para detectar las especies de *Colletotrichum* causantes de la antracnosis de los olivos. *Bol. San. Veg. Plagas*, 28: 43-50.

*Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* are the causal agents of the anthracnose on olive trees from Spain. In this work, the specific primers designed to discriminate both species are discussed.

**Key words:** *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides*, *Gloeosporium olivarium*, *Olea europaea*, anthracnose, ITS rDNA, PCR

## REFERENCIAS

- AGOSTRO, G.E.; LI DESTRI NICOSIA, M.G.; FRISULLO, S.; CACCIOLA, S.O. y MAGNANO DI SAN LIO, G., 2000: Characterization of the causal agent of olive anthracnose in southern Italy. In: *Abstracts 4<sup>th</sup> Internat. Symposium on Olive Growing*, 25-30 September, Valenzano, Bari, Italy.
- ANDRÉS, F. DE., 1991: Enfermedades y plagas del Olivo. 2ª Edición. Riquelme y Vargas Ediciones, S.L. Jaén, Spain, 646 pp.
- BOUHIMDI, K., 1999: Caracterización morfológica y patogénica de aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la "Aceituna jabonosa" del olivo. Tesis de "Máster en Olivicultura y Elaiotecnia", ETSIAM, Universidad de Córdoba, Spain, 110 pp.
- CACCIOLA, S.A.; AGOSTRO, G.E.; FRISULLO, S.; FAEDDA, R. y MAGNANO DI SAN LIO, G., 2001: Characterization of the causal agent of olive anthracnose using RAPD-PCR. Proceedings 11<sup>th</sup> Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, University of Évora, Évora, Portugal. pp. 190-192.
- GARCÍA-FIGUERES, F., 1998: Micosis de las aceitunas y su incidencia en la calidad del aceite. *Phytoma España* 102: 171-175.
- GARCÍA-FIGUERES, F.; PEDRET, L.; DUATIS, J.J. y MARCO, V. 2000: Assaig comparatiu de l'eficàcia d'infecció en oliva dels fongs causants de la Sabonosa *Colletotrichum acutatum* i *Colletotrichum gloeosporioides*. IV Jornades de Sanitat Vegetal, Barcelona.
- GARDES, M. y BRUNS, T. 1993: ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.
- GRANITI, A.; FRISULLO, S. y PENNISI, A., 1993: Infections of *Glomerella cingulata* on olive in Italy. *EPPO Bulletin* 23: 457-465.
- MARGARITA, I.; PORTA-PUGLIA, A. y QUACQUARELLI, A., 1986: *Colletotrichum acutatum*, a new pathogen of olive in China and comparison with the causal agent of olive anthracnose. *Annali dell'Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale, Roma*, 11: 125-133.

- MARTÍN, M.P. y GARCÍA-FIGUERES, F. 1999: *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* cause anthracnose on olives. *European J. Plant Pathology* **105**: 735-741.
- MATEO-SAGASTA, E., 1968: Estudios básicos sobre *Gloeosporium olivarum* Alm. (Deuteromiceto Melanconial). *Bol. Patol. Veg. Entomol. Agric.* **30**: 31-135.
- MILLS, P.R., SREENIVASAPRASAD, S. y BROWN, A.F. 1992: Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEM Microbiology Letters* **98**: 137-144.
- MILLS, P.R., SREENIVASAPRASAD, S. y BROWN, A.F. 1994: Detection of the anthracnose pathogen *Colletotrichum*. In *Modern Assay for Plant Pathogenic Fungi: Identification, detection and quantification*. Schöls A, Dewey FM, Oliver R (eds.). CAB International.
- MUGNAI, L., SURICO, G. y RAGAZZI, A., 1993: *Glomerella cingulata* on olive in India: morphological and pathological notes. *EPPO Bulletin* **23**: 449-455.
- OLIVEIRA, R y TRAPERÓ, A. 2001: Effect of temperature on species of *Colletotrichum* causing olive anthracnose. Proceedings 11<sup>th</sup> Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, University of Évora, Évora. pp. 234-236.
- PATERSON, R.R.M. y BRIDGE, P.D. 1994: Biochemical techniques for filamentous fungi. IMI Technical Handbooks: No 1, CAB International.
- SREENIVASAPRASAD, S., SHARADA, K., BROWN, A.F. y MILLS, P.R. 1996: PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *Plant Pathology* **45**: 650-655.
- TRAPERÓ, A. y BLANCO, M.A. 1999: Enfermedades. In: El cultivo de olivo (D. Barranco, R. Fernández-Escobar, L. Rallo, ed.), Coedición Junta de Andalucía/Mundi-Prensa, Madrid, Spain, 461-507.
- TRAPERÓ, A.; LÓPEZ DONCEL, L.M. y VIRUEGA, J.R., 1998: Los "Repilos" del olivo: Etiología, epidemiología y estrategias de control. *Phytoma España* **102**: 154-158.
- WHITE, T.J.; BRUNS T., LEE, S. y TAYLOR J., 1990 - Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocol. A guide to methods and applications* (M.A. Innis, D.H. David, J.J. Shinsky & T.J. white, eds.), 315-322. New York: Academic Press.

(Recepción: 28 noviembre 2001)

(Aceptación: 17 diciembre 2001)