

# CARACTERITZACIÓ DE *Colletotrichum gloeosporioides* EN OLIVA

Garcia, Francesc

Unitat de Sanitat Vegetal. Servei de Sanitat Agrària. Departament d'Agricultura Ramaderia i Pesca (**DARP**). Zona Franca. 08040 Barcelona

Gomar, Eva

Serveis Territorials del **DARP**. Sabino de Arana 22-24. 08028 Barcelona

Montón Carmina

Unitat de Sanitat Vegetal. Servei de Sanitat Agrària (**DARP**). Barcelona

## RESUM

La malaltia coneguda com «olives sabonoses», és una de les més temudes en olivera, degut a la incidència negativa sobre la collita. El fong causant, havia estat descrit com *Gloeosporium olivarum* Alm.; no obstant, moltes espècies d'aquest gènere, s'han inclòs en *Colletotrichum gloeosporioides* que és l'anamorf de *Glomerella cingulata* (Ston.) Sp. & Schr. Von Arx, també ha inclòs *Gloeosporium olivarum* dins d'aquesta espècie. Els estudis realitzats en olives, donen suport a aquesta inclusió dins de *Colletotrichum gloeosporioides* i posen de manifest la presència de diferents tipus culturals basats en la coloració i tipus de colònia que concorden en els tipus observats per *C. gloeosporioides* en altres hostes.

## INTRODUCCIO

Tradicionalment s'havia relacionat *Gloeosporium olivarum* Alm. com el causant de les «olives sabonoses» (Mateo-Sagasta, 1967). No obstant, des de la revisió de Von Arx (1970) i els estudis de Sutton (1980; 1992), pels quals desapareixia el gènere *Gloeosporium*, s'havia considerat que *G. olivarum* podria estar inclòs en el taxó heterogeni de *Colletotrichum gloeosporioides* Sacc. & Penz Vist això es va creure convenient fer un estudi en aquest sentit per tal d'establir la identitat del fong causant de l'esmentada afecció a les oliveres, que d'altra banda representa un problema important a les comarques del Baix Ebre i el Montsià.

## MATERIAL I METODES

Es van realitzar aïllaments del fong causant de les «olives sabonoses» (*Colletotrichum gloeosporioides* - CG-) en diferents finques de les comarques del Baix-Ebre i el Montsià durant el període 1990-1992.

La sembra inicial es va fer sobre medi PDA (Agar de Patata i Dextrosa), a partir de l'esperulació en fruits afectats després d'una incubació de 24 hores en cambra humida.

Les observacions per tal de catalogar el tipus d'aïllat, es van fer a partir de la tercera sembra de 10 dies cadascuna incubada a 26° C. i valorant l'aspecte de la colònia i el color per l'anvers i pel revers, així com el seu comportament amb cicles de llum o fosc.

Els cultius monospòrics es van realitzar amb una suspensió d'espores a raó de 50 espores/20 ml de medi (**PDA**). A les 24- 48 hores es van sembrar els creixements en **PDA**.

El testatge en medis de cultiu s'ha fet d'una banda amb medis comercials **PDA**, **CMA** (Agar de farina de blat de moro), **SAB** (Agar Sabouraud), **MID** (Agra Midó) i **CZ** (Czapeck-Dox) i de l'altra suplementant un medi d'extracte d'oliva (**EO**) (Garcia 1994) amb aminoàcids (**GLICO**: 0.1 g/L glicocola; **ASP**: 0.16 g/L asparagina; **TRIP**: 0.30 g/L triptòfan) i oli (**EO + O**: EO + 10 ml/L oli verge).

Els codis d'identificació emprats per a cada aïllament, responen solament a criteris de diferenciació entre ells.

En cada aïllat es va procedir a comprovar l'acompliment dels postulats de Koch sobre olives amb una suspensió d'espores amb lesió epidèrmica o sense.

## RESULTATS

Els aïllaments inicials fets a partir de masses d'espores, van donar colònies ataronjades, que sovint presentaven sectors grisos molt ben diferenciats amb un creixement micelià més fosc i ben delimitat de la resta de la colònia. Es va comprovar que tant la forma ataronjada com la grisenca corresponien a *Colletotrichum gloeosporioides*. Davant d'aquest fet, es va procedir aïllaments amb cultiu monospòrics.

Amb aquests criteris es van determinar 5 soques o aïllats que presentaven unes característiques diferenciades i dins dels quals es podien assignar els altres aïllats. Les soques «tipus» a partir d'olives infectades i que s'han pogut determinar són les següents:

### GL-9106-T - GL-9106-N 2 - GL-9112-T - GL-9112-N - GL-9212-T

Degut a que principalment presenten dues coloracions ben diferenciades, se'ls ha posat el distintiu T a les colònies que presenten una coloració ataronjada o blanquinosa i N a les que presenten una coloració grisenca, negrosa o si més no fosca.

#### Descripció de les soques tipus

La descripció de les diferents soques, s'ha realitzat segons el seu comportament en PDA.

Totes elles produïen conidis el·líptics, fusiformes o gairebé cilíndrics, amb l'extrem distal més arrodonit i el basal més agut, observant-se una formació residual en el punt d'inserció a la cèl·lula conidiògena. El creixement de la colònia era circular, molt regular amb els marges enters i molt ben definits.

En cap soca no s'ha observat la presència de sedes, ni sobre acèrvuls en olives, ni sobre medis de cultiu. En cap moment s'ha observat la forma teleomòrfica *Glomerella cingulata* (Ston.)Sp. & Schr. Von Arx

#### - GL-9106-T

**Colònia:** Miceli uniforme i dens, poc elevat del medi, de color blanc-ataronjat amb diferents intensitats formant anells de creixement els quals augmenten en nombre formant franges més estretes si es manté a un règim de llum/fosc de 12 hores. Sobre el disc de sembra, es pot formar una massa cotonosa i laxa de miceli més fosc. Al microscopi òptic, només s'observa miceli hialí. Pel revers, presenta també un creixement anular intercalant coloració taronja viu amb castany. Sovint presenta unes figures poligonals generalment estrellades a poca distància i al voltant del disc de sembra amb el marge fosc i l'interior taronja. Amb l'envelliment del cultiu es desenvolupen unes formacions fosques, compactes i enduredes amb el miceli molt dens, que poden assolir els 2 mm de diàmetre. No s'ha observat cap evolució d'aquestes estructures.

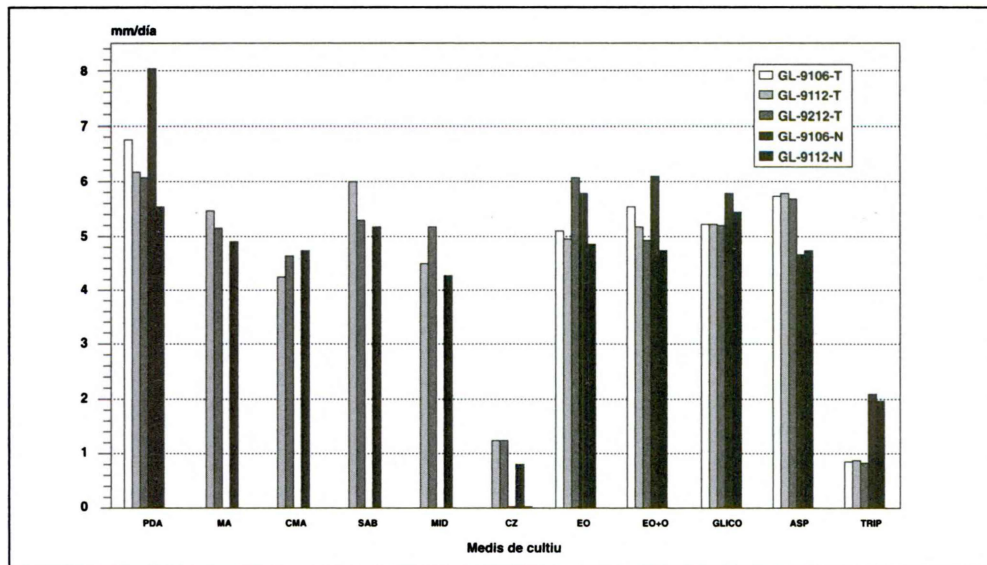
**Conidiogènesi:** Generalment per conidiòfors ampul·liformes sobre les hifes, que assoleixen una gran densitat a les franges que presenta coloració ataronjada produïda pels conidis en massa. No presenta formacions clares de tipus acèrvul. De vegades però, pot presentar formacions micelïanes denses a mena de proconidioma, però que no evoluciona clarament com a tal.

#### - GL-9106-N

**Colònia:** Miceli lax i arran de medi, de color gris de diferents tonalitats. No presenta coloració taronja, tret de punts dispersos ataronjats i molt reduïts en condicions d'elevada humitat. Sovint presenta un aspecte pulverulent, ben diferent del filamentós originari. Produeix nombrosos nòduls de miceli més dens dispersos pel medi, sense cap estructura definida. L'observació al microscopi indica que hi ha molt miceli fosc intercalat amb hialí. Pel revers té un color grisenc de vegades amb anells clars més aviat blanc-marfil. De forma dispersa pot presentar formacions compactes en envellir-se el cultiu.

**Conidiogènesi:** Presenta poca quantitat de conidis en relació a la soca anterior, molt dispersos sempre sobre conidiòfors hifals, i tret dels punts ataronjats que s'han esmentat en el paràgraf anterior no presenta cap altre tipus de producció conídica en massa. No s'ha observat cap formació de tipus acèrvul, encara que els nòduls esmentats, podrien ser estructures immadures.

**Gràfic 1.** Representació gràfica del creixement en els diferents medis de cultiu de les diferents soques de *Colletotrichum gloeosporioides*.



#### - GL-9112-T

**Colònia:** Miceli cotonós i dens de color blanc-marfil i amb producció de nombroses zones amb coloració taronja corresponent a masses gelatinoses de conidis. Prop del disc de sembra i fins a uns 10 mm, la presència d'aquestes masses és molt important. Segons les condicions o els repicats, pot presentar un enfosquiment micelià grisenc entre la zona que va des del cercle intern taronja abans descrit, fins a uns 5 mm del marge de la colònia que es manté blanc. En aquest cas s'observa al microscopi òptic la formació d'un miceli fosc amb estructures semblants a clamidòspores o fins i tot apressoris. Pel revers presenta un color ataronjat uniforme, amb tonalitats marrons i ocasionalment pot presentar dibuixos poligonals com els descrits en la soca *GL-9106-T*. En incubació amb presència de llum, pot produir zones concèntriques alternant clares i fosques, però més difuses que les anteriors. Presència també de les formacions compactes descrites a les altres soques.

**Conidiogènesi:** De forma abundant sobre conidiòfors hifals amb zones de més densitat, donant masses gelatinoses taronja. Pot presentar petits nòduls més densos que no evolucionen cap a cap estructura reproductiva, si bé hi ha un augment de les estructures tipus apressori micelià abans descrites.

#### - GL-9112-N

**Colònia:** Miceli cotonós i dens de color bru molt uniforme en tota la seva superfície, encara que pot assolir una coloració més clara, però sempre dins de les tonalitats del gris o bru. Sovint pot presentar alguna formació ataronjada dispersa per la colònia sense arribar a tenir una continuïtat. Pot produir nòduls de miceli més dens i a les hifes que envolten aquests nòduls es pot observar la presència d'apressoris. Pel revers, es pot distingir una coloració marronosa fosca amb tendència a assolir un color bru amb anells més o menys aparents alternant clar i fosc. Formacions compactes i dures quan s'envelleix el cultiu.

**Conidiogènesi:** Malgrat no desenvolupar gaires formacions taronja de masses de conidis, té una producció més abundosa que la *GL-9106-N*, encara que menys que les de la línia T. Sense tenir una estructura clara d'acèrvul, els nòduls observats amb presència d'apressoris, produeixen una major densitat de conidiòfors i conidis.

#### - GL-9212-T

**Colònia:** Aquesta soca presenta unes característiques que es poden considerar intermèdies entre *GL-9112-T* i *GL-9112-N*. Miceli cotonós i dens inicialment blanc que es va enfosquir fins arribar a bru en una franja que va dels 10 mm des del disc de sembra fins a 5 mm del marge de la colònia. La zona central (al voltant del disc), presenta una coloració taronja intensa, encara que de vegades hi ha un creixement micelià més lax amb una tonalitat taronja pàl·lida. En la zona bruna, s'observa la formació de nòduls semblants a la soca *GL-9112-N*,

però amb presència molt escassa d'apressoris. Amb l'envelliment agafa una aspecte pulverulent. Pel revers reflecteix la mateixa distribució: una zona central més clara marró-taronja i una de color bru que va fins gaire bé al marge de la colònia. També presenta les formacions compactes descrites a les altres soques.

**Conidiogènesi:** Sempre a partir d'hifes, tampoc s'han observat formacions clares de tipus acèrvul. La producció de conidis és alta, especialment a la part central de la colònia.

### Comportament en diferents medis de cultiu

En el Gràfic 1, es mostra de forma comparativa el comportament de les soques estudiades en els diferents medis de cultiu. Cal assenyalar d'entrada que hi han diferències significatives entre soques en medis com el **PDA**, que és considerat com el més estàndard i fins i tot en els d'extracte d'oliva amb oli i sense. La soca *GL-9106-N* ha estat la que més creixement ha presentat en **PDA** suposant un 45% més que la soca *GL-9112-N*, que és la que menys creixement ha tingut.

En el cas d' **EO** i **EO+Oli**, també es pot observar com el creixement de *GL-9106-N* és més alt que la resta i en el cas d' **EO** ha estat d'un 30% més que la soca *GL-9112-N*, que també ha estat la de menor creixement. En aquests medis apareixen en general estructures acervulars abundants. També hi han diferències en els creixements en GLICO, ASP i TRIP; aquest últim, és el que dona un creixement més baix en totes les soques encara que en les soques de la línia N presenta un creixement de més del 100% respecte a la T. El creixement amb triptòfan en les soques T és de l'ordre del 13% respecte al creixement en **PDA**, i del 30% en les de tipus N.

### Morfologia d'estructures de *C. Gloeosporioides*

En la Taula 1 hi han els valors morfomètrics dels conidis observats en les diferents soques estudiades, tant sobre olives com sobre **PDA**. Cal destacar una diferència significativa en les mesures de llargada entre els conidis procedents d'oliva i els de **PDA**. En aquest s'observa una reducció que va acompanyada d'un canvi relatiu d'aspecte. Els conidis procedents d'olives tenen l'extrem distal o tots dos arrodonits, mentre que els de **PDA** són més aviat fusiformes, amb tots dos extrems aguts. Entre soques no s'observen diferències significatives. S'ha constatat la presència en totes les soques d'apressoris característics del gènere *Colletotrichum mesurant* entre 4.90-5.83 X 4.46-5.28 µ.

## DISCUSSIO

La presència de diferents soques en **CG** és un fet constant en nombrosos autors. Agostini & Timmer (1992), Agostini et al. (1992) i d'altres distingeixen dos tipus principals: una soca de coloració taronja, de creixement lent que l'anomenen **SGO** (Slow-growing Orange-colored), amb abundant producció de conidis (causa de la coloració taronja); i per una altra banda, una soca de creixement més ràpid de color gris, la **FGG** (Fast-growing Grey-colored). No obstant Agostini et al. (1992), aporten una altra soca, la **KLA** (Key Lime Anthracnose) que presenta un color taronja més fosc.

Altres diferències entre aquestes soques rauen en la patogenicitat, considerant les **FGG** com a més saprófita i les **SGO** i **KLA** com a més patògenes, implicant una major activitat cutinassa més elevada (Agostini et al., 1992) les quals al mateix temps, com que tenen una taxa de producció conídica superior a les grises, la reinfecció per aquestes és més efectiva (Chandramohan et al. 1987). Podem afirmar doncs que les soques aquí estudiades, encaixen dins d'aquestes característiques culturals de soques taronja i gris.

S'ha comprovat que amb els repicats, el color del miceli es va fent en general més grisenc i la producció de conidis disminueix, encara que les taxes de creixement es mantenen (Agostini et al., 1992). Aquest fet fa que la distinció de la colònia s'ha de fer en els primers repicats. No obstant és força efectiu realitzar inoculacions periòdiques en material vegetal (olives, cireres, pomes, etc.), cosa que «refresca» les característiques de la soca.

La resposta en alguns dels medis de cultiu suplementats entre les soques de línia T i les de línia N podria ser un indicatiu de característiques diferencials. En canvi, dins de la línia T, el comportament global en gairebé tots els medis, no és significativament diferent. En les de tipus N, trobem que entre les dues soques representades, hi han grans diferències especialment en **PDA**. Aquesta variació entre diferents soques de CG ja va ser observada per altres autors. Chandramohan et al. (1987), per exemple van fer un estudi de diferents aïllats

**Taula 1.** Morfometries de les diferents soques estudiades emb conidis obtinguts directament d'olives infectades i en PDA

GL-9106-N	GL-9106-N	GL-9112-T	GL-9112-N	GL-9212-T
-----------	-----------	-----------	-----------	-----------

Produïts en olives						
<b>Llarg</b>	Mitjana	16.813	15.77	15.71	15.98	15.42
	D.S.	± 0.603	± 0.517	± 0.81	± 0.62	± 0.85
	Interval	15.5-18.12	14.47-17.08	14.40-17.02	14.67-17.29	14.11-16.72
<b>Ample</b>	Mitjana	4.60	4.18	4.10	4.18	4.27
	D.S.	± 0.23	± 0.70	± 0.13	± 0.70	± 0.19
	Interval	4.29-4.91	3.87-4.08	3.79-4.41	3.87-4.50	3.96-4.58
<b>LI/Amp</b>	Mitjana	3.73	3.77	3.86	3.81	3.62
	D.S.	± 0.20	± 0.10	± 0.21	± 0.12	± 0.16
	Interval	3.41-4.04	3.45-4.08	3.54-4.17	3.50-4.13	3.30-3.93

Produïts en P.D.A.						
<b>Llarg</b>	Mitjana	15.062	13.80	14.058	13.299	14.06
	D.S.	± 0.807	± 0.556	± 0.657	± 0.507	± 0.500
	Interval	13.86-16.26	12.60-14.99	12.67-15.15	12.10-14.50	12.87-15.26
<b>Ample</b>	Mitjana	5.195	4.145	4.21	4.163	4.861
	D.S.	± 0.296	± 0.086	± 0.160	± 0.075	± 0.137
	Interval	4.86-5.53	3.81-4.48	3.91-4.52	3.93-4.50	4.53-5.19
<b>LI/Amp</b>	Mitjana	2.926	3.337	3.383	3.198	2.907
	D.S.	± 0.101	± 0.139	± 0.196	± 0.116	± 0.110
	Interval	2.63-3.22	3.04-3.63	3.11-3.65	2.90-3.49	2.61-3.20

Mesures en m de: Llargada, Amplada i relaci Llargada/Amplada (LI/Amp).

Interval: Interval de confiança del 95%.

D.S.A: Desviaci estndard.

obtinguts de cacau (*Theobroma cacao*), trobant-se amb una gran variació en la taxa de creixement que anava de 4.8 mm a 10.83 mm/dia.

Referent a les mesures conídiques cal assenyalar que encaixen perfectament dins dels marges assenyalsats en la descripció del gènere. Força indicatiu és però, el fet que Sutton (1980, 1990, 1992), presenta mides diferents, en cada publicació (1992 especialment). Amb un rang més ampli o menys, l'amplada dels conidis sembla bastant constant entre tots els autors però amb uns màxims més alts que en la present experiència. En canvi la llargada està dins dels marges globals i molt pròxims als de Sutton (1992). En quant a la forma dels apressoris, no hi ha res que estableixi de forma taxant com han de ser; en principi poden ser rodons, clavats o subclavats i lobulats.

## CONCLUSIO

S'han pogut determinar dos tipus morfològics principals de CG: Un que manifesta una colònia de color grisenc o bru (tipus N) i un altre amb colònies de color clar, ataronjat o blanquinós (tipus T).

El medi amb un creixement micelià més abundant ha estat el **PDA**, però el que ha posat de manifest les estructures acervulars típiques ha estat EO i EO+O. La presència de Triptòfan en el medi inhibeix de forma

general el creixement micelià i diferència soques T i N. El creixement micelià sobre diferents medis de cultiu pot ajudar a distingir les diferents soques o aïllats de **CG**. Les diferències més significatives s'han obtingut amb els medis **PDA, TRIP, SAB, MID i CZ**.

No s'han observat diferències estadístiques en la llargada dels conidis de les diferents soques, en canvi, sí que se n'observen relacionant la procedència.

## BIBLIOGRAFIA

- AGOSTINI, J.P. & TIMMER, L.W. (1992). Selective Isolation Procedures for Differentiation of Two Strain of *Colletotrichum gloeosporioides* from Citrus. *Plant Disease*, 76, 11:1176-1178
- AGOSTINI, J.P., TIMMER, L.W. & MITCHELL, D.J. (1992). Morphological and Pathological Characteristics of Strain of *Colletotrichum gloeosporioides* from Citrus. *Phytopathology*, 82(11):1377-1382
- CHANDRAMOHANAN, R.; KAVERIAPPA, KM. & NAMBIAR, KKN. (1987). Variation in cultural and morphological characters within cocoa isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Proceed. of the Tenth Inter. Cocoa Research Conference*: 491-497
- GOIDANICH, G. (1964). *Manuale di Patologia Vegetale: Vol. II. Ed. Agricole. Bologna*
- MATEO-SAGASTA, E. (1967A). estudios básicos sobre *Gloeosporium olivarum* Alm. (Deuteromiceto Melanconial). *Boletín de Patología Vegetal y Entomología Agrícola.*, 30:31-39
- SUTTON, T.B. (1980). *The Coelomycetes. C.A.B. C.M.I.*
- SUTTON, T.B. (1992). The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. En «*Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*», Ed. Bailey-Jeger C.A.B.
- VON ARX, J.A. (1970). A revision of the fungi classified as *Gloeosporium*. *Bibl. Myc.*, 24:1-203