

## Observaciones del «Repilo del olivo» (*Spilocaea oleaginae* Hugh. = *Cycloconium oleaginum* Cast.) al microscopio electrónico de barrido

F. A. ANTÓN, E. LABORDA y C. ALONSO

Se presentan diversas observaciones realizadas al microscopio electrónico de barrido («Scanning») del patógeno de las hojas del olivo, el «Repilo» (*Spilocaea oleaginae* Hugh. = *Cycloconium oleaginum* Cast.) en lo referente a su morfología, al proceso de infección causado por el patógeno en su ataque foliar y a las alteraciones causadas a las formas reproductoras por el fungicida preventivo Captan.

F. A. ANTÓN, E. LABORDA y C. ALONSO. Instituto de Edafología y Biología Vegetal. CSIC. C/ Serrano, 115-Bis. Grupo de Protección Vegetal/Ecotoxicología. Madrid (España).

**Palabras clave:** Olivo, Repilo, Scanning.

### INTRODUCCION

Desde hace bastante tiempo se han venido utilizando diversas técnicas de microscopía tanto óptica como electrónica para la observación, el estudio morfológico y de las características diversas de los procesos infecciosos, localización y ataques de los patógenos foliares, especialmente en el caso de hongos, a los órganos vegetales atacados por ellos. Pero los estudios de microscopía electrónica de barrido, más modernos, proveen en determinados aspectos de una mayor información como en lo referente a la morfología de las formas reproductoras, esporas o conidios, y a la localización y procesos infecciosos causados por los patógenos fúngicos a los órganos vegetales (MARTÍNEZ *et al.*, 1982; PAUL y BRANDES, 1983; HONEGGER, 1985).

El «Repilo del Olivo» es un hongo patógeno que ataca en todas las regiones olivícolas del mundo donde se da este cultivo y más especialmente en el área mediterránea y en nuestro país, considerándose endémico en las provincias de Jaén, Córdoba y Sevi-

lla. Las pérdidas causadas a la producción olivarera por este hongo son bastante importantes (GRANITI y LAVIOLA, 1981; DE BENITO, 1984; ANTÓN, 1988) y por ello es muy importante la realización de tratamientos fitosanitarios para contener la enfermedad a unos niveles aceptables que no causen excesiva reducción en las cosechas. Para realizar esto adecuadamente es preciso tener un buen conocimiento de todos y cada uno de los aspectos referentes a la biología, hábitat y requerimientos específicos del patógeno.

Uno de los aspectos más importantes de la biología del patógeno es su exacta localización en los tejidos foliares (GRANITI y LAVIOLA, 1981; ANTÓN, 1988). Se han realizado desde hace años varios estudios con técnicas de microscopía óptica sobre la morfología del patógeno y la situación del micelio en el interior de las hojas de olivo atacadas (MILLER, 1949; TENERINI y LOPRIENO, 1960; GRANITI, 1962); estudios histológicos con tinciones superficiales de micelio (LOPRIENO y TENERINI, 1959; ANTÓN, 1988) y de los conidios del patógeno (MILLER, 1949; GRA-

NITI, 1962; GRANITI y LAVIOLA, 1981), así como también de Scanning de formas reproductoras del patógeno relacionado *Spilocaea pomi*, que causa la «Roña del manzano», tratadas con el fungicida Benomyl (CORLETT y ROSS, 1979).

En lo respectivo a la observación del «Repilo» por microscopía electrónica de Scanning, no hay nada anterior realizado. El uso de esta microscopía para el campo concreto de investigaciones fitopatológicas y referentes a la protección vegetal es de gran interés porque permite estudiar caracteres finamente de las peculiaridades morfológicas de los patógenos, así como de su comportamiento en las distintas fases del ciclo vital (GREENHALGH y EVANS, 1974; HOLLOWAY y BAKER, 1974). Otra aplicación en este mismo campo sería el estudio de las superficies cuticulares de los órganos vegetales atacados por los patógenos examinando el efecto sobre ambos de los plaguicidas utilizados para el control de las enfermedades (CORLETT y ROSS, 1979; EVELING y CALL, 1983).

Con este trabajo pretendemos contribuir al mejor conocimiento del ciclo biológico del patógeno de las hojas del olivo (*Spilocaea oleaginae* Hugh. = *Cycloconium oleaginum* Cast.) y de la exacta situación micelial en el interior de las hojas atacadas, el proceso de penetración del promicelio fúngico, y la observación de cómo afecta el fungicida preventivo de la enfermedad, Captan, a las formas reproductoras del hongo patógeno, todo ello con el fin de obtener nuevos datos para proporcionar las medidas adecuadas de lucha contra la enfermedad basadas en un buen conocimiento de tales aspectos de la biología del patógeno.

## MATERIAL Y METODOS

Se recogieron hojas sanas e infectadas de Repilo en la finca experimental del CSIC, término municipal de Santa Olalla, provincia de Toledo en distintas épocas del año, desde julio de 1983 hasta febrero de 1984. Se mantuvieron almacenadas en nevera a 4°C en bolsas de papel o plástico hasta que fueron utilizadas en los experimentos.

Para la obtención de conidios o la esporulación de las manchas aparecidas en el haz foliar de las hojas de olivo infectadas se pusieron en cámara húmeda (placa Petri con papel de filtro humedecido y con una lámina de agua destilada esterilizada en el autoclave a 110°C) durante el tiempo necesario para una abundante esporulación (2-3 días, por término medio) antes del procesamiento previo de las mismas para su observación al Scanning. También se cortaron secciones cuadradas menores a 0,5 centímetros con la mancha típica de esporulación o infección en diferentes estadios del ciclo vital fúngico, o sin ella.

El material a observar se dividió en 4 apartados diferentes:

a) Hojas de olivo en superficie con la cutícula intacta.

b) Hojas de olivo tratadas con NaOH al 4% en diferentes estadios del ciclo vital fúngico (método de diagnóstico precoz de la infección: LABORDA, 1964).

c) Hojas de olivo con la cutícula separada.

d) Observación de secciones de hojas de olivo.

e) Hojas de olivo tratadas con fungicida.

### Hojas de olivo en superficie con la cutícula intacta

Hojas sanas e infectadas, con mancha de esporulación fúngica visible (estadio E del ciclo fúngico) o sin ella, tratadas o no con NaOH al 4%.

### Hojas de olivo tratadas con NaOH al 4% en diferentes estadios del ciclo vital fúngico

Con el método de diagnóstico precoz de la enfermedad (LABORDA, 1964), se clasificaron diferentes tamaños de manchas foliares aparecidas en el haz foliar con la escala de GAMBONI (1958), readaptada por nosotros (ANTÓN, 1988) y se prepararon para su observación al Scanning.

### Hojas de olivo con la cutícula separada

Se utilizó un método de disolución de la

cutícula foliar empleado en el caso del patógeno *Venturia inaequalis* en la «Roña» de hojas y frutos del manzano (PREECE, 1962; ANTÓN, 1988), para disolver la cutícula foliar de las hojas de olivo sanas e infectadas de Repilo y tratadas o no con NaOH al 4%.

### Secciones de hojas de olivo

Secciones de 5-10  $\mu$  de espesor fueron realizadas con un microtomo de congelación REICHTER, en hojas sanas e infectadas de olivo con y sin mancha esporulante.

### Hojas de olivo tratadas con fungicida

Se prepararon trozos de hojas de olivo infectadas en distintos estadios tras el diagnóstico foliar, tratadas mediante la aplicación en el campo de CAPTAN (Orthocide 50%) para ver el efecto de este fungicida sobre las estructuras reproductoras fúngicas.

## PROCESAMIENTO DE LAS HOJAS PARA LA OBSERVACION AL SCANNING

Algunos trozos de hoja de olivo y los cortes efectuados por congelación se introdujeron en cápsulas de Beem (MARTÍNEZ y RAMÍREZ, 1981; MARTÍNEZ *et al.*, 1982) y se fijaron en solución acuosa de Glutaraldehído al 6% durante 6 horas, al menos. Las muestras se lavaron luego varias veces en agua destilada para eliminar los restos del fijador. Se utilizó también una solución acuosa de cloruro de mercurio al 5% para endurecer las muestras en los casos en que se consideró necesario, como por ejemplo, en las secciones de olivo.

Se realizó luego la deshidratación de las muestras con Methyl-Cellosolve mediante tres lavados según la técnica de SAMSON y STALPERS (1978). Se continuó deshidratando las muestras con la realización del punto crítico de CO<sub>2</sub>, en un aparato de vacío AUTOSANDRI, manteniendo 10 minutos la muestra como tiempo de purga, en tales condiciones. Este método de deshidratación es más aconsejable para este tipo de mues-

tras que la congelación empleada en la preservación del material fúngico en plantas (PARSONS *et al.*, 1974). Además pueden darse variaciones de la morfología hifal de los hongos utilizando procedimientos de congelación y descongelación de las muestras (MORRIS *et al.*, 1988).

La observación de las muestras al microscopio electrónico de barrido o Scanning se realizó tras la metalización de las mismas con oro-paladio como capa de recubrimiento, en un evaporador de vacío modelo Jee-4B, durante 2 horas hasta que la capa de recubrimiento metálico era suficiente para la buena observación al microscopio.

Se ensayaron diversos adhesivos para adherir la muestra al portamuestras con el fin de conocer cual de ellos daba mejor resultado en la observación al Scanning. Usualmente se emplea un pegamento en base a plata metálica, pero además se utilizaron también: una cinta doblemente adhesiva de aluminio, cobre, papel celofán diluido en acetona o bien este mismo calentado en estufa a 150°C durante 2 horas, y albúmina de huevo.

Finalmente, la observación de la muestra se realizó en un microscopio electrónico de barrido (Scanning) mod. Jeol Jsm-50A, con un voltaje de aceleración de 20 kilovoltios.

## RESULTADOS

A continuación se muestra una serie de fotografías obtenidas al microscopio electrónico de barrido (Scanning), donde aparecen las hojas de olivo sometidas a diferentes tipos de tratamiento, mostrando asimismo las diferentes fases del ciclo vital fúngico en el huésped atacado.

### Hojas de olivo en superficie con la cutícula intacta

En este caso, la microscopía electrónica de Scanning permite la visualización detallada de las distintas fases vitales del ciclo fúngico en la hoja de olivo, a partir del estadio «C», cuando surgen los primeros conidióforos en el exterior de la cutícula

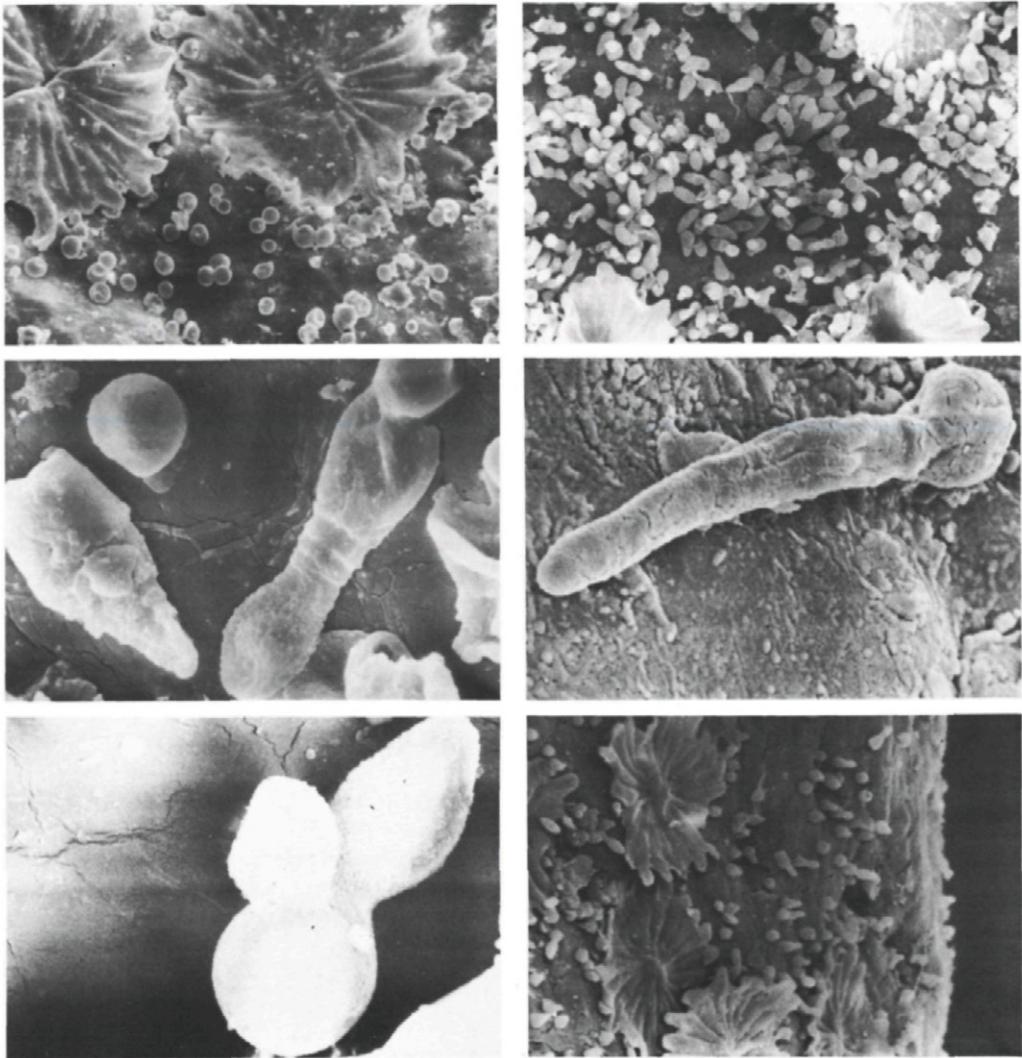


Fig. 1.—Observaciones sobre hojas de olivo en superficie con la cutícula intacta: a) Se muestra la superficie foliar de una hoja de olivo infectada en el estadio «C», con la presencia en el exterior de los conidióforos globosos y redondeados típicos del patógeno. Asimismo se pueden observar los pelos epidérmicos peltados de origen cuticular característicos de la hoja de olivo (450 aumentos). b) Superficie foliar de una hoja de olivo atacada en el estadio «E», de esporulación completa, donde se aprecian los conidios en abundancia. (300 aumentos). c) Aspecto detallado de los conidios de *Spilocaea oleaginae* Hugh, emergiendo de respectivos conidióforos que muestra, a su vez, tres anelletes o collaretes que demuestran la anterior salida a su través de otros conidios. (2.600 aumentos). d) Conidio de «Repilo» emitiendo un largo tubo de germinación. Aún no se han formado los apresorios ni ha penetrado el tubo en el interior foliar (4.000 aumentos). e) Conidióforo del hongo patógeno del olivo dando salida a dos conidios en diferente tiempo de formación y por diferentes puntos (3.000 aumentos). f) Corresponde a un estadio «D» de infección fúngica en la hoja de olivo atacada donde se aprecia una esporulación inicial pero predominando aún los conidióforos sobre la zona lesionada (300 aumentos).

infectada y hasta la esporulación, estadio «E», donde hay conidios en la zona infectada (Fig. 1). Los anteriores estadios del

ciclo no pueden observarse al scanning al estar aún el patógeno en forma micélica y extendiendo sus hifas, tras la penetración y

desarrollo vegetativo (estadios «A» y «B») por ser subcuticular la situación del patógeno, en el interior de las hojas atacadas.

### Hojas de olivo tratadas con NaOH al 4% en distintos estadios

En las hojas de olivo tratadas previamente con sosa al 4% (método de diagnóstico precoz de la enfermedad) se pueden observar igualmente que en las no tratadas los estadios fúngicos externos, a partir del «C» y no antes por lo ya dicho sobre la disposición interna del hongo en las dos primeras fases de su ciclo vital.

### Hojas de olivo sin cutícula

En estas hojas tratadas previamente para la separación de la cutícula y la observación del micelo fúngico internamente situado, las muestras no han dado resultado muy aceptables, si bien, en las fotos que se muestran a continuación se pueden observar claramente casos de marañas fúngicas bastante laxas, entrelazamientos y bifurcaciones de hifas, formación de mamelones o pequeñas ampollas en determinadas hifas, etc. (Fig. 3).

### Secciones de hojas de olivo

En este caso, se muestran otras fotos que

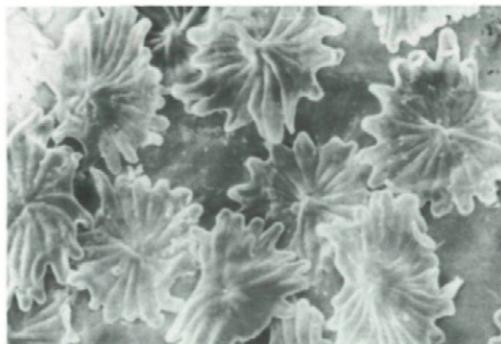


Fig. 2.—Hoja de olivo sana con gran cantidad de pelos epidérmicos peltados de origen cuticular (400 aumentos).

dan un aspecto general de una hoja sana y otra infectada (Fig. 4).

### Hojas de olivo tratadas con fungicida

Se muestran en las siguientes fotografías los efectos del tratamiento con Captan sobre las formas reproductoras del patógeno, apreciándose notables alteraciones y deformaciones evidentes en los conidióforos y conidios, y grietas en la superficie foliar de la hoja infectada tratada fitosanitariamente así como huecos en la misma causados por la salida de las formas reproductoras del hongo al exterior desde el interior de la cutícula atacada.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

El hongo *Spilocaea oleaginae* Hugh. (= *Cycloconium oleaginum* Cast), ataca al olivo, manifestándose principalmente en el haz foliar. Un conidio que llega a la cutícula de la hoja sana, la atraviesa enzimáticamente o por fuerzas mecánicas (ANTON, 1988), emitiendo un tubo germinativo que puede extenderse bastante antes de perforar la cutícula foliar externa en forma de muy finas hifas similares a haustorios, como ocurre en otros patógenos vegetales relacionados (SAAD y MASRI, 1978), si bien no han sido observados en nuestro trabajo ni en otro alguno anterior, o también puede darse un modelo de germinación «in situ» sobre la misma hoja de olivo, a partir de un mismo conidio esporulado recientemente en una zona foliar ya infectada (SALERNO, 1958), a diferencia de lo propuesto para la germinación conidial y penetración del tubo germinativo por otros autores (GAMBOGI, 1958; ALVARADO y DE BENITO, 1975; DE BENITO, 1984).

Una vez penetrado el tubo germinativo, el promicelio fúngico se sitúa en el interior cuticular (Estadio «A» de la enfermedad), en la capa cuticular basal externa, por encima de la línea de células epidérmicas (MILLER, 1949; GRANITI *et al.*, 1962; TENERINI y LOPRIENO, 1960; GRANITI y LAVIOLA, 1981). Se considera un patógeno subcuticular, al menos en una primera fase de su

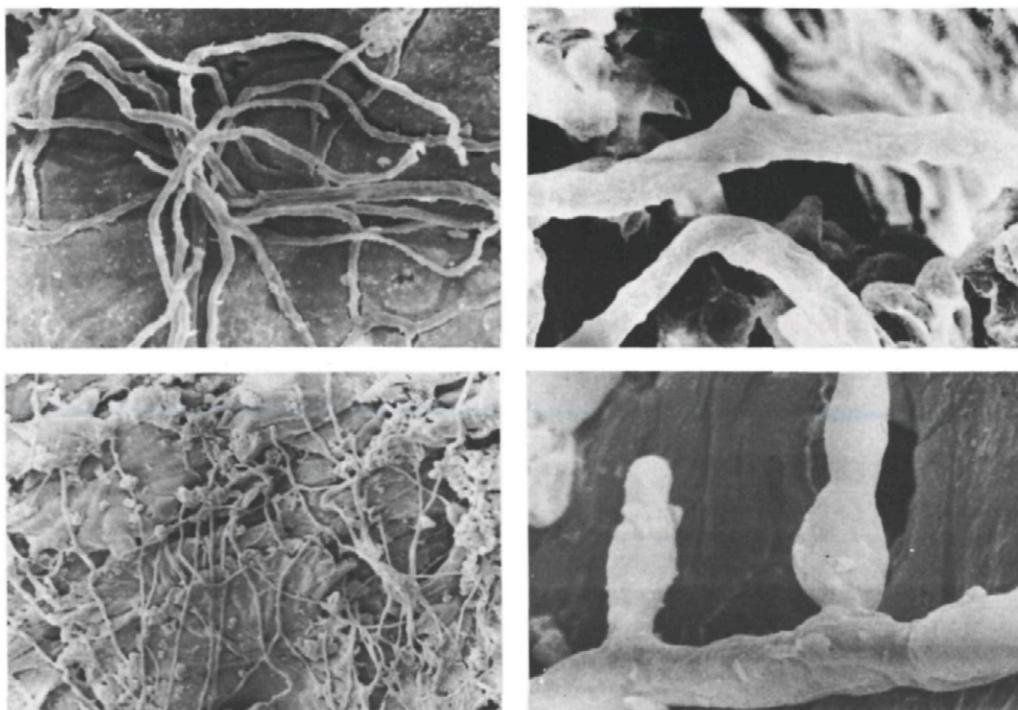


Fig. 3.—Observaciones sobre hojas de olivo sin cutícula: a) Maraña hifal del patógeno en hoja de olivo sin cutícula externa (2.000 aumentos). b) Hifa de *Spilocaea oleaginae* Hugh. mostrando un pequeño saliente o mamelón formador de una bifurcación hifal o de una forma conidiófora (5.000 aumentos). c) Maraña hifal del hongo o conjunto mecelial en hoja de olivo infectada con la cutícula degradada (500 aumentos). d) Hifa de *Spilocaea oleaginae* Hugh., dando lugar a conidióforos y conidios que salen de los mismos (7.000 aumentos).

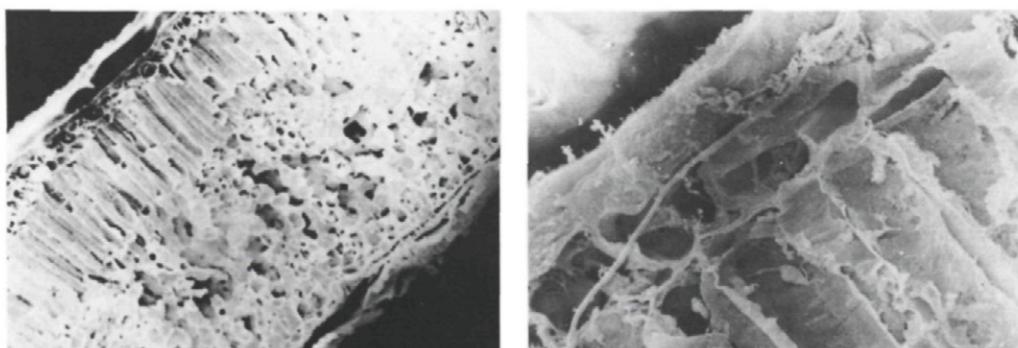


Fig. 4.—Observaciones sobre secciones de hojas de olivo: a) Sección foliar de hoja de olivo sana (200 aumentos). b) Sección foliar de hoja de olivo infectada por el patógeno (2.000 aumentos).

ataque a la hoja de olivo. Tal localización foliar es similar a la de otros patógenos relacionados. Allí, el micelo fúngico sobre-

vive protegido del ambiente externo (GRANITI, 1962; GRANITI *et al.*, 1962) y permanece en fase latente hasta que no se dan

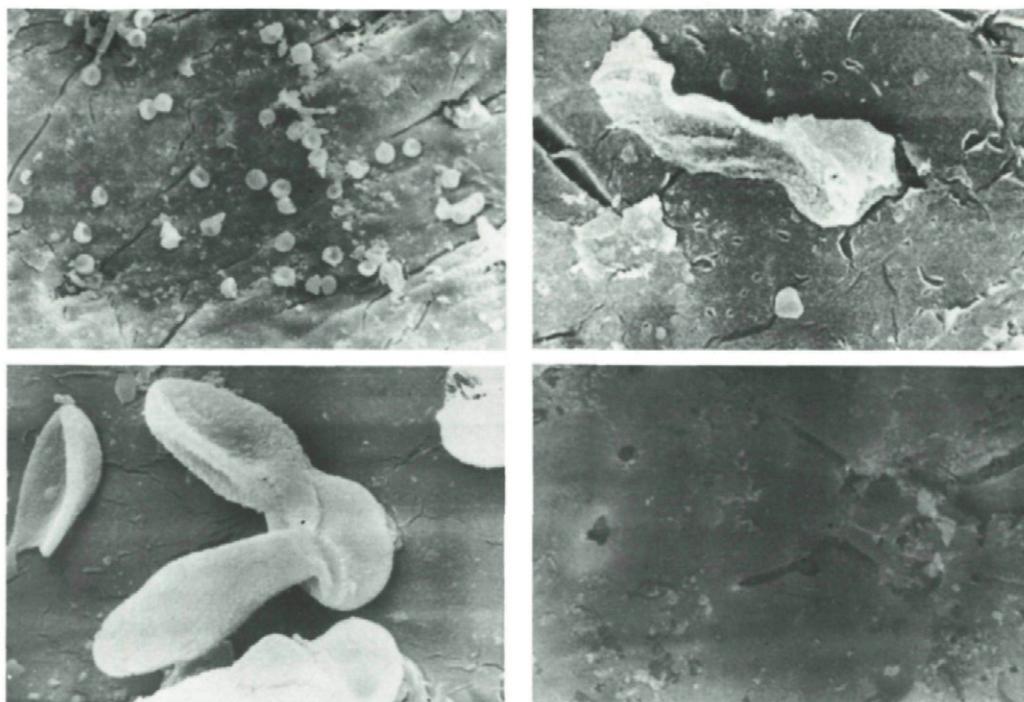


Fig. 5.—Observaciones sobre hojas de olivo tratadas con fungicida: a) Conidióforos sobre la superficie foliar de la hoja atacada (Estadio «C»), afectados por el tratamiento con Captan. También se observan grietas en la superficie cuticular (400 aumentos). b) Conidióforo de *Spilocaea oleaginae* Hugh., alterado visiblemente por el tratamiento con Captan. Se ve también que la superficie foliar queda asimismo con pequeñas grietas (3.000 aumentos). c) Conidióforo de «Repilo» con dos conidios partiendo del mismo, alterados por el tratamiento fitosanitario realizado en campo con Captan. Se hunden, abollan y se rompen, al contacto con el fungicida preventivo depositado sobre la cutícula (3.000 aumentos). d) Huecos que aparecen sobre la superficie foliar de la hoja de olivo atacada, como consecuencia de la destrucción de los conidióforos y conidios del patógeno por el fungicida Captan. Asimismo, se observan grietas cuticulares en la anterior zona donde estaba situado un pelo epidérmico foliar (700 aumentos).

condiciones medioambientales adecuadas para su desarrollo (Estadio «B»), alimentándose del interior foliar que le surte tanto en nutrientes como en humedad (PETRI, 1913; GAMBOGI, 1958; GRANITI y LAVIOLA, 1981; DE BENITO, 1984). Cuando las condiciones climatológicas externas son apropiadas (temperatura media superior a los 12° C y abundante humedad relativa en el ambiente) se inicia su emisión hifal y aparecen en el exterior de la cutícula los primeros conidióforos (Estadio «C») y, más tarde, los primeros conidios (Estadio «D») y la esporulación completa finalmente (Estadio «E»), cuando la mancha de infección se hace visible al exterior a simple vista, dispersán-

dose los conidios si prosiguen las condiciones medioambientales adecuadas para ello. Posteriormente, la lesión foliar puede avanzar al interior o mesófilo de la hoja de olivo traspasando la barrera subcuticular donde está el micelo del patógeno y llegando a alcanzar el parenquima empalizado, que va degradando paulatinamente necrosando a la hoja atacada, hasta su caída definitiva de la planta (GRANITI, 1962; GRANITI *et al.*, 1962; SPARAPANO y GRANITI, 1978; ANTÓN, 1988).

Respecto a la degradación de la cutícula foliar en las hojas de olivo infectadas por el patógeno por el procedimiento de PREECE (1962), la separación cuticular se da con

mayor facilidad en las hojas sanas que en las infectadas por el patógeno y en las zonas lesionadas que en las zonas sanas, en una misma hoja. Ello puede deberse probablemente a la función protectora que tiene la cutícula para el patógeno una vez instalado este en el interior foliar. Cuando el hongo se halla en pleno desarrollo vegetativo, se hace más difícil la separación cuticular por dicho método.

Con referencia al seccionamiento foliar y su observación al microscopio electrónico de barrido (Scanning), las hojas de olivo sanas e infectadas son prácticamente indistinguibles por este procedimiento. Otros métodos de observación quizá sean probablemente más adecuados, como la microscopía óptica utilizando diversos procesamientos de tinción con colorantes específicos de cada estructura de la interacción «huesped-patógeno», como ya se hizo anteriormente (ANTÓN, 1988).

Respecto a la morfología del hongo, el micelio radial y subcuticular (GRANITI, 1962; ANTÓN, 1988), está compuesto por hifas alargadas que se bifurcan y dan, en algunos puntos de su extensión, pequeños salientes o mamelones que, al crecer, originarán los conidióforos globosos y redondeados de los que salen los conidios, varios en las épocas de manifestación visible de la enfermedad. Ello lo demuestran claramente los anelloforos, anelidos o collaretes que se observan en la Fig. 1, c), típicos del género *Spilocaea*, Fries (PAUL y BRANDES, 1983) y tal y como creían asimismo también GRANITI y LAVIOLA (1981). Las estructuras reproductoras

del patógeno, poseen una pared lisa en un principio, que se torna luego rugosa y aspera. Si el tubo germinativo o promicelo da lugar a la formación de aporios para facilitar la penetración en el interior del huésped, como en otros hongos (GRANITI *et al.*, 1962; SAAD y MASRI, 1978), es algo que aún no se ha podido verificar, ni tampoco con las observaciones realizadas en este estudio y queda, por tanto, para posteriores investigaciones sobre el patógeno de las hojas del olivo en lo referente a su morfología.

El tratamiento con el fungicida Captan, utilizado normalmente en el tratamiento preventivo de la enfermedad, aporta una determinada causticidad contra el patógeno invasor, afectando adversamente a las estructuras reproductoras del mismo (conidióforos y conidios).

Los adhesivos metálicos al portamuestras del microscopio electrónico de barrido, han demostrado ser más eficaces que los de otro tipo que se han ensayado.

## AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestra gratitud al resto de los miembros del grupo de Protección Vegetal/ Ecotoxicología y especialmente a los titulados técnicos especializados D. Angel Braulio Pérez Rebollo, D. José María Fenollera Gutiérrez y D. Carlos Lacasta Dutoit, por su ayuda en la recogida de muestras en la Finca Experimental del CSIC. También a D. Juan Ramón Meroño por el trabajo referente a la fotografía.

## ABSTRACT

ANTÓN, F. A.; E. LABORDA y C. ALONSO (1989): Observaciones del «Repilo del olivo» (*Spilocaea oleaginae* Hugh. = *Cycloconium oleaginum* Cast.) al microscopio electrónico de barrido (scannig). *Bol. San. Veg. Plagas*, 15 (4): 375-383.

In this paper are reported several observations on the Scanning electronic microscope (S.E.M.) about the pathogen of the leaves of olive trees (*Spilocaea oleaginae* Hugh. = *Cycloconium oleaginum* Cast.) referring their morphology and the infection process caused by the pathogenic fungi on the foliar attack and the disruptions caused to the reproductive forma by the preventive fungicide Captan.

**Key words:** Olive tree, leaf spot, scanning.

## REFERENCIAS

- ALVARADO, M. y DE BENITO, J. (1975): Consideraciones sobre el momento de lucha contra el Repilo del olivo (*Cycloconium oleaginum* Cast.) en la provincia de Sevilla. II Seminario Oleícola Internacional. *Servicio de Publicaciones Agrarias (INIA)*, 12 pp.
- ANTÓN, F. (1988): Respuestas del repilo del olivo (*Cycloconium oleaginum*, Cast. = *Spilocaea oleaginae*, Hugh.) a diferentes prácticas agrícolas en la provincia de Toledo. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. (Director: E. Laborda).
- CORLETT, M. y ROSS, R. G. (1979): Morphology of *Spilocaea pomi* on untreated and Benomyl treated McIntosh apple leaves. *Can. J. Plant. Pathology*, **1**: 79-84.
- DE BENITO, J. (1984): Precisiones para un mejor conocimiento de algunas enfermedades del olivo. I Simposium Nacional de Agroquímicos. Sevilla, Enero. 13 pp.
- EVELING, D. W. y CALL, R. D. M. (1983): An evaluation of methods for preparing easily damaged cuticular surface of plants for S.E.M. *J. Mycology*, **129** (2): 113-122.
- GAMBOGI, P. (1958): Qualche notizia sull'occhio di pavone o cicloconio (nota descriptiva). *L'Agric. Italiana*, **53** (13, n.s.): 18-40.
- GRANITI, A. (1962): Osservazione su *Spilocaea oleaginae* Cast., Hugh. I. Sulla localizzazione nelle foglie di olivo. *Phyt. Medit.*, **4** (1): 157-165.
- GRANITI, A. y LAVIOLA, C. (1981): Sguardo generale alla malattie parassitarie dell'olivo. *Informatore Fitopatologico*, **31**: 77-92.
- GRANITI, A., DE LEO, P. y BAGORDO, F. (1962): Osservazione su *Spilocaea oleaginae* (Cast.) Hugh. II Attività enzimatiche del fungo in relazione al suo insediamento nelle foglie di olivo. *Phyt. Medit.*, **1**: 20-36.
- GREENHALGH, G. N. y EVANS, L. E. (1974): Scanning Electron Microscopy. Cap. XX, en: «Methods in Microbiology», **4**: 559-561. BOOTH, C. (Ed.). Academic Press. London and New York. 795 pp.
- HOLLOWAY, P. J. y BAKER, E. A. (1974): The aerial surfaces of higher plants, en «Principles and Techniques of S.E.M.: Biological Applications» HAYAT, M. E. (Ed.), vol. 1.: 181. Van Nostrand Reinhold. New York.
- HONEGGER, R. (1985): Scanning electron microscopy of fungus-plant cell interface: a simple preparative technique. *Trans. Br. Nycol. Soc.*, **84** (3): 530-533.
- LABORDA, E. (1964): Puesta a punto del método de diagnóstico precoz del Repilo del olivo. *An. Edafol. Agrobiol.*, **23**: 215-224.
- LOPRIENO, N. y TENERINI, I. (1959): Metodo per la diagnosi precoce dell'occhio di pavone dell'olivo (*Cycloconium oleaginum*, Cast.) *Sund. Phyt. Zeits.*, **34** (4): 385-392.
- MARTÍNEZ, A. T. y RAMÍREZ, C. (1981): Contribution to the preparation techniques of conidia for Scanning Electron Microscopy. Abstract of IV International Conference on Culture Collections. Brno (Jugoslavia), 66.
- MARTÍNEZ, A. T. y CALVO, M. A. y RAMÍREZ, C. (1982): Scanning Electron Microscopy of Penicillium conidia. *Antoine Van Leeuwenhoek*, **48**: 245-255.
- MILLER, H. N. (1949): Development of lead spot in the olive leaf. *Phytopathology*, **39**: 403-410.
- MORRIS, G. J.; SMITH, D. y COULSON, G. E. (1988): A comparative study of the changes in the morphology of hyphae during freezing and viability upon thawing for twenty species of fungi. *J. Gen. Microbiol.*, **134** (11): 2.897.
- PARSONS, E.; BOLE, B.; HALL, D. J. y THOMAS, W. D. W. (1974): A comparative survey of techniques for preparing plant surfaces for the S.E.M. *J. Mycology*, **101**: 59.
- PAUL, V. H. y BRANDES, W. (1983): Scanning Electron microscopic studies on pathogenesis of apple scab and control with Baycor. *Pflanz. Nach. Bayer*, **6** (1): 21-37.
- PETRI, L. (1913): Studi sulle malattie dell'olivo. III. Alcune ricerche sulla biologia dei *Cycloconium oleaginum*, Cast. *Mem. R. Staz. Patol. Veg. Roma.*, 136 pp.
- PREECE, T. F. (1962): Removal of the apple leaf cuticle by pectinase to reveal the mycelium of *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint. *Nature*, **193**: 902-903.
- SAAD, A. T. y MASRI, S. (1978): Epidemiological studies on olive leaf spot incited by *Spilocaea oleaginae* (Cast.) Hugh. *Phyt. Medit.*, **17** (3): 170-173.
- SALERNO, M. (1958): Osservazioni sull'agente dell'occhio di pavone dell'olivo (*Cycloconium oleaginum*, Cast.) *Ann. Sper. Agrar.*, **12** (3): 925-943.
- SAMSON, R. A. y STALPERS, J. A. (1978): Preparation techniques of fungal specimens for scanning electron microscopy. *Ultramicroscopy*, **3**: 140.
- SPARAPANO, L. Y GRANITI, A. (1978): Cutin degradation by two scab fungi: *Spilocaea oleaginae*, Hugh. and *Venturia inaequalis*, (Cke) Wint., en: «Current Topics in Plant Pathology» (Proceedings of a symposium), KIRALY, Z. (ed.): 117-131. Akademia Kiado, 443 p.
- TENERINI, I. y LOPRIENO, N. (1960): Ricerche istologiche sulle zone di insediamento dei *Cycloconium oleaginum* Cast., agente dell'occhio di pavone dell'olivo. *Sund. Phyt. Zeits.*, **39** (2): 101-119.