

## Respuesta del olivo a la inoculación con *Spilocaea oleagina*, agente del repilo

L. M. LÓPEZ DONCEL, J. R. VIRUEGA PUENTE y A. TRAPERO CASAS

Se ha puesto a punto un método de inoculación de olivo con *Spilocaea oleagina* utilizando hojas separadas, estaquillas con 5-6 pares de hojas y plantones de 6-9 meses. Las hojas fueron inoculadas mediante pulverización o por deposición de gotas de una suspensión de conidias ( $10^5$  conidias/ml), obtenida por agitación en ultrasonidos de hojas naturalmente infectadas que presentaban lesiones con abundante esporulación. Las hojas separadas fueron colocadas en cámaras húmedas entre dos papeles de filtro continuamente saturados de agua. Durante el período de infección (48 h), las cámaras húmedas con las hojas, así como las estaquillas y los plantones inoculados se mantuvieron en oscuridad en una cámara climática a 12-20°C y 100% RH. Después de las 48 h, todas las hojas y plantas inoculadas se incubaron en la misma cámara climática con 14 h de fotoperíodo y HR > 80%. Los plantones se incubaron, además, en invernadero a 10-30°C y baja HR. Los síntomas desarrollados en las hojas inoculadas fueron similares a los descritos para el Repilo en campo. La duración del período de incubación o latencia y el desarrollo de los síntomas dependieron de las condiciones de incubación, de la edad de las hojas y de la susceptibilidad de los cultivares. El período de incubación varió entre 1 y 6 meses. Las hojas jóvenes, o menos cutinizadas, fueron más susceptibles que las adultas. Los cultivares seleccionados difirieron en la incidencia de infecciones, así como en la producción de esporas en las lesiones. La sencillez del método de inoculación, especialmente el ensayo de hojas separadas, permite su utilización para evaluar un gran número de cultivares, así como para estudios básicos y aplicados sobre patogénesis, epidemiología y control.

L. M. LÓPEZ DONCEL, J. R. VIRUEGA PUENTE y A. TRAPERO CASAS. Depto. de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba.

**Palabras clave:** *Olea europaea*, *Cycloconium oleaginum*, resistencia varietal, 'Picual', 'Lechín de Sevilla'.

### INTRODUCCIÓN

El Repilo del olivo, causado por el hongo *Spilocaea oleagina* (Cast.) Hughes (= *Cycloconium oleaginum* Castagne), es la enfermedad más común del olivar en España, ocasionando graves defoliaciones que debilitan progresivamente al árbol y originan unas pérdidas de cosecha estimadas en más del 6%, aunque en determinados años y lugares pueden resultar catastróficas (Andrés,

1991). A estas pérdidas hay que añadir el coste económico de los tratamientos rutinarios utilizados para su control, que sólo en gasto de fungicidas supone alrededor de 2000 millones de pesetas anuales (Campillo, 1998), además de los problemas de residuos y contaminación ambiental.

Los síntomas del Repilo pueden desarrollarse en todas las partes verdes del árbol originando, además de las típicas manchas circulares del haz foliar, lesiones en el peciolo



Fig. 1. Síntomas de Repilo en campo: a) manchas de primavera con el halo amarillo y escasa esporulación.



Fig. 1. Síntomas de Repilo en campo: b) manchas de otoño-invierno sin halo amarillo y abundante esporulación.

y en el nervio central del envés de las hojas, así como lesiones en pedúnculo, en fruto y en ramos jóvenes (Andrés, 1991; Graniti, 1993; Modugno, 1959; Trapero y Blanco, 1999; Urquijo *et al.*, 1971). Aunque los síntomas pueden variar en función de la variedad de olivo, edad de la lesión y condiciones ambientales en las que se desarrollan, generalmente resultan de fácil identificación (Trapero y Blanco, 1999).

*S. oleagina* es un patógeno específico del olivo (*Olea europaea* L.), cuyo desarrollo queda restringido a la cutícula de los tejidos

afectados (Graniti, 1962; Tenerini y Loprieno, 1960), como ocurre con los hongos causantes de las roñas de los frutales (Wheler, 1969). El nombre del patógeno hace referencia exclusivamente al estado asexual del hongo. El estado sexual, aunque ha sido objeto de algunas investigaciones (Graniti y Laviola, 1968; Laviola, 1966; 1968; Miller, 1949; Viruega *et al.*, 1998), no se conoce, pero podría corresponderse con *Venturia* por analogía con otras especies de *Spilocaea*, como ocurre con *S. pomi*, anamorfio de *Venturia inaequalis*, causante de la 'roña' o 'moteado' del manzano (MacHardy, 1996). Por ello, los únicos propágulos del patógeno para la dispersión e infección son las esporas asexuales o conidias.

Aunque el Repilo es bien conocido desde su descripción en 1845 y la bibliografía al respecto es abundante (Andrés, 1991; Graniti, 1993; Graniti y Laviola, 1981; Wilson y Ogawa, 1979), la falta de un método de inoculación de olivo con *S. oleagina* ha impedido estudiar la influencia de factores ambientales sobre las distintas fases del ciclo de la enfermedad, así como la resistencia varietal, la variabilidad patogénica y la eficacia de medidas de control. Esto ha dado lugar a que la mayoría de los trabajos realizados sobre el Repilo sean estudios en condiciones de campo, con las limitaciones que ello supone. En otros patosistemas similares, como ocurre con la roña del manzano causada por *V. inaequalis*, las investigaciones en condiciones controladas son habituales para los estudios sobre patogenicidad, resistencia varietal, control químico o resistencia a fungicidas (MacHardy, 1996).

En el año 1994, se inició en el Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba un programa de investigaciones dirigido a profundizar en el conocimiento sobre el Repilo. Para la consecución de algunos de los objetivos planteados en dicho programa se desarrolló y puso a punto un método de inoculación de olivo con *S. oleagina* que permitió reproducir la enfermedad en condiciones controladas tanto en plantones

como en hojas separadas de la planta. Este método se ha utilizado desde entonces en nuestro laboratorio para evaluar la resistencia de cultivares de olivo al Repilo (López-Doncel *et al.*, 1994, 1998, 1999), así como para determinar la influencia de factores ambientales y del huésped en la infección y desarrollo del Repilo (Viruega y Trapero, 1998) y para evaluar la eficacia de fungicidas contra la enfermedad (Viruega *et al.*,

1999). En este artículo se exponen detalladamente el método de inoculación y la respuesta del olivo inoculado con *S. oleagina*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología general seguida en la inoculación del olivo con *S. oleagina* se recoge esquemáticamente en la Figura 2.

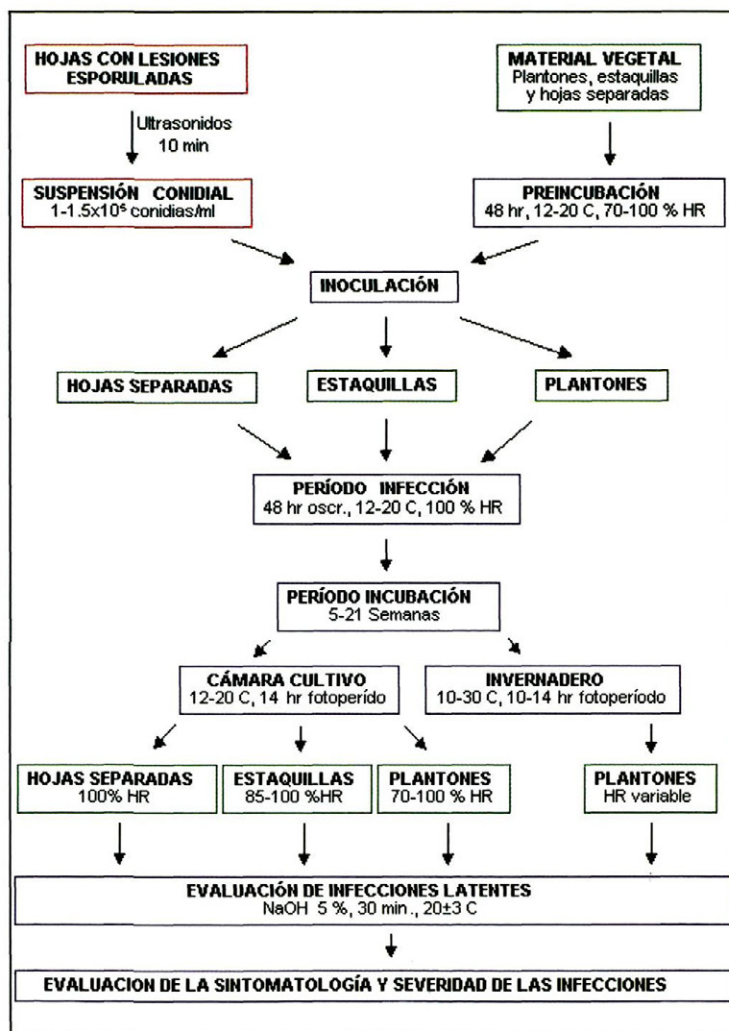


Fig. 2. Esquema del método de inoculación del olivo con *Spilocaea oleagina*.

## Inóculo

El inóculo utilizado se obtuvo de hojas infectadas naturalmente en campo, debido a la imposibilidad de obtenerlo a partir del cultivo *in vitro* de *S. oleagina* (Gutiérrez, 1998). En las épocas favorables para la enfermedad, generalmente entre los meses de noviembre y marzo, las hojas se recogieron en el momento de su utilización. Cuando se previó la falta de enfermedad en campo, estas hojas se recolectaron con antelación, cuando las lesiones de Repilo presentaban una esporulación abundante: manchas cubiertas de un polvillo negro que se desprende fácilmente al rasparlas con la uña (Fig. 1b). En este último caso, las hojas se dejaron secar a temperatura ambiente (18-25°C) durante 4-6 días y se conservaron en oscuridad a 5°C dentro de bolsas de plástico selladas herméticamente hasta el momento de su utilización. Se realizaron pruebas de germinación de las conidias, unos días antes a la utilización del inóculo, según el método de Trapero *et al.* (1994). La germinabilidad de las conidias se mantuvo generalmente en unos niveles del 40-80%, que resultaron adecuados para la realización de los experimentos.

A partir de las hojas con lesiones se obtuvo una suspensión conidial cuya concentración se ajustó siempre a unos valores de  $1-1.5 \times 10^5$  conidias/ml. Para ello, las hojas se introdujeron en un matraz de vidrio (Fig. 3a), se cubrieron completamente con agua desionizada y se añadió una gota del producto tensoactivo Tween<sup>®</sup>20 por cada 100 ml de agua. El matraz se introdujo en un baño de ultrasonidos con hielo durante 10 min, con lo que se consiguió desprender la mayoría de las conidias (Fig. 3b y c). Cuando se utilizaron hojas conservadas fue necesario, previamente a la vibración por ultrasonidos, dejar reposar el matraz con las hojas y con el agua durante 2 hr a 5°C para facilitar la separación de las conidias. La suspensión conidial obtenida se separó de las hojas por vertido a través de un filtro de malla metálica.

## Material vegetal

Se utilizaron plántones mantenidos en invernadero para asegurar la protección frente a infecciones naturales de Repilo, consiguiendo así una completa sanidad de los mismos y estando libres de tratamientos fungicidas. Los tres tipos de material utilizado fueron:

a) Plántones de 6-9 meses de edad (Fig. 3d) de los cultivares 'Picual', 'Manzanilla de Sevilla', 'Hojiblanca', 'Arbequina', y 'Lechín de Sevilla', procedentes todos ellos de estaquillas enraizadas bajo nebulización (Caballero y Río, 1999), mantenidos en una mezcla de arena-limo-turba y abonados con una solución nutritiva completa cada 15 días.

b) Estaquillas obtenidas de ramos del cultivar Picual con 8-9 nudos a los que se dejaron 5-6 pares de hojas. Las estaquillas se prepararon mediante la realización de un corte basal, con los ramos sumergidos en agua para evitar la cavitación, defoliando posteriormente los tres nudos inferiores. Finalmente se colocaron en tubos de vidrio con agua desionizada, protegidos de la luz (Rallo y Martín, 1990).



Fig. 3. Método de inoculación: a) obtención del inóculo (conidias) a partir de hojas con lesiones (derecha) y suspensión de conidias obtenida después de la agitación (izquierda).

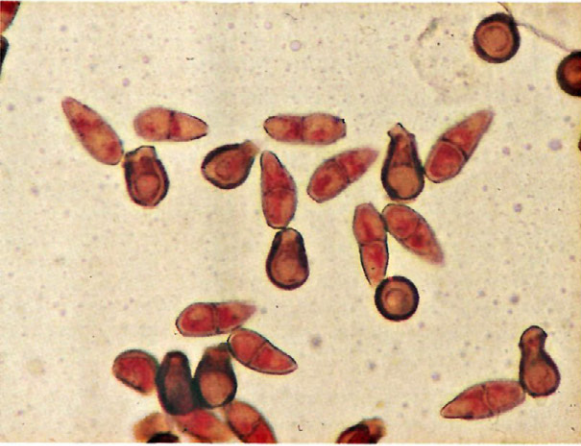


Fig. 3. Método de inoculación: b) inóculo utilizado: conidias y algunas células conidiógenas.



Fig. 3. Método de inoculación: c) detalle de la formación de una conidia en una célula conidiógena (anélida), la cual presenta varios collarettes debidos a la producción sucesiva de conidias.

c) Hojas separadas de plantones de los cultivares descritos en el apartado a) y colocadas en una cámara húmeda para evitar su desecación. Esta cámara consistió en un recipiente de plástico rígido transparente de 22x16 cm de base y 10 cm de profundidad, con una rejilla de plástico colocada en el interior y apoyada sobre cuatro puntos a una altura de 3-5 cm sobre el fondo (Fig. 3e). Sobre esta rejilla se colocó un papel de filtro de modo que comunicaba por los cuatro late-



Fig. 3. Método de inoculación: d) plantón con varios ramos de hojas jóvenes listo para inocular.

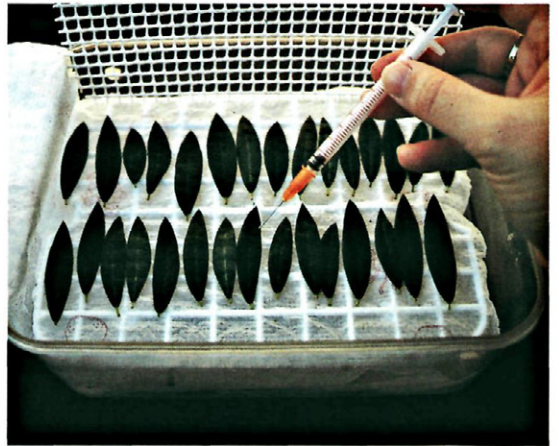


Fig. 3. Método de inoculación: e) hojas separadas colocadas en cámara húmeda para la inoculación mediante gota.

rales con el agua del fondo del recipiente. Sobre el papel de filtro se colocaron las hojas y sobre éstas se colocó otra rejilla de plástico para evitar la adhesión de las hojas a un segundo papel de filtro superior. Este papel superior permanecía en contacto con el agua aunque sólo por un lateral de la rejilla, para facilitar la observación periódica de las hojas. Este sistema permitió mantener las hojas en un ambiente saturado de humedad durante el transcurso de los experimentos.

### Inoculación y condiciones de incubación

La pulverización de la suspensión de conidias sobre el material vegetal se realizó utilizando una pistola eléctrica de aire comprimido (Fig. 3f), que proporcionó un tamaño de gota adecuado para mojar totalmente la superficie foliar sin que se produjesen goteos. La pulverización se realizó de modo homogéneo sobre el material vegetal, procurando que todas las hojas recibiesen la misma cantidad de suspensión. Las hojas separadas de la planta se inocularon, además, por deposición de tres gotas de 5 ml de la suspensión conidial (Fig. 3e). Tras la inoculación, el material vegetal se mantuvo durante 48 horas en oscuridad, con temperatura oscilante 12-20°C y 100%HR. La incubación posterior se realizó en invernadero (10-30°C, <65%HR) para los plántones y en cámara de cultivo (12-20°C, 65-100%HR) para plántones, estaquillas y hojas separadas de la planta.



Fig. 3. Método de inoculación: f) pulverizador de pistola utilizado para la inoculación.

### Evaluación de las infecciones

Desde la aparición de los primeros síntomas visibles, generalmente a partir de la cuarta semana desde la inoculación, y hasta 14 semanas después, se evaluaron semanalmente la incidencia y severidad de las infecciones. Para la evaluación de la severidad se utilizó una escala 0-8 en función del porcentaje de superficie foliar afectada por lesiones de *S. oleagina* (0=0%; 1=<12,5%; 2=12,5-25%; 4=25-50%; 6=50-75%; 8=>75%) (Fig. 4a). A cada unidad experimental se le asignó un valor de severidad medio calculado como  $S = \sum (n_i * s_i) / N$ , siendo  $n_i$  el número de hojas en cada categoría,  $s_i$  el valor de severidad de la categoría y  $N$  el número total de hojas evaluadas. Además, las hojas que se inocularon por deposición de gotas de la suspensión conidial, se evaluaron según una escala 0-3, basada en la intensidad de la esporulación de cada mancha (0=esporulación nula; 3=esporulación intensa). Las unidades experimentales consideradas fueron: plánton (6 repeticiones), estaquilla (6 repeticiones) y 10 hojas separadas (5 repeticiones).

En algunos experimentos se muestrearon hojas asintomáticas a las 4 semanas de la inoculación para la detección de las infecciones latentes mediante el método de la "sosa" ligeramente modificado (Zarco, 1995) (Fig 4b). Para ello, las hojas se sumergieron en una solución de NaOH al 5% durante 20-30 minutos, tras lo cual se evaluaron utilizando la misma escala de severidad indicada para las infecciones visibles.

A los datos de severidad de las infecciones y de duración del período de incubación se les aplicó el análisis de la varianza y los valores medios se compararon mediante el test LSD protegido de Fisher para  $P=0.05$  (Steel y Torrie, 1985). Todas las inoculaciones se repitieron al menos una vez y los resultados expresan los valores medios de los experimentos.



Fig. 4. Evaluación de las infecciones: a) hojas afectadas con diferente severidad. De izquierda a derecha se representan los valores 0, 1, 2, 4, 6 y 8 en la escala 0-8 (0 = 0%, 8 = > 75% superficie foliar afectada).



Fig. 4. Evaluación de las infecciones: b) infecciones latentes que se han manifestado tras la inmersión de las hojas en una solución de hidróxido sódico al 5% («método de la sosa»).

## RESULTADOS

### Sintomatología

En plantones, estaquillas y hojas separadas se reprodujeron fielmente los síntomas de Repilo observados en condiciones de campo (Fig. 1), dando lugar a una variada sintomatología; si bien, ésta no difirió sensiblemente entre los diferentes cultivares estudiados.

En plantones mantenidos en cámara de cultivo, las infecciones se manifestaron inicialmente como manchas circulares con toda la superficie oscura o con el centro verde, asociadas a una abundante esporulación y sin necrosis aparente de los tejidos (Fig. 5a y b). Con el transcurso del tiempo las lesiones del haz foliar presentaron cierta variabilidad (Fig. 5c). Algunas lesiones evolucionaron hacia las manchas típicas de Repilo con zonas concéntricas de distinta coloración y halo amarillento, pudiéndose extender la amarillez a gran parte de la hoja (Fig. 5d). También se produjeron manchas con la zona central necrótica, que alcanzaron el envés de la hoja (Fig. 5e) y lesiones de aspecto blanquecino que se correspondían con levantamientos de la cutícula (Fig. 5c). En invernadero, los plantones presentaron manchas irregulares pequeñas, pardo-verdosas, que destacaron sobre la coloración amarillenta del resto de la hoja (Fig. 5f) y, con menor frecuencia, lesiones circulares con halo amarillento, cuyo centro apareció algunas veces necrosado (Fig. 5g). En los cultivares susceptibles, como 'Picual', las infecciones provocaron intensas defoliaciones al final de los experimentos (Fig. 5h).

Las estaquillas presentaron pequeñas manchas muy esporuladas de color oscuro y centro verde que estuvieron asociadas a una rápida e intensa defoliación (Fig. 6a y 6b).

En las hojas separadas inoculadas mediante la deposición de gotas de la suspensión conidial, los síntomas consistieron en manchas oscuras de distinta intensidad, debidas a la esporulación de *S. oleagina*, que coincidieron con los puntos de inoculación



Fig. 5. Síntomas en plantones: a) plantón severamente afectado mostrando los síntomas más característicos de Repilo.

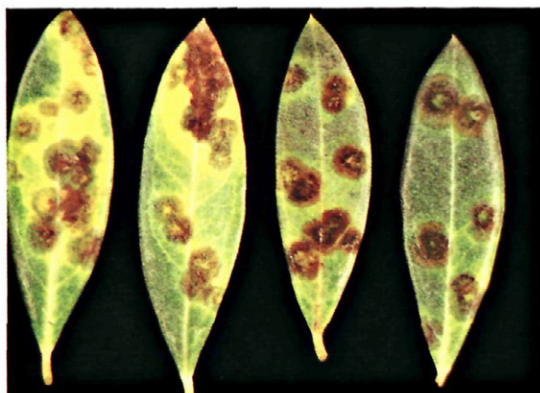


Fig. 5. Síntomas en plantones: d) manchas típicas de Repilo con y sin halo amarillo.



Fig. 5. Síntomas en plantones: b) detalle de la infección en hojas jóvenes que resultaron extremadamente susceptibles.



Fig. 5. Síntomas en plantones: e) lesiones en el haz con zona central necrótica, que se pueden apreciar en el envés.



Fig. 5. Síntomas en plantones: c) variación de los síntomas en plantones inoculados: manchas anulares, manchas circulares, lesiones circulares necróticas y manchas blanquecinas



Fig. 5. Síntomas en plantones: f) síntomas atípicos desarrollados en plantas incubadas en condiciones poco favorables para el Repilo (invernadero): lesiones puntuales, pecas, manchas irregulares y amarillez.



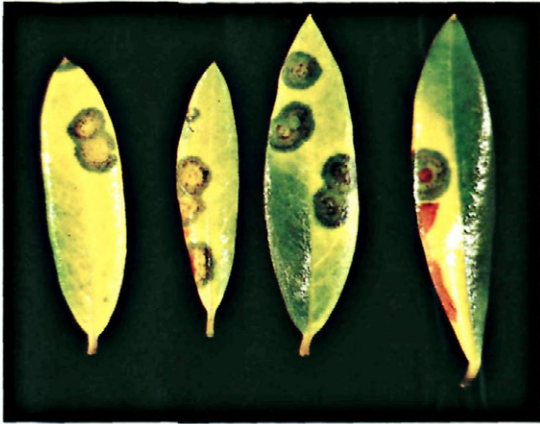


Fig. 5. Síntomas en plantones: g) lesiones verdosas escasamente esporuladas y amarillez intensa desarrolladas en hojas viejas de plantones incubados en invernadero.



Fig. 5. Síntomas en plantones: h) plantón de 'Picual' completamente defoliado por el Repilo (izquierda) y plantón de 'Lechín de Sevilla' (derecha) que resultó resistente en las inoculaciones.

(Fig. 7a). En las hojas inoculadas por pulverización, las lesiones fueron pequeñas manchas circulares oscuras (Fig. 7b).

En las hojas asintomáticas utilizadas para detectar las infecciones latentes mediante el método de la sosa, se presentaron manchas circulares completas o anillos de extensión variable, ambos de color negro, coincidiendo con los puntos de infección (Figura 4b).

En general, hubo una buena correlación entre la severidad de la infección detectada por este método y la correspondiente a las lesiones visibles evaluadas posteriormente para todas las hojas de los diferentes cultivares y edades ensayadas. Las hojas no inoculadas no presentaron ningún síntoma visible y tampoco mostraron ningún tipo de mancha tras la prueba de la sosa.



Fig. 6a. Síntomas en plantones: e) lesiones en el haz con zona central necrótica, que se pueden apreciar en el envés.



Fig. 6b. Síntomas en plantones: g) lesiones verdosas escasamente esporuladas y amarillez intensa desarrolladas en hojas viejas de plantones incubados en invernadero.



Fig. 7a. Síntomas en plantones: f) síntomas atípicos desarrollados en plantas incubadas en condiciones poco favorables para el Repilo (invernadero): lesiones puntuales, pecas, manchas irregulares y amarillez.



Fig. 7b. Síntomas en plantones: h) plantón de 'Picual' completamente defoliado por el Repilo (izquierda) y plantón de 'Lechín de Sevilla' (derecha) que resultó resistente en las inoculaciones.

**Período de incubación o latencia**

El período de tiempo transcurrido desde la infección hasta la aparición de los primeros síntomas (período de incubación), que, para esta enfermedad, coincide con el período desde la infección hasta la formación de las esporas del hongo (período de latencia), mostró diferencias notables tanto en los plantones como en las hojas separadas. La duración de dicho período estuvo influida por las condiciones de incubación posteriores a la inoculación, así como por la edad de la hoja y por el grado de resistencia de los cultivares (Tabla 1). El período de incuba-

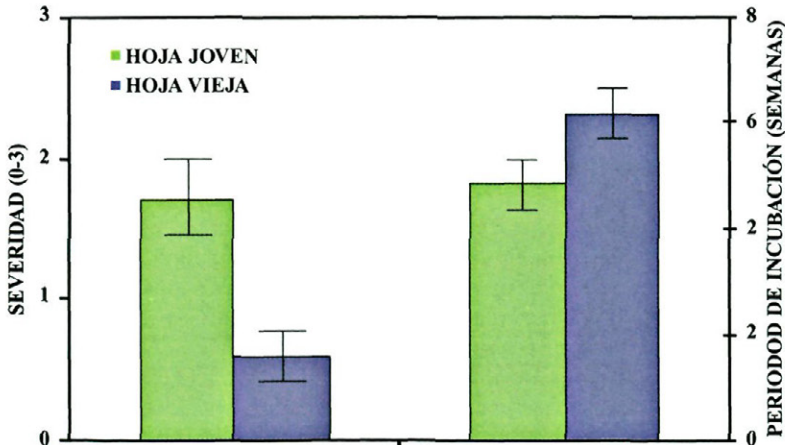
ción mínimo detectado fue de 4 semanas en las hojas más jóvenes de plantones del cultivar Picual incubados en cámara de cultivo con una temperatura 12-20°C y humedad relativa cercana al 100%. En cambio, en los plantones del mismo cultivar incubados en invernadero (10-30°C y HR<65%), los síntomas aparecieron a las 21 semanas. Tanto en los plantones como en hojas separadas, el período de incubación aumentó al incrementarse la resistencia de los cultivares, siendo de 62 y 50 días, respectivamente, en plantones y hojas separadas del cultivar más resistente Lechín de Sevilla en las condiciones más favorables (Tabla 1).

Tabla1. Período de incubación mínimo y severidad de las infecciones en plantones y hojas separadas inoculados artificialmente con *Spilocaea oleagina*<sup>1</sup>

Cultivar	Período de incubación (días)		Severidad (0-8)	
	Plantón	Hoja	Plantón	Hoja
Picual	38 c	28 c	7.5 a	6.3 a
Manzanilla de Sevilla	44 bc	30 c	5.0 b	3.9 b
Hojiblanca	44 bc	30 c	3.1 b	2.5 b
Arbequina	51 b	41 b	1.7 c	0.9 cd
Lechín de Sevilla	62 a	50 a	0.7 d	0.3 d

<sup>1</sup>Para cada columna, medias seguidas de la misma letra no difieren significativamente según el test LSD protegido de Fisher para P=0.05 (Steel y Torrie, 1985).

Fig. 8. Período de incubación y severidad de las infecciones en hojas separadas del cultivar 'Picual' inoculadas con *Spilocaea oleagina*.



### Edad de la hoja

Las hojas más jóvenes, o menos endurecidas, resultaron más susceptibles (Fig. 8). Las lesiones se detectaron antes, el período de incubación fue menor, desarrollaron un mayor número de infecciones y las lesiones presentaron mayor esporulación. En las hojas viejas los síntomas aparecieron más tarde y con menor severidad, e incluso a veces no llegaron a desarrollarse al finalizar los experimentos.

### Susceptibilidad de los cultivares

Para la comparación de los cultivares estudiados sólo se utilizaron dos métodos de inoculación: plantones y hojas separadas. La severidad de las infecciones de *S. oleagina* mostró diferencias significativas entre los cultivares inoculados y entre los dos métodos de inoculación, pero no fue significativa para la interacción entre ambos (Tabla 1). Aunque dicha severidad fue mayor en los plantones que en las hojas separadas, el cultivar Picual resultó ser el más susceptible, encontrándose en el extremo opuesto el cultivar Lechín de Sevilla (Fig. 5h). En los cultivares más resistentes, como 'Lechín de Sevilla', las escasas lesiones que se desarrollaron presentaron menor esporulación que las lesiones de los cultivares susceptibles.

### DISCUSIÓN

En las investigaciones sobre el Repilo existía una casi completa falta de estudios de inoculación en condiciones controladas y los únicos trabajos al respecto no ofrecían suficientes garantías (Loprieno y Tenerini, 1960; Wilson y Miller, 1949; Zayed *et al.*, 1980). Ello ha dado lugar a un conocimiento incompleto y fragmentario de la patogenicidad del hongo, del efecto de diversos factores ambientales y del huésped sobre la infección y el desarrollo de la enfermedad y de la resistencia de cultivares de olivo al Repilo.

El método de inoculación del olivo con *S. oleagina* desarrollado y puesto a punto en nuestro laboratorio ha permitido reproducir fielmente la sintomatología del Repilo. Este método se ha utilizado extensamente tanto en la evaluación de la resistencia del olivo a *S. oleagina*, resultando muy adecuado para establecer diferencias de susceptibilidad entre cultivares (López-Doncel *et al.*, 1998, 1999), así como en el estudio del efecto de factores ambientales y del huésped en la infección y desarrollo del Repilo (Viruega, 1999). Las repercusiones del método de inoculación no son exclusivamente de carácter científico, sino que han trascendido al ámbito industrial debido al interés mostrado por varias empresas agroquímicas y ya está siendo utilizado para evaluar la eficacia de fungicidas contra el Repilo (Campillo, 1998; Jousseau, 1998; Sánchez-Pacheco, 1999; Viruega *et al.*, 1999).

El método original de inoculación descrito en este trabajo ha sufrido diversas modificaciones para adaptarse a los distintos estudios. Así, la suspensión conidial se puede obtener por agitación manual del matraz que contiene las hojas con lesiones sumergidas en agua, no habiéndose detectado grandes diferencias respecto a la suspensión obtenida por vibración en baño de ultrasonidos. Otra modificación importante se refiere a las condiciones ambientales inmediatas a la inoculación. Así, se ha comprobado que el establecimiento de la infección tiene lugar en un rango de temperaturas entre 5 y 25°C, siempre que las hojas permanezcan mojadas al menos durante 18 horas (Viruega y Traperero, 1998). También se ha determinado que la oscuridad continua durante el período de infección no es absolutamente necesaria. Por ello, se han conseguido resultados satisfactorios inoculando plantones de olivo al aire libre, manteniendo las hojas con humectación foliar durante 48 horas gracias a un sistema de microaspersión, o bien cubriendo los plantones con plástico transparente después de la inoculación. Este sistema ha resultado adecuado para evaluar la eficacia

de fungicidas contra el Repilo (Viruega *et al.*, 1999), donde el volumen de trabajo requiere grandes espacios.

Con la inoculación artificial del olivo con *S. oleagina* se ha puesto de manifiesto que la severidad de las infecciones está correlacionada lineal y negativamente con la edad de las hojas, siendo las hojas muy jóvenes extremadamente susceptibles. Estos resultados aclaran definitivamente la controversia existente entre los autores que asignaban una mayor susceptibilidad a las hojas viejas (Andreucci y Bonifacio, 1962; Petri, 1913; Prota, 1958; Wilson y Miller, 1949) y aquellos que opinaban lo contrario (D'Armini y Raggi, 1966; Lavee, 1990; Tenerini, 1964), basados principalmente en observaciones de campo. Los resultados sugieren, además, la necesidad de utilizar hojas jóvenes para facilitar la realización de los experimentos, las cuales son de fácil obtención utilizando plantones recién podados.

El período de incubación se encuentra fuertemente influido por las condiciones ambientales posteriores a la inoculación, pudiendo variar entre 4 y 21 semanas, valores que no discrepan de la mayoría de los obtenidos por otros autores en observaciones de campo (Antón y Laborda, 1991; Graniti, 1993). No obstante, las duraciones mínimas detectadas en este trabajo son muy superiores a los 10 días observados por algunos autores italianos (Modugno, 1957; Salerno, 1960), si bien, éstos utilizaron plantas infectadas naturalmente en campo, desconociendo con certeza el momento en que se produjo la infección. Por ello, y aunque se han observado diferencias significativas en la duración del período de incubación en función de la susceptibilidad de los cultivares, las discrepancias señaladas no pueden ser explicadas exclusivamente en base a dicha susceptibilidad. Por otra parte, los períodos de incubación prolongados podrían ser interpretados como una estrategia de supervivencia de *S. oleagina* en condiciones desfavorables para el desarrollo de la enfermedad.

Cuando el período de incubación es muy prolongado, la evaluación de las infecciones latentes mediante la inmersión de las hojas en una solución de hidróxido sódico resulta un método rápido y adecuado para determinar la severidad de las infecciones sin necesidad de esperar a la aparición de las lesiones visibles. No obstante, el período mínimo para poder realizar este tipo de evaluación se ha estimado en 21 días a partir del momento de la inoculación (Zarco, 1995).

El método de inoculación ha permitido determinar diferencias de susceptibilidad entre cultivares. En general, existió una buena correlación entre los resultados obtenidos en plantones y en hojas separadas; si bien, la severidad de las infecciones fue algo más baja en éstas últimas. Por ello, el método de inoculación descrito en este trabajo se está utilizando de forma rutinaria en nuestro laboratorio para caracterizar la resistencia o susceptibilidad a *S. oleagina* de los principales cultivares de olivo (López Doncel *et al.*, 1998; 1999).

El método de inoculación de olivo con *S. oleagina* descrito en este trabajo constituye, por tanto, una herramienta imprescindible para futuras investigaciones sobre patogénesis, resistencia, epidemiología y control de la enfermedad, como lo confirman los trabajos en este sentido que se han realizado recientemente en nuestro laboratorio (López-Doncel *et al.*, 1998; Sánchez-Pacheco, 1999; Viruega, 1999; Viruega *et al.*, 1999).

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido financiada por los proyectos AGF93-0342 y AGF96-1082 de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología. Queremos expresar nuestro agradecimiento a Francisca Luque Márquez y a Miguel Navas Gutiérrez por la ayuda en la realización de los experimentos.

## ABSTRACT

LÓPEZ DONCEL, L. M.; VIRUEGA, J. R. AND TRAPERO, A., 2000: Respuesta del olivo a la inoculación con *Spilocaea oleagina*, agente del Repilo. *Bol. San. Veg. Plagas*, 26.

An inoculation method of olive leaves with *Spilocaea oleagina* has been developed using detached leaves, shoot cuttings of 5-6 pairs of leaves in test tubes with water, and 6-9 month-old rooted cuttings in soil. Leaves were sprayed or dripped with a conidial suspension ( $1 \times 10^5$  conidia/ml) obtained by sonication of naturally infected leaves showing highly sporulated scab lesions. Detached leaves were placed in plastic trays between two layers of wet filter paper. During the infection period (48h), plastic trays with leaves and cuttings were placed in the dark in a growth chamber at 12-20°C and 100% RH. After 48 h, they were incubated in the same growth chamber with 14 h photoperiod and > 80% RH. Rooted cuttings were also incubated in the greenhouse at 10-30°C and low RH. Disease symptoms in inoculated leaves mimicked the various peacock spot or scab symptoms observed under field conditions. Duration of incubation or latent period and development of symptoms depended on incubation conditions, leaf age, and cultivar susceptibility. Latent period varied from 1 up to 6 months. Younger leaves, or less cutinized leaves, were more susceptible than older ones. Selected olive cultivars showed significant differences in the incidence of infections by *S. oleagina*, and in spore production on the lesions. The simplicity of the inoculation method, particularly the detached leaf assay, makes it useful for selection of resistance in large plant populations, and for basic and applied studies on pathogenesis, epidemiology, and disease control.

**Key words:** *Olea europaea*, *Cycloconium oleaginum*, cultivar resistance, 'Picual', 'Lechin de Sevilla'

## REFERENCIAS

- ANDRÉS, F. DE, 1991: Enfermedades y plagas del olivo. 2ª ed. Riquelme y Vargas Ediciones, Jaén. 646 pp.
- ANDREUCCI, E. Y BONIFACIO, A., 1962: Recherche su *Cycloconium oleaginum* in alcune zone della Toscana Settentrionale. *Phytopathol. Medit.* 1: 141-151.
- ANTÓN, F. A., LABORDA, E., 1991: Estudio del periodo de incubación en campo del «Repilo del olivo» *Cycloconium oleaginum* (Cast.)= *Spilocaea oleagina* (Hug.). In: Estudios de Fitopatología (J. del Moral, ed.). DGIECA-SEF, Badajoz. pp. 235-243.
- CABALLERO, J. M. Y RÍO, C. DEL, 1999: Métodos de multiplicación. In: El cultivo del olivo (D. Barranco, R. Fernández-Escobar y L. Rallo, eds.). Mundi Prensajunta de Andalucía, Madrid. pp. 91-115.
- CAMPILLO, R., 1998: Los productos cúpricos en la olivicultura actual. *Phytoma* 102: 159-167.
- D'ARMINI, M. Y RAGGI, V., 1966: Ulteriori conoscenze sulla biologia dell'occhio di pavone in relazione al primo attacco. *Riv. Patol. Veg. Pavia* 2-3: 185-206.
- GRANTI, A., 1962: Osservazioni su *Spilocaea oleagina* (Cast.) Hugh. I. Sulla localizzazione del micelio nelle foglie di olivo. *Phytopathol. Medit.* 1: 157-165.
- GRANTI, A., 1993: Olive scab: a review. *EPPO Bull.* 23: 377-384.
- GRANTI, A. y LAVIOLA, C., 1968: Epidemiology of *Spilocaea oleagina* on olive in Italy. First International Congress of Plant Pathology (Abstracts Papers), London. pp. 68.
- GRANTI, A. y LAVIOLA, C., 1981: Sguardo generale alle malattie parassitarie dell'olivo. *Infor. Fitopatol.* 31: 77-92.
- GUTIÉRREZ, F., 1998: Crecimiento *in vitro* y variabilidad morfológica de *Spilocaea oleagina*, agente del repilo del olivo. Trabajo Profesional Fin de Carrera, ETSIAM, Univ. de Córdoba. 110 pp.
- JOUSSEAUME, C., 1998: Dithane: fungicida seguro y con futuro para el olivar. *Phytoma* 102: 168-170.
- LAVEE, S., 1990: Aims, methods, and advances in breeding of new olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Acta Hort.* 286: 23-36.
- LAVIOLA, C., 1966: Contribution to the knowledge of the biology of *Spilocaea oleagina* (Cast.) Hugh. in Apulia. Proc. First Congr. Medit. Phytopath. Union, Bari. pp. 327-339.
- LAVIOLA, C., 1968: Aspetti biologici ed epifitologici di *Spilocaea oleagina* (Cast.) Hugh. in Italia. *Ann. Fac. Agraria Univ. Bari* 22: 345-360.
- LÓPEZ-DONCEL, L. M.; GARCÍA-BERENGUER, A. Y TRAPERO, A., 1998: Resistencia del olivo al Repilo causado por *Spilocaea oleagina*. IX Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, Salamanca. pp. 274.
- LÓPEZ-DONCEL, L. M.; GARCÍA-BERENGUER, A. Y TRAPERO, A., 1999: Resistance of olive tree cultivars to leaf spot caused by *Spilocaea oleagina*. *Acta Hort.* 474: 549-553.

- LÓPEZ-DONCEL, L. M.; VIRUEGA, J. R. y TRAPERO, A., 1994: Respuesta del olivo a la inoculación con *Spilocaea oleagina*. VII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, Sitges. pp. 48.
- LOPRIENO, N. y TENERINI, I., 1960: Osservazioni sul ciclo biologico dell'agente patogeno dell'«occhio di pavone» dell'olivo (*Cycloconium oleaginum* Cast.). Soc. Montecatini, Milano. 19 pp.
- MACHARDY, W. E., 1996: Apple scab: biology, epidemiology, and management. APS Press, St. Paul, Minnesota. 545 pp.
- MILLER, H. N., 1949: Development of the leaf spot fungus in the olive leaf. *Phytopathology* 39: 403-410.
- MODUGNO, C., 1957: Primo contributo alle ricerche su *Cycloconium oleaginum* Cast. e sul comportamento del parassita in oliveti del Lazio. *Bol. Staz. Patol. Veg.* 15: 215-239.
- MODUGNO, C., 1959: Secondo contributo alle ricerche su *Cycloconium oleaginum* Cast. e sul comportamento del parassita in oliveti del Lazio. *Bol. Staz. Patol. Veg.* 17: 221-246.
- PETRI, L., 1913: Studi sulle malattie dell'olivo. Mem. R. Staz. Patol. Veg., Roma. 160 pp.
- PROTA, U., 1958: Contributi alla patologia dell'olivo coltivato in Sardegna. *Studi Sarsaresi* 3 (6): 256-288.
- RALLO, L. y MARTIN, G. C., 1990: Determinación de la salida del reposo de yemas de olivo en ramos aislados. Actas de Horticultura, I Congreso Ibérico de Ciencias Hortícolas. Vol III. pp. 247-252.
- SALERNO, M., 1960: Rilievi epidemiologici sull'occhio di pavone dell'olivo (*Cycloconium oleaginum* Cast.) in Sicilia. *Tecn. Agric.* 12: 572-590.
- SÁNCHEZ-PACHECO, N., 1999: Evaluación *in vitro* de fungicidas contra *Spilocaea oleagina*, agente del Repilo del olivo. Trabajo Profesional Fin de Carrera, ETSIAM, Univ. de Córdoba. 151 pp.
- STEEL, R. G. D. y TORRIE, J. H., 1985: Bioestadística: principios y procedimientos. 2ª ed. McGraw-Hill, Bogotá. 622 pp.
- TENERINI, I., 1964: Ricerche sulla biologia ed epidemiologia della *Spilocaea oleaginea* (Cast.) Hugh., agente dell'occhio di pavone dell'olivo. *Phytopathol. Medit.* 3: 63-70.
- TENERINI, I. y LOPRIENO, N. 1960: Ricerche istologiche sulle zone di insediamento del *Cycloconium oleaginum* Cast., agente dell'occhio di pavone dell'olivo. *Phytopathologische Zeitschrift* 39: 101-119.
- TRAPERO, A. y BLANCO, M. A., 1999: Enfermedades. In: El cultivo del olivo (D. Barranco, R. Fernández-Escobar y L. Rallo, eds.). Mundi Prensa-Junta de Andalucía, Madrid. pp. 477-532.
- TRAPERO, A.; LUQUE, F. y SEGURA, R., 1994: Efecto de la temperatura y la humedad sobre la germinación de conidias de *Spilocaea oleagina*, agente del repilo del olivo. VII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, Sitges, Barcelona. pp. 56.
- URQUIJO, P.; SARDIÑA, J. R. y SANTAOLALLA, G., 1971: Patología vegetal agrícola. 2ª ed. Mundi-Prensa, Madrid. 755 pp.
- VIRUEGA, J. R., 1999: Epidemiología del repilo del olivo causado por *Spilocaea oleagina* (Castagne) Hughes. Tesis doctoral, ETSIAM, Univ. de Córdoba. 220 pp.
- VIRUEGA, J. R.; LUQUE, F. y TRAPERO, A., 1998: Importancia de las hojas infectadas caídas al suelo en la biología de *Spilocaea oleagina*, agente del repilo del olivo. IX Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, Salamanca. pp. 175.
- VIRUEGA, J. R. y TRAPERO, A., 1998: Influencia de la temperatura y de la humedad en la infección del olivo por *Spilocaea oleagina*. IX Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, Salamanca. pp. 174.
- VIRUEGA, J. R.; TRAPERO, A. y MORENO, S., 1999: Eficacia del Kresoxim-metil sobre *Spilocaea oleagina*, agente del Repilo del olivo. IX Simposium Científico Técnico Expoliva, Jaén. <http://www.oliva.net>
- WHEELER, B. E. J., 1969: An introduction to plant diseases. John Wiley & Sons, London. 374 pp.
- WILSON, E. E. y OGAWA, J. M., 1949: Olive leaf spot and its control with fungicides. *Hilgardia* 19: 1-24.
- WILSON, E. E. y OGAWA, J. M., 1979: Fungal, bacterial, and certain nonparasitic diseases of fruit and nut crops in California. Division of Agric. Sci., Univ. of California, Berkeley, 190 pp.
- ZARCO, A. 1995: Detección y evaluación de las infecciones latentes de *Spilocaea oleagina* (Castagne) Hughes en hojas de olivo. Trabajo Profesional Fin de Carrera, ETSIAM, Univ. de Córdoba. 196 pp.
- ZAYED, M. A.; EL-SAIED, H. M.; ALI, A. S. y SAIED, K. S., 1980: Reaction of olive to *Cycloconium oleaginum* Cast., and chemical control of olive leaf spot disease in Egypt. *Egypt. J. Phytopathol.* 12: 49-56.

(Recepción: 27 abril 2000)  
(Aceptación: 8 noviembre 2000)