

Detección de las infecciones latentes de *Spilocaea oleagina* en hojas de olivo

A. ZARCO, J. R. VIRUEGA, L. F. ROCA, A. TRAPERO

El Repilo causado por *Spilocaea oleagina* es una enfermedad extendida por toda el área de cultivo del olivo, originando defoliaciones de los árboles afectados que dan lugar a una disminución de la producción. El largo periodo de incubación de la enfermedad hace necesaria la detección precoz de las infecciones, a fin de establecer una eficaz estrategia de control. En el presente trabajo se ha optimizado el denominado método de la sosa para la detección de infecciones latentes, usado en la mayoría de estudios sobre la biología y epidemiología de este patógeno, y se ha comparado su eficacia con otros métodos de detección. Se utilizaron hojas separadas de olivos del cultivar 'Picual' procedentes de campos con alta y baja incidencia de la enfermedad y plantones sanos. La inoculación artificial de hojas y plantones se llevó a cabo mediante deposición de gotas o pulverización con una suspensión conidial del patógeno. Los resultados obtenidos mostraron la concentración del 5% de la solución de hidróxido sódico como la más adecuada para la detección de infecciones latentes. No se observó influencia de la temperatura entre 10 y 30 °C, aunque temperaturas iguales o superiores a 60 °C redujeron significativamente el número de infecciones al disminuir el contraste de las lesiones. El tiempo de inmersión de las hojas para la detección del 95% de las lesiones fue de 20.7 min. El tiempo mínimo para la detección desde que se produce la infección se estableció en 10 días, resultando las hojas jóvenes procedentes de olivos y las procedentes de plantones más susceptibles a la infección en inoculación artificial. Ninguno de los demás métodos evaluados mejoró sensiblemente la detección de infecciones latentes respecto al método del hidróxido sódico.

A. ZARCO, J. R. VIRUEGA, L. F. ROCA, A. TRAPERO. Grupo de Patología Agroforestal, Dpto. de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba. Campus Universitario de Rabanales, Edificio Celestino Mutis, 14071 Córdoba. Correo electrónico: trapero@uco.es

Palabras clave: *Cycloconium oleaginum*, *Olea europaea*, hidróxido sódico.

INTRODUCCIÓN

El Repilo o caída de las hojas de olivo, causado por el hongo Hifomiceto *Spilocaea oleagina*, es una de las enfermedades más importantes del olivar español, siendo bien conocida por los olivicultores. La principal consecuencia de la enfermedad es la caída anticipada de las hojas infectadas, quedando en ocasiones las ramas totalmente defoliadas, lo que hace referencia al nombre de

Repilo (ANDRÉS, 1991; TRAPERO y BLANCO, 2004). Esta defoliación origina una escasa floración y fructificación. El síntoma más característico de la enfermedad se presenta en el haz de las hojas, donde se aprecian manchas, frecuentemente circulares, de tamaño variable y de coloración desde marrón oscuro a negro, a veces con un halo amarillo característico, aunque también pueden aparecer lesiones en el peciolo y en el nervio central del envés de las hojas, en el



Figura 1. Manchas foliares típicas causadas por *Spilocaea oleagina* en hojas de olivo.

pedúnculo, en el fruto y en ramos jóvenes (Figura 1) (ANDRÉS, 1991; GRANITI, 1993; MODUGNO, 1957; TRAPERO y BLANCO, 2004). *Spilocaea oleagina* es un patógeno específico del olivo y su nombre hace referencia exclusivamente al estado asexual del hongo. Los únicos propágulos del patógeno para la dispersión e infección son las esporas asexuales o conidios. Éstos se dispersan casi exclusivamente por la lluvia, aunque también se ha determinado su dispersión por viento e insectos (TJAMOS *et al.*, 1993). El establecimiento de la infección se produce entre 8 y 24 °C, con el óptimo en torno a 15 °C, y requiere agua libre o alta humedad durante al menos 12 horas (VIRUEGA y TRAPERO, 2002). El periodo de incubación o latencia, desde la infección hasta la aparición de síntomas o signos, tiene una gran importancia epidemiológica. Su duración es muy variable, pudiendo oscilar entre 1 y 10 meses, en función de la temperatura, humedad relativa, variedad de olivo, edad de la

hoja, etc. (TRAPERO *et al.*, 2001). La larga duración de este periodo pone de manifiesto la importancia de su detección temprana, que es fundamental para la oportuna aplicación de las intervenciones fitosanitarias contra la enfermedad (LOPRIENO y TENERINI, 1959). Un momento crítico para la infección es la primavera, si se presentan periodos frescos y lluviosos y existe abundancia de inóculo. Las infecciones de hojas jóvenes, que son extremadamente susceptibles, permanecen latentes hasta el otoño-invierno siguiente, constituyendo la principal fuente de inóculo (VIRUEGA y TRAPERO, 1999; TRAPERO y ROCA, 2004). Para la detección de infecciones latentes por hongos causantes de roñas en frutales u otras enfermedades foliares que presentan cierta similitud con el Repilo, hay publicados gran número de métodos (BRUZZESE y HASAN, 1983; CERKAUSKAS y SINCLAIR, 1980; GESSLER y STUMM, 1984; MYERS y FRY, 1978; PREECE, 1959; SAHA *et al.*, 1988; SHIFTON y BROWN, 1962; TUIE,

1969; WHITE y BAKER, 1954). Estos métodos utilizan aclarado y/o tinción integral de las hojas o sustancias que aceleran la senescencia de los tejidos vegetales y la manifestación de síntomas y signos de la infección. Para *S. oleagina* en olivo, el método de detección mayormente utilizado en los estudios sobre la biología y epidemiología del patógeno, fue desarrollado por LOPRIENO y TENERINI (1959) y se basa en la oxidación de los compuestos fenólicos que se acumulan en las zonas afectadas como respuesta al patógeno, al sumergir las hojas en una solución acuosa de hidróxido sódico (NaOH) o hidróxido potásico (KOH) al 5% y 50-60 °C durante 2-3 min. Este método conocido como el "método de la sosa" fue modificado por LABORDA (1964), haciéndolo aplicable a temperatura ambiente. ALVARADO y BENITO (1975) utilizaron una nueva modificación del método, prolongando el tiempo de inmersión hasta 25-35 min, manteniendo la concentración del 5% de NaOH.

Salvo en contadas ocasiones (ANTÓN, 1988; GRANITI, 1962; 1965; MILLER, 1949; SAAD y MASRI, 1978; TENERINI y LOPRIENO, 1960), no se han utilizado métodos alternativos al de la sosa para revelar infecciones latentes de *S. oleagina* en olivo.

Debido a las importantes implicaciones epidemiológicas y al limitado conocimiento existente sobre las infecciones latentes de *S. oleagina* en hojas de olivo, el objetivo del presente trabajo ha sido la optimización del método del hidróxido sódico y la evaluación de la eficacia de otros métodos en la detección de las infecciones de *S. oleagina*.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Material vegetal

Se utilizaron hojas de olivo del cultivar 'Picual' recogidas en la finca "Alameda del Obispo" del C.I.F.A. de Córdoba; las hojas procedían de parcelas con un ataque severo de Repilo (incidencia de hojas con lesiones visibles del 25-45%) y de parcelas con bajo ataque (incidencia de lesiones latentes o visibles <0,5%). También se utilizaron

plantones del mismo cultivar, de 4-6 meses de edad, cultivados en invernadero y libres de Repilo, así como hojas separadas de éstos.

2.- Inoculación

La inoculación de las hojas o plantones con *S. oleagina* se llevó a cabo siguiendo el método desarrollado por LÓPEZ DONCEL *et al.* (2000). Dos formas de inoculación fueron utilizadas, en la primera se colocaron en el haz foliar, tres gotas de una suspensión conidial obtenida sumergiendo en agua hojas intensamente esporuladas, ajustándose la suspensión a $1-1,5 \times 10^5$ conidios /ml. En el segundo caso se pulverizaron las hojas o los plantones con dicha suspensión conidial. Tras la inoculación se incubaron las hojas o los plantones durante 48 horas en oscuridad a 12-20 °C y 100% HR. Las hojas separadas se mantuvieron en cámaras húmedas para evitar la desecación durante el transcurso del ensayo.

3.- Optimización del método de detección del hidróxido sódico

Para optimizar el método de detección de las infecciones latentes con hidróxido sódico se evaluaron los siguientes factores: concentración de NaOH (10 a 300 g/l), temperatura (10 a 100 °C), tiempo de inmersión (2 a 60 min), edad de la hoja (joven, intermedia, vieja) y procedencia de la hoja (plantón en invernadero, olivo en campo). Debido al gran número de factores, su efecto se determinó en experimentos secuenciales, en los que se evaluaron por separado cada uno de ellos fijando los restantes, a excepción del caso de la temperatura, donde se incluyeron tres tiempos de inmersión (5, 15 y 30 min). Los valores de los factores fijos en cada uno de los experimentos, ordenados cronológicamente, fueron: 20 °C y 30 min de inmersión para estudiar el efecto de la concentración de NaOH; 50 g/l y 5, 15 y 30 min para la temperatura; 50 g/l y 20 ± 2 °C para el tiempo de inmersión y 50 g/l, 20 ± 2 °C y 30 min para la edad y procedencia de las hojas.

4.- Comparación con otros métodos de detección

Utilizando como referencia el método de la sosa, se evaluaron 10 métodos de tinción integral (con o sin clarificado previo de las hojas), tinción con azul algodón en lactofenol (WHITE y BAKER, 1954), DIENER (1955), PREECE (1959), TENERINI y LOPRIENO (1960), SHIPTON y BROWN (1962), Enochs (TUIITE, 1969), MYERS y FRY (1978), BRUZZESE y HASAN (1983), GESSLER y STUMM (1984) y el método de tinción con rosa de bengala (SAHA, 1988); tres métodos basados en la reacción con los grupos fenólicos acumulados en las zonas infectadas (métodos del hidróxido potásico (LOPRIENO y TENERINI, 1959), agua oxigenada y del cloruro férrico) y un último método basado en acelerar la senescencia de las hojas (método del "Parquat") (CERKAUSKAS y SINCLAIR, 1980).

5.- Evaluaciones realizadas y análisis de los datos

Las determinaciones realizadas tras la aplicación de estos métodos para la detección de infecciones latentes de *S. oleagina* fueron: incidencia de hojas con infecciones latentes, número de lesiones latentes por hoja (distinguiendo tres tamaños: pequeñas (<1 mm), medianas (1-3 mm) y grandes (>3 mm) y diámetro medio de las lesiones.

Los datos se analizaron mediante el programa "Statistix" (ANALYTICAL SOFTWARE, 2003). A partir de los datos de incidencia de hojas con síntomas visibles (evaluada en campo) y de hojas con lesiones latentes (evaluada en laboratorio), se determinó la incidencia total según la expresión:

$$\text{Totales} = \text{Visibles} + (100 - \text{Visibles}) \times (\text{Latentes}/100)$$

en la que todos los valores se expresan como porcentaje. Se realizaron análisis de la varianza para el efecto de los factores estudiados. La comparación de medias se hizo según el test DMS (Diferencia Mínima Significativa), protegido de Fisher al nivel de probabilidad del 5% (STEEL y TORRIE, 1985).

Para analizar el efecto del tiempo de inmersión de las hojas en la detección de infecciones latentes, se ajustaron los datos a la distribución de Weibull (WEIBULL, 1951), definida por la ecuación:

$$Y = 1 - e^{-(t-a)/b)^c}$$

en la que Y = proporción acumulada de lesiones detectadas; t= tiempo en minutos; a= parámetro de localización o tiempo de comienzo de la detección (en este caso a = 0); b y c son los parámetros de escala y forma, respectivamente. El ajuste estadístico de los datos se realizó sobre la forma lineariizada de dicha ecuación:

$$\text{Ln} (\text{Ln} (1/(1-y))) = c \text{Ln} t - c \text{Ln} b$$

en la que Ln es el logaritmo natural. Este modelo de regresión fue elegido en base a la significación de los parámetros estimados ($P < 0.05$), coeficiente de correlación (R^2), coeficiente de correlación ajustado por los grados de libertad (R^2_a), estadístico Durbin-Watson de autocorrelación y la distribución de residuos (CAMPBELL y MADDEN, 1990; ANALYTICAL SOFTWARE, 2003). Para el ajuste se utilizaron los valores medios ponderados por la inversa del coeficiente de variación de la proporción de lesiones detectadas sin acumular ($1/CV = \text{media}/\text{desviación estándar}$).

RESULTADOS

1.- Efecto de la concentración de NaOH

La concentración de la solución de hidróxido sódico ejerció una influencia significativa sobre la detección de infecciones latentes de *S. oleagina*, tanto en el número de lesiones aparecidas y el tamaño de éstas, como en la incidencia de hojas con infecciones latentes (Cuadro 1; Figura 2). En las concentraciones superiores a 100 g/l, el contraste entre las lesiones y los tejidos de la hoja se hizo paulatinamente menor. Al aumentar la concentración, la superficie de las manchas tendió a hacerse mayor, disminuyendo sin embargo su color. Así, se encontró que el número de

Cuadro 1. Efecto de la concentración de la solución de hidróxido sódico en la detección de infecciones latentes de *Spilocaea oleagina* en hojas de olivo infectadas en campo^y

FECHA MUESTREO	CONC ^x	INCIDENCIA DE HOJAS INFECTADAS (%)	NÚMERO DE LESIONES LATENTES ^y			
			PEQ.	MED.	GRA.	TOT.
MARZO	12.5	10.4 ^z a	25.7 a	13.0 a	1.8 a	40.5 a
	25	12.3 ab	25.0 a	18.5 a	1.1 a	44.6 a
	50	14.7 c	54.1 b	36.7 b	7.1 b	97.9 b
	100	13.8 bc	34.1 ab	20.9 a	5.4 b	60.4 a
NOVIEMBRE	10	6.8 a	28.1 a	28.5 a	3.2 a	60.8 a
	25	8.9 b	26.0 a	32.5 a	3.2 ab	61.7 a
	50	10.5 bc	30.9 b	21.6 a	3.3 ab	55.8 a
	100	11.7 cd	40.3 bc	39.9 b	6.3 bc	86.5 b
	150	13.1 d	49.3 c	43.8 b	8.8 c	101.9 b
DICIEMBRE	10	12.1 a	88.0 ab	7.8 a	0.9 a	96.7 ab
	25	11.5 a	71.8 a	8.0 a	2.0 a	81.8 a
	50	15.9 b	126.7 cd	11.0 a	2.8 a	140.5 c
	100	16.2 b	136.4 d	10.1 a	2.6 a	149.1 c
	150	17.0 b	97.5 bc	11.1 a	8.0 b	116.6 bc
	200	15.7 b	96.6 abc	12.9 a	10.0 b	119.5 bc
	250	16.2 b	88.8 ab	24.7 b	20.5 c	134.0 c
	300	15.7 b	80.5 ab	32.1 b	23.2 c	144.8 c

v Hojas asintomáticas procedentes de una parcela experimental de la finca "Alameda del Obispo" (CIFA, Córdoba) que presentaba un severo ataque de Repilo.

x Concentración de la solución de hidróxido sódico en g/l.

y Pequeñas (PEQ., < 1mm), Medianas (MED., 1-3mm), Grandes (GRA., > 3mm)], Totales =PEQ+MED+GRA.

z Cada valor es media de 10 repeticiones de 20 hojas. Para cada columna y fecha, valores seguidos de una letra común no difieren significativamente (P=0.05), según el test DMS protegido de Fisher (STEEL y TORRIE, 1985). Para el análisis de la varianza se realizaron las transformaciones Arcoseno $(x/20)^{0.5}$ para la incidencia y $(x+0.5)^{0.5}$ para los conteos de los diferentes tipos de lesiones.

lesiones pequeñas detectadas iba disminuyendo conforme aumentaba la concentración de la solución a partir de los 100 g/l, mientras que aumentó el número de lesiones medianas y grandes, hasta los 300 g/l. En el total de lesiones, ambas tendencias se contrarrestaron, tendiendo su número a permanecer estable a partir de los 50 g/l. La incidencia de hojas con infecciones latentes de Repilo, fue significativamente superior para concentraciones de hidróxido sódico iguales o superiores a 50 g/l, no existiendo en general, diferencias significativas entre estas últimas concentraciones. En las hojas inoculadas, el efecto de la concentración sobre el diámetro de las lesiones no resultó significativo. Para el número de lesiones detectadas sí hubo un

efecto significativo de la concentración, detectándose mayor número de lesiones con concentraciones iguales o superiores a 25 g/l y no existiendo diferencias entre las últimas concentraciones (Cuadro 2).

2.- Efecto de la temperatura

La temperatura, entre 10 y 30 °C, no mostró una influencia significativa sobre la detección de las infecciones latentes de Repilo (Cuadro 3). No obstante, se observó una disminución del contraste de las lesiones al aumentar la temperatura, por lo que el número de lesiones disminuyó al emplear la temperatura de 60 °C. A 100 °C no se detectó ninguna infección. En este experimento se emplearon tres tiempos de inmersión de las



Figura 2. Síntomas latentes en hojas inoculadas sometidas al método de la sosa. A) hojas procedentes de plantones tras 10 minutos de inmersión en solución de NaOH. B) hojas inoculadas mediante gota.

hojas (5, 15 y 30 min), observándose un aumento significativo de la incidencia de hojas infectadas y del número de lesiones latentes, especialmente las lesiones medianas y grandes, al aumentar el tiempo de inmersión (Cuadro 4). Sin embargo, no se observó interacción entre temperatura y tiempo de inmersión.

3.- Efecto del tiempo de inmersión

La evaluación de la detección de infecciones latentes en función del tiempo de inmersión de las hojas se representa en la Figura 3. Como puede apreciarse, la gran mayoría de lesiones latentes de *S. oleagina* se detectaron a los pocos minutos (< 5 min) de la inmersión en hidróxido sódico, pero continuaron apareciendo algunas hasta los 60 min (Figura 3). No obstante, a partir de los 45 minutos, el contraste de las manchas disminuyó marcadamente. El modelo de Weibull presentó un buen ajuste a los datos experimentales. Los dos parámetros fueron significativos ($p=0.05$), los valores de R^2 y R^2_a fueron

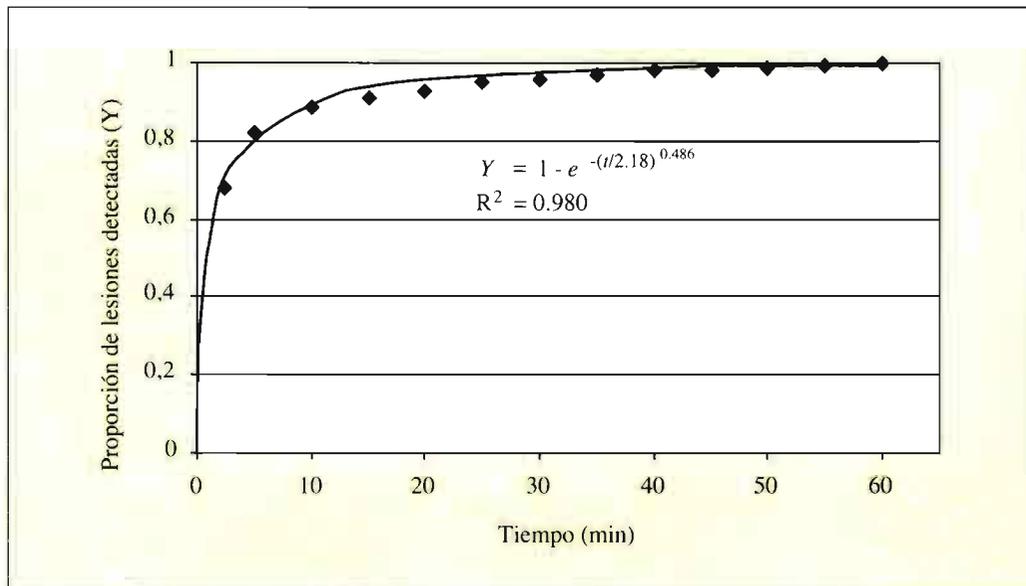


Figura 3. Evolución de la detección de infecciones latentes de *Spillocaea oleagina* en hojas de olivo en función del tiempo de inmersión de las hojas en NaOH. Curva de valores ajustados por el modelo de Weibull frente a los valores observados (rombos).

Cuadro 2. Efecto de la concentración de la solución de hidróxido sódico en la detección de infecciones latentes de *Spilocaea oleagina* en hojas de olivo inoculadas^y

CONCENTRACIÓN (g/l NaOH)	NÚMERO DE LESIONES LATENTES POR HOJA	DIÁMETRO DE LAS LESIONES (mm)
10	0.6 ^z a	0.83
25	1.0 abc	1.20
50	0.7 ab	0.82
100	1.3 abc	1.09
150	1.5 abc	1.14
200	1.9 c	1.86
250	1.9 c	1.53
300	1.6 bc	1.61

y Hojas sanas del cultivar 'Picual' se inocularon mediante deposición de gotas de una suspensión de conidios de *S. oleagina* (3 gotas/hoja).

z Cada valor es media de 10 repeticiones de 1 hoja. Para cada columna, valores seguidos de una letra común, o sin letra, no difieren significativamente, según el test DMS protegido de Fisher (STEEL y TORRIE, 1985). Para el análisis de la varianza se realizó la transformación Arcoseno $(x/3)^{0.5}$ para el número de lesiones.

Cuadro 3. Efecto de la temperatura de la solución de hidróxido sódico en la detección de infecciones latentes de *Spilocaea oleagina* en hojas de olivo infectadas en campo^x

TEMP (°C)	INCIDENCIA DE HOJAS INFECTADAS (%)	NÚMERO DE LESIONES LATENTES ^y			
		PEQ.	MED.	GRA.	TOT.
10	14.6 ^z ab	46.6 b	26.5 ab	3.9 a	77.0 b
20	13.3 a	54.1 b	29.5 ab	4.2 a	87.8 b
30	15.2 b	53.5 b	37.7 b	4.7 a	95.9 b
60	13.6 a	16.4 a	22.7 a	3.5 a	42.6 a

x Hojas asintomáticas procedentes de una parcela experimental de la finca "Alameda del Obispo" (CIFA, Córdoba) que presentaba un severo ataque de Repilo.

y Pequeñas (PEQ., < 1mm), Medianas (MED., 1-3 mm), Grandes (GRA., > 3mm), Totales = PEQ + MED + GRA.

z Cada valor es media de 5 repeticiones de 100 hojas. Para cada columna, valores seguidos de una letra común, no difieren significativamente (P=0.05), según el test DMS protegido de Fisher (STEEL y TORRIE, 1985). Para el análisis de la varianza se realizaron las transformaciones Arcoseno $(X/100)^{0.5}$ para la incidencia y $(X+0.5)^{0.5}$ para los conteos de los diferentes tipos de lesiones.

0.980 y 0.977 respectivamente, no existió autocorrelación y no se observó un patrón claro en la distribución de los residuos estandarizados sobre los valores ajustados ni sobre la variable independiente (Ln t). Las predicciones del modelo para el tiempo necesario para detectar el 50, 95 y 99% de las infecciones latentes fueron 1.1, 20.7 y 49.3 min, respectivamente. El intervalo de confianza y el intervalo de predicción para el tiempo necesario para la detección del 95% de las infecciones latentes fueron 18.5-23.2 y 14.4-29.9 min, respectivamente.

4.- Efecto de la edad y procedencia de la hoja

La edad y el tipo de hoja tuvieron una marcada influencia en la detección de infecciones latentes de *S. oleagina*. En los experimentos con plántones inoculados artificialmente (Experimentos 1 y 2; Figura 4A) las lesiones comenzaron a detectarse a partir de los 10 días de la inoculación. Entre los 10 y 14 días se produjo un aumento drástico en la detección, que continuó hasta estabilizarse en torno al 85%, a partir de la 4ª semana de la inoculación. El valor T_{50} (tiempo en el

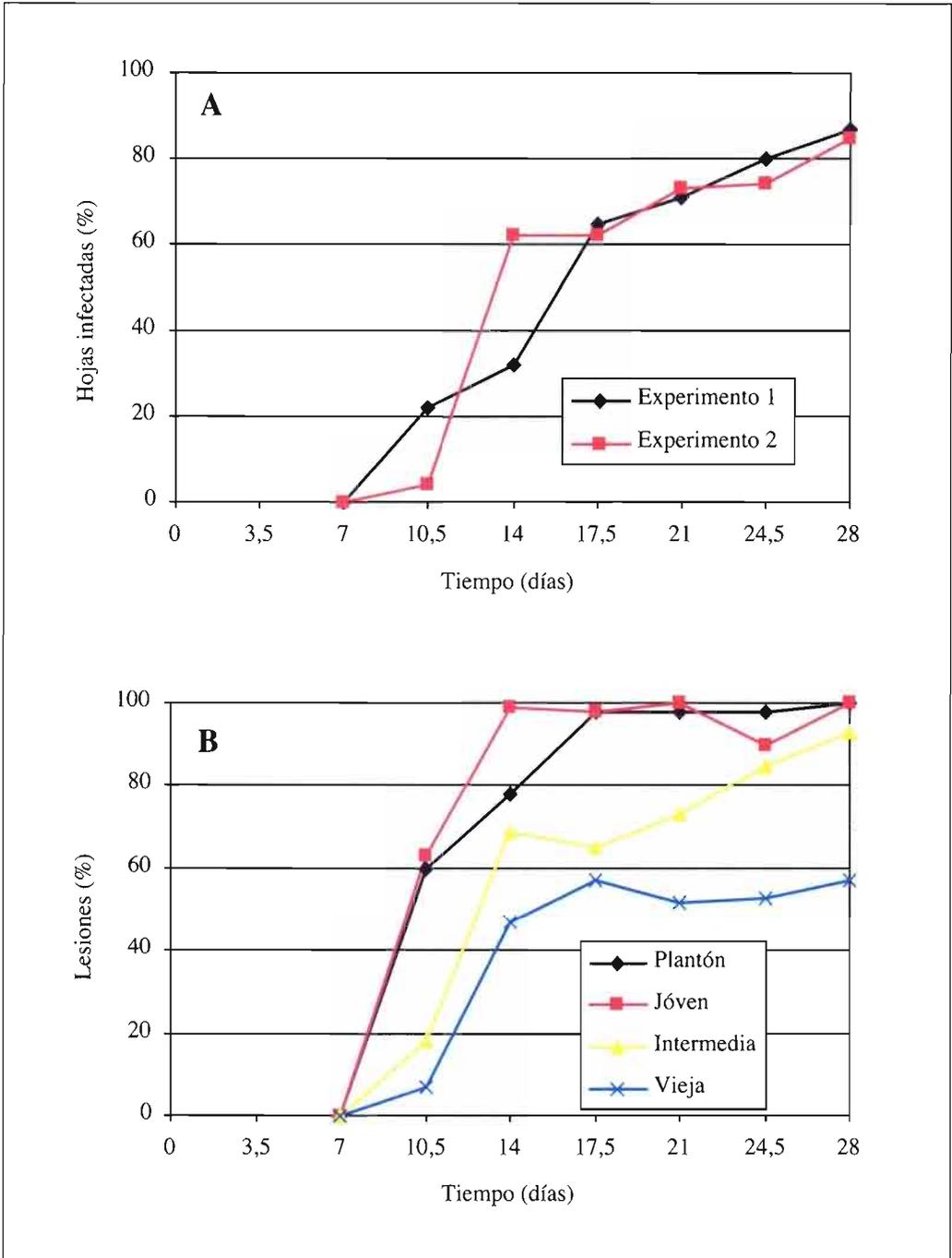


Figura 4. Variación temporal en la detección de infecciones latentes de *Spilocaea oleagina*.

A) plántones de 6 meses inoculados por pulverización.

B) hojas separadas inoculadas mediante gota, obtenidas de plántones en invernadero y de árboles en campo (hoja joven, intermedia y vieja).

Cuadro 4. Efecto de tres tiempos de inmersión en la solución de hidróxido sódico en la detección de infecciones latentes de *Spilocaea oleagina* en hojas de olivo infectadas en campo^x

TIEMPO (min)	INCIDENCIA DE HOJAS INFECTADAS(%)	NÚMERO DE LESIONES LATENTES ^y			
		PEQ.	MED.	GRA.	TOT.
5	12.5 ^z a	43.8 a	22.3 a	2.1 a	68.2 a
15	14.2 b	42.7 a	30.1 b	3.8 a	76.6 a
30	15.8 c	41.3 a	34.8 b	6.2 b	82.3 a

x Hojas asintomáticas procedentes de una parcela experimental de la finca "Alameda del Obispo" (CIFA, Córdoba) que presentaba un severo ataque de Repilo.

y Pequeñas (PEQ., < 1mm), Medianas (MED., 1-3 mm), Grandes (GRA., > 3mm), Totales = PEQ + MED + GRA.

z Cada valor es media de 5 repeticiones de 100 hojas. Para cada columna, valores seguidos de una letra común, no difieren significativamente (P=0.05), según el test DMS protegido de Fisher (STEEL y TORRIE, 1985). Para el análisis de la varianza se realizaron las transformaciones Arcoseno (X/100)^{0.5} para la incidencia y (X+0.5)^{0.5} para los conteos de los diferentes tipos de lesiones.

Cuadro 5. Efecto de la edad y del tipo de hoja en la detección secuencial de infecciones latentes de *Spilocaea oleagina*^t

Material vegetal ^u	T ₅₀ ^v	Incidencia ^x infecciones (%)	Diámetro ^y mancha (mm)
Plantón (Exp. 1)	15.9 ^z	86.0	-
Plantón (Exp. 2)	13.8	84.0	1.1
Hoja (plantón) (Exp. 3)	9.9a	100a	5.4a
Hoja (árbol-A) (Exp.3)	9.7a	100a	4.6a
Hoja (árbol-M) (Exp. 3)	12.8b	93.3b	2.9b
Hoja (árbol-B)	15.6c	66.7c	0.9c

t Plantones completos u hojas separadas de olivo del cultivar 'Picual' se inocularon con una suspensión de conidios de *S. oleagina*, mediante pulverización o gota (3 gotas/hoja), respectivamente. Cada 3.5 días durante 4 semanas, se tomaron muestras de hojas que fueron evaluadas con el método del hidróxido sódico.

u Se utilizaron plantones completos (Exp. 1 y Exp. 2) cultivados en invernadero durante 6 meses, hojas separadas de los plantones y hojas de tres edades (A = jóvenes, zona apical del ramo; M = edad intermedia; B = viejas, zona basal del ramo) procedentes de olivos que no presentaban ataques de Repilo.

v Tiempo en días en que se detectaron el 50% de las infecciones.

x Porcentaje medio de infecciones detectadas a las 4 semanas de la inoculación.

y Diámetro medio de las manchas detectadas a las 4 semanas de la inoculación.

z Para cada columna, los valores de los distintos tipos de hojas seguidos de una letra común no difieren significativamente (P = 0.05), según el test DMS protegido de Fisher (STEEL y TORRIE, 1985).

que se detectaron el 50% de las lesiones) fue de 15.9 días para el primer experimento y 13.8 para el segundo (Cuadro 5). Las infecciones latentes se hicieron visibles, convirtiéndose en lesiones con abundante esporulación, a partir de los 60 días de la inoculación. En el tercer experimento, con hojas separadas procedentes de plantones y olivos, la evolución temporal de la detección de infecciones latentes fue similar a lo indicado anteriormente, aunque más rápida (Figura 4B). Las hojas de plantones y las hojas jóvenes de olivo de campo presentaron un 60-63% de

incidencia a los 10 días, alcanzando el máximo (próximo al 100%) a partir de los 14-17 días; mientras que las hojas viejas del campo mostraron una incidencia del 5,5% a los 10 días, alcanzando el máximo (aproximadamente 70%) a partir de los 28 días de la inoculación. Las hojas de edad intermedia mostraron tiempos de detección intermedios. Las lesiones latentes se hicieron visibles a partir de los 30 días de la inoculación. El diámetro medio de las lesiones también mostró un incremento gradual con el tiempo; si bien, los diámetros de las lesiones de las hojas



Figura 5. Lesiones latentes de *Spilocaea oleagina* en hojas infectadas en campo, tras la aplicación de varios métodos de detección. 1) Método de Enochs (1969), 2) Método de Tenerini y Loprieno (1960), 3) Método de Myers y Fry (1978), 4) Método del cloruro férrico, 5) Método del agua oxigenada, 6) Método del "Paraquat", 7) Método de tinción con rosa de bengala, 8) Método de Preece (1959).

procedentes de plantones o de hojas jóvenes del campo fueron similares y difirieron a su vez de los de las hojas intermedias y viejas procedentes del campo (Cuadro 5).

5.- Comparación entre métodos de detección

En la valoración cualitativa de los métodos de detección de infecciones latentes de *S. oleagina*, la mayoría de los métodos ensayados lograron una buena clarificación de las hojas a excepción de la tinción con azul algodón en lactofenol, la tinción con rosa de bengala, y los métodos del Paraquat, del agua oxigenada y del cloruro férrico. En algunos de los métodos la tinción logró poner de manifiesto claramente las infecciones latentes de *S. oleagina*, (Preece, Enochs, Bruzzese, agua oxigenada) aunque en ciertos casos, también aparecían manchas similares en zonas dañadas mecánicamente o por el propio procedimiento (Preece, cloruro férrico) e incluso en hojas no infectadas (Gessler), o bien el número de lesiones detectadas era inferior al de otros métodos (Shipton y Brown). En otros casos, el contraste entre la zona de infección y el

resto de la hoja no era fácilmente apreciable (tinción con azul algodón, Diener, Tenerini y Loprieno, Myers, y tinción con rosa de bengala). El método del hidróxido potásico mostró resultados similares al del hidróxido sódico. El método del Paraquat originó manchas en las hojas infectadas pero también en las sanas, que derivaban hacia una necrosis de las zonas afectadas.

Ninguno de los métodos evaluados cuantitativamente en hojas de campo resultó superior al del hidróxido sódico en la detección de infecciones latentes (Figura 5). Los más destacados en la detección de la incidencia de hojas infectadas y número de lesiones fueron los métodos del hidróxido sódico, Tenerini y Loprieno, agua oxigenada, Preece, hidróxido potásico y Shipton y Brown, aunque existió solapamiento con otros métodos (Cuadro 6). En las hojas inoculadas sólo se evaluaron los métodos de mejor resultado (hidróxido sódico, Tenerini y Loprieno, agua oxigenada, Preece y Enochs), pero no hubo diferencias significativas ni sobre el número de lesiones detectadas ni sobre el tamaño de éstas (Cuadro 7).

Cuadro 6. Comparación de métodos de detección de infecciones latentes de *Spilocaea oleagina* en hojas infectadas en campo^v

MÉTODO	INC ^y .	NÚMERO DE LESIONES LATENTES ^x			
		PEQ.	MED.	GRA.	TOT.
BRUZESSE & H.	6.4 ^z ab	19.8 a	10.4 bcd	5.4 abc	35.6 ab
CLORURO-FE	7.0 abc	32.0 ab	14.2 cd	8.2 bc	54.4 bcd
TENERINI & L.	9.0 d	59.0 bc	19.0 d	10.4 c	88.4 cde
H ₂ O ₂	7.2 abcd	115.8 c	7.0 abc	4.4 ab	127.2 e
KOH	6.6 abc	94.6 c	5.4 ab	1.8 a	101.8 de
NaOH	7.8 bcd	113.8 c	10.0 bcd	3.0 ab	126.8 e
PREECE	8.4 cd	34.2 ab	13.2 bcd	2.8 ab	50.2 abc
SHIPTON & B.	5.8 a	68.0 bc	16.4 d	2.6 ab	87.0 cde
ENOCHS	5.84 a	40.4 ab	9.2 bcd	2.2 ab	51.8 bcd
WHITE & B.	5.6 a	10.4 a	2.4 a	3.4 ab	16.2 a

^v Hojas asintomáticas procedentes de una parcela experimental de la finca "Alameda del Obispo" (CIDA, Córdoba) que presentaba un severo ataque de Repilo.

^x Pequeñas (PEQ., < 1 mm), Medianas (MED., 1-3 mm), Grandes (GRA., > 3 mm)]. Totales =PEQ+MED+GRA.

^y Incidencia de hojas con infecciones latentes de Repilo (%).

^z Cada valor es media de 5 repeticiones de 20 hojas. Para cada columna, valores seguidos de letra común no difieren significativamente (P=0.05) según el test DMS protegido de Fisher (STEEL y TORRIE, 1985). Para el análisis de la varianza se realizaron las transformaciones Arcoseno (X/20)^{0.5} para la incidencia y (X+0.5)^{0.5} para los conteos de lesiones.

Cuadro 7. Comparación de métodos de detección de infecciones latentes de *Spilocaea oleagina* en hojas de olivo inoculadas^x

DÍAS DESDE INOCULACIÓN	MÉTODO	NÚMERO DE LESIONES/HOJA	DIÁMETRO DE LESIONES (mm)
13	NaOH	0.7 ^y	0.07 ^z
	PREECE	0.4	0.04
	TENERINI & L.	0.7	0.04
34	ENOCHS	2.9	3.66
	NaOH	1.9	2.17
	H ₂ O ₂	2.1	3.21

x Hojas sanas del cultivar 'Picual' se inocularon mediante deposición de gotas de una suspensión de conidios de *S. oleagina* (3 gotas/hoja).

y Cada valor es media de 10 repeticiones de 1 hoja. Para cada columna y cada tiempo, valores seguidos de una letra común, o sin letra, no difieren significativamente, según el test DMS protegido de Fisher (STEEL y TORRIE, 1985). Para el análisis de la varianza se realizó la transformación Arcoseno $(x/3)^{0.5}$ para el número de lesiones.

z Media de la suma de los diámetros de las lesiones de 10 hojas.

DISCUSIÓN

El método del hidróxido sódico (LOPRIENO y TENERINI, 1959) ha sido usado en la mayoría de los estudios sobre biología y epidemiología del Repilo del olivo causado por *S. oleagina* (D'ARMINI y RAGGI, 1966; GRANITI, 1993; LAVIOLA, 1968; RAMOS, 1968; RENAUD, 1968; SAAD y MASRI, 1978; SALERNO, 1960). Debido a su sencillez y facilidad de manejo sigue siendo ampliamente utilizado entre los técnicos de la Protección Vegetal (CIVANTOS y SÁNCHEZ, 1994), investigadores e incluso agricultores. A pesar de la enorme difusión del método, prácticamente no existen estudios sobre aspectos esenciales del mismo, como son la concentración, temperatura y tiempo de inmersión óptimo para la detección de las infecciones latentes de *S. oleagina*, así como la influencia de factores como la edad de la hoja o el estado de desarrollo de la infección sobre la eficacia del método. LOPRIENO y TENERINI (1959) recomendaron usar una solución de NaOH (ó KOH) al 5% y 50-60 °C, manteniendo las hojas sumergidas durante 2-3 min. LABORDA (1964) modificó ligeramente el método, usando una concentración del 4% de NaOH y aplicación a temperatura ambiente. ALVARADO y BENITO (1975) establecieron una correlación entre el tiempo de inmersión de las hojas y el estado de desarrollo de la infección, señalando que si se prolonga dicho

tiempo hasta 25-35 min, se pueden detectar lesiones en las fases iniciales de desarrollo.

Según los resultados del presente estudio, parece que la concentración del 5% es la adecuada ya que concentraciones menores han sido menos eficaces y las superiores no se han mostrado significativamente más eficientes en la detección de hojas infectadas ni en el número de lesiones reveladas. Además, concentraciones mayores disminuyen el contraste de las lesiones sobre los tejidos de la hoja. No se obtuvo variación significativa de la detección en el intervalo de temperatura de 10-30 °C, aunque a 60 °C la detección fue significativamente peor. Este resultado concuerda con el uso de la solución a temperatura ambiente propuesto por LABORDA (1964).

Los resultados del seguimiento de la aparición de manchas en las hojas durante 60 min, indican que a los pocos minutos (< 5 min) se detecta la gran mayoría de las infecciones latentes de *S. oleagina*. A partir de 45 min el contraste disminuyó considerablemente. En nuestro trabajo el tiempo estimado por el modelo para detectar el 95% de las lesiones fue de 20.7 min, con un intervalo de predicción de 15-30 min, por lo que se eligió el tiempo de inmersión de 30 min para el resto de evaluaciones. No se ha encontrado relación entre la temperatura de la solución y el tiempo de inmersión de las hojas. Aunque no ha sido objeto de este trabajo estudiar la relación entre la detección y el estado de

desarrollo de las infecciones, nuestros resultados parecen indicar que no existe relación directa entre el estado de desarrollo de las colonias de *S. oleagina* en las hojas y la rapidez de aparición de las manchas correspondientes. La disponibilidad de un método de inoculación (LÓPEZ DONCEL *et al.*, 2000) ha permitido evaluar el tiempo mínimo necesario para la detección de infecciones latentes, estableciéndose en 10 días desde la infección, aunque tanto el momento de aparición como la incidencia de las infecciones y el tamaño de las lesiones dependieron de la edad y tipo de hoja. Las hojas más jóvenes procedentes de olivos, así como las hojas de plantones resultaron más susceptibles.

Son pocos los casos en que se han usado métodos alternativos al de la sosa para la detección de infecciones latentes de Repilo (ANTÓN, 1988; GRANITI, 1962; 1965; TENERINI y LOPRIENO, 1960; MILLER, 1949; SAAD y

MASRI, 1978). En este trabajo se han evaluado varios métodos usados en la detección de infecciones latentes de otras enfermedades. Ninguno de los métodos evaluados ha mejorado sensiblemente los resultados respecto al método del hidróxido sódico. No obstante, algunos de ellos (Preece, Enochs, agua oxigenada) pueden servir para contrastar resultados dudosos obtenidos con dicho método.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a todos los miembros del Grupo de Patología Agroforestal de la Universidad de Córdoba y, en especial, a Paqui Luque por su excelente ayuda técnica. Al Dr. Miguel Pastor Muñoz-Cobo por su inestimable ayuda en los campos experimentales. Este trabajo ha sido financiado con los proyectos de investigación AGF93-0342 y AGL2004-7495.

ABSTRACT

ZARCO A., J. R. VIRUEGA, L. F. ROCA, A. TRAPERO. 2007. Detection of latent infections caused by *Spilocaea oleagina* in olive leaves. *Bol. San. Veg. Plagas*, 33: 235-248.

Olive leaf spot caused by *Spilocaea oleagina* is widespread in olive growing regions around the world, causing premature leaf fall and yield decrease. Early detection of latent infections is necessary to achieve an effective control, because of the long incubation period of the disease. In this research work, the NaOH method for detecting latent infections, used in many studies about the biology and epidemiology of this pathogen, has been optimized and compared with other detection methods. Detached leaves from olive orchards of cultivar 'Picual' showing high and low disease incidence, and healthy potted olive plants of the same cultivar were used. Inoculation of leaves and olive plants was carried out by dripping or spraying them with a conidial suspension of the pathogen. Results showed that 5% NaOH solution was the best concentration to detect latent infections. No influence of the temperature was observed on detection from 10 to 30 °C, although temperatures of 60 °C or above caused a decrease in the number of latent infections due to the lack of contrast of the lesions. Immersion time of the leaves for detecting 95% of the lesions was 20,7 min. The period of time from infection up to detection of 50% latent infections (T_{50}) was 10 days. Maximum values for detection were reached at 28 days. Young leaves were more susceptible and showed a shorter incubation period than older ones. None of the assayed detection methods enhanced the detection of latent infections when compared with the NaOH method.

Key words: *Cycloconium oleaginum*, *Olea europaea*, sodium hydroxide.

REFERENCIAS

- ALVARADO, M., BENITO, J. DE. 1975. Consideraciones sobre el momento de lucha contra el repilo del olivo (*Cycloconium oleaginum* Cast.) en la provincia de Sevilla (España). Comunicación II Seminario Oleícola Internacional, Córdoba. 12 pp.
- ANALYTICAL SOFTWARE. 2003. Statistix 8. User's manual. Analytical software, Tallase, FL. 397 pp.
- ANDRÉS, F. DE. 1991. Enfermedades y plagas del olivo. 2ª ed. Riquelme y Vargas Ediciones, Jaén. 646 pp.

- ANTON, F. A. 1988. Respuestas del "Repilo del olivo" (*Cycloconium oleaginum* Cast. - *Spilocaea oleaginea* Hugh.) a diferentes prácticas agrícolas en la provincia de Toledo. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias, Dpto. de Química Agrícola, Universidad Autónoma de Madrid. 422 pp.
- BRUZZESE, E., HASAN, S. 1983. A whole leaf clearing and staining technique for host specificity studies of rust fungi. *Plant*, **32**: 335-338.
- CAMPBELL, C. L., MADDEN, L. V. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. John Wiley & Sons. New York. 532 pp.
- CERKAUSKAS, R. F., SINCLAIR, J. B. 1980. Use of paracut to aid detection of fungi in soybean tissues. *Phytopathology*, **70**: 1036-1038.
- CIVANTOS, M., SANCHEZ, M. 1994. Nuevos métodos de lucha contra plagas y enfermedades en olivar. Olivicultura, Jornadas Técnicas. La Caixa - Agro Latino, Barcelona. Pp. 69-76.
- D'ARMINI, M., RAGGI, V. 1966. Ulteriori conoscenze sulla biologia dell'occhio di pavone in relazione al primo attacco. *Riv. Patol. Veg. Pavia*, **2-3**: 185-206.
- DIENER, 1955. Host penetration and pathological histology in gray leaf spot of tomato. *Phytopathology*, **45**: 654-658.
- GESSLER, C., STUMM, D. 1984. Infection and stroma formation by *Venturia inaequalis* on apple leaves with different degrees of susceptibility to scab. *Phytopathol. Z.*, **110**: 119-126.
- GRANITI, A. 1962. Osservazioni su *Spilocaea oleagina* (Cast.) Hugh. I. Sulla localizzazione del micelio nelle foglie di Olivo. *Phytopath. Medit.*, **1**: 157-165.
- GRANITI, A. 1965. Osservazioni su *Spilocaea oleagina* (Cast.) Hugh. III. Struttura submicroscopica della parete epidérmica fogliare dell'olivo sana e invasa dal fungo. *Phytopath. Medit.*, **4**: 38-47.
- GRANITI, A. 1993. Olive scab: a review. *EPPO*, **23**: 377-384.
- LABORDA, E. 1964. Puesta a punto del método de diagnóstico precoz del Repilo del olivo. *Ann. Edafol. Agróbiol.*, **23**: 215-224.
- LAVIOLA, C. 1968. Aspetti biologici ed epifitologici di *Spilocaea oleagina* (Cast.) Hugo. in Italia. *Ann. Fac. Agraria Univ. Bari*, **22**: 345-360.
- LÓPEZ DONCEL, L. M., VIRUEGA PUENTE, J. R., TRAPERO CASAS, A. 2000. Respuesta del olivo a la inoculación con *Spilocaea oleagina*, agente del Repilo. *Bol. San. Veg. Plagas*, **26**: 349-363.
- LOPRIENO, N., TENERINI, I. 1959. Metodo para la diagnosi precoce dell'occhio di pavone dell'olivo (*Cycloconium oleagineum* Cast.). *Phytopathol. Z.*, **34**: 385-392.
- MILLER, H. N. 1949. Development of the leaf spot fungus in the olive leaf. *Phytopathology*, **39**: 403-414.
- 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.
- MYERS, D. F., FRY, W. E. 1978. The development of *Gloeocercospora sorghi* in sorghum. *Phytopathology*, **68**: 1147-1155.
- PREECE, T. F. 1959. A staining method for the study of apple scab infections. *Plant. Pathol.*, **8**: 127-129.
- RAMOS, P. 1968. Estudios epidemiológicos sobre *Spilocaea oleagina* (Cast.) Hugh., en la zona de Granada. *Ars. Pharm.*, **9**: 453-460.
- RENAUD, P. 1968. Ecologie de la maladie de l'oleil de paon et resistance varietale dans leurs incidences sur la culture de l'olivier dans le pays. *Al Awamia*, **26**: 55-74.
- SAAD, A. T., MASRI, S. 1978. Epidemiological studies on olive leaf spot incited by *Spilocaea oleagina* (Cast.) Hugh. *Phytopath. Medit.*, **17**: 170-174.
- SAHA, D. C., JACKSON, M. A., JOHNSON-CICALESE, J. M. 1988. A rapid staining method for detection of endophytic fungi in turf and forage grasses. *Phytopathology*, **78**: 237-239.
- SALERNO, M. 1960. Rilievi epidemiologici sull' "occhio di pavone" dell'olivo (*Cycloconium oleaginum* Cast.). *Ann. Sper. Agrar.*, **12**: 925-943.
- SHIPTON, W. A., BROWN, J. F. 1962. A whole leaf clearing and staining technique to demonstrate host-pathogen relationship of wheat stem rust. *Phytopathology*, **52**: 1313.
- STEEL, G. D., TORRIE, J. H. 1985. Bioestadística. Principios y procedimientos. Mc Graw-Hill. Bogotá. 622 pp.
- TENERINI, I., LOPRIENO, N. 1960. Ricerche istologiche sulle zone di insediamento del *Cycloconium oleaginum* Cast., agente dell'occhio di pavone dell'olivo. *Phytopath. Z.*, **39**: 101-119.
- TIAMOS, E. C., GRANITI, A., SMITH, I. M., LAMBERTI, F. 1993. Conference on olive diseases. *EPPO*, **23**: 365-550.
- TRAPERO, A., BLANCO, M. A. 2004. Enfermedades. In: El cultivo del olivo; (D. Barranco, R. Fernández-Escobar y L. Rallo, eds.). Mundi Prensa-Junta de Andalucía. Madrid. pp. 557-614.
- TRAPERO, A., ROCA, L. F. 2004. Bases epidemiológicas para el control integrado de los Repilos del olivo. *Phytoma*, **164**: 130-137.
- TRAPERO, A., VIRUEGA, J. R., LÓPEZ-DONCEL, L. M. 2001. El repilo o caída de las hojas del olivo. *Vida Rural*, **123**: 46-50.
- TUITE, J. 1969. Plant pathological methods. Burgess, Minneapolis, MN. 239 pp.
- VIRUEGA, J. R., TRAPERO, A. 1999. Epidemiology of leaf spot of olive tree caused by *Spilocaea oleagina* in southern Spain. *Acta Hort.*, **474**: 531-534.
- VIRUEGA, J. R., TRAPERO, A. 2002. Efficacy of kresoxim-metil against olive leaf spot caused by *Spilocaea oleagina* in southern Spain. *Acta Hort.*, **586**: 801-804.
- WEIBULL, W. 1951. A statistical distribution of wide applicability. *J. Appl. Mechanics*, **18**: 293-297.
- WHITE, N. H., BAKER, E. P. 1954. Host pathogen relations of powdery mildew of barley. I. Histology of tissue relations. *Phytopathology*, **44**: 657-652.

(Recepción: 5 diciembre 2006)

(Aceptación: 27 diciembre 2007)