

## El Escudete de la aceituna II: Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica del agente causal

N. GONZÁLEZ, A. TRAPERO

Las observaciones morfológicas del hongo causante del Escudete de la aceituna en Andalucía lo identifican con la especie *Camarosporium dalmaticum* descrita en Grecia y que ha sido reclasificada recientemente como *Botryosphaeria dothidea* (anamorfio: *Fusicoccum aesculi*). La caracterización fisiológica del patógeno determinó que se trata de un hongo con un amplio rango de temperaturas de crecimiento y germinación de conidios, con una temperatura óptima elevada (26°C para el crecimiento en medio de cultivo y 30°C para la germinación de conidios), mostrando así una buena adaptación para su desarrollo en la aceituna durante el verano y el principio del otoño. Los requerimientos de humedad son similares a los de la mayoría de los hongos, lo que indica que este patógeno no está adaptado a condiciones excepcionales de baja humedad, sino que obtiene los requerimientos de agua de la propia aceituna en la que se desarrolla. Las inoculaciones artificiales realizadas en aceitunas confirmaron la patogenicidad de *C. dalmaticum* y se obtuvieron resultados positivos incluso sin practicar herida en los frutos. En las aceitunas afectadas se produjo una podredumbre del fruto en lugar de la típica mancha circular, oscura y ligeramente deprimida observada en campo. La variedad 'Manzanilla de Sevilla' resultó más susceptible que 'Hojiblanca' en la inoculación artificial.

N. GONZÁLEZ, A. TRAPERO. Grupo de Patología Agroforestal, Dpto. Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, Edif. Celestino Mutis, 14071-Córdoba, España. Dirección de correo electrónico: trapero@uco.es

**Palabras clave:** *Camarosporium dalmaticum*, *Botryosphaeria dothidea*, temperatura, potencial hídrico, patogenicidad, 'Manzanilla de Sevilla', 'Hojiblanca'.

### INTRODUCCIÓN

El Escudete de la aceituna es una enfermedad ampliamente distribuida en la mayoría de los países donde se cultiva el olivo (*Olea europaea*) y, especialmente, en la Cuenca mediterránea (ANDRÉS, 1991). Las aceitunas presentan manchas más o menos circulares de color marrón, deprimidas en el centro y con el borde ligeramente más elevado y oscuro (NAVARRO, 1923). Esta sintomatología tan característica es la que da nombre a la enfermedad y puede observarse en las aceitunas verdes a lo largo del verano hasta principios de otoño. Durante el otoño e

invierno las aceitunas maduran y su contenido en agua disminuye teniendo entonces lugar el segundo síndrome de la enfermedad, un momificado parecido al producido por *Colletotrichum* spp. (= *Gloeosporium olivarum*) pero de menor gravedad (MATEO-SAGASTA, 1968; ZACHOS y TZAVELLA-KLONARI, 1983).

El patógeno fue descrito por primera vez en 1883 en olivos de la región de Dalmacia (Croacia) por Von Thümen, quien lo nombró como *Phyllosticta dalmatica* Thüm., hongo imperfecto del grupo de los coelomicetos formadores de conidios en picnidios. Desde entonces la confusión sobre su correcta iden-

tificación ha sido la nota dominante, debido a la diversa morfología de los conidios y a la ausencia de reproducción sexual. Ello ha llevado a la inclusión de esta especie en diferentes géneros, como *Phoma*, *Macrophoma* y *Sphaeropsis* (ANDRÉS, 1991). En 1979, ZACHOS y TZAVELLA-KLONARI realizaron un estudio detallado sobre este patógeno que los llevó a reclasificarlo como *Camarosporium dalmaticum* (Thüm.) Zach. et Tzav.-Klon., en base a la coloración y septación de los conidios. Estos autores describieron dos tipos principales de conidios, que se formaban en los mismos o en diferentes picnidios. Los conidios del primer tipo eran fusiformes, hialinos, aseptados o con varias septas, y de dimensiones 20-34 x 6.5-9 µm. Los del segundo tipo, formados en picnidios más pequeños, eran hialinos, amarillentos o marrones, ovoides, elipsoidales, limoniformes, o piriformes, con 0-5 septas transversales y 0-3 septas longitudinales, de dimensiones 10.5-23.5 x 6.5-9.5 µm. Las características peculiares de este segundo tipo de conidios, sobre todo la coloración oscura y la septación, sirvieron para reclasificar este hongo como *C. dalmaticum*, que es el nombre utilizado actualmente para referirse al patógeno causante del escudete de la aceituna (TRAPERO y BLANCO, 2004).

En una revisión reciente del género *Phyllosticta* (AA y VANEV, 2002), la especie descrita originalmente como *P. dalmatica* fue reclasificada como *Fusicoccum dalmaticum* (Thüm.) Vanev. Por ello, PHILLIPS *et al.* (2005) han realizado un estudio taxonómico comparativo, utilizando varios aislados de este patógeno procedentes de Grecia y otras especies del género *Botryosphaeria*, basándose en criterios morfológicos y moleculares. Los análisis filogenéticos, utilizando las secuencias de las regiones ITS y EF1- $\alpha$ , han demostrado que los aislados causantes del Escudete muestran una homología plena de estas regiones con el ascomiceto *Botryosphaeria dothidea* (Moug.:Fr.) Ces. & De Not., cuyo anamorfo es *Fusicoccum aesculi* Corda. Los datos morfológicos se correlacionan bien con *F. aesculi*, aunque los conidios oscuros y septados

observados en los aislados de aceitunas no son habituales para esta especie, lo que no ha sido un impedimento importante para su reclasificación como *F. aesculi*, ya que el oscurecimiento y septación de los conidios con la edad es una característica incluida en las enmiendas recientes del género *Fusicoccum* (CROUS y PALM, 1999; SLIPPERS *et al.*, 2004). Por tanto, PHILLIPS *et al.* (2005) proponen que el hongo causante del Escudete de la aceituna sea designado como *B. dothidea* y su anamorfo como *F. aesculi*.

Los estudios sobre fisiología y patogenicidad de este hongo son todavía más escasos, a pesar de que la enfermedad se desarrolla inicialmente durante el verano, con tiempo muy seco y caluroso, poco favorable para las micosis vegetales. De nuevo hay que destacar los trabajos de ZACHOS y TZAVELLA-KLONARI (1979; 1983), quienes estudiaron el comportamiento *in vitro* de cultivos monoclónicos de los dos tipos de conidios. El crecimiento en el medio patata-dextrosa-agar a diferentes temperaturas fue similar para todos los cultivos, los cuales presentaron una tasa de crecimiento lineal de 5 a 30° C (máximo) y formaron los dos tipos de conidios. El tiempo requerido para la germinación de los conidios a 26° C fue de tres horas para los fusiformes y ocho para los ovoides-piriformes. El crecimiento también se vio afectado por la presión osmótica del medio, creada por adición de glucosa a una solución de Richards (YOSHIDA *et al.*, 2000). Este crecimiento resultó óptimo a 51 bares y satisfactorio entre 10-71 bares, pero no hubo diferencias entre aislados del hongo.

La infección de la aceituna por *C. dalmaticum* se ve favorecida enormemente por la presencia de heridas en los frutos y ha sido correlacionada positivamente con los ataques de la mosca (*Bactrocera oleae*) y con la incidencia de un parásito de ésta (*Prolasiop-tera berlesiana*), el cual se cree que actúa como vector del patógeno (ARAMBOURG, 1986; ANDRÉS, 1991; LA GRECA y VRENNA, 1995). No obstante, con frecuencia se han observado ataques de Escudete en ausencia de heridas o de otro agente parasitario distin-

to de *C. dalmaticum* (MATEO-SAGASTA, 1971). En 1934, GIGANTE llevó a cabo inoculaciones artificiales en aceitunas, peras y manzanas empleando una suspensión de conidios, concluyendo que los resultados eran positivos en todos los casos sólo si se practicaba una pequeña lesión. Ante estos resultados, ZACHOS y TZAVELLA-KLONARI (1983) realizaron inoculaciones en aceitunas y manzanas empleando micelio en lugar de conidios y realizando una pequeña incisión, con resultados positivos en todos los casos. Aunque no se han desarrollado experimentos respecto a la resistencia varietal, son claras las diferencias encontradas por diversos autores (LONGO *et al.*, 2004), resultando más susceptibles las variedades de verdeo que las de aceite.

En España, la enfermedad es conocida desde antiguo, pero ha sido poco estudiada. Fue citada por primera vez por Paúl y Arozarena en Huévar, Sevilla (GONZÁLEZ FRAGOSO, 1914). Poco después GONZÁLEZ FRAGOSO (1914) menciona a *M. dalmatica* como agente del "escudete de la gordal" y lo incluye como un componente más de los cuatro hongos patógenos que los agricultores andaluces confundían bajo la denominación de "repilo". Posteriormente, hay referencias de graves pérdidas en aceituna de verdeo en Sevilla (NAVARRO, 1923; GONZÁLEZ FRAGOSO, 1927; BENLLOCH, 1942). Hasta el trabajo de MATEO-SAGASTA (1968), donde se pone de manifiesto que el patógeno origina también una podredumbre y momificado de la aceituna, parecido al causado por *Gloeosporium olivarum*, pero de menor gravedad. En las últimas décadas no se ha llevado a cabo ningún estudio sobre esta enfermedad en nuestro país (TRAPERO y BLANCO, 2004). Por ello, se planteó este trabajo sobre caracterización del patógeno por su morfología, crecimiento en diferentes medios de cultivo y temperaturas, y patogenicidad en aceitunas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Caracterización morfológica

Las observaciones sobre características morfológicas del patógeno se realizaron

sobre muestras de aceitunas con síntomas de Escudete (Figura 1) procedentes del campo y sobre cultivos puros en el medio Patata-Dextrosa-Agar (PDA). Las muestras de aceitunas, procedentes de las variedades 'Manzanilla de Sevilla', 'Hojiblanca' y 'Tetuda', fueron tomadas periódicamente en dos campos de la Sierra Sur de Sevilla, una zona endémica de mosca que en años anteriores había presentado una elevada incidencia de Escudete. Además, se incluyeron muestras de tres campos de la provincia de Córdoba: dos de la variedad 'Hojiblanca' situados en los términos de Montilla y de Córdoba, y uno de la variedad 'Gordal sevillana' situado en la finca Alameda del Obispo, Córdoba.

Las observaciones sobre cultivos puros se realizaron con 6 aislados monoconídicos obtenidos a partir de siembra de trozos de aceitunas afectadas de Escudete en el medio PDA. Los aislados procedían de las variedades 'Manzanilla de Sevilla' y 'Hojiblanca' de los dos campos de la provincia de Sevilla.

De cada muestra de campo o de cada aislado se observaron los picnidios formados en las aceitunas (Figura 1), o en el medio PDA, y se determinó la morfología y el tamaño de 30 conidios seleccionados. Para cada conidio se indicó además su coloración (hialino u oscuro) y el número de septas. El tamaño de los conidios se determinó midiendo su longitud y anchura a 400 aumentos y se calculó la relación longitud/anchura.

### Efecto de la temperatura sobre el crecimiento micelial

Se seleccionaron 6 aislados monoconídicos del patógeno cultivados en el medio PDA. Utilizando un sacabocados de 5 mm de diámetro se cortaron discos de la zona periférica en crecimiento activo del hongo para realizar la siembra en el medio PDA. Una vez sembradas, las placas se sellaron con parafilm y se metieron en doble bolsa de plástico. A continuación se sometieron a distintas temperaturas, de 5 a 40°C a intervalos de 5°C, en oscuridad. Al cabo de 3 días se midió el diámetro medio de la colonia con el que se obtuvo la tasa de crecimiento diaria

(mm/día). El diseño experimental fue factorial con dos factores (temperatura y aislado) y tres repeticiones (placas) completamente al azar. El experimento completo se repitió tres veces. Con los valores obtenidos se determinó la curva de crecimiento a distintas temperaturas de cada aislado y su temperatura óptima de desarrollo. Para la comparación entre aislados se realizó un análisis de la varianza de la Tasa máxima ajustada y del Área bajo la curva de crecimiento, utilizando

las repeticiones del ensayo como bloques. La comparación de medias se hizo según el test LSD protegido de Fisher ( $P=0.05$ ) (STEEL y TORRIE, 1985).

#### **Efecto de la temperatura sobre la germinación de conidios**

Para la realización de este ensayo se utilizó un cultivo en PDA de una mezcla de 5 aislados monoconídicos. Las conidias se obtuvieron por raspado de la colonia con un asa de

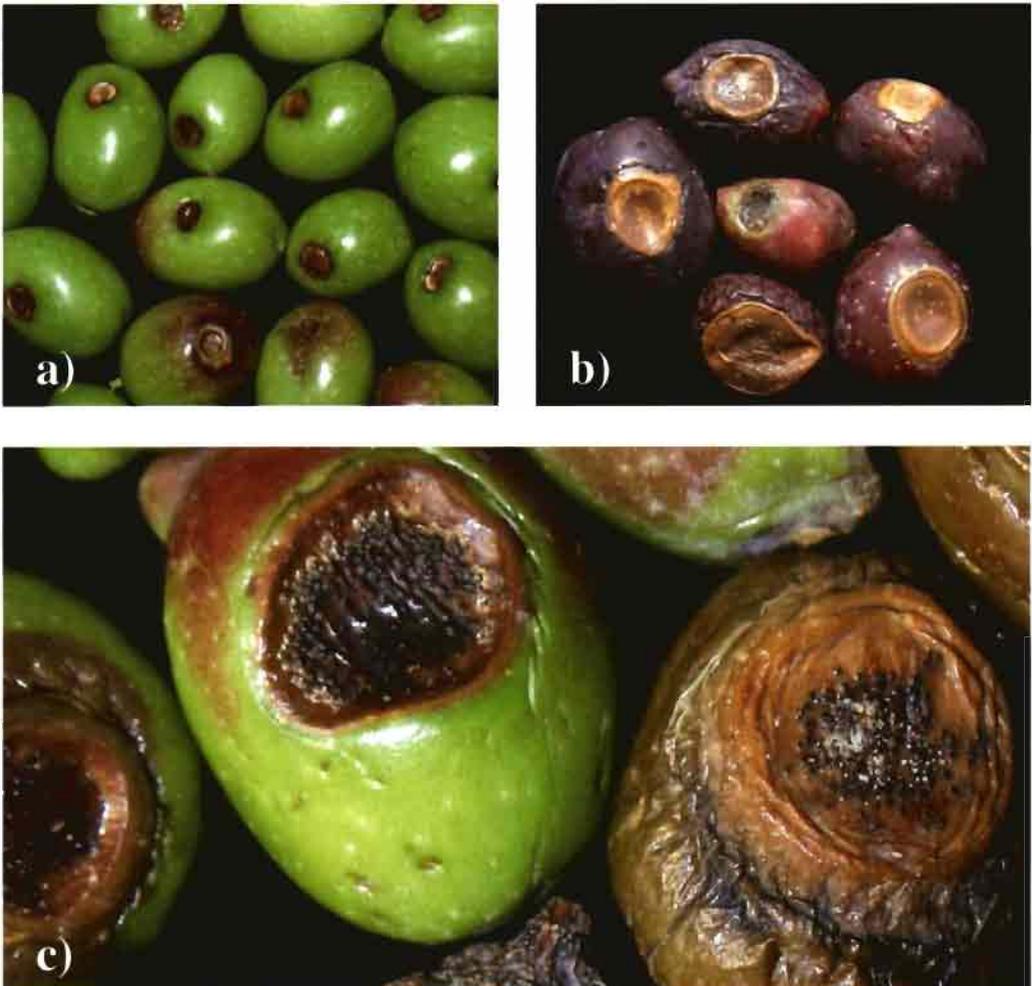


Figura 1. Síntomas de Escudete: a) lesiones en aceitunas verdes, b) lesiones en aceitunas maduras, c) lesión con picnidios característicos del patógeno y el daño de la mosca del olivo.

siembra y agua desionizada y destilada (ADD) estéril. La suspensión conidial se ajustó a  $10^5$  conidios  $\text{ml}^{-1}$ . Se realizaron cámaras húmedas que consistían en placas de Petri con una capa de agar-agua (2%) en la base y otra en la tapa. En el interior de la cámara húmeda se situaron 3 cubreobjetos de vidrio, en el centro de los cuales se depositó una gota de  $10 \mu\text{l}$  de la suspensión de conidios. Las cámaras húmedas se incubaron en oscuridad a 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y  $50^\circ\text{C}$ . Como tiempos de incubación se utilizaron: 6, 12, 24 y 48 h para cada temperatura. Para cada par temperatura-tiempo se preparó una cámara húmeda con tres repeticiones (gotas).

Transcurrido el tiempo de incubación, los cubreobjetos de vidrio se situaron sobre portaobjetos con una gota de fucsina ácida en lactofenol para detener la germinación. El porcentaje de conidios germinados se determinó con el microscopio a 400 aumentos, contabilizando al azar de 100 a 200 conidios entre los tres cubreobjetos de cada combinación de temperatura-tiempo de incubación y sin tener en cuenta la morfología de los conidios. Otro parámetro utilizado para evaluar la germinación fue el tiempo medio de germinación (TMG) durante las 48 h que se calculó como:

$$TMG = \frac{1}{2G_n} \sum_{i=1}^{i=n} [(t_i - t_{i-1}) \times (G_i + G_{i-1})]$$

donde  $t_i$  = Tiempo de evaluación de la germinación de la conidios,  $G_i$  = Germinación (%) a tiempo  $i$ ,  $G_n$  = Germinación a las 48h.

El experimento se repitió tres veces y se determinaron las curvas de regresión que mejor ajustaban los valores del porcentaje de germinación y del TMG en función de la temperatura. Utilizando la ecuación resultante para el porcentaje de germinación, se calculó la temperatura óptima de germinación para la mezcla de aislados.

#### Efecto del potencial hídrico sobre el crecimiento micelial

Se llevó a cabo un ensayo preliminar para fijar un rango de potenciales basado en la

adición de un soluto al medio PDA (HARRIS, 1981) y que éste no tuviera un efecto perjudicial en el crecimiento. Se consideró un único aislado y dos solutos (glicerol y cloruro sódico) bajo condiciones de oscuridad a  $25^\circ\text{C}$ . Se hallaron diferencias en la tasa de crecimiento según el soluto empleado y por ello en los sucesivos ensayos se empleó glicerol por afectar menos al desarrollo del cultivo. En el experimento final se evaluaron 4 aislados monoconídicos y el siguiente rango de potenciales: 0 (testigo), -5, -10, -25, -50, -100, -150, -200, -250, y -300 bares. El experimento se repitió tres veces y se realizó un análisis de regresión lineal de la tasa diaria de crecimiento en función del potencial hídrico.

#### Patogenicidad en aceitunas

Se utilizaron frutos sanos y verdes recolectados en Septiembre de dos variedades de verdeo ('Manzanilla de Sevilla' y 'Hojiblanca') en la parcela "Triángulo" del C.I.F.A. "Alameda del Obispo" de Córdoba. Las aceitunas se lavaron y desinfectaron (15 min bajo chorro de agua corriente, baño de ultrasonidos con Tween-20 durante 4 min, inmersión en una solución al 10% de hipoclorito sódico por 1 min, y aclarado con agua destilada y desionizada estéril), se secaron, y se colocaron en cámaras húmedas para evitar su desecación.

Se utilizaron dos tipos de inóculo: micelio y conidios. En la inoculación con micelio se emplearon discos de 10 mm de diámetro obtenidos de la periferia de la colonia de un cultivo en PDA. Para la inoculación con conidios se obtuvo una suspensión ajustada a  $1.2 \times 10^6$  conidios/ml. La inoculación se realizó depositando un disco de micelio o una gota de  $10 \mu\text{l}$  de la suspensión sobre cada aceituna. En el caso de los testigos el disco eran de Agar-Agua (2 %) y la gota de ADD estéril. La mitad de las aceitunas no sufrió ningún tipo de daño, mientras que en la otra mitad se practicó una herida empleando un alfiler estéril, bien antes de añadir la gota de inóculo o bien sujetando el disco de micelio con el mismo alfiler.

Tras la inoculación las aceitunas se incubaron a 22° C y 12 h de fotoperiodo en cajas de plástico con un ambiente saturado de humedad (LÓPEZ-DONCEL *et al.*, 2000). El diseño experimental fue factorial con tres factores (variedad, inóculo y herida) y tres repeticiones (cajas), con un testigo de cada una de las ocho combinaciones experimentales, repetido también tres veces. La unidad experimental fue la caja con 20 aceitunas. Por tanto, en cada combinación experimental se dispusieron 60 aceitunas.

En la sexta y octava semana después de la inoculación se determinó un índice de enfermedad (IE) para cada unidad experimental según la siguiente expresión:

$$IE(\%) = \frac{\sum_{i=0}^{i=5} n_i * S_i}{5 * 20} * 100 = \sum_{i=0}^{i=5} n_i * S_i$$

donde,  $S_i$  = severidad de la infección, según una escala 0-5 en función de la superficie del fruto afectada (0= no síntomas, 5= >75 % superficie afectada, Figura 2);  $n_i$  = número de frutos afectados de cada valor  $S_i$ .

#### Análisis de los datos

Los datos se analizaron utilizando el programa estadístico "Statistix 8" (ANALYTICAL

SOFTWARE, 2003). Para los datos de factores cualitativos se aplicó el análisis de la varianza y las comparaciones de medias según el test LSD (Mínima Diferencia Significativa) protegido de Fisher ( $P=0.05$ ) (STEEL y TORRIE, 1985).

Para los datos de factores cuantitativos se empleó el análisis de regresión. La elección del modelo de regresión se realizó según los criterios: i) coeficiente de determinación ( $R^2$ ), ii) significación de los coeficientes de las variables independientes y, iii) distribución de los residuos estandarizados (CAMPBELL y MADDEN, 1990).

## RESULTADOS

### Caracterización morfológica

En las muestras de aceitunas los picnidios se desarrollaron en el interior de la lesión de Escudete (Figura 3) y fueron muy variables en tamaño (100-380  $\mu$ m). Los conidios también variaron marcadamente en su morfología, habiéndose observado dos tipos morfológicos principales: alargados (cilíndricos-fusiformes) y redondeados (ovoides-piriformes-claviformes) (Figura 3). Los dos tipos se formaron en distintos picnidios, o bien en



Figura 2. Escala visual de severidad de síntomas (0- 5) en aceitunas afectadas por *Camarosporium dalmaticum*.

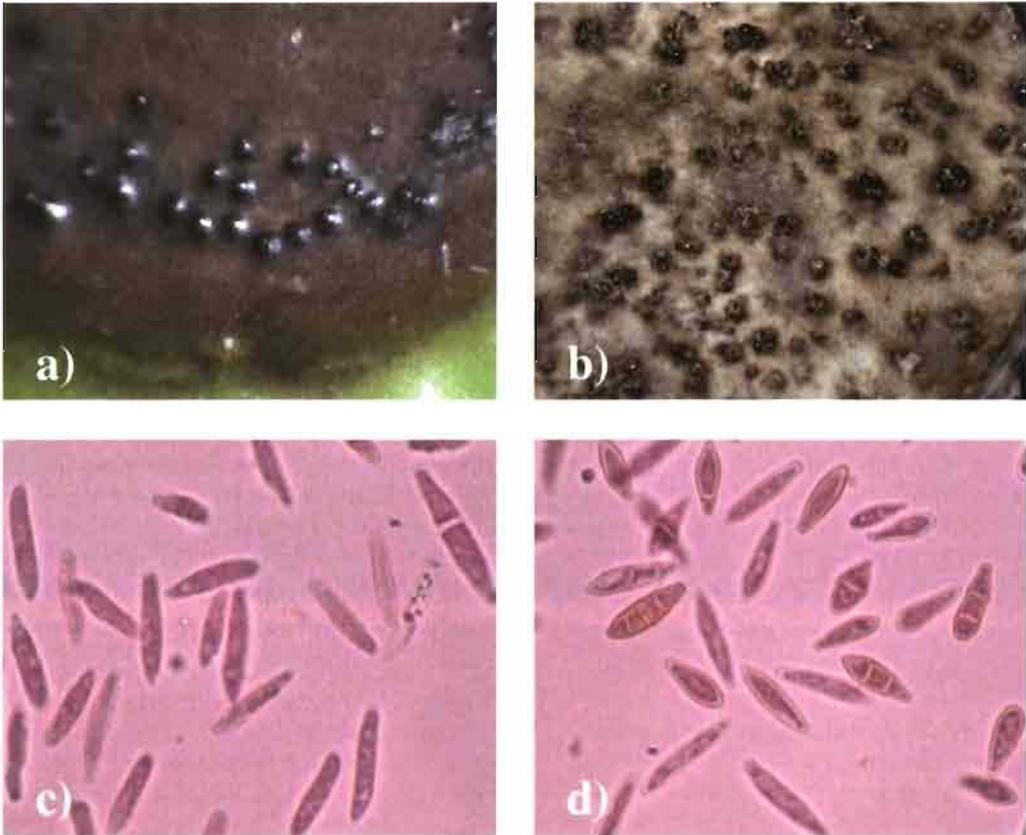


Figura 3. Picnidios y conidios de *C. dalmaticum*: a) picnidios formados en la lesión de Escudete en la aceituna, b) picnidios formados en el medio de cultivo PDA, c) conidios del tipo alargado: fusiformes, hialinos y mayoritariamente aseptados, d) conidios del tipo redondeado: ovoides-piriformes, frecuentemente oscuros y septados (nótese algunos conidios fusiformes, y otros hialinos o aseptados).

el mismo picnidio. Los conidios alargados fueron más frecuentes (72%), la gran mayoría hialinos y aseptados, aunque también se observaron algunos septados (hasta 3 septas transversales) y otros de color oscuro, con o sin septas. Las dimensiones de estos conidios fueron:  $13.7\text{--}27.5 \times 3.7\text{--}7.5 \mu\text{m}$ , media  $\pm$  S.D. de 90 conidios =  $21.2 \pm 3.4 \times 5.2 \pm 0.7 \mu\text{m}$ , relación longitud/anchura (L/A) =  $4.2 \pm 0.8$ . Los conidios del segundo tipo fueron predominantemente de color marrón claro y aseptados, aunque también se observaron con cierta frecuencia septados (hasta 5 septas) y con menor frecuencia hialinos. Las dimensiones de este segundo tipo de coni-

dios fueron:  $8.7\text{--}20.0 \times 3.7\text{--}7.5 \mu\text{m}$ , media y S.D. de 90 conidios =  $13.7 \pm 2.5 \times 6.0 \pm 1.1 \mu\text{m}$ , L/A =  $2.3 \pm 0.4$ .

En el medio PDA, el tamaño de los picnidios osciló entre 110 y 520  $\mu\text{m}$ . La morfología, coloración y tamaño de los conidios también resultaron muy variables, habiéndose observado los dos tipos morfológicos encontrados en campo. Los dos tipos morfológicos (alargados y redondeados) tuvieron una frecuencia similar y fueron predominantemente hialinos y aseptados, aunque también resultó frecuente observar conidios de color marrón claro y septados (hasta 3 septas) en los dos tipos. Las dimensiones de los

conidios alargados fueron: 15.0-25.0 x 3.7-7.5  $\mu\text{m}$ , media y S.D. de 90 conidios = 19.2  $\pm$  2.8 x 5.2  $\pm$  0.6  $\mu\text{m}$ , L/A = 3.7  $\pm$  0.7; mientras que las del segundo tipo de conidios fueron: 12.5-20.0 x 3.7-8.7  $\mu\text{m}$ , media y S.D. de 90 conidios = 14.6  $\pm$  1.9 x 5.2  $\pm$  0.9  $\mu\text{m}$ , L/A = 2.8  $\pm$  0.5.

Los análisis de varianza realizados pusieron de manifiesto diferencias significativas para la longitud y para la relación L/A entre los dos tipos de conidios, tanto en las muestras de campo como en los cultivos en PDA. Estas diferencias fueron independientes de la muestra o aislado, ya que la interacción aislado\*tipo morfológico no resultó significativa. Asimismo, existieron diferencias significativas, aunque de menor cuantía, entre las diferentes muestras de campo o aislados en PDA, debidas al menor tamaño de los dos tipos de conidios en una muestra de campo y en dos aislados en PDA. No se observaron diferencias significativas en la anchura de los conidios para las diferentes muestras o aislados.

#### Efecto de la temperatura sobre el crecimiento micelial

Las colonias de los 6 aislados en PDA mostraron el mismo aspecto morfológico, un

micelio blanquecino superficial que tornaba a verde oliva en el centro cuando la colonia tenía cierto desarrollo. El rango de temperaturas de crecimiento fue amplio, de 5 a 40°C (Figura 4), para todos los aislados y las mayores diferencias entre éstos se concentraron en las temperaturas más favorables (20, 25, 30°C).

El modelo de regresión lineal que mejor se ajustó a todos los aislados fue un polinomio de tercer grado del tipo:

$$Y = aT^3 + bT^2$$

donde  $Y$  es el porcentaje de germinación,  $T$  la temperatura y  $a$ ,  $b$  los coeficientes de la regresión. En base a esta ecuación se determinó la temperatura óptima y la tasa máxima de crecimiento para cada aislado. El análisis de la varianza realizado para estos dos parámetros no mostró diferencias significativas entre aislados, oscilando la temperatura óptima entre 25.7 y 26.2°C. Los valores del Área bajo la curva de crecimiento también fueron sometidos al análisis de la varianza mostrando en este caso pequeñas diferencias significativas entre algunos aislados. Por ello, se ajustó una curva global de crecimiento para el conjunto

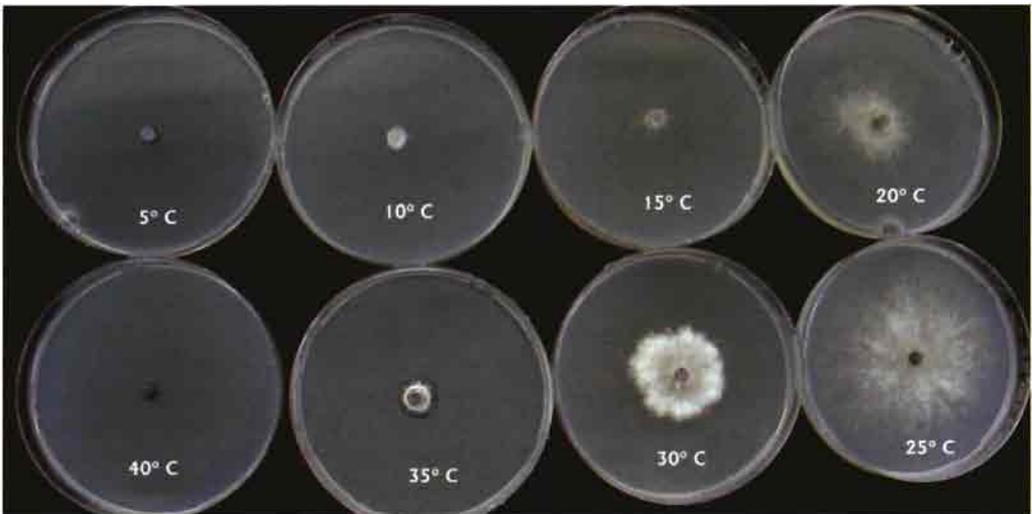


Figura 4. Colonias de *Camarosporium dalmaticum* en PDA a distintas temperaturas.

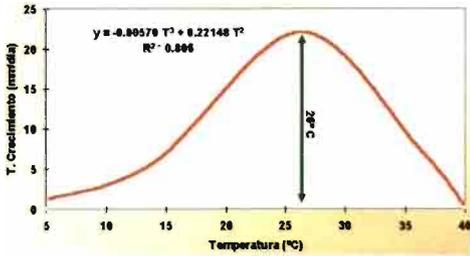


Figura 5. Tasa de crecimiento global (mm/día) de *C. dalmaticum* en función de la temperatura. Se indica la temperatura óptima.

de los 6 aislados, la cual reveló una temperatura óptima de 26°C y una tasa máxima de crecimiento de 16.5 mm/día (Figura 5).

**Efecto de la temperatura sobre la germinación de conidios**

Los diferentes tipos de conidios germinaron formando uno o dos tubos germinativos, aunque se apreció un menor número de tubos y una velocidad de germinación más lenta en los del tipo redondeado (claviformes-piriformes-ovoides); no obstante, estas diferencias no se cuantificaron. El rango de temperaturas de germinación fue amplio, de 5 a 40°C en todos los tiempos de incubación, e incluso germinaron a 45°C tras 48 h. El porcentaje de germinación aumentó con el tiempo y tuvo una respuesta curvilínea homogénea en función de la temperatura.

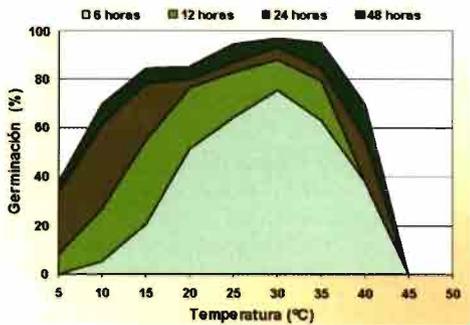


Figura 6. Curvas de germinación de conidios de *Camarosporium dalmaticum* en función de la temperatura para distintos tiempos de incubación.

El modelo de regresión que mejor se ajustó a la germinación de conidios en función de la temperatura para todos los tiempos de incubación fue un polinomio de tercer grado con la ecuación:

$$Y = aT^3 + bT^2$$

donde, *Y* es el porcentaje de germinación, *T* la temperatura y *a*, *b* los coeficientes de la regresión (Figura 6). Del ajuste global se obtuvo la temperatura óptima de germinación que fue 30°C. El tiempo medio de germinación (TMG) se ajustó a una parábola que indicó la temperatura de 23.2° C para el menor TMG (5.15 h), aunque el ajuste de regresión fue mejor para el porcentaje de germinación (Figura 7).

**Efecto del potencial hídrico sobre el crecimiento micelial**

El tipo de colonia formada fue muy similar a la que se desarrolla en el medio habitual PDA (Figura 8). El potencial hídrico o la actividad de agua (*A<sub>w</sub>*), determinada por la concentración de glicerol en el medio, tuvo un efecto muy marcado en el crecimiento del hongo. La tasa de crecimiento aumentó linealmente con el incremento de *A<sub>w</sub>* desde *A<sub>w</sub>* = 0.8964 (-150 bares) hasta *A<sub>w</sub>* = 1 (0 bares) (Figura 9). Para *A<sub>w</sub>* = 0.8644 (-200 bares) no hubo ningún crecimiento fúngico. La comparación de las rectas de regresión permitió

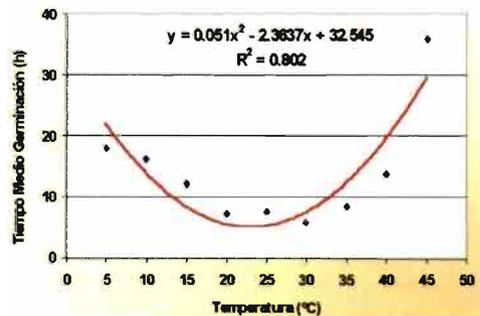


Figura 7. Curva del Tiempo Medio de Germinación (TMG) de conidios de *C. dalmaticum* en función de la temperatura.

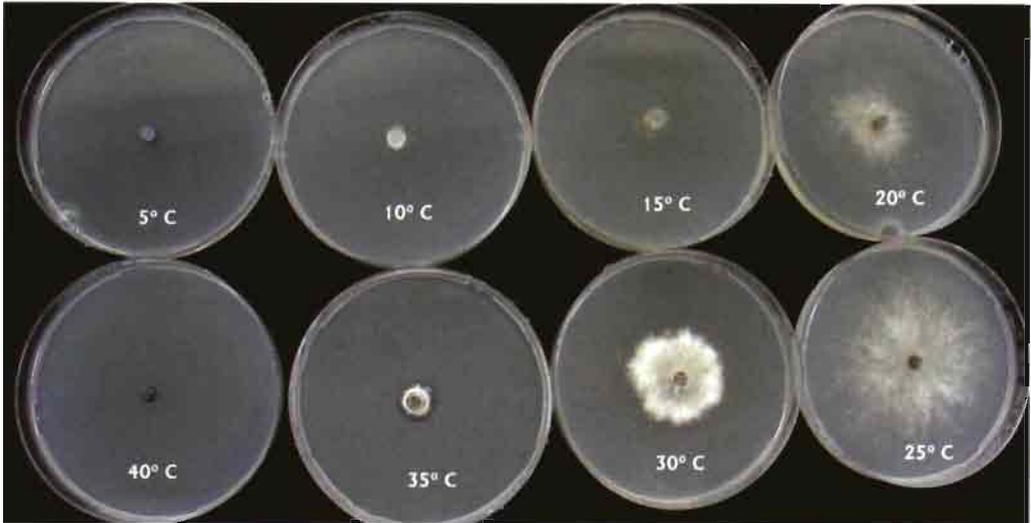


Figura 8. Colonias de *Camarosporium dalmaticum* creciendo en el medio PDA con distintas actividades de agua (Aw).

diferenciar un aislado de los tres restantes por su menor crecimiento general.

### Patogenicidad en aceitunas

Lo primero a destacar fue la rápida maduración de las aceitunas colocadas en las cajas húmedas en comparación con los frutos en el árbol, siendo más acusada en la variedad 'Manzanilla de Sevilla'. El primer síntoma que se apreció fue una isla verde, que se manifestó como una zona verde más o menor circular alrededor del punto de inoculación. Este síntoma fue más evidente cuando se practicó una herida y en la inoculación con

conidios, siendo la variedad 'Manzanilla de Sevilla' la primera en expresarlo (2 semanas desde la inoculación). También 'Hojiblanca' mostró la isla verde, pero una semana más tarde que la anterior, siendo al principio más difuminada y duradera en el tiempo. Los primeros síntomas necróticos aparecieron a las 4 semanas de la inoculación en la variedad 'Manzanilla de Sevilla', en las aceitunas inoculadas con conidios y herida. Consistían en pequeñas depresiones con una coloración de la piel marrón cobrizo que daba un aspecto blando a la aceituna y en muchos casos afloraban picnidios por toda la superficie (Figura 10a). En 'Hojiblanca' la depresión aparecía de forma más o menos marcada y los picnidios afloraban sólo en la lesión y no por toda la superficie. En ambos casos, la sintomatología era muy diferente a la que presentaban en campo las aceitunas afectadas de Escudete (Figura 10b), debido probablemente al diferente ritmo de maduración. En los casos en que no se practicó herida se produjo un retraso en la expresión de síntomas, aunque tanto los conidios como el micelio resultaron patogénicos.

De los análisis de la varianza realizados a las 6 y 8 semanas sobre el índice de enferme-

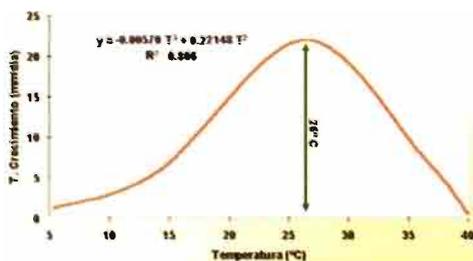


Figura 9. Línea de regresión global de la Tasa de crecimiento (mm/día) de *C. dalmaticum* en función de la Actividad de agua.

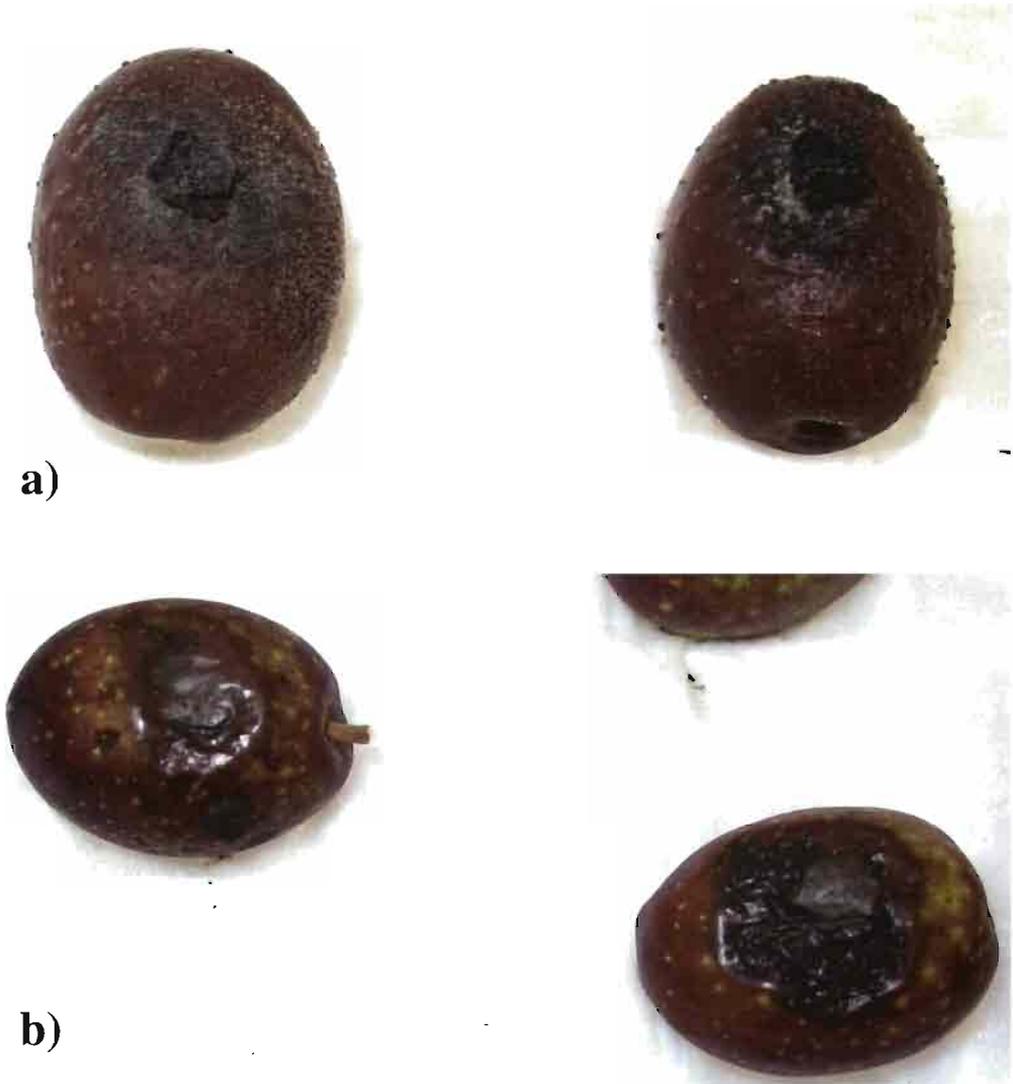


Figura 10. Síntomas presentes en aceitunas inoculadas con *C. dalmaticum*, según la variedad: a) 'Manzanilla de Sevilla'. b) 'Hojiblanca'.

dad (IE), lo primero a destacar es que a las 6 semanas resultaron significativos los tres factores analizados, según el siguiente orden de importancia: variedad ('Manzanilla de Sevilla' > 'Hojiblanca'), tipo de inóculo (conidios > micelio) y herida (sí > no). En cambio, a las 8 semanas sólo el factor herida resultó significativo. En los dos tiempos de incubación las

diferentes interacciones entre factores no resultaron significativas (Figura 11).

## DISCUSIÓN

La variación observada en la morfología, coloración y septación de los conidios del hongo causante del Escudete de la aceituna

en Andalucía se corresponde bien con la descripción de *C. dalmaticum* realizada por ZACHOS y TZAVELLA-KLONARI (1979) en Grecia. No obstante, estos autores destacaron una mayor septación de los conidios, incluso la existencia de septas longitudinales, que no hemos encontrado en nuestras observaciones, tanto en aceitunas de campo como en los cultivos en PDA. Estas últimas características fueron precisamente las que tuvieron un mayor peso para la inclusión de este hongo en el género *Camarosporium* (ZACHOS y TZAVELLA-KLONARI, 1979). Así pues, esta reclasificación del patógeno desde el género *Macrophoma* o *Sphaeropsis* a *Camarosporium* genera ciertas dudas, ya que, al menos desde nuestras observaciones, se basa en las características de los conidios

menos frecuentes. En cambio, los conidios más frecuentes, fusiformes e hialinos, sugieren su pertenencia al género *Fusicoccum*, como ha sido propuesto por VANEV (AA y VANEV, 2002).

La reciente reclasificación del patógeno como *Botryosphaeria dothidea* (PHILLIPS *et al.*, 2005) despeja algunas dudas, pero no cierra completamente el debate sobre su identidad. Desde el punto de vista molecular, la homología de secuencia de las regiones ITS y EF1- $\alpha$  no admite dudas sobre su coincidencia con otros aislados de *B. dothidea*. Sin embargo, desde el punto de vista morfológico, este hongo presenta unas características tan peculiares, sobre todo la variabilidad de sus conidios e incluso de sus picnidios, que lo distinguen claramente de *Fusicoccum aesculi*, el anamorfo de *B. dothidea* (SLIPPERS *et al.*, 2004; PHILLIPS *et al.*, 2005). Su inclusión en la especie compleja *B. dothidea* ha obligado a redefinir esta especie, para incluir aislados con esporas oscuras y septadas, características no consideradas anteriormente en esta especie morfológica, al igual que ha ocurrido con otras especies del género *Fusicoccum* (CROUS Y PALM, 1999). Por todo ello, creemos que aunque la denominación *B. dothidea* parece la más adecuada con los datos disponibles hasta ahora, deberían realizarse análisis moleculares más complejos, incluyendo otros genes o regiones del ADN y otras especies del género *Botryosphaeria* (anamorfos *Fusicoccum*, *Diplodia* y *Dothiorella*), para confirmar su identificación. El teleomorfo del hongo podría ayudar a su correcta identificación, pero hasta ahora no se ha observado el estado sexual del patógeno causante del Escudete de la aceituna (GONZÁLEZ *et al.*, 2006).

La temperatura tuvo un claro efecto sobre el crecimiento del hongo, pero lo más llamativo fue su amplio rango, de 5 a 40°C, aunque en los extremos el crecimiento fue muy reducido. Otro aspecto destacable fue la rapidez en el desarrollo de la colonia (16.5 mm/día). Aunque se obtuvieron diferencias significativas entre aislados, éstas no parecen ser importantes en cuanto a requerimiento

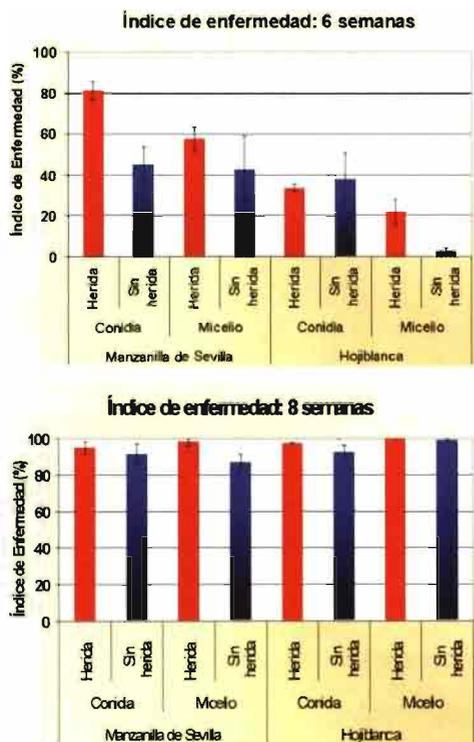


Figura 11. Índice de enfermedad a las 6 y 8 semanas después de la inoculación con micelio y conidias en aceitunas de las variedades 'Hojiblanca' y 'Manzanilla de Sevilla'.

elevado de temperatura, ni en lo referente a temperatura óptima (en torno a 26°C para todos los aislados) presentando a su vez el mismo patrón de crecimiento (polinómico). Este efecto se aprecia aún más en la germinación de conidios, donde el rango de temperaturas (5-45°C) y la temperatura óptima (30°C) son incluso mayores. Nuestros resultados discrepan de los obtenidos por ZACHOS y TZAVELLA-KLONARI (1979), quienes describen un crecimiento en placa casi lineal, y no polinómico, a partir de 10°C y hasta 30°C, temperatura donde se obtiene el máximo y partir de la cual el crecimiento desciende rápidamente hasta ser casi inapreciable a 35°C. Estos autores tampoco encontraron diferencias significativas en las colonias, aunque ellos tuvieron en cuenta el tipo de conidios del que procedía el cultivo y no diferentes aislados. En cualquier caso, el crecimiento resultó más lento que el observado en nuestro trabajo puesto que las esporas fusiformes requirieron 4 días para llenar una placa Petri y 5 días las esporas ovoides. Las diferencias pueden deberse a las distintas condiciones climáticas entre las zonas de donde se obtuvieron los aislados, o incluso al fotoperiodo, ya que no hay constancia de éste en el ensayo de ZACHOS y TZAVELLA-KLONARI (1979) y en el nuestro se incubaron en oscuridad. Lo mismo podría decirse en el caso de la germinación ya que los mismos autores llevaron a cabo un ensayo sin tener en cuenta la temperatura, considerando sólo la morfología de las conidias y el tiempo de incubación necesario para su germinación. Las esporas del tipo fusiforme requirieron 2-3 horas, mientras que las esporas ovoides necesitaron 8 horas. Nosotros también hemos observado una germinación algo más lenta de los conidios redondeados y oscuros. En cualquier caso todos los estudios realizados coinciden en un tiempo breve de germinación de las esporas (ZACHOS y TZAVELLA-KLONARI, 1979; GIGANTE, 1934).

La actividad de agua ( $A_w$ ) en el medio de cultivo es la mejor expresión de la disponibilidad de agua para el crecimiento y la actividad enzimática (HARRIS, 1981; ROSELLÓ *et*

*al.*, 2004). En los ensayos realizados, los valores de  $A_w$  estuvieron determinados por la concentración de glicerol en el medio. El rango de crecimiento fue desde  $A_w = 0.8964$  hasta  $A_w = 1$ , con una tasa de crecimiento que aumentó linealmente con el incremento de  $A_w$ . Aunque existieron diferencias significativas entre aislados, éstas sólo se manifestaron en un menor crecimiento de uno de los aislados, sin afectar al rango de  $A_w$ . Estos resultados permiten concluir que no se trata de un hongo que crezca en condiciones excepcionales de baja humedad, sino que simplemente obtiene los requerimientos de agua de la propia aceituna en la que se desarrolla. ZACHOS y TZAVELLA-KLONARI (1983) ensayaron la influencia de la presión osmótica del medio de cultivo sobre el crecimiento del hongo y obtuvieron un rango de presiones adecuado entre 10-71 bares ( $A_w = 0.9964-0.9503$ ), destacando ligeramente la presión de 51 bares ( $A_w = 0.9642$ ) como algo más favorable.

En la inoculación artificial la mezcla de aislados resultó patogénica en las dos variedades de aceituna y para todos los métodos llevados a cabo. El índice de enfermedad varió significativamente según se tuviese en cuenta la variedad, el inóculo y la práctica de herida, de manera que resultó mayor para la variedad 'Manzanilla de Sevilla', la suspensión de conidios y la herida. Los conidios resultaron mejor inóculo que el micelio, lo que era esperable, ya que posiblemente el inóculo natural esté constituido por conidios. Las inoculaciones artificiales llevadas a cabo con conidios por GIGANTE (1934) y con micelio por ZACHOS y TZAVELLA-KLONARI (1979) confirmaron la necesidad de herida en los frutos para las infecciones de este patógeno. De acuerdo con nuestros resultados, la práctica de herida favorece la infección pero no es necesaria, al menos en aceitunas recogidas en septiembre. Estos resultados están de acuerdo con las observaciones de MATEO-SAGASTA (1968), quién indicó ataques de Escudete en ausencia de heridas u otro agente parasitario. Por otro lado, los síntomas obtenidos no se corresponden con los

observados en campo y difieren ligeramente según se trate de una variedad u otra. Cuando se recolectaron las aceitunas en septiembre, la variedad 'Manzanilla de Sevilla' comenzaba a enverar y 'Hojiblanca' permanecía aún con un color verde intenso. Esta diferencia en el ritmo de maduración, unida a que las aceitunas separadas del árbol maduran más rápidamente, podría explicar el desfase en la aparición de síntomas entre las variedades y las ligeras diferencias entre ellos. Por otro lado, la diferente intensidad en que se manifestaron los síntomas según la variedad parece indicar una mayor susceptibilidad en 'Manzanilla de Sevilla', algo que en principio se corresponde con lo observado en campo (BARRANCO *et al.*, 1999), y que apoya la teoría de que el grado de maduración juega un papel crítico. La evolución de síntomas, especialmente necróticos, que se observó entre las 6 y 8 semanas de la inocu-

lación, tiempo durante el cuál los frutos siguen madurando, confirmó la marcada influencia del estado de madurez sobre la susceptibilidad de las aceitunas. A las 6 semanas la mayoría de las aceitunas presentaban un índice de enfermedad por debajo del 50%, mientras que al cabo de 8 semanas todas las aceitunas presentaban un índice de enfermedad entre el 90-100%.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a todos los miembros del grupo de investigación Patología Agroforestal de la Universidad de Córdoba y, en particular, a Paqui Luque por su excelente ayuda. Este trabajo forma parte de la Tesis de Máster en Olivicultura y Elaiotecnía de Nazaret González Garrido que ha sido financiada por los proyectos CAO00-013 y AGL2004-7495.

## ABSTRACT

GONZÁLEZ N., A. TRAPERO. 2006. Dalmatian disease of olive fruits II: Morphological, physiological, and pathogenic characterization of the causal agent. *Bol. San. Veg. Plagas*, 32: 723-737.

Morphological observations on the causal agent of the Dalmatian disease of olive fruits in Andalucía, southern Spain, confirm its identification as *Camarosporium dalmaticum*. This species was identified in Greece and it has been recently reclassified as *Botryosphaeria dothidea* (anamorph *Fusicoccum aesculi*). Physiological characterization of the pathogen demonstrated that the fungus has a wide range of temperatures for growth and germination of conidia. The optimum temperature was 26°C for growth on PDA medium and 30°C for germination of conidia. These results showed a good ability of the fungus to grow in olive fruits with high temperature during the summer and early autumn. The range of water activity in the medium for growth of *C. dalmaticum* was 0.93 to 1, similar to most fungi, suggesting that this pathogen is not particularly adapted to low humidity, instead it gets its water requirements growing inside of olive fruits. The fungus *C. dalmaticum* was pathogenic in olive fruits inoculated with conidia or mycelium, even in unwounded fruits. The main symptom was a fruit rot instead of the characteristic rounded lesion observed in the field. Olive cultivar 'Manzanilla de Sevilla' was more susceptible than 'Hojiblanca' in these inoculations.

**Key words:** *Camarosporium dalmaticum*, *Botryosphaeria dothidea*, temperature, water potential, pathogenicity, 'Manzanilla de Sevilla', 'Hojiblanca'.

REFERENCIAS

- AA. H. A. VAN DER, VANEV, S. 2002. A revision of the species described in *Phyllosticta*. CBS, Utrecht, The Netherlands. 510 pp.
- ANALYTICAL SOFTWARE. 2003. Statistix 8 User's manual. Tallahassee, FL. 359 pp.
- ANDRÉS CANTERO, F. DE 1991. Enfermedades y plagas del olivo. Riquelme y Vargas Ediciones, Jaén. 646 pp.
- ARAMBOURG, Y. 1986. Traité d'entomologie oleicole. Consejo Oleícola Internacional, Madrid. 360 pp.
- BARRANCO, D., CIMATO, A., FIORINO, P., RALLO, L., TRUJILLO, I. 1999. Catálogo Mundial de variedades de olivo. Consejo Oleícola Internacional, Madrid. 360 pp.
- BENLLOCH, M. 1942. Observaciones sobre algunas enfermedades del olivo. *Bol. Patol. Veg. Entomol. Agric.*, **11**: 1-12.
- CAMPBELL, S. O., MADDEN, L. V. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. John Wiley and Sons, New York. 532 pp.
- CROUS, P. W., PALM, M. E. 1999. Reassessment of the *Botryosphaeria* anamorph genera *Fusicoccum*, *Dothiorella* and *Botryodiplodia*. *Sydowia*, **52**: 167-175.
- FARR, D. F., BILL, G. F., CHAMURIS, G. P., ROSSMAN, A. Y. 1989. Fungi on plants and plant products in the United States. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 1252 pp.
- GIGANTE, R. 1934. Ricerche sulla morfología, la biología e la posizione sistemática del fungo che é stato descritto come *Macrophoma dalmatica*. *Boll. R. Staz. Pat. Veg.*, N. S., **14**: 125-172.
- GONZÁLEZ, N., VARGAS-OSUNA, E., TRAPERO, A. 2006. El Escudete de la aceituna I: Biología y daños en olivares de la provincia de Sevilla. *Bol. San. Veg. Plagas*, **32**.
- GONZÁLEZ FRAGOSO, R. 1914. Aclaraciones a los hongos conocidos con el nombre vulgar de "repilo". *Bol. Soc. Esp. Hist. Nat.*, **14**: 291-293.
- HARRIS, R. F. 1981. Effect of water potential on microbial growth and activity. In: Water potential relations in soil microbiology. Soil Science Society of America. Special Publication Number 9. pp. 23-95.
- LA GRECA, L., VRENNIA, G. 1995. Danni da *Sphaeropsis dalmatica* in Calabria. *Informatore fitopatologico*, **45**: 32-33.
- LONGO, O., CAVALLO, C., D'AGNANO, G., SCHIAVONE, D., PORCELLI, F. 2004. Inusuale cascola di olive per azione combinata di tre parassiti. *Informatore Agrario*, **22**: 57-59.
- LÓPEZ-DONCEL, L. M., VIRUEGA, J. R., TRAPERO, A. 2000. Respuesta del olivo a la inoculación con *Spilocaea oleagina*, agente del repilo. *Bol. San. Veg. Plagas*, **26**: 349-363.
- MATEO-SAGASTA AZPEITIA, E. 1968. Notas sobre un nuevo tipo de ataque criptogámico en aceitunas españolas posiblemente atribuible a una nueva forma de ataque del hongo *Macrophoma dalmatica*. *Bol. Patol. Veg. Entomol. Agric.*, **30**: 137-146.
- MOTTA, E., SAPONARO, A. 1982/1983. Micoflora dei semi di Cupressaceae. *Annali dell' Istituto sperimentale per la Patologia Vegetale Roma*, **8**: 71-75.
- NAVARRO, L. 1923. Las enfermedades del olivo. Calpe, Madrid. 176 pp.
- PHILLIPS, A. J. L., RUMBOS, J. C., ALVES, A., CORREIA, A. 2005. Morphology and phylogeny of *Botryosphaeria dothidea* causing fruit rot of olives. *Mycopathologia*, **159**: 433-439.
- ROSELLÓ, J., SEMPERE, F., SANTAMARINA, M. P. 2004. Repuestas al agua y a la temperatura del agente causante de la fusariosis del tomate: *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Phytoma España*, **162**: 98-100.
- SLIPPERS, B., CROUS, P. W., DENMAN, S., COUTINHO, T. A., WINGFIELD, B. D., WINGFIELD, M. J. 2004. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia*, **96**: 83-101.
- STEEL, R. G. D., TORRIE, J. H. 1985. Bioestadística: principios y procedimientos. MacGraw-Hill, Bogotá. 622 pp.
- TRAPERO, A., BLANCO, M. A. 2004. Enfermedades. In: El cultivo del olivo. Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, L. eds. Coedición Junta de Andalucía/Mundi-Prensa. Madrid. pp. 557-614.
- YOSHIDA, S., HIRADATE, S., FUJII, Y., SHIRATA, A. 2000. *Colletotrichum dematium* produces pleytotoxins in anthracnose lesions of mulberry leaves. *Phytopathology*, **90**: 285-291.
- ZACHOS, D. G., TZAVELLA-KLONARI, K. 1979. Recherches sur l'identité et la position systématique du champignon qui provoque la maladie de olives attribuée au champignon *Macrophoma* o *Sphaeropsis dalmatica*. *Annls. Inst. Phytopath. Benaki*, **12**: 59-71.
- ZACHOS, D. G., TZAVELLA-KLONARI, K. 1983. Recherches sur les causes des infections localisées ou généralisées des olives attaquées par le champignon *Camarosporium dalmatica*. I. Influence de l'humidité, de la pression osmotique et du pH des fruits. *Annls. Inst. Phytopath. Benaki*, **14**: 1-9.

(Recepción: 1 septiembre 2006)  
(Aceptación: 2 octubre 2006)