



**aecid**

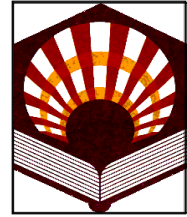
Agencia Española  
de Cooperación  
Internacional  
para el Desarrollo

**INAGBE**

Instituto Nacional e Gestão de  
Bolsas de Estudos



Instituto de Investigação Agronómica de Angola  
Ministerio da Agricultura e do Desenvolvimento Rural



**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

## **TESIS DOCTORAL**

**“Resistencia y Control Químico en la Antracnosis del  
Olivo causada por *Colletotrichum* spp.”**

**CARLOS JOSÉ XAVIÉR**

**DIRECTORES: Dr. ANTONIO TRAPERO CASAS**

**Dr. JUAN MORAL MORAL**

**CÓRDOBA, NOVIEMBRE DE 2015**

TITULO: *Resistencia y control químico en la Antracnosis del olivo causada por Colletotrichum spp.*

AUTOR: *Carlos José Xavier*

---

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2015  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---



aecid

Agencia Española  
de Cooperación  
Internacional  
para el Desarrollo

**INAGBE**

Instituto Nacional e Gestão de  
Bolsas de Estudos



Instituto de Investigaçao Agronomica de Angola  
Ministerio da Agricultura e do Desenvolvimento Rural



UNIVERSIDAD DE CORDOBA

## “Resistencia y Control Químico en la Antracnosis del Olivo causada por *Colletotrichum* spp.”

Tesis redactada para optar al grado de Doctor por la Universidad de  
Córdoba, por el Ingeniero Agrónomo:

**CARLOS JOSÉ XAVIÉR**

Visto Bueno:

Los Directores de la tesis

Fdo: Dr. Antonio Trapero Casas

Catedrático Patología Vegetal

Universidade de Córdoba

Fdo: Dr. Juan Moral Moral

Patología Vegetal

Universidad de Córdoba

Córdoba, Noviembre de 2015.



### **TÍTULO DE LA TESIS:**

“Resistencia y control químico en la Antracnosis del olivo causada por *Colletotrichum* spp.”

**DOCTORANDO:** Carlos José Xaviér

### **INFORME RAZONABLE DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS**

(Se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

El trabajo “Resistencia y control químico en la Antracnosis del olivo causada por *Colletotrichum* spp”, del que es autor el Ingeniero Agrónomo D. Carlos José Xaviér, se ha realizado en el Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba. El trabajo tiene carácter de investigación y se considera ya finalizado y puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en la Universidad de Córdoba.

Los resultados que se han ido generando durante la realización de la tesis Doctoral se han expuesto y discutido en diversos foros y congresos científicos nacionales e internacionales, dando lugar a varias comunicaciones y publicaciones.

### **Comunicaciones y publicaciones:**

- **Xaviér, C.J.**, Moral, J., Trapero, A. 2010. Caracterización de la virulencia de *Colletotrichum acutatum*, agente causal de la Antracnosis del Olivo. XV Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología (SEF), Vitoria.
- **Xaviér, C.J.**, Moral J., Cherifi, F., Díez, C.M., Trapero, A. 2012. Resistencia del acebuche a la Antracnosis del olivo causada por *Colletotrichum* spp., y su posible origen. XVI Congreso Sociedad Española de Fitopatología (SEF), Málaga.
- Jurado, J., Moral, J., Pérez, M., **Xaviér, C.J.**, Sergeeva, V., Trapero, A. 2012. Caracterización de los aislados de *Colletotrichum* spp., causantes de la Antracnosis del olivo en Australia. XVI- Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología (SEF), Málaga.



- **Xaviér, C.J.**, Moral J., Cherife, F., Díez, C.M., Trapero, A. 2012. Resistencia del acebuche a la Antracnosis del olivo causada por *Colletotrichum* spp., y su posible origen. I<sup>o</sup> Jornadas Científicas de Investigaciones Agrarias, Huambo-Angola.
- **Xaviér, C.J.**, Moral, J., Pérez, M., Agalliu, G., Alcántara, E., Trapero A. 2014. El calcio como herramienta para el control de la Antracnosis del olivo causada por *Colletotrichum* spp. XVII-Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología (SEF), Lérida.
- **Xaviér, C.J.**, Moral, J., Viruega, J.R., Caballero, J., Del Río, C., Trapero, A. 2014. Susceptibilidad relativa de cultivares de olivo a la Antracnosis causada por *Colletotrichum* spp. XVII-Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología (SEF), Lérida.

#### **Artículos publicados en revistas científicas indexadas (SCI, Science Citation Index):**

- Moral, J., Cherifi, F., Muñoz-Díez, C., **Xaviér, C.J.**, Trapero, Casas, A. 2009. Infection of olive seeds by *Colletotrichum acutatum* and its effect on germination. Phytopathology 99: S88.
- J. Moral, **C. Xaviér**, L.F. Roca, J. Romero, W. Moreda y A. Trapero. 2014. La Antracnosis del Olivo y su Efecto en la Calidad del Aceite. Grasas y Aceites 65 (2): e028 doi: <http://dx.doi.org/10.3989/gya.110913>.

#### **Artículos publicados en revistas científicas no indexadas y de divulgación científica:**

- J. Moral, L.F. Roca, J. Romero, M. Pérez, J. Jurado, **C.J. Xaviér**, D. Cabello y A. Trapero. 2014. Gestión integrada de la Antracnosis del olivo. Vida Rural-379: 56-60.
- Romero, J., Moral, J., **Xaviér, C.**, Roca, L.F., Raya, C., Trapero, A. 2015. La Antracnosis del olivo la enfermedad más perjudicial para la calidad del aceite. MERCACEI, 84, 130-133.



Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 02 de Septiembre de 2015

**Firma de los directores**

**Fdo:** Dr. Antonio Trapero Casas

Catedrático de Patología Vegetal

Universidad de Córdoba

**Fdo:** Dr. Juan Moral Moral

Investigador Contratado

Universidad de Córdoba

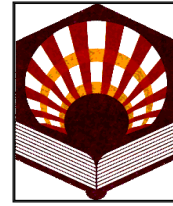


**INAGBE**

Instituto Nacional e Gestão de Bolsas de Estudos



Instituto de Investigaçao Agronomica de Angola  
Ministerio da Agricultura e do Desenvolvimento Rural



**UNIVERSIDAD DE CORDOBA**

Este trabajo ha sido realizado en el grupo PAIDI AGR-216 “PATOLOGÍA AGROFORESTAL” en el Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba. Cofinanciado por el proyecto de excelencia P08-AGR-3635 de la Junta de Andalucía y los proyectos AGL2004-7425 y AGL2008-1683 del Ministerio de Economía y Competitividad, gracias a la concesión de una beca doctoral por la Agencia Española de Cooperación Internacional y Desarrollo (AECID), del Instituto Nacional e Gestão de Bolsas de Estudos (INAGBE) y el apoyo del Ministerio de Agricultura de Angola a través del Instituto de investigação Agrônomico de Angola (IIA).

Córdoba, Noviembre de 2015

**DEDICO:**

A mi esposa y mis hijos, que me apoyaron en todo,  
aunque lejos y fuera de casa  
largo tiempo, pero es  
por ellos, que  
me esfuerzo  
cada día.



## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo expresar mis agradecimientos a todas las personas que directa o indirectamente han hecho posible y me apoyaron en todo, dedicando su tiempo a la elaboración de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar agradecer a mis directores de tesis Profesor Antonio Trapero Casas y Doctor Juan Moral Moral, por su orientación, paciencia, esfuerzo, dedicación, consejos el apoyo y por animarme a seguir adelante para la conclusión de este trabajo, sin ellos no hubiese sido posible la realización del mismo. Aprovecho esta ocasión para decirlos muchísimas gracias por todo.

A mi familia en especial a mi esposa! Salette te quiero con el alma! mis hijos que son mi alegría, razón de vivir y de lucha, los que me dan fuerza para seguir adelante, gracias por entenderme y por ayudarme a ser un mejor padre y esposo.

A lo largo de mi estancia en el Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba, me he sentido como uno más, gracias a todos los profesores, en particular al Dr. Miguel Ángel Blanco, Dr. Esteban Alcántara y demás investigadores sin excepción de ninguno. Al personal de los laboratorios dentro y fuera del Departamento de Agronomía. Decir gracias por la ayuda y por haber mantenido las puertas abiertas haciendo posible para aquellos que la necesitamos. A Walter J. Kaiser, gracias por todo.

De manera muy especial, quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio, a los Doctores y todos los que en breve lo serán: Dr. Luis Roca, Dra. María del Carmen, Dra. Esperanza Sánchez, Dr. Javier López, Dra. Concepción Muñoz, Dra. María Ángeles Romero, Diego Cabello, Mario Pérez, Francisco Carmona, Paco, Joaquín Romero, Ángela, Dra. María Serrano, Manuela Domínguez, María Ángeles Fernández, Dr. Carlos Trapero, María Denis, Mario González, pepe Jurado, Eduardo Ostos, Pablo, Dr. Jonatán, Pedro Ríos, Antonio Mulero, Ana López, Nerea Cortés, Dra. Rocío, Imma, Dra. Verónica, Dra. Ana Borrego, Raúl Navas, Paolo, Gentjan Galliu, Fariza, Hanen, Fahima (recuerdo con mucho cariño, ya que hacíamos el despacho de la ONU). En general lo he pasado en grande y me quedo con lo mejor de cada uno, sabiendo que los milagros solo Dios lo puede hacerlo pero a todos vosotros gracias por su ayuda y apoyo. A ti en especial Paqui Luque, gracias por abrir las puertas de tu casa, de tu vida hacia mi familia, te estaremos eternamente agradecidos por el cariño, por habernos acogido de primera hora, por ayudarnos con las cosas de la casa, a tu hija Marta con los deberes de

la escuela de los niños, por haberme ayudado mucho en los ensayos, en lo personal por haber creído en mi y por los consejos sinceros que me has dado. Sinceramente eres el alma del laboratorio y lo más grande que hemos tenido. Por eso en nombre de todos los extranjeros que han pasado por el laboratorio, que hubiesen querido decirte gracias, gracias, muchísimas gracias que Dios todo poderoso te bendiga.

A la secretaria Ana Vacas, por su inestimable bondad y ayuda con el papeleo que no ha sido poco pero valioso, a ti gracias. Al igual que a Inés por la disponibilidad siempre que he necesitado. Al personal de consejería del edificio C4: Catalina Cañas (Cati), Juan Francisco, Joaquín Jimenez. A los propietarios de las fincas donde hemos realizado los ensayos “Fuente Rosa”: Rafael Sánchez de Puerta, del IFAPA, “El Río” Peraleda del Zaucejo en Badajoz gracias por todo.

También a mi padre Cordobés Manuel Corpas y su esposa por toda la ayuda y preocupación conmigo.

A la otra familia de todos mis hermanos, hermanas, sobrinos, sobrinas y sus hijos por haber estado ahí apoyándome en todo, desde la distancia, por los consejos sabiendo que siempre se puede. Azevedo Xaviér, Alberto Xaviér, Mario Orlando, Rosa Sebastião, Helena Francisco, Mariana, Mila, Nana.

A todos hermanos de la iglesia Evangélica de Córdoba, pastor Paco y esposa. Al pastor Norberto Loureiro y esposa y demás hermanos en Cristo Señor, gracias por el apoyo.

A todos mis amigos que me convirtieron en un, Angoleño-Cubano-Andaluz mezcla rara que da esa tierra. A la Dra. Eugenia Viera y Esposo por su ayuda y entrega. A la Dra. Paula Inês secretaria de estado del Ministerio de Educación y Dr. Abel Kerlan por su amistad y cariño.

A la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECID) por concederme la beca, que me ha permitido realizar los estudios de Máster y Doctorado en España.

Al Instituto Nacional e Gestão de bolsas de Estudos (INAGBE), por toda ayuda e apoyo. Muchas gracias a todos.

**“Ninguna inversión es más segura que la realizada para la eternidad”**

## Resumen

La Antracnosis o Aceituna Jabonosa, es la enfermedad más importante del fruto del olivo y origina pérdidas estimadas en unos 75 millones de euros en España. La Antracnosis está causada por varias especies de hongos del género *Colletotrichum* pertenecientes a los complejos *Colletotrichum acutatum sensu lato (s.l)* y *Colletotrichum gloeosporioides s.l.* En Andalucía, las especies más frecuentes asociadas con la Antracnosis pertenecen al complejo *C. acutatum s.l.* La enfermedad presenta dos síndromes característicos, el primero es la podredumbre del fruto de aspecto jabonoso que puede avanzar hasta afectar al fruto completo y que termina por momificarse. El segundo síndrome es la muerte y desecación de ramas y está asociado a las toxinas que produce el patógeno en las aceitunas afectadas y que se movilizan a las ramas. Además, los aceites obtenidos de aceitunas afectadas muestran pésimas características químicas y sensoriales, no apto para el consumo, conocidos como aceites colorados. A pesar de que la enfermedad es bien conocida por sus efectos en zonas de clima mediterráneo, todavía existen lagunas en su conocimiento. Por ello, en el presente trabajo se planteó el objetivo de revisar y actualizar toda la información sobre la Antracnosis del olivo y su efecto en la calidad del aceite.

El desarrollo de la enfermedad está condicionado por la resistencia de la variedad. En los últimos 15 años se han registrados cuatro graves epidemias en Andalucía y dado el desconocimiento de la susceptibilidad de los cultivares de olivo a esta enfermedad, permitieron que en el grupo de Patología Agroforestal de la Universidad de Córdoba se pusieran a punto métodos de evaluación de susceptibilidad en condiciones controladas y de campo. Por ello, como segundo objetivo de esta tesis se ha completado la evaluación de las variedades de olivo en las parcelas principales del Banco Mundial de Germoplasma de Olivo, localizadas el Centro “Alameda del Obispo” del IFAPA en Córdoba. En total, se han evaluado 384 cultivares y se han establecido 5 categorías de susceptibilidad/resistencia: altamente resistentes (8.9%), resistentes (14.3%), intermedios (19.8%), susceptibles (31.5%) y altamente susceptibles (25.5%). Los cultivares representativos de cada uno de estos grupos son Frantoio, Picual, Arbequina, Lechín de Sevilla y Ocal, respectivamente. Los resultados de este estudio son de gran interés para futuras plantaciones de olivo y para desarrollar estrategias de control integrado para esta enfermedad.

El desconocimiento de la susceptibilidad de los acebuches a la Antracnosis, motivaron la realización de prospecciones de campo en Andalucía, en las que no se han observado síntomas de la enfermedad, aunque, algunas acebuchinas mostraron infecciones latentes. Por ello, se estudió la resistencia de 45 genotipos de acebuche y la posible transmisión del patógeno a la semilla. En consonancia con las observaciones de campo, los acebuches evaluados han mostrado un elevado nivel de resistencia a la infección por el patógeno, igual o superior al que muestra el cultivar altamente resistente Frantoio. A pesar de ello, hay que resaltar que los acebuchales andaluces se sitúan en zonas propicias para el desarrollo de enfermedades aéreas debido a alta pluviometría y temperaturas suaves en donde estos patógenos han podido ejercer una elevada presión de selección. Nuestros resultados sugieren que la presión de selección hacia resistencia a la Antracnosis en las masas forestales de Acebuche se ha incrementado por el efecto negativo del patógeno sobre la germinación de la semilla y la nascencia de las plántulas. Además, la dispersión de las acebuchinas por las aves puede verse disminuida ya que algunas especies de pájaros no consumen las aceitunas o acebuchinas afectadas por la Antracnosis.

Los compuestos ricos en calcio se están utilizando para el control de la Antracnosis del manzano, debido a que inhiben la actividad de enzimas y toxinas excretadas por el patógeno y refuerzan la pared celular de los tejidos del fruto. Estos compuestos podrían ayudar a mejorar el control de la Antracnosis del olivo causando un bajo impacto ambiental. El desconocimiento existente sobre el papel del calcio en la Antracnosis del olivo, nos llevó a estudiar el efecto de tratamientos de calcio sobre la respuesta a la enfermedad de varios cultivares. Aunque, las aplicaciones exógenas de calcio en aceitunas, tanto en condiciones controladas como en campo, no han permitido un control de la enfermedad posiblemente debido a la inmovilidad de este elemento, se ha observado que existe una relación lineal positiva entre el contenido en calcio de las aceitunas y su resistencia a la Antracnosis. Ello podría explicar que la enfermedad sea endémica en áreas de suelos ácidos como la Sierra Norte de Sevilla y algunas comarcas de Huelva y sur de Portugal, en los que el contenido en calcio del fruto es bajo. Asimismo, se ha observado que el efecto de calcio, en aceitunas tratadas con cloruro de calcio e inoculadas, se perdía cuando las aceitunas eran lavadas antes de la inoculación indicando que se trata de un efecto protector del tratamiento.

En años epidémicos, el control de la enfermedad se basa principalmente en el uso de productos cúpricos, siendo la aplicación de estos fungicidas en otoño la medida de control más utilizada. Por ello, se ha evaluado en condiciones de campo el efecto de diferentes fungicidas contra la Antracnosis del olivo. Los compuestos cúpricos evaluados (hidróxidos, óxidos, oxicluros y sulfatos) han mostrado cierta eficacia contra la enfermedad, con excepción del sulfato tribásico de cobre que resultó menos eficaz. En el caso de los productos penetrantes o sistémicos, se ha observado que existe una elevada eficacia del tebuconazol, aunque su uso está limitado a prefloración. Las estrobilurinas, como el trifloxistrobin, también han resultado útiles contra la Antracnosis, siendo un complemento a los fungicidas cúpricos. También se han observado una buena eficacia de las mezclas de compuestos cúpricos y orgánicos, como el oxicluro de cobre y propineb o trifloxistrobin y el hidróxido cúprico y folpet. En este estudio se confirma que los tratamientos al inicio del otoño con fungicidas cúpricos permiten un control eficiente de la Antracnosis del olivo. La aplicación en otoño con trifloxistrobin, o su mezcla con oxicluro de cobre, puede ser una alternativa a los tratamientos basados únicamente con productos cúpricos. Asimismo, el uso de nuevos compuestos de baja concentración de cobre son de especial interés ya que permitirían reducir la cantidad de cobre aplicada, cuyo límite máximo permitido actualmente es de 6 Kg/ha al año en la Unión Europea.



## ABSTRACT

Anthrachnose of olive (*Olea europaea*) is the most important disease of the olive fruit causing losses estimated of ~ 75 million euros in Spain. The disease is caused by several species of the fungal genus *Colletotrichum*, mainly the species complex *Colletotrichum acutatum sensu lato (s.l.)* and *Colletotrichum gloeosporioides s.l.* In Andalusia, the most common species associated with olive anthracnose is *C. acutatum s.l.* Olive anthracnosis has two characteristic disease syndromes. The first one is the fruit rot with soapy appearance that can progress causing its mummification. The second syndrome is and drying and death of branches and it is associated with toxins produced by the pathogen in affected fruits that are mobilized to the branches. In addition, olive oils from affected fruits, known as red-colored oils, show awful chemical and sensory characteristics, so they are not suitable for consumption. Although the disease is well known by its effects in Mediterranean areas, there are still gaps in the knowledge about it. Therefore, in this study we have reviewed and updated the information about anthracnose and its effects on olive oil quality.

The resistance or susceptibility of the olive cultivar is the main factor determining the development of this disease. In the last 15 years, four serious anthracnose epidemics have been registered in Andalusia and given the lack of knowledge about the susceptibility of the olive cultivars to the disease, the group of Pathology Agroforestry University of Cordoba developed methods to evaluate it in controlled and field conditions. Therefore, as a second objective of this thesis, we have completed the evaluation of olive cultivars in the main plots of the World Olive Germplasm Bank of Córdoba (WOGBC), located in the "Alameda del Obispo" IFAPA Center in Córdoba (Spain). In total, we have evaluated 384 cultivars and established five categories of susceptibility/resistance: highly resistant (8.9%), resistant (14.3%), intermediate (19.8%), susceptible (31.5%) and highly susceptible (25.5%). Representative cultivars of each of these groups are 'Frantoio', 'Picual', 'Arbequina', 'Lechín de Sevilla' and 'Ocal', respectively. The results of this study are of great interest for future olive plantations and to develop integrated strategies to control this disease.

The lack of knowledge about the susceptibility of the wild olives to anthracnose, led us to undertake field surveys in Andalusia, in which no disease symptoms were observed, although some wild olives showed latent infections. Therefore, the resistance of 45 wild olive genotypes and the possible transmission of the pathogen to the seed were

evaluated. In line with field observations, the evaluated wild olives showed a high level of resistance to the pathogen infection, being similar or higher than the level showed by the highly resistant cultivar 'Frantoio'. We must highlight that forests of wild olives in Andalusia are located in favorable areas for anthracnose development due to high rainfall and mild temperatures. Our results suggest that selection pressure towards anthracnose resistance in the forests of wild olives has increased by the negative effect of the pathogen on seed germination and seedling emergence. Furthermore, the dispersion of the wild olives by birds may be diminished because some species of birds do not eat cultivated or wild olive fruits affected by anthracnose.

Calcium rich compounds are being used to control apple scab, because they inhibit the activity of enzymes and toxins excreted by the pathogen and strengthen cell walls of fruit tissues. These compounds may help to improve the control of olive anthracnose with a low environmental impact. The lack of knowledge about the role of calcium in olive anthracnose, led us to study the effect of calcium treatments on the response to the disease of various cultivars. Although exogenous applications of calcium to olive fruits, both under controlled and field conditions, have not allowed to control the disease, possibly due to immobility of this element, it has been observed that there is a positive linear relationship between the calcium content of olive fruits and the resistance to anthracnose. This could explain why the disease is endemic of areas with acid soils as the Sierra Norte of Seville and Huelva and some regions of southern Portugal, where the calcium content of the fruit is low. Also, it has been observed that the effect of calcium on olives treated with calcium chloride and inoculated with *C. acutatum*, was lost when the olives were washed before inoculation, indicating a protective effect of the treatment.

In epidemic years, the control of the disease is based primarily on the application of copper products during the fall season. Therefore, it has been evaluated in field conditions the effect of different fungicides for the control of anthracnose in olive. The evaluated cupric compounds (hydroxides, oxides, oxides and sulfates) have shown some efficacy against the disease, with the exception of the tribasic copper sulfate that was less effective. In the case of penetrating or systemic products, it has been observed that there was a high efficiency of tebuconazole, although its use is limited to pre-flowering. The strobilurins such as the trifloxystrobin, have also been effective against anthracnose as a complement to the copper fungicides. There were also observed good efficacy of



mixtures of cupric and organic compounds, such as copper oxychloride plus propineb or trifloxystrobin and cupric hydroxide plus folpet. This study confirms that treatments with copper fungicides in the early fall allow an efficient control of olive anthracnose. The application of trifloxystrobin in fall, or its mixture with copper oxychloride, can be an alternative to the treatment with only copper products. Also, the use of novel compounds with low concentration of copper are of particular interest because they would allow the reduction of the amount of applied copper, whose current limit is 6 kg / ha per year in the European Union.



	Página
<b>INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b> -----	I
INTRODUCCIÓN-----	I
OBJETIVOS CONCRETOS-----	V

**CAPÍTULO I. LA ANTRACNOSIS DEL OLIVO Y SU EFECTO EN LA CALIDAD DEL ACEITE.**

1. INTRODUCCIÓN-----	5
2. HISTORIA, IMPORTANCIA Y DISTRIBUCIÓN DE LA ANTRACNOSIS-----	6
3. SINTOMATOLOGÍA-----	9
4. ETIOLOGÍA-----	11
5. CICLO BIOLÓGICO Y EPIDEMIOLOGÍA-----	13
6. CONTROL-----	18
7. INFLUENCIA SOBRE LA CALIDAD DEL ACEITE-----	25
8. PERSPECTIVAS FUTURAS-----	29

**CAPÍTULO II. VARIABILITY IN SUSCEPTIBILITY TO ANTHRACNOSE IN THE WORLD COLLECTION OF *OLEA EUROPAEA* CULTIVARS OF CORDOBA (SPAIN).**

ABSTRACT-----	41
1. INTRODUCTION-----	41
2. MATERIALS AND METHODS-----	43
2.1. PLANT MATERIAL AND ORCHARD-----	43
2.2. ASSESSMENT OF DISEASE INCIDENCE IN THE FIELD-----	43
2.3. INOCULATION OF DETACHED FRUIT-----	44
3. RELATIONSHIP BETWEEN DISEASE INCIDENCE AND SOME PHENOTYPE CHARACTERISTICS OF CULTIVARS-----	45
4. STATISCAL ANALYSIS-----	45
5. RESULTS-----	46
5.1. SUSCEPTIBILITY OF CULTIVARS IN THE FIELD-----	46
5.2. SUSCEPTIBILITY OF CULTIVARS IN ARTIFICIAL INOCULATION-----	48
5.3. Relationship between anthracnosis incidence and some phenotypic characteristics of cultivars-----	48
6. DISCUSSION-----	49

**CAPÍTULO III. RESISTENCIA DEL ACEBUCHE A LA ANTRACNOSIS CAUSADA POR *COLLETOTRICHUM* SPP. Y SU POSIBLE ORIGEN.**

1. INTRODUCCIÓN-----	72
2. MATERIALES Y METODOS-----	74
2.1. EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA/SUSCEPTIBILIDAD DE ACEBUCHES-----	74
2.2. MATERIAL VEGETAL-----	74
2.3. INOCULACIÓN E INCUBACIÓN-----	75
2.4. EVALUACIÓN-----	75
3. INFECCIÓN DE ENDOCARPOS Y SEMILLAS-----	76
3.1. MATERIAL VEGETAL-----	76
3.2. TRATAMIENTO DE LAS ACEITUNAS-----	76
ENDOCARPOS-----	76
SEMILLAS-----	76
3.3. EVALUACIÓN-----	77

4. EFECTO EN LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO DE LA RADÍCULA-----	77
4.1. MATERIAL VEGETAL Y GERMINACIÓN-----	77
4.2. EVALUACIÓN-----	77
5. DINAMICA DE INFECCIÓN EN LA ACEITUNA-----	78
5.1. MATERIAL VEGETAL-----	78
5.2. SEGUIMIENTO DE LA INFECCIÓN-----	78
6. SUSCEPTIBILIDAD DEL SISTEMA RADICULAR DE PLÁNTULAS DE OLIVO Y ACEBUCHE A LA INFECCIÓN-----	78
6.1. EVALUACIÓN-----	79
7. ANALISIS DE LOS DATOS-----	80
8. RESULTADOS-----	80
8.1. EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA/SUSCEPTIBILIDAD DE ACEBUCHE-----	80
9. INFECCIÓN DE ENDOCARPOS Y SEMILLAS-----	82
10. EFECTO EN LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO DE LA RADÍCULA-----	84
11. DINÁMICA DE INFECCIÓN DE LA ACEITUNA-----	86
12. SUSCEPTIBILIDAD DEL SISTEMA RADICULAR DE PLÁNTULAS DE OLIVO Y ACEBUCHE A LA INFECCIÓN-----	87
13. DISCUSIÓN-----	90
14. CONCLUSIONES-----	93

#### **CAPÍTULO IV. PAPEL DEL CALCIO EN EL CONTROL DE ANTRACNOSIS.**

1. INTRODUCCIÓN-----	99
2. MATERIALES Y METODOS-----	101
2.1. EFECTO DE LOS COMPUESTOS DE CALCIO EN EL CRECIMIENTO MICELIAL---	101
2.2. MATERIAL UTILIZADO-----	101
2.3. PREPARACIÓN DE LOS AISLADOS-----	102
2.4. PRODUCTOS EMPLEADOS-----	102
2.5. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO-----	103
2.6. SIEMBRA E INOCULACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS-----	103
2.7. EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAL-----	104
3. EFECTO DE LOS COMPUESTOS DE CALCIO EN LA GERMINACIÓN DE CONIDIOS-----	104
3.1. MATERIAL UTILIZADO-----	104
3.2. PREPARACIÓN DEL INÓCULO-----	104
3.3. COMPUESTOS EVALUADOS-----	105
3.4. PREPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE CALCIO-----	105
3.5. INCUBACIÓN DE LAS SUSPENSIONES DE CONIDIOS-----	105
3.6. EVALUACIÓN DE LA GERMINACIÓN DE CONIDIOS-----	106
4. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE CLORURO DE CALCIO-----	106
4.1. EXPERIMENTO EN UMBRÁCULO-----	106
4.1.1. TRATAMIENTOS DE LOS PLANTONES-----	107
4.1.2. MEDIDA DE CALCIO EN EL FRUTO-----	107
4.1.3. INOCULACIÓN E INCUBACIÓN-----	108
4.2. EXPERIMENTO DE CAMPO-----	108
4.2.1. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS-----	109
4.2.2. INOCULACIÓN E INCUBACIÓN-----	109
4.2.3. EVALUACIÓN-----	109
5. EFECTO DE LAS APLICACIONES DE AGENTES QUELATANTES Y CLORURO DE CALCIO EN LA SUSCEPTIBILIDAD DEL FRUTO-----	110

5.1. MATERIAL VEGETAL Y FÚNGICO-----	110
5.2. PREPARACIÓN DEL INÓCULO-----	110
5.3. EXPERIMENTO I (2010)-----	110
5.4. EXPERIMENTO II (2011)-----	111
5.5. EVALUACIÓN-----	111
6. RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE CARBONATO CÁLCICO EN EL SUELO, CALCIO EN ACEITUNAS Y LA SUSCEPTIBILIDAD A <i>COLLETOTRICHUM</i> SPP-----	111
6.1. MATERIAL VEGETAL-----	112
6.2. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS-----	112
6.3. EVALUACIÓN-----	114
6.4. ANÁLISIS DE LOS DATOS-----	114
7. RESULTADOS-----	115
7.1. EFECTO DE LOS COMPUESTOS DE CALCIO EN EL CRECIMIENTO MICELIAL-----	115
7.2. EFECTO DE SALES DE CALCIO EN LA GERMINACIÓN DE CONIDIOS-----	115
7.3. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE CLORURO DE CALCIO-----	118
7.3.1. EXPERIMENTO EN UMBRÁCULO-----	118
7.3.2. EXPERIMENTO EN CAMPO-----	119
8. EFECTO DE AGENTES QUELATANTES Y CLORURO DE CALCIO EN LA SUSCEPTIBILIDAD DE LA ACEITUNA-----	121
9. RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE CARBONATO CÁLCICO EN EL SUELO, CALCIO EN ACEITUNAS Y LA SUSCEPTIBILIDAD A <i>COLLETOTRICHUM</i> SPP.-----	123
10. DISCUSIÓN-----	124

**CAPÍTULO V. EVALUACIÓN EN CAMPO DE FÚNGICIDAS, SALES DE CALCIO Y  
EXTRATOS VEGETALES PARA EL CONTROL DE LA ANTRACNOSIS DEL OLIVO  
CAUSADA POR *COLLETOTRICHUM* SPP.**

1. INTRODUCCIÓN-----	132
2. MATERIALES Y METODOS-----	135
2.1. CAMPOS EXPERIMENTALES-----	135
3. EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA DE LA ENFERMEDAD-----	136
4. TRATAMIENTOS-----	137
5. ANALISIS DE LOS DATOS-----	137
6. RESULTADOS-----	141
7. DISCUSIÓN-----	146
8. CONCLUSIONES-----	150
<b>DISCUSIÓN GENERAL-----</b>	<b>160</b>
<b>CONCLUSIONES-----</b>	<b>164</b>



<b>Cap. Figuras</b>	<b>Página</b>
<p>1 Síntomas de la Antracnosis del olivo causado por <i>Colletotrichum</i> spp. A)- Aceitunas con podredumbre en el área peduncular. B)- Aceituna momificada. C)- Desecación y muerte de ramos fructíferos. D)- Olivo severamente afectado de muerte de ramas junto a un olivo completamente podado (flecha) debido a la enfermedad-----</p>	12
<p>2 Ciclo de patogénesis de la Antracnosis del olivo causado por <i>Colletotrichum</i> spp.-----</p>	16
<p>3 Evolución de la incidencia (0-1) de aceitunas con infecciones visibles y latentes de <i>Colletotrichum</i> spp., en el T.M de Cabra, Córdoba, durante la campaña 2005/06 en los cvs: A)- Hojiblanca (susceptible). B)- Picudo (susceptible) y C)- Picual (resistente)-----</p>	18
<p><b>I</b></p> <p>4 Relación lineal entre la tasa de maduración del fruto (días<sup>-1</sup>) y la incidencia final (0-1) de aceitunas afectadas por <i>Colletotrichum</i> spp.; en los cvs. A)- Hojiblanca (susceptible), B)- Picudo (susceptible) y C)- Picual (resistente)-----</p>	19
<p>5 Relación entre precipitaciones e incidencia de aceitunas afectadas por <i>Colletotrichum</i> spp.; durante 2005, 2006 y 2007 en el T.M de Cabra. A)- Precipitación acumulada (mm) en primavera-verano, otoño e invierno. B)- Aceitunas afectadas (%) en los cvs. Hojiblanca (susceptible), Picudo (susceptible), Picual (resistente)-----</p>	19
<p>6 Aceite de oliva colorado (Izq.) procedente de aceitunas afectadas por <i>Colletotrichum</i> spp. Junto aceite virgen extra (Dcha) procedente de aceitunas sanas-----</p>	29
<p>1 Frequency distribution by category of susceptibility in 384 olive cultivars in the World Olive Germplasm Bank of Córdoba (Spain)-----</p>	60
<p><b>II</b></p> <p>2 Frequency distribution by branch dieback in 384 olive cultivars in the World Olive Germplasm Bank of Córdoba (Spain)-----</p>	60
<p>3 Linear correlation between fruit-rot incidence and dieback severity in olive trees of 384 cultivars in the World Olive Germplasm Bank of Córdoba (Spain)-----</p>	61

		Página
1	Inoculación de raíces de plántulas de olivo y acebuche con una suspensión de conidios de <i>Colletotrichum godetiae</i> (izq). Plántulas inoculadas y trasplantadas en perlita húmeda (drcha)-----	82
2	Área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) de frutos de 45 genotipo de acebuche y 3 cultivares inoculados con <i>Colletotrichum godetiae</i> . El punto representa la media de 102 frutos y las barras la desviación estándar-----	84
3	Aislamiento de <i>Colletotrichum</i> spp., de endocarpios (izq.) y semillas (drcha.) procedentes de aceitunas momificadas-----	85
4	Micelio de <i>Colletotrichum</i> en la cavidad de la semilla del hueso de aceituna-----	86
5	Semillas de olivo con acérvulos y conidios de <i>Colletotrichum</i> junto a semillas sanas (Izq.) y semillas germinadas y afectadas por el patógeno junto a semillas germinadas y sanas (drcha.)-----	88
<b>III</b>		
6	Porcentaje de tejidos de aceituna colonizados por <i>Colletotrichum godetiae</i> durante el proceso de infección. Aceitunas inoculadas de los cvs. Frantoio (resistente) y Hojiblanca (susceptible) en envero (superior) y verde-amarillentas (inferior). Las columnas representan la media de 25 trozos de fruto y las barras la desviación estándar	88
7	Efecto de la inoculación de raíces de olivo y acebuche con una suspensión de conidios de <i>Colletotrichum godetiae</i> en el peso del sistema radicular (mg), la severidad de síntomas (0-3) y el número de pares de hojas nuevas. Las columnas representan la media de 25 plántulas y las barras la desviación estándar-----	91
8	Efecto de la inoculación de raíces de olivo y acebuche con una suspensión de conidios de <i>Colletotrichum godetiae</i> en el peso del sistema radicular (seco y fresco) y de la planta (mg), y el número de pares de hojas nuevas. Las columnas representan la media de 25 plántulas y las barras la desviación estándar-----	92



		Página
1	Inhibición relativa del crecimiento (IRC) micelial del aislado Col – 104 de <i>Colletotrichum godetiae</i> sobre medio PDA con distintas concentraciones de sales de calcio. Cada concentración evaluada representa el valor medio de 3 repeticiones-----	119
2	Características morfológicas de <i>Colletotrichum godetiae</i> . A) Conidios sin germinar. B) Conidios germinados mostrando el tubo germinativo. B) Conidios germinados mostrando el tubo germinativo y el apresorio-----	120
3	A) Inhibición relativa de la germinación de los conidios (IRG). B) Inhibición relativa de la formación de apresorios (IRAP) de aislados Col-104 y Col-121 de <i>Colletotricum godetiae</i> , causada por distintos compuestos de calcio-----	121
4	Efecto del cloruro de calcio en la severidad de síntomas de la Antracnosis causada por <i>Colletotrichum godetiae</i> en aceitunas del cv. Arbequina tratadas semanalmente durante tres periodos-----	123
5	Efecto del cloruro de calcio en el Área Bajo Curva de Progreso de la Enfermedad (ABCPE) de la Antracnosis causada por <i>Colletotrichum godetiae</i> en aceitunas del cv. Arbequina. Se diferenciaron tres tratamientos de las aceitunas: tratadas con Ca y lavadas (Lavadas), tratadas con Ca y no lavadas (No lavadas) y sin tratar con Ca y lavadas (Testigo).--	124
6	Evolución de la incidencia (%) de aceitunas cv. Hojiblanca tratadas e inoculadas con <i>Colletotrichum godetiae</i> . Cada columna se representa la media de 75 aceitunas y las barras representan la desviación estándar-----	125
7	Aceitunas del cv. Hojiblanca sumergidas en Cl <sub>2</sub> Ca e inoculadas (izqda) y aceitunas sumergidas en EDDHA e inoculadas con <i>Colletotrichum godetiae</i> (drcha)-----	126
8	Evolución de la incidencia (%) de aceitunas cv. Hojiblanca tratadas e inoculadas con <i>Colletotrichum godetiae</i> . Cada columna se representa la media de 75 aceitunas y las barras representan la desviación estándar-----	126
9	Infecciones latentes (%) de <i>Colletotrichum</i> spp. en 27 olivares del cv. Arbequina-----	127
10	Relación entre la severidad de síntomas de Antracnosis, y el contenido de calcio inoculados con <i>Colletotrichum godetiae</i> . La severidad de síntomas esta expresada por el Área Relativa Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (ARBCPE)-----	128

IV

		Página
1	A. Síndrome de podredumbre de frutos causado por <i>Colletotrichum</i> spp. en olivo cv Hojiblanca. B. Desecación de ramas en un olivo cv. Hojiblanca causada por <i>Colletotrichum</i> spp. C. Aplicación del tratamiento en la finca “La Fuente Rosa”. D. Incubación de aceitunas del cv. Hojiblanca para la detección de infecciones latentes-----	145
2	Progreso temporal de la severidad de síntomas causada por <i>Colletotrichum</i> spp. en olivos del cv. Hojiblanca en la finca “La Fuente Rosa” durante el otoño de 2006. Los puntos representan el valor medio de la severidad de síntomas de 6 árboles tratados con distintos fungicidas (Tabla 1)-----	146
3	Número de frutos afectados por <i>Colletotrichum</i> spp., en olivo cv. Hojiblanca tratados con diferentes fungicidas (Tabla 1) en la finca “La Fuente Rosa” en diferentes épocas del año 2007. Las barras representan la media de aceitunas de 7 árboles. Barras con la misma letra no difieren significativamente ( $P = 0,05$ ) según el test LSD protegido de Fisher-----	148
4	Área bajo la curva progreso de la enfermedad (ABCPE) de aceitunas del cv. Hojiblanca tratadas con distintos fungicidas (Tabla 1) y sales de calcio en la finca “La Fuente Rosa” en distintas épocas del año 2007 e inoculadas con el aislado Col-133 de <i>Colletotrichum acutatum</i> . Las barras representan la media de 200 aceitunas por tratamiento. Barras con la misma letra no difieren significativamente ( $P = 0,05$ ) según el test LSD protegido de Fisher-----	149
5	Porcentaje de frutos afectados por <i>Colletotrichum</i> spp. del cv. Picudo tratados con distintos fungicidas y productos de origen biológico en el campo experimental “Las Minas” de la estación experimental del IFAPA de Cabra. Los frutos fueron evaluados en condiciones controladas de laboratorio. Las barras representan la media de 800 aceitunas. Barras con la misma letra no difieren significativamente ( $P = 0,05$ ) según el test LSD protegido de Fisher-----	151

Cap.	Tabla	Página
	1 Países en los que se ha descrita la Antracnosis del Olivo-----	10
	2 Resistencia de cultivares de olivo a la Antracnosis causada por <i>Colletotrichum</i> spp.-----	23
<b>I</b>	3 Características físico-químicas y sensoriales de las diferentes categorías de aceite de oliva-----	28
	4 Efecto de la incidencia % de aceituna cv. Sinopolese afectadas por <i>Colletotrichum</i> en la calidad del aceite-----	30
	5 Contenido en esteres alquílicos de los ácidos grasos de aceites obtenidos de aceitunas con diferentes grados de deterioro-----	31
	1 Rating scale values and average and interval of percentage of olive fruit affected by anthracnose-----	62
	2 Incidence of anthracnose in five olive cultivars in the World Olive Germplasm Bank of Córdoba during 1997-98, 2005-06 and 2006-07-----	63
<b>II</b>	3 Origin, age and susceptibility to anthracnosis of the olive cultivars evaluated in the World Olive Germplasm Bank of Córdoba (Spain)-----	64
	4 Disease reaction of five selected olive cultivars inoculated with <i>Colletotrichum acutatum</i> <sup>a</sup> .-----	65
	5 Fruit-rot incidence and dieback severity in 384 cultivars in the World Olive Germplasm Bank of Córdoba (Spain)-----	66
	1 Plántulas de olivo y acebuche inoculadas mediante inmersión del sistema radicular en una suspensión de conidios de <i>C. godetiae</i> ----	82
<b>III</b>	2 Efecto del método de desinfestación en el aislamiento de <i>Colletotrichum</i> spp. de 100 semillas de olivo-----	87
	3 Porcentaje de aislamiento de <i>Colletotrichum</i> de radículas de semillas de olivo procedentes de aceitunas con síntomas o no de Antracnosis-----	89

Cap.	Tabla	Página
	1 Aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. estudiados-----	105
	2 Compuestos de calcio evaluados por su actividad antifúngica-----	106
	3 Productos y dosis utilizadas para evaluar la inhibición del crecimiento micelial y germinación de conidios de <i>Colletotrichum godetiae</i> -----	107
<b>IV</b>	4 Análisis de la turba utilizada-----	111
	5 Análisis de caliza activa, pH, calcio y humedad en suelos y aceitunas de 27 olivares con características edafoclimáticas distintas-----	117
	6 Datos de los parámetros analizados de aceitunas tratadas (julio-octubre) y no tratadas con cloruro de calcio del cv. Arbequina-----	122
	7 Datos de los parámetros analizados de aceitunas tratadas y no tratadas (campo) con cloruro de calcio del cv. Arbequina-----	124
<b>V</b>	1 Productos fungicidas y sales de calcio evaluados durante los años 2006 y 2007 para el control de Antracnosis en olivos de la variedad Hojiblanca en la finca “La Fuente Rosa”, situada en el término municipal de La Rambla, Córdoba-----	143
	2 Productos fungicidas y extractos vegetales, evaluados durante los años 2009 y 2010 para el control de Antracnosis en olivos del cv. Picudo en la finca "Las Minas" situada en el IFAPA de Cabra, Córdoba-----	144

## INTRODUCCIÓN

El olivo (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*) es uno de los primeros cultivos leñosos domesticados que se encuentra ampliamente distribuido por varias regiones del mundo. De forma natural ocupa las orillas del Mar Mediterráneo y se ha extendido en zonas de clima mediterráneo del hemisferio sur como Argentina, Australia, Chile y Sudáfrica (Zohary, 1994; FAO, 2012). En España, el cultivo del olivo se conoce desde la época del Imperio Romano, aunque su expansión ha sido durante los siglos de civilización hispano-árabe, sobre todo en el valle del Guadalquivir (Cherifi, 2007). Actualmente, el olivar en España ocupa una superficie de unos 2.6 millones de ha donde aproximadamente 60% se sitúa en Andalucía (MARM, 2010).

El término “Repilos” hace referencia a las principales enfermedades aéreas fúngicas, que afectan al olivo, entre las que se destacan el Repilo, causada por *Spilocaea oleaginea*; el Emplomado, debido a *Pseudocercospora cladosporioides*, y la Antracnosis o Aceituna jabonosa, causada por varias especies del género *Colletotrichum*. La Antracnosis es la enfermedad más importante de la aceituna (Andrés, 1991; Trapero y Blanco, 2008; Moral *et al.*, 2009c; Cacciola *et al.*, 2012) y es la enfermedad que más perjudica la calidad organoléptica del aceite (García, 1995; 1998; García *et al.*, 1997a; Iannotta *et al.*, 1999; Mincione *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2008). Los mayores daños económicos son especialmente en regiones húmedas donde se cultivan variedades susceptibles como en el (Algarve) sur de Portugal, sur de la Provincia de Córdoba o las zonas del Bajo Ebro y Montsiá en Cataluña.

Uno de los métodos de control de la Antracnosis del olivo y más eficaces, es la utilización de cultivares resistentes. La resistencia varietal, combinada con otros métodos de control como químico, permite incrementar la producción agrícola y el equilibrio de cosechas entre años. La variabilidad de resistencia/susceptibilidad de los cultivares de olivo y la necesidad de evaluar la colección del Banco Mundial de Germoplasma (OWGB) localizado en Córdoba, ha permitido establecer métodos de evaluación en condiciones controladas y de campo de Andalucía, donde se han registrado graves epidemias (Moral *et al.*, 2008; Moral y Trapero, 2009). Las evaluaciones observadas mostraron una gradación continua desde cultivares de olivo extremadamente susceptibles hasta muy resistentes, aunque se presentaron limitaciones desde la identificación de los cultivares o la confusión entre síntomas causados por

distintos patógenos (Mateo-Sagasta, 1968; Moral *et al.*, 2005). A esto, se suman otros factores que condicionan la resistencia de los cultivares como la madurez del fruto, la interacción especie de *Colletotrichum* – cultivar o la existencia de grupos de virulencia o razas del patógeno (Moral y Trapero, 2009b; Xaviér *et al.*, 2010).

Con el interés de conocer la resistencia del olivo silvestre o acebuche, se desarrollaron estudios con técnicas moleculares que permitieron distinguir tres grupos genéticos, el olivo cultivado, el olivo silvestre o acebuche (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*) y formas ferales del “olivo cultivado” (Muñoz-Díez, 2008; Belaj *et al.*, 2010). En este, caso se evaluaron la resistencia/susceptibilidad de 45 genotipos de acebuchinas seleccionados con características moleculares de la variedad botánica y los cultivares de referencia “Frantoio, Picual” resistentes y “Hojiblanca” susceptible, donde se observaron que los genotipos de acebuche fueron más resistentes a la Antracnosis que las aceitunas de los cultivares Picual y Hojiblanca, pero similar en resistente que las aceitunas del cultivar Frantoio. Además se cultivaron en medio PDAac semillas y endocarpios de aceitunas asintomáticas y sintomáticas del cultivar Hojiblanca y se detectaron micelio en el interior del hueso y el patógeno fue aislado del endocarpio y de la semilla. Por otro lado, semillas desnudas se sometieron a un proceso de estratificación para la germinación y desarrollo de la radícula e incubadas 45 días (Santos-Antunes *et al.*, 2005) donde se realizaron aislamiento de semillas sintomáticas y asintomáticas, así como se trataron las semillas que mostraron necrosis radicular. También se estudió la capacidad del patógeno en causar infecciones en el sistema radicular de plántulas de olivo y acebuche, donde causó síntomas como de marchitez generalizada, el abarquillamiento de las hojas y la muerte de la yema apical. Para la dinámica y seguimiento de infecciones, se realizaron aislamientos a lo largo de 21 días de incubación para evaluar como el patógeno alcanzaba y se establecía en la semilla de la aceituna.

Los frutos con una concentración adecuada de calcio, mejoran su capacidad de almacenamiento al incrementar la resistencia de los tejidos vegetales (Hirschi, 2004). La aplicación de compuestos cálcico pueden mejorar el control de la Antracnosis causando un bajo impacto ambiental, incluso aplicados en hojas, frutos y suelo, reducen la severidad de síntomas de numerosas enfermedades de importancia como la Alternaría del manzano (Biggs *et al.*, 1993), la Mancha gris de los cítricos (Mondal y Timmer, 2003), o el Oídio de la vid (Gadoury *et al.*, 1994). En olivo se observaron graves

epidemias de Antracnosis asociadas a suelos ácidos de la sierra norte de Sevilla y el Algarve portugués (Moral y Trapero, 2009). En este caso, se evaluaron el efecto de calcio en el crecimiento micelial y germinación de conidios, la resistencia sobre aplicaciones exógenas en la aceituna en condiciones controladas y de campo, aplicaciones de agentes quelatantes y de cloruro de calcio en la resistencia/susceptibilidad del fruto, así como, la relación entre la concentración de carbonato cálcico en el suelo, calcio en aceitunas y la susceptibilidad/resistencia a *Colletotrichum* spp., buscando establecer una relación entre éste y la resistencia a la Antracnosis.

Las prácticas culturales como la poda de ramas internas, los marcos de plantación estrechos que favorecen la ventilación muestran ser medidas muy eficaces a la Antracnosis, además de eliminar las ramas muertas y aceitunas momificadas de los árboles. La estrategia de control es adelantar la recolección por la susceptibilidad y la madurez de la aceituna (Andrés, 1991; Graniti *et al.*, 1993; Moral *et al.*, 2008; Trapero *et al.*, 2009; Cacciola *et al.*, 2012). A pesar de que la aplicación de fungicidas cúpricos es la medida de control más utilizada para las enfermedades del olivo y en particular para la Antracnosis, (Martelli y Piglionica, 1961; Graniti y Laviola, 1981; Graniti *et al.*, 1993; Pérez, 2011), que suponen un gasto anual de unos 200 millones de euros al sector oleícola español (Trapero *et al.*, 2009). En este trabajo se evaluaron diferentes fungicidas, hidróxido de cobre, sulfato de cobre, oxiclورو de cobre, sulfato tribásico de cobre, piraclostrobin, trifloxistrobin, kresoxim-metil, tebuconazol, las mezclas hidróxido de cobre/kresoxim-metil, hidróxido de cobre/mancozeb y oxiclورو/trifloxistrobin; las sales de calcio, cloruro de calcio y hidróxido de calcio; y los productos biológicos, jabón potásico y extractos vegetales y cítricos, para establecer las bases para el uso más racional de los productos fungicidas aplicados contra la Antracnosis del olivo.

El presente trabajo se incluye dentro del proyecto de excelencia AGR08-3635 de la Junta de Andalucía y los proyectos, AGL2004-7495 y AGL2008-1683 del Ministerio de Economía y Competitividad y supone una continuación de las investigaciones llevadas a cabo por el grupo de investigación de Patología Agroforestal sobre la Antracnosis del olivo, en que sus objetivos concretos son:





**OBJETIVOS CONCRETOS:**

1. Revisar la información sobre la Antracnosis del olivo y su efecto en la calidad del aceite. (Capítulo I).
2. Evaluar las variedades, de las parcelas del Banco Mundial de Germoplasma de Olivo (OWGB), situadas en la finca “Alameda del Obispo”, de Córdoba. (Capítulo II).
3. Estudiar la resistencia de genotipos de acebuche y la transmisión de *Colletotrichum* spp. a la semilla. (Capítulo III).
4. Estudiar el efecto de tratamientos de calcio sobre la respuesta a la enfermedad de varios cultivares. (Capítulo IV).
5. Evaluar en condiciones de campo el efecto de diferentes fungicidas contra la Antracnosis del olivo. (Capítulo V).



## LA ANTRACNOSIS DEL OLIVO Y SU EFECTO EN LA CALIDAD DEL ACEITE

### 1. INTRODUCCIÓN

El olivo (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*) es miembro de la familia Oleaceae junto a unas 600 especies entre las que se encuentran el aligustre (*Ligustrum*), fresno (*Fraxinus*) y jazmín (*Jasminun*). Dentro de la especie *O. europea* se insertan distintas subespecies como *laperrinei*, *cuspidata*, *guanchita*, *marroccana* y *cersiformis* (Green, 2002), aunque su correcta ubicación filogenética está en continuo cambio. El olivo es una especie que de forma natural ocupa las orillas del Mar Mediterráneo, aunque de la mano del hombre ha colonizado zonas de clima mediterráneo del hemisferio sur como Argentina, Australia, Chile y Sudáfrica (Zohary, 1994; FAO, 2012).

El acebuche u olivo silvestre (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*), es la variedad botánica más próxima al olivo cultivado y de la cual procede. En general, se acepta que el olivo se domesticó mediante selección automática de los individuos más sobresalientes de acebuche en el Oriente Medio durante la Edad del Bronce, hace unos 6000–5500 años (Zohary y Spiegel-Roy, 1975). Posteriormente, estas variedades primigenias fueron propagadas vegetativamente y distribuidas por ambas orillas del Mediterráneo por los fenicios y posteriores civilizaciones (Rallo, 2005). A pesar de ello, no se descarta que hubiesen procesos de domesticación secundarios en otros puntos alejados del Medio Oriente como España o el Magreb, aunque estas zonas están consideradas como centros de diversificación no domesticación (Besnard *et al.*, 2013). Actualmente, se calcula que existen 2.500 variedades de olivo distribuidas localmente (Caballero *et al.*, 2006) aunque unas pocas han colonizado un amplio rango de zonas agroclimáticas (Bronzini de Caraffa *et al.*, 2002).

El olivo es una de las fuentes más importante de aceite vegetal para el consumo humano. Varios estudios realizados entre los años 1950-1970 por el Dr. Keys y colaboradores asociaron la dieta mediterránea, y en particular el consumo de aceite de oliva, con el escaso número de fallecimientos por enfermedades cardiovasculares en la isla griega de Creta (38/10000 habitantes) comparado con otros países como Estados Unidos (773/10000 hab.). Esta diferencia se acentuaba aún más en el caso de Finlandia (1202/10000 hab.) cuyos habitantes tenían un nivel de consumo de grasas similar al de

los cretenses aunque mayoritariamente de origen animal (Keys *et al.*, 1952; Keys, 1970; Matalas *et al.*, 2001). El aceite de oliva ha sido declarado como un “alimento medicinal” por la Administración Americana de Alimentos y Medicamentos (FDA) debido a su efecto protector contra las enfermedades cardiovasculares uniéndose al grupo de alimentos medicinales junto a los frutos secos y los ácidos grasos omega-3 ([www.fda.gov](http://www.fda.gov)).

Entre las enfermedades aéreas que afectan al olivo destacan la Tuberculosis, causada por la bacteria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*; y sobre todo las enfermedades fúngicas Repilo, causada por *Spilocaea oleaginea*; Emplomado, causada por *Pseudocercospora cladosporioides*; y la Antracnosis o Aceituna jabonosa, causada por varias especies del género *Colletotrichum*. Mundialmente, la Antracnosis es la enfermedad más importante de la aceituna (Andrés, 1991; Trapero y Blanco, 2008; Moral *et al.*, 2009c; Cacciola *et al.*, 2012) y, sin duda alguna, la enfermedad que causa un mayor deterioro de la calidad del aceite (García, 1995; 1998; García *et al.*, 1997a; Iannotta *et al.*, 1999; Mincione *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2008).

El género *Colletotrichum* está compuesto por unas 600 especies que afectan a más de 3000 especies de plantas silvestres y cultivadas (Farr y Rossman, 2013). Entre ellas, numerosos cultivos leñosos de zonas tropicales, subtropicales y templadas como almendro (*Prunus dulcis*), arándano (*Vaccinium* spp.), cítricos (*Citrus* spp.), mango (*Magnifera indica*), melocotonero (*Prunus persica*) y, frutos con alto contenido lipídico como los del aguacate (*Persea americana*) (Prusky *et al.*, 2000). Este trabajo pretende ayudar al sector oleícola a mejorar el conocimiento y control de la enfermedad del olivo que perjudica más seriamente a la calidad organoléptica del aceite. Además, actualiza el conocimiento científico de la enfermedad y establece futuras líneas de colaboración entre especialistas en calidad de aceite y fitopatólogos.

## 2. HISTORIA, IMPORTANCIA Y DISTRIBUCIÓN DE LA ANTRACNOSIS

La Antracnosis fue descrita científicamente por primera vez en Portugal por J.V. d'Almeida quien publicó una breve descripción de la enfermedad y del agente causal (Almeida, 1899). Posteriormente, la Antracnosis ha sido descrita en la mayoría de los Países oleícolas del mundo de ambos hemisferios (Tabla 1).

En diversos tratados clásicos de agricultura, como los libros de Columela (siglo I), Plinio (siglo I) y Alonso de Herrera (siglo XVI), se menciona la necesidad de adelantar la recolección en los años lluviosos, reducir el atrojado y eliminar las aceitunas que estén en mal estado para obtener aceite de buena calidad. Aunque, es el agrónomo sevillano Buñol-Jayr (siglo XI) quien hace alusión clara a la Aceituna Jabonosa al recomendar procesos especiales de elaboración de aceite “*si las aceitunas enferman y se debilitan hasta convertirse en una especie de jabón*”. (Trapero, 2004).

En Italia, es probable que la Antracnosis fuera introducida en el sur desde Albania o Grecia durante la Segunda Guerra Mundial originando gravísimas epidemias durante la década de 1950–60 que afectaron a unas 5000 ha en la región de Apulia (Ciccarone, 1950; Graniti y Laviola, 1981). Posteriormente, la enfermedad se extendió en toda la región llegando a afectar a unas 40.000 ha detectándose en las islas de Cerdeña y Sicilia (Ciccarone, 1950; Saponaro, 1953; Martelli, 1959, 1960; Graniti *et al.*, 1993). Durante estas epidemias, el patógeno afectó entre el 10 y 65% de las aceitunas de diversas zonas de la Apulia causando importantes defoliaciones en el cv. Cellina di Nardò (Martelli, 1959; 1960). A partir de 1960 se observó una mengua de la enfermedad que se ha atribuido a la disminución de las precipitaciones, al incremento de tratamientos cúpricos y a un cambio en la virulencia del hongo, al mezclarse las poblaciones patogénicas de olivo con otras locales menos virulentas pero mejor adaptadas (Graniti *et al.*, 1993).

**Tabla 1.** Países en los que se ha sido descrita la Antracnosis del Olivo.

País	Año	Fuente
Portugal	1899	Almedia, 1899
Francia	1911	Citado por Bompeix <i>et al.</i> , 1998
España	1914	González-Fragoso, 1914
Rusia	1929	Citado por Farr y Rossman, 2013
Uruguay	1932	Citado por Farr y Rossman, 2013
Grecia	1934	Biraghi, 1934
Japón	1935	Hemi y Murata, 1935
EE.UU	1942	Pontis y Hansen, 1942
Brasil	1943	Farr y Rossman, 2013
Argentina	1943	Citado por Fernández, 1973
Italia	1950	Ciccarone, 1950
Sudáfrica	1956	Gorter, 1956
Australia	1962	Sergeeva <i>et al.</i> , 2008 <sup>a</sup>
China	1986	Margarita <i>et al.</i> , 1986
India	1990	Sharma y Kaul, 1990
Yugoslavia (antigua)	1999	Vucinic <i>et al.</i> , 1999
Montenegro	2002	Latinovic y Vucinic Z, 2002
Ucrania	2004	Citado por Farr y Rossman, 2013
Túnez	2010	Rhouma <i>et al.</i> , 2010

En Portugal, se han descrito varias epidemias severas asociadas al cultivar dominante del país ‘Galega vulgar’. A finales de los años 60, las pérdidas debidas a la Antracnosis superaban los 3 millones de dólares en este país (Coutinho, 1968). Años más tarde, (Azevedo, 1976), calculó que en zonas húmedas de este país el patógeno causaba unas pérdidas próximas al 50% de la producción de aceite. En estudios realizados entre 2004–2006, Talhinhos *et al.* (2009) describen una prevalencia de la enfermedad entre el 65 y 100% y una incidencia del 22% en los años más secos (2004 y 2005), y del 85% en el año más lluvioso (2006), en los olivares de la región del Algarve.

En España, la Antracnosis ocupa el 5º lugar en importancia entre las plagas y enfermedades del olivo, produciendo unas pérdidas medias anuales del 2.6% de la

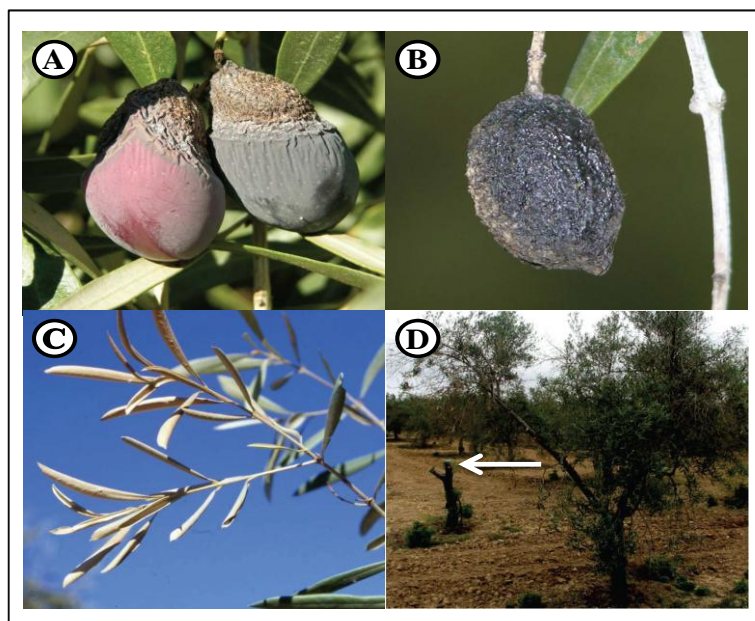
cosecha, aunque éstas alcanzan un 40% en las zonas húmedas del sur y noreste peninsular donde predominan cultivares susceptibles y la enfermedad es endémica (Andrés, 1991; García, 1998; Trapero y Blanco, 2008). Recientemente, hemos estimado que las pérdidas alcanzan los 75.2 millones de euros anuales en España (Moral *et al.*, 2009c). En Andalucía, cabe destacar que el cv. Picual, predominante en la principal provincia oleícola, Jaén, muestra un elevado nivel de resistencia por lo que las epidemias están asociadas a zonas productoras dominadas por los cvs. Hojiblanca, Lechín de Sevilla o Picudo. Aunque carecemos de información precisa, no se registraron epidemias severas de Antracnosis en esta región durante el periodo 1970–1995 coincidiendo con una menor pluviometría. En 1997, el otoño especialmente cálido y lluvioso propició una grave epidemia de esta enfermedad que, en el sur de Córdoba y norte de Málaga, afectó a la totalidad de las aceitunas con la consiguiente pérdida de producción y de calidad de la cosecha (Trapero y Blanco, 2008). Por último, en la campaña oleícola 2012/13, condicionada por la elevada pluviometría y las temperaturas suaves, el patógeno ha afectado gravemente a olivares de las provincias de Córdoba, Málaga y Sevilla.

### 3. SINTOMATOLOGÍA

Los síntomas más característicos de la Antracnosis se manifiestan en las aceitunas maduras aunque pueden observarse también en los frutos verdes dependiendo de la resistencia del cultivar, presión de inóculo y condiciones ambientales. Las aceitunas afectadas presentan manchas deprimidas de color ocre o pardo, que crecen y pueden llegar a coalescer, dando lugar a su podredumbre parcial o total. Los ataques se producen en cualquier parte de la aceituna, aunque suelen ser más frecuentes en su zona apical o basal (Martelli, 1960; Mateo-Sagasta, 1968). En aceitunas sin síntomas externos pueden observarse un deterioro del mesocarpio alrededor del hueso que adquiere una tonalidad parda (Agosteo *et al.*, 2005).

Cuando el tiempo es húmedo, sobre las lesiones aparecen los órganos fructíferos asexuales del hongo (conidiomas acervulares o acérvulos), que emiten una sustancia gelatinosa rosa-anaranjada que contiene gran cantidad de esporas (conidios) y que le da el nombre de Aceituna jabonosa (Mateo-Sagasta, 1968; Moral y Trapero, 2009b; (Figura 1A). Si baja la humedad y la temperatura se incrementa, las aceitunas afectadas se momifican (Mateo-Sagasta, 1968; Graniti *et al.*, 1993; (Figura 1B). El patógeno

coloniza el pedúnculo desde el fruto infectado causando su caída (Oliveira *et al.*, 2005) aunque algunas momias pueden quedar en la copa de los árboles entre campañas. El patógeno también puede colonizar las semillas de la aceituna a través del canal peduncular del hueso causando su podredumbre o afectando a la germinación y desarrollo de las plántulas que, en ocasiones, pueden morir (*damping-off*) (Moral *et al.*, 2009a).



**Figura 1.** Síntomas de la Antracnosis del olivo causado por *Colletorichum* spp. **A)**- Aceitunas con podredumbre en el área peduncular. **B)**- Aceituna momificada. **C)**- Desección y muerte de ramos fructíferos. **D)**- Olivo severamente afectado de muerte de ramas junto a un olivo completamente podado (flecha) debido a la enfermedad.

El segundo síndrome asociado a la Antracnosis es la muerte de ramas. Inicialmente, las hojas muestran zonas necróticas que pueden avanzar hasta afectar a su totalidad. Las hojas marchitas terminan por abarquillarse y quedan adheridas a las ramitas dando lugar a un puntisecado generalizado que puede progresar hasta afectar a ramas principales (Martelli, 1960; Zachos y Makris, 1963; Azevedo, 1976; Moral *et al.*, 2009c; (Figura 1C). Es frecuente observar árboles que han sido severamente afectados por este segundo síndrome y sometidos a una poda intensa buscando la formación de una nueva copa sana (Figura 1D). Este segundo síndrome se ha asociado a la producción de toxinas del patógeno en las aceitunas afectadas y que se movilizan al resto del árbol (Moral *et al.*, 2009c). En España, el patógeno puede ser aislado de hojas infectadas aunque no llega a



desarrollar acérvulos en condiciones de campo (Moral *et al.*, 2009c) y sólo lo hace cuando las hojas están sometidas a elevada humedad durante varias semanas en condiciones artificiales. Por el contrario, acérvulos en hojas sí se han observado en condiciones naturales en Australia (Sergeeva *et al.*, 2008b), Grecia (Zachos y Makris, 1963) e Italia (Martelli, 1961). El patógeno también causa infecciones de inflorescencias y frutos jóvenes. Estos ataques tienen escasa o nula importancia sobre la cosecha y sólo se han registrado en Sudáfrica (Gorter, 1956), España (Moral *et al.*, 2009c) y Australia (Sergeeva *et al.*, 2008a).

#### 4. ETIOLOGÍA

El hongo causante de la Antracnosis fue descrito por Almeida en 1899 con el nombre de *Gloeosporium olivarum* Alm. Estudios posteriores confirmaron que esta especie era indistinguible de otras especies de *Gloeosporium* siendo reclasificadas por Von Arx en la especie compleja *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. *et al.*, Sacc. (Arx, 1970). El género *Colletotrichum* (teleomorfo *Glomerella*), contiene aproximadamente 900 especies (Sutton, 1980). En la clasificación tradicional de los hongos, *Colletotrichum* se encuadra en la división *Eumycota*, subdivisión *Deuteromycotina*, clase *Coelomycetes* y orden *Melanconiales* (Ainsworth, 1973). Si se clasifica éste atendiendo a su teleomorfo *Glomerella*, se inserta en el subreino *Dikarya*, phylum *Ascomycota*, subphylum *Pezizomycotina*, clase *Sordariomycetes* y orden *Phyllachorales* (Hibbet *et al.*, 2007).

En 1986 se detectó la especie *C. acutatum* Simmonds ex Simmonds atacando al olivo en China (Margarita *et al.*, 1986) y cuya principal característica distintiva era poseer una mayor proporción de conidios fusiformes y estrechos. Posteriormente, esta especie se describió afectando a olivos en India (Mugnai *et al.*, 1993), España (Martín y García, 1999), Italia (Agosteo *et al.*, 2000) y Portugal (Talhinhas *et al.*, 2005). La presencia de *C. acutatum* en estas zonas plantea la cuestión sobre si se trata de una introducción reciente, o bien si han existido diferentes variantes o especies del patógeno bajo la denominación común de *G. olivarum* o *C. gloeosporioides*.

El incremento del potencial discriminante de las técnicas moleculares ha permitido diferenciar grupos genéticamente homogéneos dentro de las especies originales *C. acutatum sensu lato (s.l.)* y *C. gloeosporioides s.l.* Posteriormente, estos grupos han

sido reclasificados como especies nuevas aceptando que las especies de hongos están constituidas por grupos filogenéticamente próximos debido a que las formas intermedias (“híbridos”) tienden a desaparecer por una menor adaptación. Tras diversas reclasificaciones, análisis moleculares recientes utilizando varias regiones del ADN han permitido discernir 31 y 22 especies pertenecientes a los complejos *C. acutatum s.l* y *C. gloeosporioides s.l.*, respectivamente (Damm *et al.*, 2012; Weir *et al.*, 2012).

De las 31 especies del complejo *C. acutatum s.l.*, seis han sido asociadas con la Antracnosis del olivo: *C. acutatum sensu stricto (s.s)*, *C. fiorinae*, *C. godetiae* (= *C. clavatum*), *C. nymphaeae*, *C. rhombiforme* y *C. simmondsii* (Damm *et al.*, 2012). La importancia de estas especies en olivo varía sustancialmente con la región olivarera, destacando *C. godetiae* en Andalucía (Moral *et al.*, 2012) y en Italia (Faedda *et al.*, 2011) *C. nymphaeae* en Portugal (Talhinhas *et al.* 2005) y *C. acutatum s.s.* en Australia y Sudáfrica (Damm *et al.*, 2012). Aunque en Portugal la especie *C. nymphaeae* es dominante y la única que se encuentra en muchos olivares, es frecuente encontrar esta especie junto a las restantes especies descritas (Talhinhas *et al.*, 2009). En Andalucía, la especie mayoritaria es *C. godetiae* aunque hemos detectado algunos aislados de *C. nymphaeae* en la provincia de Huelva. La especie *C. godetiae* fue identificada en Italia como *C. clavatum*, debido a la morfología claviforme de los conidios (Faedda *et al.*, 2011), pero *C. godetiae* es el nombre actualmente aceptado por los micólogos (Damm *et al.*, 2012).

De las 22 especies del complejo *C. gloeosporioides s. l.*, seis han sido asociadas con la Antracnosis del olivo: *C. aenigma*, *C. gloeosporioides s.s.*, *C. kahawe* sbp. *ciggaro*, *C. queenslandium*, *C. siamense* y *C. theobromicola* (Schena *et al.*, 2013). La importancia de estas especies en olivar es poco conocida al haberse descritas recientemente. El complejo *C. gloeosporioides s.l.* está ampliamente distribuido en todas las regiones olivareras, pero su virulencia en aceituna parece menor que la de *C. acutatum* (Martín *et al.*, 2002), habiéndose postulado como un patógeno secundario (Talhinhas *et al.*, 2009). No obstante, se han observado ataques severos en campo por *C. gloeosporioides s.l.* y los estudios de Schena *et al.* (2013) han puesto de manifiesto que algunas especies, como *C. gloeosporioides s.s.* y *C. theobromicola*, resultan altamente virulentas incluso en aceitunas verdes. En este estudio se identificó también la especie *C. karstii*, del complejo *C. boninense s.l.*, como patógeno de aceitunas aunque de escasa virulencia.

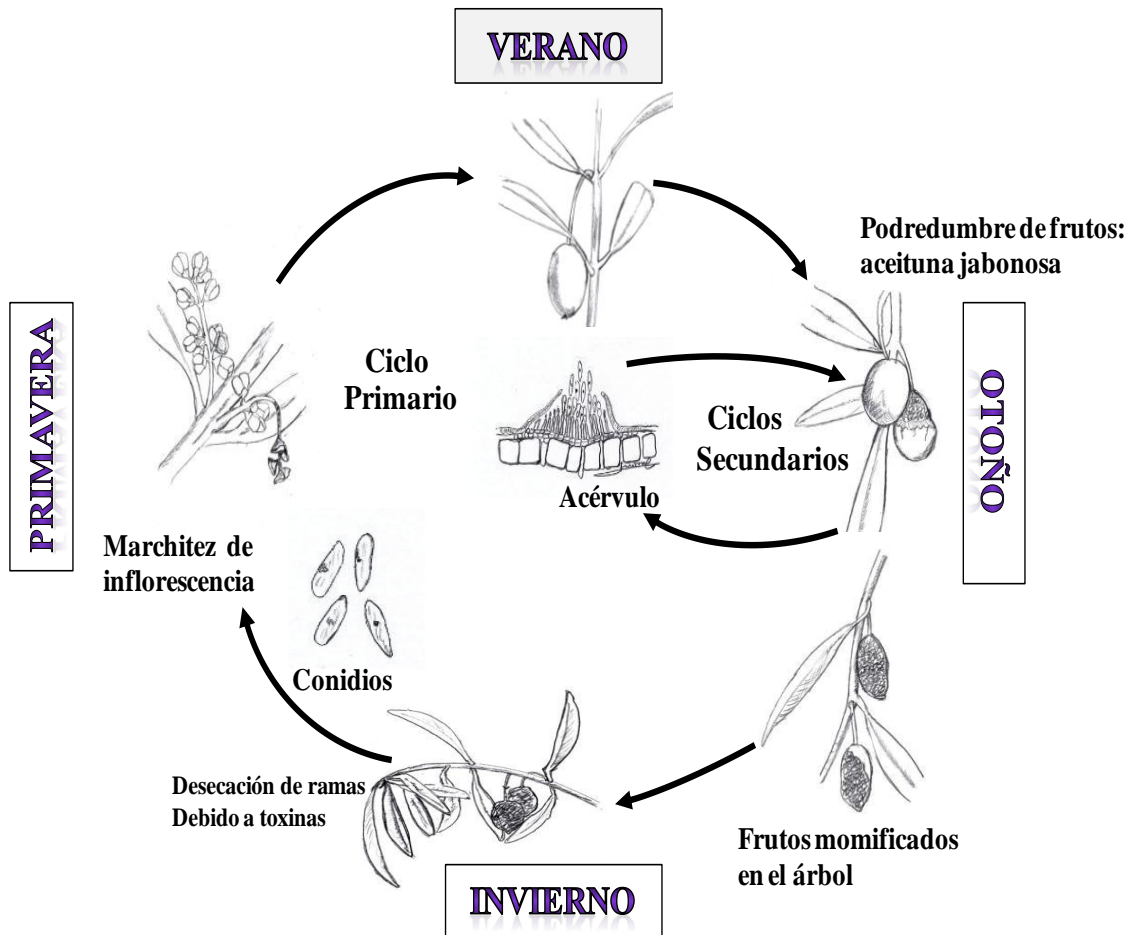
En ninguno de los estudios donde se aborda la influencia de la Antracnosis en la calidad del aceite de oliva se especifica la especie concreta de *Colletotrichum* involucrada (García *et al.*, 1997a; García, 1998; Carvalho *et al.*, 2008; Iannotta *et al.*, 1999), de ahí que la influencia de factor especie sea desconocida.

## 5. CICLO BIOLÓGICO Y EPIDEMIOLOGÍA

La principal fuente de inóculo de la Antracnosis son las aceitunas momificadas que quedan en la copa del árbol (Mateo-Sagasta, 1968; Graniti *et al.*, 1993; Moral y Trapero, 2012). Durante el otoño, el patógeno produce una enorme cantidad de conidios (>20. dos conidios/momia) en éstas aunque varía con el cultivar y las condiciones ambientales, siendo las óptimas 20–25 °C y 96 h de humectación (Moral y Trapero, 2012). Los conidios son dispersados a corta distancia por las salpicaduras de las gotas de lluvia de ahí la distribución en focos de la enfermedad. La dispersión de inóculo a larga distancia se debe a la distribución de plantones infectados o contaminados (Cacciola *et al.*, 2012; Moral *et al.*, 2012) y a la posible dispersión por la mosca del olivo (Agosteo *et al.*, 2006) o la maquinaria de recolección. El teleomorfo del patógeno, cuyas ascosporas podrían dispersarse por el viento a larga distancia, no se ha detectado en condiciones de campo (Cacciola *et al.*, 1996).

Los frutos momificados que caen al suelo, y no se recolectan, se degradan debido a microorganismo secundarios o son enterrados, por lo que participan escasamente en la generación de inóculo si son comparados con las momias aéreas (Graniti *et al.*, 1993; Moral y Trapero, 2012). En las zonas donde se dan ataques en ramas y hojas, Australia o el sur de Italia, el hongo sobrevive y puede producir inóculo en éstas, por lo que el ciclo de patogénesis en estos lugares es diferente al que resulta de considerar exclusivamente los ataques al fruto (Martelli, 1960; Cacciola *et al.*, 1996; Seergeva *et al.*, 2008b).

La infección primaria ocurre durante la primavera pudiendo afectar a las inflorescencias aunque en condiciones de campo tienen escasa repercusión (Seergeva *et al.*, 2008a; Moral *et al.*, 2009c). El patógeno también puede causar infecciones latentes (asintomáticas) en las aceitunas desde sus primeros estadios fenológicos (Moral *et al.*, 2009c).



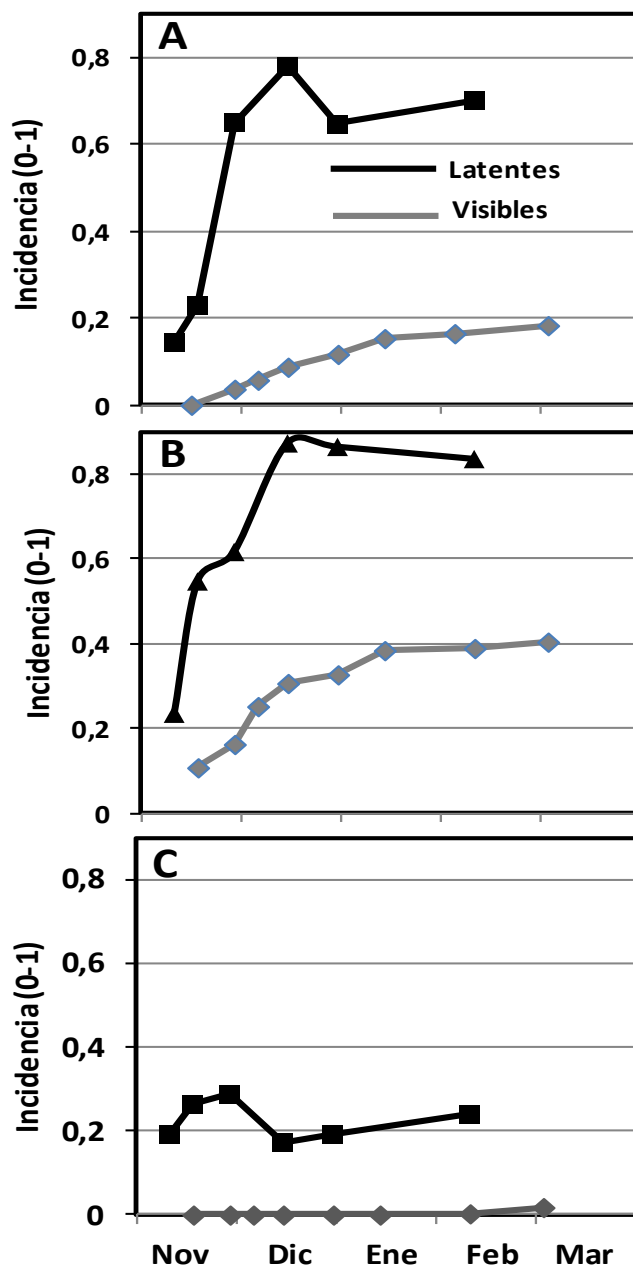
**Figura 2.** Ciclo de patógenesis de la Antracnosis del olivo causado por *Colletotrichum* spp.

Durante el otoño, cuando las aceitunas infectadas cambian de color, el patógeno se reactiva causando la típica podredumbre de aspecto jabonoso (Cacciola *et al.*, 2012; Moral *et al.*, 2009c). No se conocen los procesos que desencadenan la salida de latencia del patógeno, aunque las aceitunas disminuyen su resistencia con la madurez (Moral *et al.*, 2008) debido a la dinámica de compuestos fenólicos del fruto. Las aceitunas momificadas que quedan en el árbol pueden producir inoculo a lo largo de todo el año cuando se hidratan. Así, tras las primeras lluvias de otoño se inicia la producción masiva de conidios en las momias. Una vez que el fruto está maduro, la Antracnosis muestra un periodo de incubación de 4–10 días en los cultivares susceptibles (Mateo-Sagasta, 1968; Graniti *et al.*, 1993; Moral *et al.*, 2008) por lo que se considera una enfermedad policíclica (Graniti *et al.*, 1993; Trapero y Blanco, 2008; Cacciola *et al.*, 2012; Figura 2). Aun así, en condiciones de campo suelen producirse pocos ciclos

secundarios ya que cuando la temperatura media baja ( $\leq 15^{\circ}\text{C}$ ) las infecciones se mantienen latentes (Moral y Trapero, 2012). Finalmente, el patógeno produce una toxina (Aspergillomarasma B) en los frutos momificados que se moviliza causando el segundo síndrome: la desecación y muerte de ramas (Ballio *et al.*, 1969; Bousquets *et al.*, 1971; Bottalico, 1973; Moral *et al.*, 2009c).

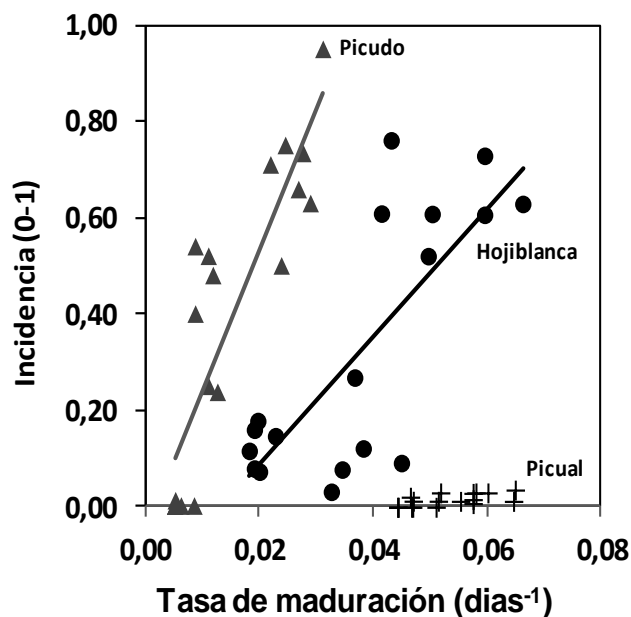
La temperatura óptima para la germinación de los conidios es  $20\text{--}24^{\circ}\text{C}$  (Oliveira *et al.*, 2005; Moral *et al.*, 2011) aunque en algunos aislados Italianos se sitúa entre  $25\text{--}30^{\circ}\text{C}$  (Loprieno y Tenerini, 1960). La germinación, a su vez, es dependiente de la humedad relativa siendo necesaria agua libre o humedad próxima a saturación ( $>98\%$ ) (Graniti *et al.*, 1993; Moral *et al.*, 2011). La infección de las aceitunas se produce a temperaturas comprendidas entre los  $10$  y  $30^{\circ}\text{C}$ , mostrando un óptimo entre  $17\text{--}20^{\circ}\text{C}$ , y se incrementa con el periodo de humectación (Graniti *et al.*, 1993; Oliveira *et al.*, 2005; Moral *et al.*, 2012). La especie de *Colletotrichum* también influye en la infección y desarrollo de síntomas siendo *C. simmondsii* menos virulento que *C. godetiae* a temperaturas  $\leq 20^{\circ}\text{C}$  (Moral *et al.*, 2012).

En Andalucía, la epidemia suele iniciarse durante la primera quincena de noviembre y se incrementa de forma exponencial hasta diciembre cuando la temperatura media baja ( $\leq 15^{\circ}\text{C}$ ). Este hecho limita la salida de latencia del patógeno, de ahí que sea frecuente que la incidencia de aceitunas con infecciones latentes sea entre dos y tres veces superior al de aceitunas con lesiones visibles (Moral y Trapero, 2012; Figura 3). A su vez, la incidencia final está linealmente relacionada con la tasa de maduración de las aceitunas, por lo que los síntomas se adelantan en olivos de cultivares susceptibles cuyas aceitunas maduran más rápido (Moral y Trapero, 2012; Figura 4). Este hecho está condicionado por la epidemia del año anterior, ya que si ésta causó la seca de ramos fructíferos, los olivos muestran menor carga de aceituna adelantando su maduración. Ello, junto a la presencia de mayor número de momias (inoculo), explicaría la existencia de epidemias concatenadas entre años (Moral *et al.*, 2008). Finalmente, la severidad de la epidemia está relacionada con las precipitaciones acaecidas durante el otoño y no muestra relaciones con las ocurridas durante la primavera (Moral y Trapero, 2010; Figura 5).

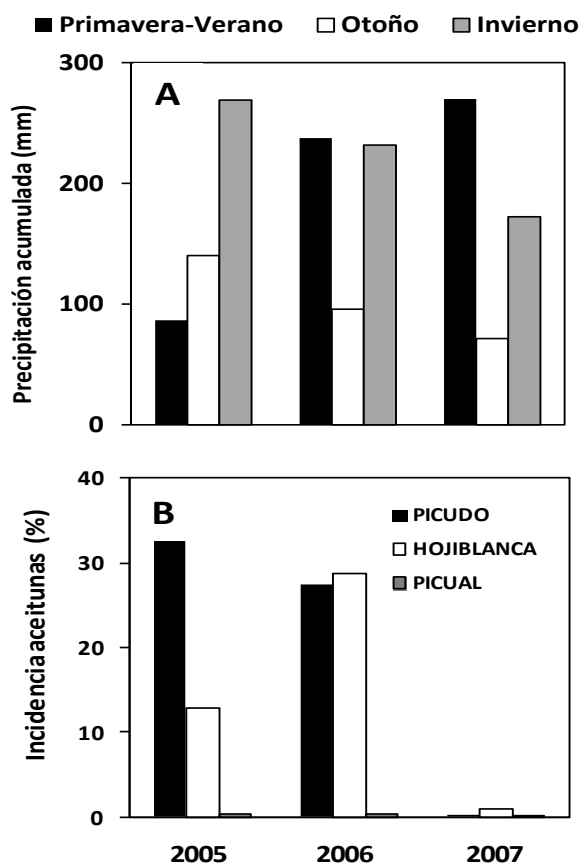


**Figura 3:** Evolución de la incidencia (0-1) de aceitunas con infecciones visibles y latentes de *Colletotrichum* spp.; en el T.M de Cabra, Córdoba, durante la campaña 2005/06 en los cvs: **A)**- Hojiblanca (susceptible). **B)**- Picudo (susceptible) y **C)**- Picual (resistente).

En trabajos realizados en Andalucía con el cultivar moderadamente susceptible ‘Arbequina’, hemos podido observar el desarrollo epidémico de la enfermedad progresa más rápido en las plantaciones en seto (1904 árboles ha<sup>-1</sup>) que las plantaciones de alta densidad (204 a 816 árboles ha<sup>-1</sup>) (Moral *et al.*, 2012).



**Figura 4:** Relación lineal entre la tasa de maduración del fruto (días<sup>-1</sup>) y la incidencia final (0-1) de aceitunas afectadas por *Colletotrichum* spp.; en los cvs. **A)**- Hojiblanca (susceptible), **B)**- Picudo (susceptible) y **C)**- Picual (resistente).



**Figura 5:** Relación entre precipitaciones e incidencia de aceitunas afectadas por *Colletotrichum* spp., durante 2005, 2006 y 2007 en el T.M de Cabra. **A)**- Precipitación acumulada (mm) en primavera-verano, otoño e invierno. **B)**- Aceitunas afectadas (%) en los cvs. Hojiblanca (susceptible), Picudo (susceptible), Picual (resistente).

Este hecho se debe principalmente a las condiciones de microclimáticas en el interior del seto (baja ventilación, elevada humedad relativa y tiempo de humectación) y al escasa distancia entre fuentes de inóculo (aceitunas momificadas), por lo que se recomienda incrementar los tratamientos cúpricos en este tipo de plantaciones.

Otros factores que influyen en el desarrollo epidémico de la enfermedad son: la presencia de microorganismos antagonistas (Segura, 2003), la presencia de heridas causadas por la mosca del olivo (Mateo-Sagasta, 1968; Graniti *et al.*, 1993; Moral *et al.*, 2008), y los tratamientos fungicidas realizados (Roca *et al.*, 2007). Además hemos podido observar que existe una relación negativa entre susceptibilidad a la Antracnosis y concentración de calcio en el fruto (Moral y Trapero, 2009b), lo que explicaría la severas epidemias que se desarrollan en suelos ácidos de Portugal o de las provincias de Sevilla y Huelva.

## 6. CONTROL

La resistencia es uno de los métodos de control más eficaces y respetuoso medioambientalmente, puede combinarse con otros métodos de control como el biológico o químico y ha permitido incrementar la producción agrícola amortiguando la fluctuación de la cosecha entre años. En el olivo, desafortunadamente, la resistencia a plagas o enfermedades no se ha considerado como una medida de control debido en gran parte a la falta de una información rigurosa sobre la resistencia/susceptibilidad de los cultivares. En el caso de la Antracnosis del olivo, la resistencia y susceptibilidad genética son los extremos de una variable continua resultado de la interacción entre los mecanismos utilizados por el hongo para producir infección y enfermedad y los mecanismos, pasivos o activos, de resistencia de la planta (Moral y Trapero, 2009b).

En condiciones controladas, la resistencia del olivo a *Colletotrichum* spp. se expresa como: retraso en la colonización de los tejidos de la aceituna (Gomes *et al.*, 2009), incremento del periodo de latencia, disminución de la tasa máxima de desarrollo de síntomas (Moral *et al.*, 2008) y reducción de la cantidad de inóculo que produce el patógeno (Moral y Trapero, 2012). En campo, se observa una disminución de la tasa máxima de desarrollo de síntomas y un incremento del periodo de latencia, siendo frecuente que las infecciones queden asintomáticas durante periodos prolongados en los cultivares resistentes (Moral y Trapero, 2012; Figura 3).



Actualmente podemos encontrar desde cultivares de olivo altamente susceptibles a cultivares con resistencia completa (Tabla 2), aunque esta información presenta limitaciones, ya que en la mayoría de los casos está basada en observaciones de campo siendo frecuentes las contradicciones debido a errores de identificación de los cultivares y a la confusión entre síntomas causados por distintos patógenos (Mateo-Sagasta, 1968; Moral *et al.*, 2005). Un factor crítico que condiciona la resistencia de los cultivares es el estado de madurez del fruto, ya que cuando la aceituna está sobremadura todos los cultivares resultan susceptibles y apenas existen diferencias entre ellos. Otros factores que pueden influir en la resistencia son la interacción especie de *Colletotrichum*-cultivar o a la existencia de grupos de virulencia o razas del patógeno (Moral y Trapero, 2009b; Xaviér *et al.*, 2010).

La evaluación de los 15 primeros cultivares obtenidos en el programa de mejora UCO-IFAPA de Córdoba también ha permitido encontrar una amplia respuesta a la Antracnosis, obteniéndose dos cultivares resistentes ('UC 07-60' y 'UC 10-30'), aunque ninguno mejora las características de resistencia del parental 'Frantoio' (Moral *et al.*, 2015).

Por último, cabe comentar que tanto en las prospecciones de campo como en las inoculaciones artificiales hemos podido observar que la mayoría de los genotipos de acebuche muestran una elevada resistencia a la Antracnosis. Esta selección natural hacia resistencia puede deberse al hecho de que el patógeno afecta a la viabilidad de la semillas (Xaviér *et al.*, 2012) o la capacidad de dispersión de las aceitunas sintomáticas que podrían ser rechazadas por las aves frugívoras.

Las prácticas culturales que favorezcan la ventilación de los olivos, como la poda de las ramas internas y evitar los marcos de plantación excesivamente estrechos, muestran elevada eficacia en la Antracnosis del olivo. Además, es aconsejable la eliminación de las ramas muertas y de las aceitunas momificadas de la copa de los árboles. Cabe destacar, que la estrategia de control más efectiva es adelantar la recolección, debido a que la susceptibilidad de la aceituna aumenta con su estado de madurez, acortándose el tiempo necesario para que se desarrollen ciclos secundarios (Andrés, 1991; Graniti *et al.*, 1993; Moral *et al.*, 2008; Trapero *et al.*, 2009; Cacciola *et al.*, 2012). Este hecho, ha llevado a algunos autores a recomendar la utilización de cultivares de maduración tardía (Bompeix *et al.*, 1988).

En cultivares susceptibles a la Antracnosis, cuando no se recogen en verde, el control efectivo de la enfermedad requiere el empleo de fungicidas. A pesar de que se redujo un 43% el consumo de fungicidas cúpricos a nivel europeo durante 1993-2003 en favor de otros compuestos como los carbamatos, quinolinas o estrobilurinas (Eurostat, 2007). La aplicación de fungicidas cúpricos sigue siendo la medida de control más utilizada para la enfermedades del olivo y en particular, para la Antracnosis (Martelli y Piglionica, 1961; Graniti y Laviola, 1981; Graniti *et al.*, 1993; Pérez, 2011), y suponen un gasto anual de unos 200 millones de euros al sector oleícola español (Trapero *et al.*, 2009). Esta prevalencia de los productos cúpricos se debe a que el uso de fungicidas orgánicos en postfloración está muy limitado ya que existe la posibilidad de que se absorban en el aceite del fruto al ser en su mayoría liposolubles (Moral y Trapero, 2009b).

**Tabla 2:** Resistencia de cultivares de olivo a la Antracnosis causada por *Colletotrichum* spp.

Cultivar	Reacción <sup>a</sup>	Cultivar	Reacción <sup>a</sup>
Abou-salt	R <sup>3(b)</sup>	Manzanilla del centro	S <sup>16</sup>
Alameño de Marchena	R <sup>16</sup>	Manzanilla del piquito	S <sup>16</sup>
Alfajara	S <sup>16</sup>	Megaritiki	R <sup>16</sup>
Arauco	R <sup>3</sup>	Manzanilla del centro	S <sup>16</sup>
Arbequina	S <sup>2,4</sup> M <sup>7-14-16-19</sup>	Meski	S <sup>16</sup>
Arbosana	R <sup>16-19</sup>	Mele	S <sup>4</sup>
Ascolana tenera	S <sup>4</sup>	Mission	S <sup>4-19</sup> M <sup>4</sup>
Azara	S <sup>20</sup>	Mixan	M <sup>4</sup>
Azeiteira	R <sup>5</sup>	Moraiolo	S <sup>4</sup>
Azeitoneira	M <sup>4</sup>	Morisca	S <sup>4-15-16</sup>
Barnea	S <sup>4-19-20</sup>	Morona	S <sup>19</sup>
Barouni du nord	S <sup>4</sup>	Morrudo	S <sup>4-7</sup>
Bical de Castelo Branco	M <sup>4</sup>	Morrut	S <sup>4-7</sup> M <sup>16-19</sup>
Bico de corno	S <sup>2</sup>	Negrinha	M <sup>4</sup> R <sup>5</sup>
Blanqueta	S <sup>16</sup> M <sup>4-5</sup> R <sup>15-19</sup>	Nera di Oliena	M <sup>4</sup>
Blanqueta de Elvas	R <sup>5</sup>	Nabali	R <sup>16</sup>
Branquita	R <sup>4</sup>	Nevadillo blanco de Lucena	S <sup>14</sup>
Callosina	S <sup>16</sup> R <sup>14</sup>	Negral	M <sup>14</sup>
Canetera	R <sup>7</sup>	Nocettara Etnea	S <sup>8</sup>
Carolea	S <sup>19</sup>	Ocal	S <sup>16-19</sup>
Carrasquenha	R <sup>4-5</sup>	Oglierola di Lecce	M <sup>13</sup>
Cassanese	M <sup>19</sup>	Orebetana	R <sup>4</sup>
Cellina di Nardo	S <sup>12</sup> M <sup>7</sup>	Ottobratica	S <sup>12-19</sup>
Changlot real	S <sup>14-16</sup>	Ottobratica rotondella	S <sup>4</sup>
Cipressino	S <sup>16</sup>	Pajarero	M <sup>19</sup> R <sup>16</sup>
Cobrançosa	S <sup>4-5-16</sup>	Patronet	M <sup>7</sup>
Conserva de Elvas	S <sup>4-5</sup>	Pendolino	S <sup>11</sup>
Coratina	M <sup>4</sup>	Pequeña de Casa Ibañez	R <sup>16</sup>
Cordovil de Castelo Branco	S <sup>5</sup> M <sup>4</sup>	Perillo de Jaén	R <sup>16</sup>
Cornezuelo de Jaén	R <sup>14</sup>	Picholine	S <sup>3</sup> R <sup>16</sup>
Cornicabra	S <sup>14-16</sup>	Picholine marrocaïne	R <sup>16</sup>
Cornicabra de Mérida	S <sup>16</sup>	Picual	R <sup>5-14-16-19</sup>
Cornicabra parda	R <sup>14</sup>	Picual de Estepa	S <sup>16</sup>
Corniola	S <sup>11-19</sup>	Picual de hoja clara	S <sup>16</sup>

Dolce Agogia	R <sup>16</sup>	Picudo	S <sup>3-14-16</sup>
Empeltre	M <sup>3-14</sup> R <sup>7-16-19</sup>	Picudo de Montoro	S <sup>16</sup>
Farga	S <sup>14-16</sup> M <sup>7</sup>	Queen	S <sup>10</sup>
Frantoio	S <sup>2-11</sup> M <sup>4</sup> R <sup>5-15-16-19</sup>	Racimal de Jaén	S <sup>16</sup>
FS-17	R <sup>4</sup>	Razzola	R <sup>19</sup>
Galega grada de Serpa	S <sup>4</sup>	Rasti	S <sup>4</sup>
Galega vulgar	S <sup>2-5-16</sup>	Redondal	S <sup>4-5</sup>
Gerbou du nord	R <sup>4</sup>	Redondil	S <sup>4</sup>
Gordal sevillana	S <sup>14-16</sup>	Picual de hoja clara	S <sup>16</sup>
Hojiblanca	S <sup>14-16</sup>	Redondilla de Logroño	S <sup>14</sup>
Itrana	S <sup>4-19</sup>	San Mauro	S <sup>12</sup>
Kalamata	S <sup>20</sup>	Sant`Agostino	S <sup>4</sup>
Kalinjot	M <sup>4</sup>	Santomauro	R <sup>19</sup>
Kokërr Madh Berati	S <sup>4</sup>	Sevillenca	S <sup>7-16</sup>
Kokërr Madh Elbasani	M <sup>4</sup>	Sikitita (= Chiquitita)	S <sup>19</sup>
Koroneiki	R <sup>16-19</sup>	Sinopolese	S <sup>6-12-19</sup>
Leccino	S <sup>11-16</sup> M <sup>19</sup> R <sup>19</sup>	Tempranilla	R <sup>14</sup>
Lechín de Granada	S <sup>16</sup>	Tonda di Strongoli	S <sup>4</sup>
Lechín de Sevilla	S <sup>14-16</sup>	Tonda Iblea	S <sup>4-8-9</sup>
Leucocarpa	M <sup>4</sup>	Tondina	S <sup>19</sup>
Limli	M <sup>4</sup>	Verdeal Alentejana	M <sup>4</sup> R <sup>5</sup>
Llumet	R <sup>7</sup>	Verdial de Badajoz	S <sup>3</sup>
Maçanilha algarvia	S <sup>4-5</sup>	Verdial de Huevar	S <sup>16</sup> R <sup>14</sup>
Manzanilla cacereña	M <sup>16</sup>	Verdial de Vélez-Málaga	S <sup>14</sup> M <sup>16</sup>
Manzanilla de agua	S <sup>16</sup>	Vernina (=Ciparsiota)	S <sup>12</sup>
Manzanilla de Carmona	M <sup>3</sup>	Villalonga	S <sup>16</sup> M <sup>19</sup>
Manzanilla de Guadix	S <sup>16</sup>	Zarzaleña	R <sup>14</sup>
Manzanilla de Hellín	R <sup>16</sup>	Zarzariega	S <sup>14</sup>
Manzanilla de Jaén	S <sup>16</sup> R <sup>14</sup>	Zutica	M <sup>4</sup> R <sup>3</sup>
Manzanilla de Sevilla	S <sup>2-3-7-14-16-20</sup>	UC 13A6	S <sup>20</sup>
Manzanilla de Tortosa	S <sup>16</sup>		

<sup>a</sup>R = Resistente, M = Moderadamente susceptible, S = Susceptible.

<sup>b</sup>Agosteo *et al.*, 2005<sup>1</sup>; Andrés, 1991<sup>2</sup>; Barranco *et al.*, 2000<sup>3</sup>; Bartolini y Cerreti, 2013<sup>4</sup>; Branz-Sobreiro, 1992<sup>5</sup>; Cacciola *et al.*, 1996<sup>6</sup>; **García *et al.*, 1997b**<sup>7</sup>; Graniti, 1953<sup>8</sup>; Graniti, 1954<sup>9</sup>; Hemi y Murata, 1935<sup>10</sup>; **Loprieno y Tenerini, 1960**<sup>11</sup>; Martelli, 1960<sup>12</sup>; Martelli, 1961<sup>13</sup>; **Mateo-Sagasta, 1968**<sup>14</sup>; Montioroni, 1956<sup>15</sup>; Moral *et al.*, 2005<sup>16</sup>; **Moral *et al.*, 2006**<sup>17</sup>; **Moral y Trapero, 2009a**<sup>19</sup>; Penninsi *et al.*, 1993<sup>19</sup>; **Pontis y Hansen, 1942**<sup>19</sup>; Sergeeva, 2011<sup>20</sup>

Nota: Los trabajos en los que las evaluaciones se realizaron en condiciones de inoculación artificial aparecen marcadas en negrita.

Los compuestos cúpricos además poseen numerosas características que han motivado su amplia utilización como: elevada persistencia, amplio espectro de acción contra hongos y bacterias, capacidad de interferir con las toxinas del patógeno y precio bajo, aunque en los últimos años se ha incrementado su precio sustancialmente (Pennissi *et al.*, 1993, Roca *et al.*, 2007). Asimismo, y aunque se han utilizado en el olivar prácticamente desde su descubrimiento por Millardet (1885), no se han detectado poblaciones de hongos tolerantes, al tratarse de fungicidas “*multisitio*” que afectan a la membrana celular de las esporas sustituyendo otros iones ( $H^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ ) esenciales y afectando a las esterasas de membrana. En el interior de la espora, los iones  $Cu^{2+}$  se fijan sobre diversos grupos químicos (imidazoles, carboxilos, fosfatos, sulfhidrilos, aminas o hidroxilos) presentes en numerosas proteínas y afectan a la cadena de respiración mitocondrial (Montag *et al.*, 2006; Borkow y Gabbay, 2009).

En un trabajo realizado durante 4 años en Andalucía, se identificó el inicio del otoño como el momento óptimo de control de la enfermedad (Pérez, 2011) coincidiendo con las recomendaciones realizadas en Italia (Graniti *et al.*, 1993; Penninsi *et al.*, 1993; Prota, 1995). Debido a la enorme capacidad de dispersión y multiplicación del hongo y al carácter protector de los fungicidas cúpricos, los tratamientos otoñales deben realizarse antes de que se observe el primer fruto afectado en campo, repitiéndose en años lluviosos o con cultivares tardíos debido al lavado del cobre (Moral *et al.*, 2009b).

Por el contrario, los tratamientos otoñales no son necesarios en las zonas donde predominen cultivares resistentes a la Antracnosis, como es el caso de la provincia de Jaén donde domina el cv. Picual. Hasta el momento, los tratamientos primaverales han mostrado una eficacia limitada (Martelli y Piglionica 1961; Pérez, 2011) debido a la mayor importancia de las infecciones otoñales. Por ello, estos tratamientos sólo serían eficaces los años con primavera lluviosa, elevado inóculo en campo y otoño seco.

En general, los años con elevado inóculo en campo (años precedidos de epidemias de Antracnosis), condiciones climáticas favorables (otoño húmedo y cálido) para el desarrollo de la enfermedad y en los que las aceitunas adelanten su maduración (años de descarga), si los cultivares son susceptible al patógeno, es recomendable mantener protegido el fruto durante todo el otoño y adelantar la recolección. En el caso de que el cultivar sea de doble aptitud (mesa y aceite) podemos optar por el verdeo.

Los compuestos cúpricos que hemos evaluado (hidróxido de cobre, oxiclорuro de cobre y sulfato cuprocálcico) han mostrado una eficacia alta contra el patógeno a excepción del sulfato tribásico de cobre. A nivel experimental, también hemos observado una elevada eficacia del tebuconazol, aunque su uso está limitado a prefloración (Pérez, 2011). En Italia, Pennisi *et al.* (1993) observaron que el sulfato cuprocálcico permite un control mejor de la enfermedad que el bitertanol, hexaconazol, miclobutanil metiram y ziram. Resultados similares se obtuvieron en la India al comparar los compuestos cúpricos con distintos compuestos orgánicos (Sharma y Kaul, 1990). En el caso de las estrobilurinas, familia de fungicidas de más reciente incorporación al olivar, han sido escasamente investigadas contra la Antracnosis, aunque existen resultados que demuestran la eficacia de azoxistrobin en Italia (Agosteo *et al.*, 2007) y de trifloxistrobin en España (Pérez, 2011). Cabe destacar que se han observado buena eficacia de la mezclas de compuestos cúpricos y orgánicos, como en el caso de oxiclорuro de cobre y propineb o trifloxistrobin, o hidróxido cúprico y folpet (Pérez, 2011). Actualmente, el estudio de mezclas de ambos tipos de fungicidas, o la utilización de nuevos compuestos con baja concentración de cobre, son de especial interés ya que se espera una reducción importante de la cantidad cobre permitida que actualmente es de 6 kg/ha al año en la Unión Europea (EEC, 2007; Trapero *et al.*, 2009; Cacciola *et al.*, 2012).

Los compuestos cálcicos se están utilizando para control de la Antracnosis del manzano debido a que inhiben la actividad de enzimas excretadas por los patógenos y refuerzan la estructura de la pared celular de los tejidos del fruto (Rahman y Punja, 2007). En el caso del olivo, aún no hemos observado un efecto destacable de los compuestos de calcio (carbonato, cloruro, hidróxido, propinato y silicato) en el control de la enfermedad (Pérez, 2011). Aunque alguno de estos compuestos causan una inhibición de la formación de los apresorios, estructura fundamental para la infección de los conidios, próxima al 80% (Agalliu, 2009). Además, en condiciones naturales, se ha observado que el contenido de calcio en la aceituna esta positivamente relacionado con la resistencia que muestra al patógeno (Moral *et al.*, 2009b).

La lucha biológica no han sido empleada de forma comercial contra la Antracnosis del olivo, aunque en inoculaciones artificiales de aceitunas, un aislado fúngico de *Aureobasidium pullulans* y dos bacterianos, *Curtobacterium flaccumfaciens* y

*Paenibacillus polymyxa*, mostraron una capacidad de inhibición superior al 50% (Segura, 2003).

## 7. INFLUENCIA SOBRE LA CALIDAD DEL ACEITE

La obtención de un aceite de calidad es una premisa fundamental para cualquier olivicultor. Para ello, es necesario tener en cuenta los diferentes factores que pueden afectar a la calidad del producto final en cualquiera de sus etapas de producción. Los factores climatológicos, edafológicos, agronómicos y, especialmente, la recolección y la sanidad de la aceituna influyen notablemente en la calidad del aceite de oliva.

Los parámetros físico-químicos (acidez libre, índice de peróxidos, absorbancia ultravioleta K270 y K232, y esteres alquílicos), y sensoriales que permiten diferenciar las categorías comerciales del aceite de oliva virgen están recogidos en los reglamentos EEC 1991 y IOOC 2012 (Tabla 3). A su vez, los aceites de oliva de mayor calidad (vírgenes extras) se diferencian según la cantidad e intensidad de matices sensoriales tanto para el olfato como para el gusto.

En general, los aceites procedentes de aceitunas caídas muestran elevada acidez y deterioro de la calidad sensorial (Uceda *et al.*, 2008). Si las aceitunas caídas suponen un 5-10% del total de frutos, se produce un descenso notable de la calidad del aceite (Famiani *et al.*, 2002). El estado de madurez de la aceituna también tiene una marcada influencia en la calidad del aceite (Alba *et al.*, 2008). En general, el contenido en compuesto fenólicos se incrementa durante las primeras fases de maduración de la aceituna y disminuye posteriormente según una curva parabólica (Uceda *et al.*, 2008). Durante el la maduración, además, se suele producir un incremento del ácido linoleico y, en ocasiones, del oleico, mientras que los ácidos palmítico y esteárico tienden a disminuir causando un descenso de la relación monoinsaturados/poliinsaturados (Uceda *et al.*, 2008; Inglese *et al.*, 2011). Para establecer el momento óptimo de recolección se aconseja la realización de análisis periódicos de las aceitunas (Alba, 2008), aunque suele ser próximo al momento en el que la pigmentación está limitada a la epidermis (Inglese *et al.*, 2011). Por lo tanto, los sistemas de recolección que permitan una recolección de aceitunas en el momento óptimo de madurez de forma rápida, para evitar la sobre maduración y caída, y que no dañen su epidermis son los más aconsejados. Entre estos sistemas, podemos destacar los vibradores, tanto de tronco como manuales,

y la vendimiadoras utilizadas para los setos del olivar de alta densidad. Recientemente, Guerfel *et al* (2010; 2012) demostraron que este factor agronómico, el marco de plantación, también puede afectar a las características químicas (ácido oleico, hexanol, clorofila, carotenoides y fenoles totales) aunque estos estudios se realizaron en condiciones de secano en Túnez y con densidades comprendidas entre 51 y 156 árboles ha<sup>-1</sup>.

Una vez recogida la aceituna, los procesos de transporte, almacenamiento de las aceitunas, batido, centrifugación y almacenamiento del aceite también influyen marcadamente en la calidad del aceite (Alba, 2008).

**Tabla 3:** Características físico-químicas y sensoriales de las diferentes categorías de aceite de oliva.

Grados	Acidez (%)	P.V. (meq.0 <sub>2</sub> /Kg)	UV 270 nm	C. Organolépticas Intensidad Defecto; Frutado
Virgen extra	≤ 0,8	≤ 20	≤ 0,22	Defecto= 0 Frutado > 0
Virgen	≤ 2,0	≤ 20	≤ 0,25	0 < Defecto ≤ 3,5 Frutado > 0
Virgen Corriente <sup>a</sup>	≤ 3,3	≤ 20	≤ 0,30	3,5 < Defecto ≤ 6,0 0 < Defecto ≤ 3,5 y F = 0 Defecto > 3,5
Lampante	> 2,0 > 3,3 <sup>b</sup>	-----	-----	0 < Defecto ≤ 3,5 y F = 0 Defecto > 6,0 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Solo existe esta categoría en el Reglamento del COI T. 15/NC N°3 Rev.7

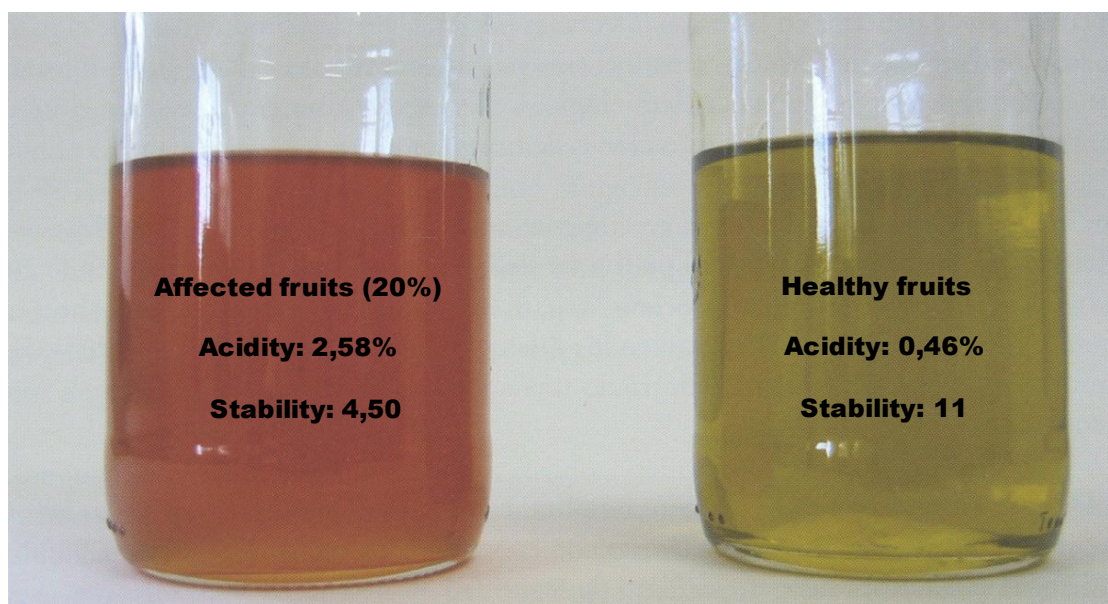
<sup>b</sup>Valor para dicha categoría en el Reglamento del COI T. 15/NC N°3 Rev. 7

La obtención de aceite de oliva calidad requiere la utilización de aceitunas sanas, es decir que no estén afectadas por insectos u organismos patógenos que les causen alteraciones (Runcio *et al.*, 2008). Entre los insectos, destaca la mosca del olivo que puede causar tanto pérdida de cosecha como de calidad del aceite, debido a la caída de aceitunas y a la galerías de las larvas en la pulpa de los frutos (Andrés, 1991). Una elevada infestación de mosca está asociada con incrementos de la acidez libre, de la absorbancia en el ultravioleta y del índice de peróxidos (Tamendjari *et al.* 2009; Mraicha *et al.*, 2010), así como una disminución de la estabilidad y contenido de compuestos fenólicos del aceite (Gómez-Caravaca *et al.* 2008; Tamendjari *et al.* 2009; Mraicha *et al.*, 2010).



En la mayor parte de los casos, los agentes biológicos que en última instancia deterioran la calidad del aceite son hongos filamentosos o levaduras que colonizan las galerías de las larvas de la mosca (Andrés, 1991).

Entre los organismos patógenos de las aceitunas destacan diversos hongos y principalmente las especies del género *Colletotrichum* (García *et al.*, 1997a; García, 1998). Estudios recientes han mostrado que aceitunas bien recogidas y procesadas producen aceites de inferior calidad a las procesadas de manera irregular, siendo sólo la diferencia entre ellas la incidencia en las primeras de frutos afectados por Antracnosis. Las especies de *Colletotrichum* causan la podredumbre y caída prematura de las aceitunas, lo que origina en el aceite un color rojizo (“aceites colorados”) característico (Fig. 6), aumento de la acidez y pésima calidad organoléptica, apareciendo los defectos de tierra y moho-húmedo-terroso (Mincione *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2008).



**Figura 6:** Aceite de oliva colorado (Izq.) procedente de aceitunas afectadas por *Colletotrichum* spp., junto aceite virgen extra (Dcha) procedente de aceitunas sanas (Foto de: Miguel Pastor).

En general, a medida que aumenta la incidencia de frutos afectados por Antracnosis, se produce simultáneamente una caída de la calidad de los aceites extraídos. Los aceites procedentes de aceitunas afectadas muestran aumento en el índice de peróxidos y, sobre todo, en la acidez libre (Iannotta *et al.*, 1999); y una disminución de la estabilidad oxidativa, del contenido de polifenoles y  $\alpha$ -tocoferol. De manera, que aceites

procedentes de aceitunas con una incidencia del 15-20% dejan de ser clasificados como aceites de oliva virgen extra y con una incidencia mayor del 40-45% no pueden ser clasificados como aceites vírgenes al mostrar un porcentaje de acidez  $> 0,8\%$  y  $2\%$ , respectivamente (Mincione *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2008).

Otro parámetro de caracterización del aceite afectado por la Antracnosis es la composición esterólica que puede impedir el cumplimiento de las normas de comercio internacional de los aceites de oliva. En cambio, la composición de ácidos grasos se mantiene más o menos estable (Iannotta *et al.*, 1999; Mincione *et al.*, 2004) (Tabla 4).

Recientemente, Runcio *et al.* (2008) han demostrado que los aceites procedentes de aceitunas afectadas por el patógeno muestran un incremento significativo en el contenido de aldehídos, principalmente heptanal, octanal y nonanal que atribuyen a las reacciones de descomposición de hidróxidos peróxidos que se forman durante la auto-oxidación del ácido oleico del aceite (Vichi *et al.*, 2003).

**Tabla 4:** Efecto de la incidencia (%) de aceitunas cv. Sinopolese afectados por *Colletotrichum* en la calidad del aceite.

Incidencia %	Acidez Libre %	Índice Peróxidos (meq. $O_2$ $kg^{-1}$ )	K232	K270	Estabilidad Oxidativa (h)	Fenoles Totales ( $mg\ kg^{-1}$ )	$\beta$ - Sitosterol (%)	Esteroles Totales ( $mg\ kg^{-1}$ )
0	0,45	4,16	1,40	0,13	11,00	299,7	93,9	3026
20	2,58	16,24	1,50	0,15	4,50	208,7	93,4	3443
40	6,43	33,14	1,75	0,19	2,00	139,7	91,6	4197
60	6,00	32,80	1,77	0,19	2,50	148,8	91,8	4400
100	8,38	42,73	2,06	0,25	1,50	133,4	90,8	4855

Fuente: Iannotta *et al.*, 1999

**Tabla 5:** Contenido con esteres alquílicos de los ácidos grasos de aceite obtenidos de aceitunas con diferentes grados de deterioro.

Muestra	Apilamiento (Días)	FAME (mg/kg)	FAEE (mg/kg)	FAPE (mg/kg)	FABE (mg/kg)
Inicial	0	24	18	n.d	n.d
1	14	24323	177703	434	905
2	28	24963	88925	380	693
3	42	30014	167783	735	1052
4	50	38923	278260	1027	1543

Fuente Pérez –Camino *et al.*, 2002.

Asimismo, la infección por *Colletotrichum* también afecta a los alcoholes alifáticos y terpénicos y los contenidos de ceras (Mincione *et al.*, 2004).

Por último, el contenido de esteres alquílicos de los ácidos grasos en los aceites obtenidos de aceitunas que han sufrido un proceso de degradación por apilamiento en condiciones húmedas durante un largo período aumenta considerablemente (Tabla 5). Por lo que cabe esperar que la incidencia de *Colletotrichum* spp., que produce un aumento de la acidez libre y del contenido de alcoholes alifáticos, origine un aumento por esterificación de los ácidos grasos y los alcoholes, de manera que posiblemente no sólo haya esteres metílicos y etílicos sino que se produzcan otros como propílicos y butílicos (Gómez-Coca *et al.*, 2012).

## 8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Aunque durante los últimos años se han realizado avances importantes en el conocimiento de la epidemiología y control de la Antracnosis del olivo, todavía quedan numerosas investigaciones por desarrollar para conseguir un control más eficaz y respetuoso medioambientalmente. Por ello, actualmente estamos trabajando en el desarrollo de un sistema de toma de decisiones con un entorno informático amigable para los olivicultores. Con este sistema se espera identificar los momentos óptimos de control de la enfermedad en función de las condiciones ambientales y de la resistencia del cultivar lo que derivaría en un ahorro sustancial de fungicidas.

En el caso de la influencia del patógeno en la calidad del aceite de oliva, y a pesar de sus nefastas consecuencias, las carencias de conocimiento son aún mayores. Creemos que son necesarios estudios que aborden la influencia de la incidencia y severidad de la infección sobre la calidad del aceite incluyendo, además de los parámetros tradicionales, como la acidez y el índice de peróxidos, otros como el contenido de esteres. Igualmente interesante sería estudiar el efecto del patógeno sobre la calidad de los aceites elaborados con aceitunas afectadas por el patógeno pero que aún no muestran síntomas visibles, es decir durante el proceso de infección latente. Por último, creemos esencial abordar el efecto varietal y etiológico en la calidad de los aceites procedentes de frutos afectados y la dinámica de degeneración de los aceites colorados. Afrontar estos trabajos requiere la colaboración necesaria de químicos del aceite y fitopatólogos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agalliu G. 2009. Evaluación de Fungicidas para el control de la antracnosis del olivo causada por *Colletotrichum acutatum*. Trabajo profesional fin de Máster, ETSIAM, Córdoba.
- Agosteo GE, Li Destri Nocosia, MG, Magnano di San Lio G, Frisullo S, Cacciola, SO. 2000. Characterization of the causal agent of olive Anthracnose in southern Italy. IV Symposium on Olive Growing, Bari (Italia).
- Agosteo GE, Macrí C, Cacciola, SO, Magnano di San Lio G. 2006. Olive fruit fly (*Bactrocera oleae*) is a vector of *Colletotrichum* sp. causing olive anthracnose. XIII Congresso SIPV. Foggia, (Italia).
- Agosteo GE, Macri C, Taccone P. 2005. Susceptibility of olive cv. Itrana to Anthracnose. *J. Plant Pathol.* 87, 287.
- Agosteo GE, Scolaro L, Previtera G. 2007. Non-conventional chemical control of olive anthracnose. Integrated protection of Olive Crops. *IOBC/WPRS Bull.* 30, 245-248.
- Ainsworth GC. 1973. Introduction and keys to higher taxa. In: Ainsworth GC, Sparrow FK, and Sussman AS (Eds). *The fungi: an advanced treatise*. Academic Press, Nueva York, 1-7.
- Alba J. 2008. Elaboración de aceite de oliva virgen. In Barranco D, Fernández-Escobar R, Rallo L. (Eds). *El cultivo de olivo*. Coedición Junta de Andalucía/Mundi-Prensa, Madrid, 657-697.
- Almeida MJV. 1899. La gaffa des olives en Portugal. *Bull. Soc. Mycol. Franc.* 15, 90-94.

- Andrés F. 1991. *Enfermedades y plagas del olivo*. 2ª Ed. Riquelme y Vargas Ediciones, S.L., Jaén.
- Arx von JA. 1970. A revision of the fungi classified as *Gloeosporium*. *Bibl. Mycol.* 24, 1-203.
- Azevedo AR. 1976. *A defesa sanitaria da oliveira em Portugal*. Instituto Nacional de Investigação Agrária, Oeiras, Portugal.
- Ballio A, Bottalico A, Bounocore V, Carilli, A, Di Vittorio V, Graniti A. 1969. Production and isolation of aspergillomarasmin B (lycomarasmic acid) from cultures of *Colletotrichum gloeosporioides* (*Gloeosporium olivarum*). *Phytopathol. Mediterr.* 8, 187-196.
- Barranco D, Cimato A, Fiorino P, Rallo L. Touzani A, Castañeda C, Serafín E, Trujillo I. 2000. *World catalogue of olive varieties*. International Olive Oil Council y Mundi-Prensa, Madrid.
- Bartolini G, Cerreti S. 2013. Olive germplasm (*Olea europaea* L.). <http://www.oleadb.it>. Consultado (26/04/2013).
- Besnard G, Khadari B, Navascués M, Fernández-Mazuecos M, El Bakkali A, Arrigo N, Baali-Cherif D, Bronzini de Caraffa V, Santoni S, Vargas P, Savolainen V. 2013. The complex history of the olive tree: from Late Quaternary diversification of Mediterranean lineages to primary domestication in the northern Levant. *Proc. R. Soc. B* doi:10.1098/rspb.2012.2833
- Biraghi A. 1934. Variazioni in ceppi di *Gloeosporium olivarum* Alm. di provenienze diverse. *Boll. R. Staz. Patol. Veg.* 14, 223-253.
- Bompeix G, Julio EVR, Phillips DH. 1988. *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spaulding et V. Schrenk, in Smith IM, Dunez J, Lelliot RA, Phillips DH, Archer SA, (Eds.) *European handbook of plant diseases*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England.
- Borkow G, Gabbay J. 2009. Copper, an ancient remedy returning to fight microbial, fungal and viral infections. *Curr. Chem. Biol.* 3, 272-278.
- Bottalico A. 1973. Qualche dato sperimentale sugli effetti fitotossici dell' aspergillomarasmina B associata a vari ioni metallici. *Phytopathol. Medit.* 12, 1-6.
- Bousquets JF, Vegh I, Pouteau-Thouvenot M, Barbier M. 1971. Isolement de l'aspergillomarasmine A de cultures de *Colletotrichum gloeosporioides*, agent pathogène de saules. *Ann. Phytopathol.* 3, 407-408.
- Branz-Sobreiro J. 1992. *Guia para a protecção fitosanitaria da oliveira*. Centro nacional de protecção de produção agrícola, Lisboa, Portugal.

- Bronzini de Caraffa V, Maury J, Gambotti C, Breton C, Bervillé A, Giannettini J. 2002. Mitochondrial DNA variation and RAPD mark oleasters, olive and feral olive from Western and Eastern Mediterranean. *Theor. Appl. Genet.* 104, 1209-1216.
- Bū 'l-Jayr (siglo XI). Kitab Al-Filāha. Tratado de Agricultura. Trad. J.M. Carabaza 1991, AECl, Madrid.
- Caballero JM, del Río C, Barranco D, Trujillo I. 2006. The olive world germplasm bank of Córdoba, Spain. *Olea* 25, 14-19.
- Cacciola SO, Faedda R, Sinatra F, Agosteo GE, Schena S, Frisullo S, Magnano di San Lio G. 2012. Olive Anthracnose. *J. Plant Pathol.* 94, 29-44.
- Cacciola SO, Pane A, Agosteo GE, Magnano di San Lio G. 1996. Osservazioni sull'epidemiologia dell'antracnosi dell'olivo in Calabria. *Inform. Fitopatol.* 6, 27-32.
- Carvalho MT, Simoe-Lopes P, Monteiro da Silva MJ. 2008. Influence of different olive infection rates of *Colletotrichum acutatum* on some important olive oil chemical parameters. *Acta Hort.* 791, 555-559.
- Ciccarone A. 1950. Considerazioni biologiche e sistematiche sull'agente della «lebbra» delle olive recentemente osservata nel Leccese. *Boll. Staz. Pat. Veg. Roma* 5, 143-165.
- Council Regulation (EEC). 2007. No. 834/2007 of 28 of June 2007. On organic production and labelling of organic products and repealing regulation. *Off. J. Eur. Commun.* L189, 1-23.
- Council Regulation (EEC). 1991. No. 2568/91 of 11<sup>th</sup> of July 1991. On the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis. *Off. J. Eur. Commun.* L248, 1-83.
- Coutinho MP, 1968. Algumas notas sobre a gaffa da azeitona. *Ao Serviço da Lavoura* 85, 1-7.
- Damm U, Cannon PF, Woudenberg JHC, Crous PW. 2012. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Stud. Mycol.* 73, 37-113.
- Eurostat. 2007. The use of plant protection products in the European Union: data 1992-2003. Statistical book. European Communities, Luxembourg.
- Faedda R, Agosteo GE, Schena L, Mosca S, Frisullo S, Magnano di San Lio G, Cacciola SO. 2011. *Colletotrichum clavatum* sp. nov. identified as the causal agent of olive Anthracnose in Italy. *Phytopathol. Medit.* 50, 283-302.
- Famiani F, Proietti P, Farineli D, Tombesi A. 2002. Oil quality in relation to olive ripening. *Acta Hort.* 586, 671-674.

- FAO. 2012. The Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Database (FAOSTAT). <http://faostat.fao.org>. Consultado (26/04/2013).
- Farr DF, Rossman AY. 2013. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>. Consultado (20/11/2013).
- Fernández MV. 1973. Introducción a la Fitopatología. 3ª Ed. Vol. III. Hongos. Colección Científica del INTA, Buenos Aires. Argentina.
- García F, Pedret E, Marco V, Duatis JJ. 1997b. Sensibilidad de diversas variedades de olivo al hongo *Colletotrichum gloeosporioides*. *Frut. Profesional* 88, 60-63.
- García, F. 1995. Micoflora asociada a la aceituna. Su repercusión en la calidad del aceite. *Agricultura* 760, 931-933.
- García F. 1998. Micosis de las aceitunas y su incidencia en la calidad del aceite. *Phytoma España* 102, 171-175.
- García F, Duatis JJ, Marco V, Pedret E. 1997b. Influencia de los ataques fúngicos en la pérdida de calidad del aceite de oliva. *Frut. Profesional* 88, 131-135.
- Gomes S, Prieto P, Martins-Lopes P, Carvalho T, Martin A, Guedes-Pinto H. 2009. Development of *Colletotrichum acutatum* on tolerant and susceptible *Olea europaea* L. cultivars: a microscopic analysis. *Mycopathol.* 168, 203-211.
- Gómez-Caravaca AM, Cerretani L, Bendini A, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A, Del Carlo M, Compagnone D, Cichelli A. 2008. Effects of fly attack (*Bactrocera oleae*) on the phenolic profile and selected chemical parameters of olive oil. *J. Agr. Food Chem.* 56, 4577-4583.
- Gómez-Coca RB, Moreda W, Pérez-Camino MC. 2012. Fatty acid alkyl esters presence in olive oil vs. organoleptic assessment. *Food Chem.* 135, 1205-1209.
- González-Fragoso R. 1914. Aclaraciones a los hongos conocidos con el nombre de "Repilos". *Bol. Soc. Esp. Hist. Nat.* 14, 291-293.
- Gorter GJMA. 1956. Anthracnose fungi of olives. *Nature* 178, 1129-1130.
- Graniti A, Frisullo S, Penissi A, Magnano L. 1993. Infections of *Glomerella cingulata* on olive in Italy. *EPPO Bull.* 23, 457-465.
- Graniti A, Laviola C. 1981. Sguardo generale alle malattie parassitarie dell'olivo. *Informatore Fitopatol.* 31, 77-92.
- Graniti A. 1953. La "lebbra delle" Olive in Sicilia. *Notiz. Malatt. Piante* 27, 27-32.
- Graniti A. 1954. La "lebbra delle" Olive in Sicilia. *Olivicoltura* 9, 1-5.
- Green PS. 2002. A revision of *Olea* L. (*Oleaceae*). *Kew Bulletin* 57, 91-140.

- Guerfel M, Ben Mansour M, Ouni Y, Guido F, Boujnah D, Zarrouk M. 2012. Triacylglycerols composition and volatile compounds of virgin olive oil from cv. Chemlali: Comparison among different planting densities. *Sci. World J.* 2012, 354019.
- Guerfel, M., Zaghdoud, C., Jebahi, K., Boujnah, D., Zarrouk, M. 2010. Effects of the planting density on virgin olive oil quality of ‘Chemlali’ olive trees (*Olea europaea* L.). *J. Agric. Food Chem.* 58: 12469–12472.
- Hemmi T, Kurata S. 1935. Contributions to the knowledge of Anthracnose of plants II, on *Gloeosporium olivarum* Alm. causing the olive Anthracnose. *J. Soc. Trop. Agric. Taiwan* 6, 573-583.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Zhang N. *et al.* 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* 111, 509-547.
- Iannotta I, Perri E, Siriani R, Tocci C. 1999. Influence of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzing) and *Camarosporium dalmatica* (Thum) attacks on olive oil quality. *Acta Hort.* 474, 399-401.
- Inglese P, Famiani F, Galvano F, Servili M, Esposto S, Urbani S. 2011. Factors affecting extra virgin olive oil composition. *Hortic. Rev.* 38, 83-147.
- International Olive Oil Council. 2012. Norma Comercial aplicable a los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva. (COI/T.15/NC n° 3/Rev. 2)
- Keys A, Scardi V, Bergami G. 1952. The trends of serum cholesterol levels with age. *Lancet* 2, 209-210.
- Keys A. 1970. Coronary heart disease in seven countries. *Circulation*, 41 (Suppl. I).
- Latinovic J, Vucinic Z. 2002. Cultural characteristics, pathogenicity, and host range of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from olive plants in Montenegro. *Acta Horticult.* 586, 753-755.
- Loprieno N, Tenerini I. 1960. Indagini sul *Gloeosporium olivarum* Alm., agente della “lebbra” delle olive. *Phytopathol. Z.* 39, 262-290.
- Margarita L, Porta-Puglia A, Quacquarelli A. 1986. *Colletotrichum acutatum*, nuovo patogeno dell’olivo in Cina e confronto con l’agente della «lebbra» dell’olivo. *Ann. Ist. Sper. Patol. Veg. Roma* 11, 125-133.
- Martelli GP, Piglionica V. 1961. Tre anni di lotta contra la Lebbra delle olive in Puglia. *Phytopathol. Medit.* 3, 101-112.
- Martelli GP. 1959. La lebbra delle olive. Presenza e diffusione in Calabria. *Italia Agric.* 96, 905-914.



- Martelli GP. 1960. Primo contributo alla conoscenza della biologia di *Gloeosporium olivarum* Alm. *Phytopathol. Medit.* 1, 31-43.
- Martelli GP. 1961. Acervuli di *Gloeosporium olivarum* Alm. su foglie di olivo. *Phytopathol. Medit.* 1, 43-51.
- Martín, M.P., García, F. 1999. *Colletotrichum acutatum* y *C. gloeosporioides* cause anthracnose on olives. *Eur. J. Plant Pathol.* 105, 733-741.
- Martín MP, García-Figueres F, Trapero, A. 2002. Iniciadores específicos para detectar las especies de *Colletotrichum* causantes de la antracnosis de los olivos. *Bol. Sanl. Veg. Plag.* 28 43-50.
- Matalas AL, Zampelas A, Staurnos V, Wolinski I. 2001. The Mediterranean Diet Constituents and Health Promotion. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Mateo-Sagasta E. 1968. Estudios básicos sobre *Gloeosporium olivarum* Alm. (Deuteromiceto Melanconial). *Bol. Patol. Veg. Entomol. Agric.* 30, 31-135.
- Mincione A, Valenzise M, Runcio A, Poiana M, Agosteo GE, Taccone PL. 2004. Ricerche sugli oli di oliva vergini calabresi. Influenza delle fitopatie sulle caratteristiche qualitative degli oli. Nota I - Effetti diretti degli attacchi di Antracnosi. *Riv. It. Sost. Grasse* 81, 9-17.
- Montag J, Schreiber L, Schönherr J. 2006. An in vitro study of the nature of protective activities of copper sulphate, copper hydroxide and copper oxide against conidia of *Venturia inaequalis*. *J. Phytopathol.* 154, 474-481.
- Montironi RA. 1956. Olivo. Frantoio variedad resistente a la Antracnosis. Pulverizaciones recomendables en montes de olivo. *Idia* 106, 176-177.
- Moral J, Alsalimiya M, Muñoz-Díez C, León L, de la Rosa R, Trapero A. 2006. Evaluación de preselecciones de olivo por su resistencia a Repilo y Antracnosis. *Act. Hort.* 45, 177-178.
- Moral J, Ávila A, López-Doncel LM, Alsalimiya M, Oliveira R, Gutiérrez F, Navarro N, Bouhmidi K, Benali A, Roca L, Trapero A. 2005. Resistencia a los Repilos de distintas variedades de olivo. *Vida Rural* 208, 34-40.
- Moral J, Bouhmidi K, Trapero A, 2008. Influence of fruit maturity, cultivar susceptibility, and inoculation method on infection of olive fruit by *Colletotrichum acutatum*. *Plant Dis.* 92, 1421-1426.
- Moral J, Cherifi F, Muñoz-Díez C, Xavier CJ, Trapero Casas A. 2009a. Infection of olive seeds by *Colletotrichum acutatum* and its effect on germination. *Phytopathology* 99, S88.
- Moral J, Jurado-Bello J, Sánchez MI, Oliveira R, Trapero A. 2012. Effect of temperature, wetness duration, and planting density on olive anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. *Phytopathology* 102, 974-981.

- Moral J, Jurado-Bello J, Trapero A. 2011. Effect of temperature and relative humidity on mycelial growth, conidial germination and fruit infection by *Colletotrichum* spp. causing olive Anthracnose. *IOBC/WPRS Bull.* 79, 14.
- Moral, J, Oliveira, R., Roca, L.F., Cabello, D., Trapero, A. 2009b. Control of olive Anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. *IOBC/WPRS Bull.* 78, 55.
- Moral, J., Oliveira, R., Trapero, A. 2009c. Elucidation of disease cycle of olive anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology* 99: 548-556.
- Moral J, Trapero A. 2009a. Assessing the susceptibility of olive cultivars to anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum*. *Plant Dis.* 93, 1028-1036.
- Moral J, Trapero A. 2009b. Resistencia del olivo a la Antracnosis causada por *Colletotrichum* spp. *Boletín SEF* 66, 22-30.
- Moral J, Trapero A. 2010. Fuentes de inóculo y dinámica de la infección en la Antracnosis del olivo causada por *Colletotrichum* spp. XV Congreso SEF (Vitoria).
- Moral J, Trapero A. 2012. Mummified fruit as a source of inoculum and disease dynamics of olive anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. *Phytopathology* 102 982-989.
- Mraicha F, Ksantini M, Zouch O, Ayadi M, Sayadi S, Bouaziz M. 2010. Effect of olive fruit fly infestation on the quality of olive oil from Chemlali cultivar during ripening. *Food Chem. Toxicol.* 48, 3235-3241.
- Mugnai L, Surico G, Rogazzi A. 1993. *Glomerella cingulata* on olive in India: morphological and pathological notes. *EPPO Bull.* 23, 449-455.
- Oliveira R, Moral J, Bouhmidi K, Trapero A. 2005. Caracterización morfológica y cultural de aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la antracnosis del olivo. *Bol. San. Veg. Plagas* 31, 531-548.
- Pennisi M, Agosteo GE, Grasco S. 1993. Chemical control of the olive rot caused by *Glomerella cingulata*. *EPPO Bull.* 23, 467-472.
- Pérez M. 2011. Evaluación en campo de fungicidas, sales de calcio y extractos vegetales para el control de la antracnosis del olivo causada por *Colletotrichum* spp. Trabajo Profesional Fin de Máster, ETSIAM, Córdoba.
- Pérez-Camino MC, Moreda W, Mateos R, Cert A. 2002. Determination of esters of fatty acids with low molecular weight alcohols in olive oils. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4721-4725.
- Pontis RE, Hansen HN. 1942. Olive Anthracnose in the United States. *Phytopathology* 32, 642-644.

- Prota U. 1995. Le malattie dell'olivo. *Infor. Fitopatol.* 45, 16-26.
- Prusky D, Freeman S, Dickman MB. 2000. *Colletotrichum: Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction*. The American Phytopathological Society. St. Paul MN, USA
- Rahman M, Punja ZK. 2007. Calcium and plant disease. in Datnoff LE, Elmer WH, Huber DM (Eds) *Mineral nutrition and plant disease*. APS Press, San Paul, MN, 79-93.
- Rallo L. 2005. Variedades del olivo en España: una aproximación cronológica. in Rallo L, Barranco D, Caballero JM, del Río C, Martín A, Tous J, Trujillo I (Eds) *Variedades del olivo en España*. Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 15-44.
- Rhouma A, Triki MA, Msallem M. 2010. First report of olive anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Tunisia. *Phytopathol. Med.* 49, 95-98.
- Roca L.F, Moral J, Viruega JR, Ávila A, Oliveira R, Trapero A. 2007. Copper fungicides in the control of olive diseases. *Olea* 26, 48-50.
- Runcio A, Sorgonà L, Mincione A, Santacaterina S, Poiana M. 2008. Volatile compounds of virgin olive oil obtained from Italian Cultivars grown in Calabria. Effects of processing methods, cultivar, stone removal, and anthracnose attack. *Food Chemistry* 106, 735-740.
- Saponaro A. 1953. Presenza di *Gloeosporium olivarum* Alm. sugli organi vegetativi dell'olivo nel Lecce e nel Brindisino. *Ann. Sperim. Agraria* 7, 609-619.
- Schena L, Mosca S, Cacciola, SO, Faedda R, Sanzani SM, Agosteo GE, Sergeeva V, Magnano di San Lioa G. 2013. Species of the *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. boninense* complexes associated with olive anthracnose. *Plant Pathol.* DOI: 10.1111/ppa.12110.
- Segura R. 2003. Evaluación de microorganismos antagonistas para el control biológico del Repilo y la Antracnosis del olivo. Tesis doctoral, ETSIAM, Córdoba.
- Sergeeva V, Nair NG, Spooner-Hart R. 2008a. Evidence of early flower infection in olives (*Olea europaea*) by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* causing anthracnose disease. *Australas. Plant Dis. Not.* 3, 81-82.
- Sergeeva V, Spooner-Hart R, Nair NG. 2008b. First report of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* causing leaf spots of olives (*Olea europaea*) in Australia. *Australias. Plant Dis. Not.* 3 143-144.
- Sergeeva V. 2011. Disease resistance and adaptability of olive cultivars. *Australas. N. Zealand Olivegro. Proces.* 81, 27-29.
- Sharma RL, Kaul JL. 1990. Field evaluation of fungicide for control of olive Anthracnose. *Indian J. Mycol. Plant Pathol.* 20, 185-187.

- Sutton BC. 1980. The *Coelomycetes*. Fungi imperfecti with pycnidia, acervula and stromata. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England.
- Talhinhas P, Neves-Martins J, Oliveira H, Sreenivasaprasad S. 2009. The distinctive population structure of *Colletotrichum* species associated with olive anthracnose in the Algarve region of Portugal reflects a host-pathogen diversity hot spot. *FEMS Microb. Lett.* 296, 31-38.
- Talhinhas P, Sreenivasaprasad S, Neves-Martins J, Oliveira H. 2005. Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 2987-2998.
- Tamendjari A, Angerosa F, Mettouchi S, Bellal MM. 2009. The effect of fly attack (*Bactrocera oleae*) on the quality and phenolic content of Chemlal olive oil. *Grasas y Aceites* 60, 507-513.
- Trapero A. 2004. Aspectos históricos de las enfermedades del olivo. Conferencia del Acto Académico Conmemorativo de la festividad de San Isidro Labrador, ETSIAM, Universidad de Córdoba.
- Trapero A, Blanco MA. 2008. Enfermedades. In Barranco D, Fernández-Escobar R, Rallo L. (Eds) *El cultivo de olivo*. Coedición Junta de Andalucía/Mundi-Prensa, Madrid, 595-656.
- Trapero A, Roca LF, Moral J. 2009. Perspectivas futuras del control químico de las enfermedades del olivo. *Phytoma España* 212, 80-82.
- Uceda M, Hermoso M, Aguilera MP. 2008. La calidad del aceite de oliva. In Barranco D, Fernández-Escobar R, Rallo L. (Eds) *El cultivo de olivo*. Coedición Junta de Andalucía/Mundi-Prensa, Madrid, 699-727.
- Vichi S, Pizzale L, Conte LS, Buxaderas S, Lopez-Tamames E. 2003. Solid-phase Microextraction in the analysis of virgin olive oil volatile fraction: Modifications induced by oxidation and suitable markers of oxidative status. *J. Agr. Food Chem.* 51 6564-6571.
- Vucinic Z, Latinovic J, Metzidakis IT, Voyiatzis DG. 1999. *Colletotrichum gloeosporioides*, a new olive (*Olea europaea* L.) parasite in Yugoslavia. *Acta Hort.* 474, 577-579.
- Weir BS, Johnston PR, Damm U, 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *St. in Mycol.* 73 115-80.
- Xaviér CJ, Moral J, Cherefi F, Díez CM, Trapero A. 2012. Resistencia del acebuche a la Antracnosis del olivo causada por *Colletotrichum* spp. y su posible origen. XVI Congreso SEF (Málaga).

Xaviér CJ, Moral J, Trapero 2010. Caracterización de la virulencia de *Colletotrichum acutatum*, agente de la Antracnosis del olivo. XV Congreso SEF (Vitoria).

Zachos DG, Makris SA. 1963. Recherches sur le *Gloeosporium olivarum* en Grèce. II. Symptomatologie de la maladie. III. Epidémiologie de la maladie. *Ann. Inst. Phytopathol. Benaki*, 5, 128-130.

Zohary D, Spiegel-Roy P. 1975. Beginning of fruit growing in the old world. *Science* 187, 319-327.

Zohary D. 1994. The wild genetic resources of the cultivated olive. *Acta Hort.*, 356, 62-65.



**VARIABILITY IN SUSCEPTIBILITY TO ANTHRACNOSE IN THE WORLD COLLECTION OF *OLEA EUROPAEA* CULTIVARS OF CORDOBA (SPAIN)****ABSTRACT**

Anthracnose of olive (*Olea europaea* L.), caused by *Colletotrichum* spp., is a serious disease of the olive tree whose epidemics are highly dependent on the susceptibility of the cultivars and environmental conditions in the fall. In the last 15 years there have been four serious epidemics in Andalusia that allowed us to complete the assessment of the World Olive Germplasm Bank of Córdoba (WOGBC), including the main plot in the IFAPA in Córdoba and two complementary fields located in Cabra (Córdoba) and in Mengíbar (Jaén). A total of 384 cultivars have been evaluated from twenty-two all olive-growing countries in the world, mainly from Spain (222 cvs.), Syria (31), Italy (22), Turkey (18) and Greece (17). Disease assessments were performed using a 0-10 scale, specially developed to estimate the incidence of fruit affected in the canopy of the olive trees, confirming by artificial inoculations in some cases. Because of the direct relationship between maturity of the olives and susceptibility to anthracnose, all evaluations were performed at the beginning of ripening of the fruit, which has forced coupling assessments according to the state of maturity of the trees. Statistical analysis of representative cultivars allowed grouping the 384 cultivars in five categories of susceptibility: highly susceptible (25.5%), susceptible (31.5%), intermediate (19.8%), resistant (14.3%) and highly resistant (8.9%). Representative cultivars of these categories are ‘Ocal’, ‘Lechín de Sevilla’, Arbequina, Picual and Frantoio, respectively. With some exceptions, such as cvs Arbequina and Picual, most of the main Spanish cultivars, as Cornicabra, Hojiblanca, Manzanilla de Sevilla, Morisca, Picudo, Farga and Verdial de Huévar are included in the categories of susceptible or highly susceptible. The phenol content in the fruit, depending on the ripeness of the same, was the best feature associated with the resistance of the cultivars.

*Additional Keywords:* “aceituna jabonosa”, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Gloeosporium olivarum*, *Olea europaea*, resistance.

## 1. INTRODUCTION

Olive (*Olea europaea* L.) is the most extensively cultivated fruit crop in the world (FAO, 2015), and its great intra-specific diversity is the key to its good adaptation to the many different areas with a Mediterranean climate. Although olives are grown worldwide, the Mediterranean basin is the major cultivation area, comprising about 98% of olive trees and more than 1200 cultivars (Bartolini and Cerreti, 2015). About 25% of all olive trees are grown in Spain, where the number of well-identified cultivars is 272 (Rallo et al., 2005). The Spanish olive industry presently has over 2.6 million ha with an annual olive oil production value exceeding 2.8 billion euros in the last 4 years (MAGRAMA, 2014). More than 65% of Spanish olive production is concentrated in the Andalusian region of southern Spain, where olive trees are an essential element of the landscape and form a mosaic of cultivars (Rallo et al., 2005).

Anthrachnose of olive, caused by the mitosporic fungi *Colletotrichum acutatum* s. l. Simmonds ex Simmonds and *C. gloeosporioides* s.l. (Penzing) Penzing & Saccardo, is the most destructive disease of olive fruit and is widely distributed in many olive-growing regions of the world (Andrés, 1991; Graniti et al., 1993; Talhinhos et al., 2005). In Spain, the disease is named for its characteristic fruit-rot and mummification syndrome, with abundant production of conidia in a gelatinous matrix (“aceituna jabonosa” or “soapy fruit”) under wet conditions (Andrés, 1991; Mateo-Sagasta, 1968).

In recent epidemics in southern Spain, affected trees showed wilting of leaves and dieback of shoots and branches, as well as the characteristic fruit-rot syndrome (Barranco et al., 2008; Moral et al., 2014; Trapero et al., 1998). All isolates of *Colletotrichum* causing olive anthracnose in these epidemics in Andalusia were identified as *C. acutatum* s.l. However, *C. gloeosporioides* s.l. has also been identified as causal agent of olive anthracnose in Spain (Moral et al., 2014).

The incidence of anthracnose depends greatly on cultivar susceptibility and weather. In Andalusia, severe anthracnose epidemics only occur under favorable weather conditions in areas where susceptible cultivars are grown, such as in southern Córdoba, northern Málaga-Sevilla, and western Granada provinces. The dominant cultivars in these areas are ‘Hojiblanca’ and ‘Picudo’, which are highly susceptible to anthracnose (Barranco et al., 2008). A similar situation occurs in wet regions of Portugal, where the susceptible cv. Galega vulgar is grown (Talhinhos et al., 2005). Fortunately, the most important



cultivar in Andalusia, ‘Picual’, is considered resistant to anthracnose under field conditions, although a moderate level of disease occurs when ‘Picual’ trees are grown mixed with susceptible cultivars (Trapero et al., 1998).

Information on the susceptibility or resistance to anthracnose in olive cultivars is based on field observations and farmer experience rather than on systematic studies. To characterize resistance levels, researchers have artificially inoculated fruit or plants only in a few cases and with variable results (García-Figueroles et al., 1997; Mateo-Sagasta, 1968). A related problem is that olive cultivars are frequently misidentified in the field (Barranco et al., 2008). For these reasons, discrepancies in resistance or susceptibility to anthracnose for some olive cultivars are quite common (Moral et al., 2005; 2008a). An example of these discrepancies is the database of olive germplasm (Bartolini and Cerreti, 2015), which includes two cultivars each with two different levels of susceptibility to anthracnose. Another source of confusion is the similarity of anthracnose fruit-rot symptoms to those caused by other fungal pathogens, such as species of *Alternaria*, *Botryosphaeria*, *Fusarium*, and *Phlyctema* (Barranco et al., 2008; del Moral et al., 1986; García-Figueroles, 1998; Moral et al., 2008b).

The need to determine the relative susceptibility of olive cultivars to anthracnose became more evident after the establishment of the World Olive Germplasm Bank of Cordoba (WOGBC) and the beginning of an olive breeding program in Córdoba, southern Spain (Caballero et al., 2006; Rallo et al., 2005; Trujillo et al., 2013). The demand to assess a great number of olive cultivars and genotypes and the lack of a suitable method for their evaluation led to the development of an inoculation method to quantify resistance to *Colletotrichum* spp. (Moral et al., 2008) and to develop a method to assess the susceptibility to anthracnose of selected olive cultivars in the field (Moral and Trapero, 2009). The objectives of this study were the following (i) to assess the susceptibility of olive cultivars in the WOGBC to anthracnose caused by *Colletotrichum* spp., (ii) to identify cultivars representative of each of the susceptibility categories determined in this study and (iii) to correlate the anthracnosis susceptibility with other phenotypic characteristics of cultivars. A preliminary report of this study has been published (Xaviér et al., 2014).

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Plant material and orchard

We have evaluated 384 accessions of cultivated olive (*Olea europaea* L.) from 22 countries of origin (Table 1). These accessions are conserved in live collections in the WOGBC located at the “Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera de Andalucía (IFAPA)” centre “Alameda del Obispo”, Córdoba (southern Spain). Although these accessions are not yet fully authenticated (Trujillo et al., 2013), we will refer to them as cultivars. The WOGBC was planted in several stages starting in 1982 and by 2005 it contained 406 cultivars (Caballero et al., 2006). In this study, which covers the period 1997-2008, we have evaluated the susceptibility to anthracnosis of the 384 cultivars that presented a consistent response among replicates. The remaining 22 cultivars were quite different from their reps, or it was only possible to evaluate a single tree without repetitions, so they are not included in this study. There were 2 to 16 replicated trees (average 3 trees) per cultivar in a completely randomized design.

Experimental orchard was managed according to the principles of commercial olive orchards in Andalusia (Barranco et al., 2008; Civantos, 1999). Each tree was planted in a 7 × 7 m square, with one trunk per tree, and was pruned every 3 years beginning 5 years after planting. Several copper-based treatments (bordeaux mixture, Caldo Bordelés Vallés, IQV, 6 kg Cu per ha) were applied during the spring and autumn to control fungal foliar and fruit diseases caused by *Fusicladium oleagineum*, *Pseudocercospora cladosporioides*, and *Colletotrichum* spp. (Barranco et al., 2008; Civantos, 1999).

### 2.2. Assessment of disease incidence in the field

Fruit-rot incidence was assessed in each olive tree by estimating the percentage of affected fruit using a 0 to 10 rating scale. This scale was validated in field conditions (Moral and Trapero, 2009) and is the logistic transformation of the percentage or proportion of affected fruit, which are binary data (Table 1). Thus, the data are normalized using this scale and the scale values can be analyzed directly through parametric methods.

Disease incidence was assessed at different times, when most fruit of each cultivar had become black or had the value 4 in the 0 to 4 rating scale for olive fruit ripening (Rallo

et al., 2005). Disease incidence was assessed from the end of November to the end of January in 1997/98, 2005/06, and 2006/07. There were severe epidemics of olive anthracnose in the experimental orchards during these years (Moral and Trapero, 2009).

The severity of branch dieback was evaluated at the end of March 2007, after 2 years of fruit-rot epidemics. Disease severity was assessed using a 0 to 5 rating scale based on the percentage of tree canopy affected: 0 < 10%, 1 = 10–25%, 2 = 25–50%, 3 = 50–75%, 4 = 75–90%, 5 = > 90%. The presence of *Colletotrichum* spp. in affected branches was evaluated by culturing small tissue pieces from leaves, shoots, and branches on acidified PDA plus 100 mg of copper sulfate ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) per liter of medium following the method of Moral et al. (2009).

### 2.3. Inoculation of detached fruit

Olive fruit from five cultivars selected by their response to anthracnosis in the field and olive fruit from cultivars that had a dubious response were collected at the onset of ripening from asymptomatic trees in the experimental orchard during non-epidemic years. The fruit were green-yellow and with a value of 1 on the 0–4 ripening scale (Rallo et al., 2005).

Inoculations were performed with the isolate Col-10 of *C. acutatum*, which is representative of the Spanish population of the pathogen causing olive anthracnose (Moral et al., 2014). Fruit were washed, disinfested, air dried, and sprayed with a conidial suspension ( $10^5$  conidia per ml or sterile water for the control) as previously reported (Moral et al., 2008a). Inoculated and control fruit were incubated in moist chambers (plastic containers,  $22 \times 16 \times 10 \text{ cm}^3$ , with 100% RH) at  $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  under fluorescent lights (12 h photoperiod,  $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Disease severity was assessed every 2 to 3 days after inoculation by using a 0 to 5 rating scale where 0 = no visible symptoms, 1 = visible symptoms affecting less than 25% of the fruit surface, 2 = 25–50%, 3 = 50–75%, 4 = 75–100%, and 5 = fruit completely rotted with abundant conidia in a gelatinous matrix (soapy fruit), or fruit with abundant white-grey mycelium on the surface (Moral et al., 2008a). There were two replicates (moist chambers) per treatment and 25 fruit per replicate arranged in a completely randomized design. The experiment was repeated once and data analyses were performed on the pooled data from the two experiments.

### 3. Relationship between disease incidence and some phenotypic characteristics of cultivars

Since some field observations and published data suggested a relationship for some cultivars between susceptibility to anthracnose and some phenotypic characteristics, such as size and phenol content of the fruit (Moral et al., 2014), we have studied these possible relationships for cultivars evaluated. To do this, we have collected published data of phenotypic characters from 30 cultivars and we have compared them with the results of the susceptibility to anthracnose in these cultivars.

The mean value of disease incidence assessed by the 0 to 10 rating scale was used for these comparisons.

### 4. Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) was performed on the rating scale data of fruit- rot incidence and branch dieback severity in selected olive cultivars because these data satisfied the normality and homogeneity of variances requirements of ANOVA. Cultivar means were compared using the Least Significant Difference (LSD) test at  $P = 0.05$ . The ANOVA was not applied to the data of all cultivars evaluated because there were very marked differences between the number of observations for each cultivar (years and repetitions). Instead, all cultivars are classified roughly into five categories of susceptibility established with the reaction of selected cultivars. For all cultivars, the relationship between fruit-rot incidence and branch dieback severity was analyzed by the Pearson's correlation test. This test was also used to analyze the relationship between disease incidence and fruit size or phenol content in the fruit.

A chi-squared test was used to check if the origin of the cultivars has any effect on the frequency of resistant or susceptible cultivars.

Disease severity values of inoculated fruit were used to calculate a Disease Intensity Index (DII) using the following formula:

$$DII = \frac{\sum n_i \times i}{5 \times N} \times 100$$

where  $i$  represents severity (0 to 5),  $n_i$  is the number of fruit with the severity of  $i$ , and  $N$  is the total number of evaluated fruit. For each cultivar and replication, the standardized

area under the disease progress curve (SAUDPC) was calculated by trapezoidal integration of DII values over time expressed as a percentage of a maximum theoretical curve. The SAUDPCs were transformed to  $\arcsin \sqrt{SAUDPC/100}$  when necessary for homogeneity of variance. ANOVA was performed on the SAUDPC data, and treatment means were compared using LSD test at  $P = 0.05$ . Data from all experiments were analyzed using Statistix 8 (Analytical Software, Tallahassee, FL).

## 5. RESULTS

### 5.1. Susceptibility of cultivars in the field

Incidence of fruit rot on olive cultivars in the WOGBC varied greatly among years. All trees in the experimental field were only evaluated in three seasons (1997/98, 2005/06 and 2006/07) because of the generally low level of infection in other years. The most severe anthracnose epidemic occurred in 1997/98, whereas the lowest levels of disease occurred in 2005/06. Cultivar reaction ranged continuously from highly susceptible to highly resistant. Based on these results, we selected five representative cultivars of the range of variability observed, each of which should be represented by at least seven repetitions (trees) in the experimental field. These cultivars were: 'Frantoio' ( $n=8$  trees) for the highly resistant cultivars (0 to 1.9 in the rating scale), 'Picual' ( $n=7$  trees) for the resistant cultivars (2 to 3.9 in the rating scale), 'Arbequina' ( $n=7$  trees) for the moderately susceptible cultivars (4 to 5.9 in the rating scale), 'Lechín de Sevilla' ( $n=8$  trees) for the susceptible cultivars (6 to 7.9 in the rating scale), and 'Ocal' ( $n=16$  trees) representing the group of highly susceptible cultivars (8 to 10 in the rating scale).

The incidence of fruit in the five selected cultivars varied significantly ( $P < 0.05$ ) among them, but these differences depended on the epidemic season (Table 2). The most marked differences among cultivars occurred in the year of the greatest epidemic. Cultivars whose response did not differ significantly from each other for the three epidemic seasons were 'Picual' (resistant) and 'Arbequina' (moderately susceptible). However, all of selected cultivars differed significantly among them when analysis was applied to the average of the three years (Table 2). The incidence of branch dieback in the five selected cultivars also differed significantly among cultivars, being particularly severe in the most susceptible cultivar 'Ocal' (Table 2). There was a significant linear correlation ( $r = 0.691$ ,  $P < 0.0001$ ) between the incidence of fruit rot and the severity of branch dieback for these five cultivars.

Since the response of the 384 cultivars during the three years of evaluation varied significantly between years, it was conducted a joint analysis of the incidence of fruit rot using the years as blocks. The overall results of this analysis are summarized in Table 4. Due to the large number of cultivars evaluated, the results showed a continuous gradation in the susceptibility of cultivars, from completely resistant showing none or very few symptoms (e.g. ‘Dolce Agogia’, ‘Frantoio’, ‘Razzola’) to extremely susceptible which had all affected fruits (e.g. ‘Acebuchera’, ‘Picudo BE’, ‘Uovo Piccione’). By applying the five categories of susceptibility to all cultivars, the 384 cultivars were distributed as follows: 34 (8.9%) highly resistant, 55 (14.3%) resistant, 76 (19.8%) intermediate, 121 (31.5%) susceptible and 98 (25.5%) highly susceptible (Table 3).

The frequency distribution of cultivars according to the categories of fruit-rot incidence showed a negative skew ( $k = -0.504$ ) and a negative kurtosis ( $k = -0.662$ ), which highlighted the prevalence of susceptible or highly susceptible cultivars in the collection (Fig. 1). Instead, the frequency distribution of cultivars according to the categories of branch-dieback severity showed a positive skew ( $k = 1.679$ ) and a positive kurtosis ( $k = 2.532$ ), which evidenced that the drying branches only occurred in cultivars that had a high incidence of fruit rot (Fig. 2). There was also a significant linear correlation ( $r = 0.540$ ,  $P < 0.0001$ ) between the incidence of fruit rot and the severity of branch dieback for all cultivars (Fig. 3). This relationship was weak in general, but more evident to the varieties which showed a fruit rot incidence higher than 2.5. However, some varieties that showed high values of fruit-rot incidence did not present branch dieback (Fig. 3).

To check if the origin of the cultivars has any effect on their susceptibility, we made comparisons for each country between the frequency of resistant cultivars (HR and R categories) and the frequency of susceptible ones (M, S and HS categories) using a chi-square test. The null hypothesis in these tests was that there was no prevalence of any category of susceptibility and the alternative hypothesis was that there was prevalence of resistant or susceptible cultivars. The results showed that there was no prevalence of resistant or susceptible cultivars in most countries, probably due to the low number of cultivars available. However, in countries with a greater number of cultivars such as Spain and Syria, susceptible cultivars were dominant, coinciding with the corresponding result for all cultivars. The only exception was for cultivars from Italy, where there was a domain of resistant versus susceptible cultivars (Table 3).

The pathogen *C. acutatum* was isolated from < 3% of the sampled leaves, shoots, and branches with dieback symptoms.

### 5.2. Susceptibility of cultivars in artificial inoculation.

The five selected cultivars developed fruit-rot anthracnose symptoms at the end of the experiment, 84 days after inoculation. Disease incidence and severity varied greatly with cultivar and time. The time of appearance for the first symptom varied from 5 days after inoculation in the most susceptible cultivar ('Ocal') to 26 days in the most resistant ('Frantoio'). Complete fruit rot required as little as 21 days ('Lechín de Sevilla' and 'Ocal') to more than 84 days ('Frantoio'). Many fruit of the latter cultivar did not show symptoms at the end of the experiment. For each cultivar, three disease development times were calculated by interpolation:  $T_0$  = days from inoculation until the first fruit with symptoms appeared,  $T_{50}$  = days from inoculation until 50% of the fruit were affected, and  $T_{100}$  = days from inoculation until 100% of the fruit were affected (Table 3). The SAUDPC analysis separated the cultivars into five groups which were significantly different (Table 4).

For the five cultivars, susceptibility based on artificial inoculation and susceptibility based on field observations were compared by correlating the SAUDPC measured in the artificial inoculation with the average disease incidence observed in the orchard (Table 1). There was a significant linear correlation ( $r = 0.989$ ,  $P = 0.0015$ ) between the SAUDPC of inoculated fruit and the fruit-rot incidence in the field.

Twenty-seven cultivars that showed a dubious response in the field were also inoculated as the previous five cultivars. The results served to resolve the doubts raised in the field and to classify these cultivars in their corresponding category of susceptibility (Table 5).

### 5.3. Relationship between anthracnosis incidence and some phenotypic characteristics of cultivars

For 30 cultivars, susceptibility based on field observations and some characteristic of the fruit were compared by correlating the average disease incidence observed in the experimental orchard (Table 5) with the published data on size and phenols content of the fruit (Rallo et al., 2005). The correlation coefficient for the fruit size variable were low and not significant ( $r = 0.285$ ,  $P = 0.124$ ). The correlation coefficients for the different phenol compounds in the fruit were low and most of them were not significant.

The only variables that resulted in a significant linear correlation were total phenols ( $r = -0.348$ ,  $P = 0.043$ ) and oleuropeina ( $r = -0.286$ ,  $P = 0.049$ ).

## **6. DISCUSSION**

Variability of olive cultivars is being studied in 107 collections from 30 countries including 5,477 accessions (Bartolini and Cerreti, 2015). In part because there are so many cultivars and many poorly identified cultivars, information on susceptibility or resistance to major diseases is limited, particularly in the case of olive anthracnose (Barranco et al., 2008; Bartolini and Cerreti, 2015). Until the study of Moral and Trapero (2009), little or no information was available on methods to assess cultivars for their susceptibility to anthracnose under field and controlled conditions. The development and validation in the field of an effective assessment method (Moral and Trapero, 2009) has allowed us to evaluate for several years the main plots of the WOGBC. This collection of olive cultivars contained 406 cultivars (Caballero et al., 2006) during the years of this study, but only 384 cultivars were evaluated due to lack of consistent data in 22 cultivars.

During the years of this study, susceptibility to anthracnose differed greatly among cultivars and years. The ranking of cultivars, however, did not change markedly with the year, suggesting a dominant effect of genotype over the environment (weather, pathogen population, level of disease). This effect, however, was clearest in the years of severe epidemics. In the years in which the disease had a low incidence, it was not possible to establish differences in susceptibility among cultivars, so those years were removed from the evaluation. For this reason, only three seasons (1997/98, 2005/06 and 2006/07) were evaluated during the study period.

A major limitation for assessing cultivar susceptibility was the different ripeness times, as the susceptibility of fruit to anthracnose increases with ripeness (Mateo-Sagasta, 1968; Moral et al., 2008a). To minimize this effect of ripeness, the date of assessment was varied with the cultivar, and disease was assessed when most fruit of each cultivar had become black, i.e. had a value of 4 on the olive ripening scale (Rallo et al., 2005). Besides cultivar misidentification, the lack of a uniform time for disease assessment related to olive maturation may be the main cause for discrepancies among published data on cultivar susceptibility (Moral et al., 2008a). Information on cultivar susceptibility to anthracnose under field conditions is limited. For example, the olive



database contains data for only 54 cultivars, which are classified by their susceptibility to anthracnose as low (eight cultivars), medium (17 cultivars), and high (31 cultivars). Two of these cultivars are duplicated because they have been included in two categories of susceptibility (Bartolini and Cerreti, 2015). Our field assessments agree with previous observations for susceptible cultivars Arbequina, Blanqueta, Hojiblanca, Manzanilla de Sevilla, Morrut, Ocal, and Picudo, and for the resistant or moderately resistant cultivars Empeltre, Leccino, and Picual (Barranco et al., 2000; Bartolini and Cerreti, 2008; De Andrés, 1991; Moral et al., 2008a; Rallo et al., 2005; Tous and Romero, 1993). Cultivar Frantoio had low susceptibility in our assessments, which agrees with some other observations (Bartolini and Cerreti, 2008; Montironi, 1956), but it was considered susceptible in Argentina (De Andrés, 1991), possibly due to a misidentification of the cultivar (Barranco et al., 2000). Our results are also the first report of anthracnose susceptibility under field conditions for cvs. Arbosana, Cornicabra, Koroneiki, Lechín de Sevilla, Morona, Pajarero, Razzola, Verdial de Huévar, and Villalonga.

Other fungal fruit-rot diseases caused by species of *Alternaria*, *Botryosphaeria*, *Fusarium*, and *Phlyctema* occurred in some cultivars during our assessment of anthracnose incidence. The incidence of these diseases was low, however, and therefore did not prevent us from assessing anthracnose incidence, although the time of assessment was longer in trees affected by both anthracnose and some of these diseases. The only exception was cv. Blanqueta, which was severely affected by *Phlyctema vagabunda* in some years. Because symptoms caused by this fungus can be confused with anthracnose, trees severely affected by *P. vagabunda* were excluded from this study.

Leaf wilt and branch dieback are important symptoms associated with olive anthracnose (Barranco et al., 2008; Moral et al., 2009). In some countries, such as Greece, Italy, and Portugal, these symptoms have been considered as a primary anthracnose syndrome caused by a direct attack of the pathogen on leaves and branches (Graniti et al., 1993; Zachos and Makris, 1963). In Spain, however, branch dieback has been considered a secondary syndrome resulting from phytotoxins produced in affected fruit (Moral et al., 2009). In this study, the pathogen was isolated from affected leaves, shoots, and branches of all sampled cultivars, but the recovery of *Colletotrichum* was low (< 3%), supporting the phytotoxin hypothesis. The results of these studies also demonstrate that,

at least on susceptible cultivars, the damage caused by anthracnose on branches should be considered an important aspect of the disease. In Spain, branch dieback has been traditionally ignored, and reductions in fruit yield and oil quality were considered the only harmful effects of olive anthracnose (De Andrés, 1991; García-Figueres, 1998; Mateo-Sagasta, 1968).

Artificial inoculation of detached fruit has been used to evaluate cultivar susceptibility to anthracnose (García-Figueres et al., 1997; Mateo-Sagasta, 1968), but discrepancies exist among results from different studies and there was no relationship between artificial inoculations and field observations for some cultivars (Barranco et al., 2008). To clarify these disagreements, 11 selected cultivars were assessed for their susceptibility to fruit rot using an inoculation method that considered major factors affecting disease severity under controlled conditions (Moral et al., 2008a). Although the progress of disease intensity over time followed a logistic curve for all cultivars, the curves differed substantially among cultivars, and these differences depended on the variable measured: incubation period, AUDPC, ET<sub>50</sub>, MDP, and DSI. The best linear correlations between disease measured after artificial inoculation and disease incidence in the field was obtained with DSI. Two cultivars (Morona and Picudo), however, showed great discrepancies and had to be eliminated from the correlation analysis. In the case of 'Morona', there was a misidentification of cultivar. Cultivar Picudo was very susceptible in the field but only moderately susceptible in artificial inoculations. In this case, the difference was probably due to the use of unripe fruit in the laboratory assay; although the fruit color (green-yellow) indicated ripening stage 1, the true ripening stage (based on maturity of internal tissues) was probably lower. This was suspected because many inoculated fruit remained green-yellow at the end of the experiment, 84 days after inoculation, when most the fruit of the other cultivars had become violet or black (ripening stages 3 or 4). Differences between internal and external fruit ripening stages have been reported for other late-maturing cultivars (Barranco et al., 2000).

Artificial inoculations confirmed orchard observations and were consistent with the published results for most cultivars (Bartolini and Cerreti, 2008; Moral et al., 2005). However, there were some discrepancies with respect to the reaction of some cultivars under controlled conditions. Mateo-Sagasta (1968), who inoculated non-wounded detached fruit of 26 Spanish cultivars, found that cv. Picual was immune, 'Verdial de Huévar' was less susceptible, and 'Hojiblanca' and 'Lechín de Sevilla' were moderately

resistant. These cultivars were more susceptible in our study and in other studies (Barranco et al., 2008; Moral et al., 2005; Rallo et al., 2005) than in Mateo-Sagasta (1968), perhaps because the latter study used olive fruit that were less ripe. The increase in susceptibility of fruit with maturity (Moral et al., 2008a) was confirmed by our results for cv. Picual, in which mature black fruit ('Picual-V') were highly susceptible whereas green fruit ('Picual-G') were moderately resistant. The greater susceptibility of mature fruit may be related to the loss of one or several host resistance mechanisms that are present in immature fruit (Prusky, 1996). Although these resistance mechanisms have not been studied for olive anthracnose, higher concentrations of phenolic compounds in immature than mature olive fruits may account for the resistance of immature fruit to several olive pests and diseases (Ryan and Robards, 1998). Other discrepancies between our results and those published by other researchers using artificial inoculation concern cvs. Frantoio and Leccino, which have been reported to be susceptible under artificial inoculation (Loprieno and Tenerini, 1960), but were resistant in the current study. This difference could once again be related to the ripeness of the inoculated fruit, because our results and field observations (Barranco et al., 2000; Bartolini and Cerreti, 2008) concur on the resistance of both cultivars to anthracnose. Differences in virulence of pathogen populations also could explain some discrepancies for cultivar reaction in different places, but variation in virulence has not been studied.

Benlloch (1942) and De Andrés (1991) indicated that late-maturing cultivars were more affected by anthracnose than the earlier-maturing ones. Our study did not demonstrate differences in susceptibility of cultivars associated with the time of ripeness because we found high susceptibility to anthracnose in early-, medium-, and late-maturing cultivars. The higher incidence of anthracnose in late-ripening cultivars indicated above may be related with the excessively late harvest of these cultivars, when their fruit become black at the end of winter. In this case, cultivars that ripen early may escape from anthracnose because they are usually harvested at the end of autumn (Benlloch, 1942). However, if harvest is made before the fruit become black, such is being done at present, cultivars that ripen more slowly can be used as an avoidance strategy to reduce anthracnose epidemics, which are favoured by wet and warm weather on autumn, so the planting of late-maturing cultivars has been recommended as a control practice (Bompeix et al., 1988; Moral et al., 2008a).

Based on field observations and laboratory data on susceptibility to anthracnose, cultivars were classified into three categories: highly susceptible, moderately susceptible, and resistant. Because cultivar reactions varied continuously from highly susceptible to highly resistant, significant differences were found in susceptibility among cultivars within each category. Still, the simplified classification, with only three categories, will be valuable if included in a database where it can be compared with other published research.

Assessments of artificial inoculations of detached fruit complements field assessments to characterize anthracnose susceptibility in olive cultivars. At present, the rating scale and artificial inoculations are being used to assess the entire OGWB and other cultivar trials in southern Spain. These assessment methods could also be used to characterize anthracnose susceptibility of other olive cultivars and genotypes in different collections and breeding programs in the world (Barotolini and Cerreti, 2008; Rallo et al., 2005).

The use of less susceptible or resistant cultivars is the best way to control many plant diseases. Although this control method has not been considered as a priority for olive anthracnose, it will become more important for newly established plantations with a high density of trees or for hedgerow plantations. These new plantations are more vulnerable to anthracnose epidemics because the high density of trees favors pathogen dispersal and environmental conditions for infection (Trapero, 2007). The methods described in this paper will help researchers screen olive cultivars and genotypes for anthracnose resistance.

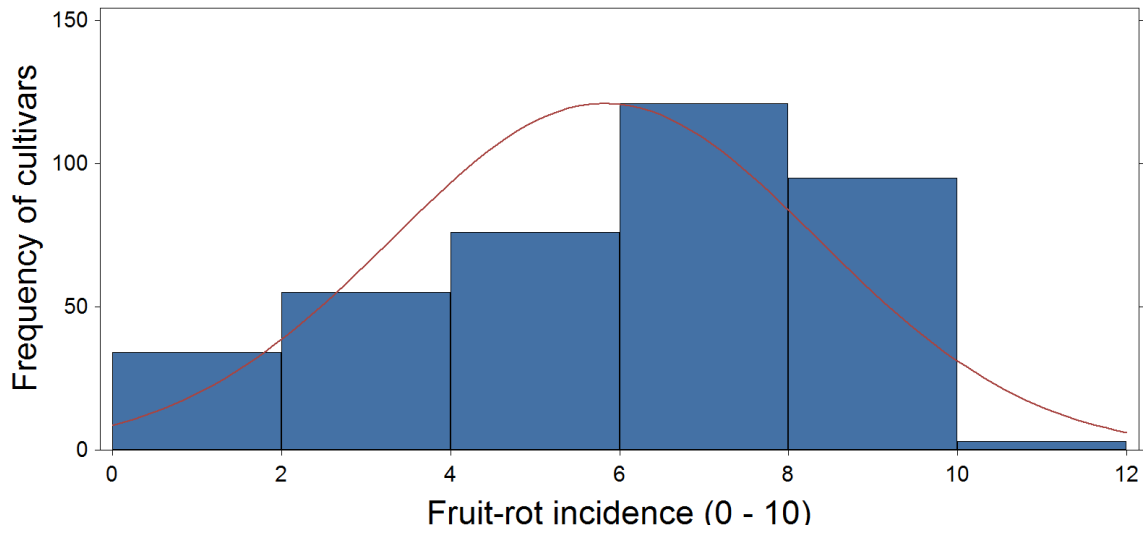
## **LITERATURE CITED**

- Barranco, D., Cimato, A., Fiorino, P., Rallo, L., Touzani, A., Castañeda, C., Serafini, E., and Trujillo, I. 2000. World catalogue of olive varieties. International Olive Oil Council & Mundi-Prensa, Madrid, Spain.
- Barranco, D., Fernández-Escobar, R., and Rallo, L., eds. 2008. El cultivo de olivo. Junta de Andalucía & Mundi-Prensa, Madrid, Spain.
- Bartolini, G. and Cerreti, S. 2015. Olive germplasm (*Olea europaea* L.) [<http://www.oleadb.it>].

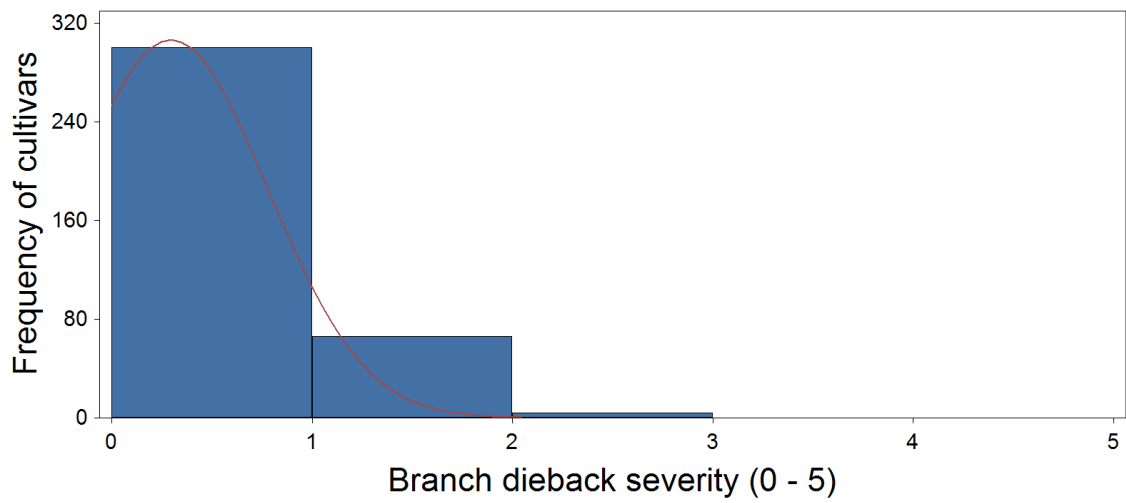
- Benlloch, M. 1942. Observaciones sobre algunas enfermedades del olivo. Boletín de Patología Vegetal y Entomología Agrícola 11:1-12.
- Bompeix, G., Julio, E. V. R., and Phillips, D. H. 1988. *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spaulding *et v.* Schrenk. Pages 373-376 in: Manual de enfermedades de las plantas. Smith, I. M., Dunez, J., Lelliot, R. A, Phillips. D. H, and Archer, S. A. eds. Mundi-Prensa, Madrid, Spain.
- Caballero, J. M., del Río, C., Barranco, D., and Trujillo, I. 2006. The olive world germplasm bank of Córdoba, Spain. Olea 25:14-19.
- Civantos, M. 1999. Control de plagas y enfermedades del olivar. Consejo Oleícola Internacional, Madrid, Spain.
- de Andrés, F. 1991. Enfermedades y plagas del Olivo. Riquelme y Vargas Ediciones S.L., Jaén, Spain.
- del Moral, J., Mazón, J. J., and Santiago, R. 1986. *Phlyctaena vagabunda* Desm. von Arx y *Fusarium moniliforme* Sheldon, nuevos patógenos de la aceituna en España. Boletín Sanidad Vegetal Plagas 12:9-17.
- FAO. 2015. The FAO Statistical Database (FAOSTAT): Food and Agriculture Organization of the United Nations [<http://faostat.fao.org>].
- García-Figueroles, F. 1998. Micosis de las aceitunas y su incidencia en la calidad del aceite. Phytoma España 102:171-175.
- García-Figueroles, F., Pedret, E., Marco, and V., Duatis, J. J. 1997. Sensibilidad de diversas variedades de olivo al hongo *Colletotrichum gloeosporioides*. Fruticultura Profesional 88:60-63.
- Graniti, A., Frisullo, S., Pennisi, A. M., and Magnano di San Lio G. 1993. Infections of *Glomerella cingulata* on olive in Italy. EPPO Bulletin 23: 457-465.
- Little, T. M. and Hills, F. J. 1975. Statistical methods in agricultural research. University of California, Davis, California, USA.
- Loprieno, N. and Tenerini, I. 1960. Studies on *Gloeosporium olivarum*, the cause of 'leprosy' of olive. Phytopathol. Z. 39:262-290.

- M.A.P.A. 2006. Encuesta sobre superficie y rendimiento de cultivos. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, Spain.
- Madden, L. V., Hughes, G., and van den Bosch, F. 2007. The study of plant disease epidemics. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Mateo-Sagasta, E. 1968. Estudios básicos sobre *Gloeosporium olivarum* Alm. (Deuteromiceto Melanconial). Boletín de Patología Vegetal y Entomología Agrícola 30:31-135.
- Montironi, R. A. 1956. Olivo. Frantoio variedad resistente a la Antracnosis. Pulverizaciones recomendables en montes de olivo. Idia 106:176-177.
- Moral, J. and Trapero, A. 2009. Assessing the susceptibility of olive cultivars to anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum*. Plant. Dis. 93: 1028-1036.
- Moral, J., Ávila, A., López-Doncel, L. M., Alsalimiya, M., Oliveira, R., Gutiérrez, F., Navarro, N., Bouhmidi, K., Benali, A., Roca, L., and Trapero, A. 2005. Resistencia a los Repilos de distintas variedades de olivo. Vida Rural 208:34-40.
- Moral, J., Bouhmidi, K., and Trapero, A. 2008. Influence of fruit maturity, cultivar susceptibility, and inoculation method on infection of olive fruit by *Colletotrichum acutatum*. Plant Dis. 92:1421-1426.
- Moral, J., de la Rosa, R., León, L., Barranco, D., Michailides, T. J., and Trapero, A. 2008. High susceptibility of the olive cultivar FS-17 to *Alternaria alternata* in southern Spain. Plant Dis. 92:1252.
- Moral, J., Oliveira, R., and Trapero, A. 2009. Elucidation of the disease cycle of olive anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum*. Phytopathology 99:548-556.
- Moral, J., Xaviér, C., Roca, L.F., Romero, J., Moreda, W., Trapero, A. 2014. La Antracnosis del olivo y su efecto en la calidad del aceite. Grasas y Aceites 65 (2): e028. doi: <http://dx.doi.org/10.3989/gya.110913>.
- Oliveira, R. 2003. Etiología y control químico de la Aceituna Jabonosa causada por *Colletotrichum* spp. Ph.D. thesis. Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain.

- Prusky, D. 1996. Pathogen quiescence in postharvest diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:413-434.
- Rallo, L., Barranco, D., Caballero, J. M., del Río, C., Martín, A., Tous, J., and Trujillo, I., eds. 2005. *Variedades de Olivo en España*. Junta de Andalucía, M.A.P.A. & Mundi-Prensa, Madrid, Spain.
- Ryan, D. and Robards, K. 1998. Phenolic compounds in olives. *Analyst* 123:31-44.
- Talhinhas, P., Sreenivasaprasad, S., Neves-Martins, J., and Oliveira, H. 2005. Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2987-2998.
- Tous, J., and Romero, A. 1993. *Variedades del olivo*. Fundación “La Caixa”, Barcelona, Spain.
- Trapero, A. 2007. Enfermedades del olivar y densidad de plantación. *Mercacei* 51:210-212.
- Trapero, A., López-Doncel, L. M., Viruega, J. R. 1998. Los “Repilos” del olivo: etiología, epidemiología y estrategias de control. *Phytoma España* 102:154-158.
- Trujillo, I., Ojeda, M.A., Urdiroz, N.M., Potter, D., Barranco, D., Rallo, L., Diez, C.M. 2013. Identification of the Worldwide Olive Germplasm Bank of Córdoba (Spain) using SSR and morphological markers. *Tree Genetics & Genomes*. DOI 10.1007/s11295-013-0671-3.
- Xaviér, C.J., Moral, J., Viruega, J.R., Caballero, J., Del Río, C., Trapero, A. 2014. Susceptibilidad relativa de cultivares de olivo a la antracnosis causada por *Colletotrichum* spp. XVII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. 7 - 10 de Octubre, Lleida. pp. 345.
- Zachos, D. G. and Makris, S. A. 1963. Studies on *Gloeosporium olivarum* in Greece II: Symptoms of the disease. *Annales Institute Phytopathologique Benaki* 5:128-130.

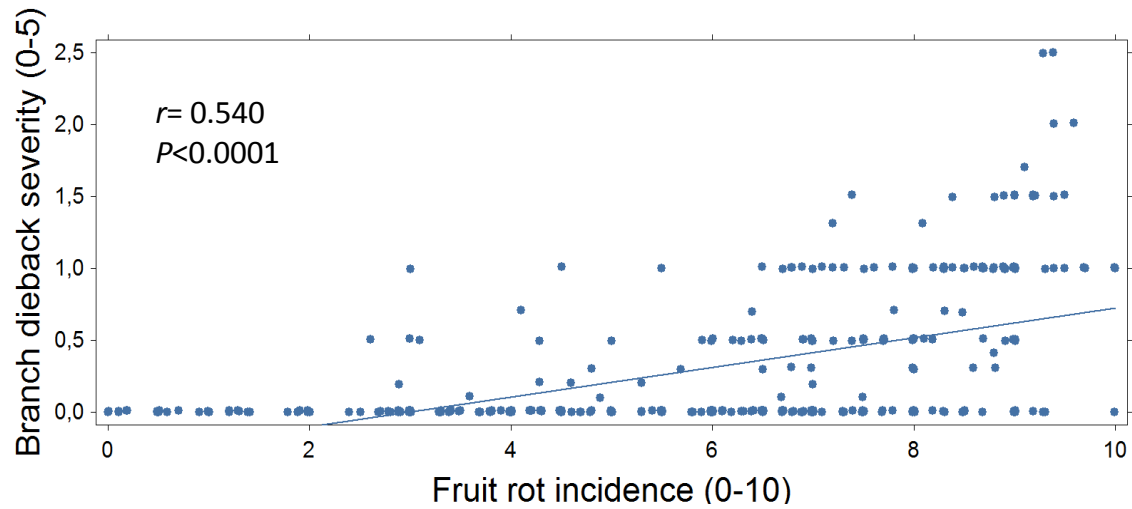


**Figure 1.** Frequency distribution by fruit-rot incidence in 384 olive cultivars in the World Olive Germplasm Bank of Córdoba (Spain).



**Figure 2.** Frequency distribution by branch dieback in 384 olive cultivars in the World Olive Germplasm Bank of Córdoba (Spain).





**Figure 3.** Linear correlation between fruit-rot incidence and dieback severity in olive trees of 384 cultivars in the World Olive Germplasm Bank of Córdoba (Spain).

**Table 1.** Rating scale values and average and interval of percentage of olive fruit affected by anthracnose.

Scale value (0-10)	Affected fruit (%) <sup>a</sup>	Interval (%) <sup>a</sup>
0	<0.04	<0.04
1	0.14	0.04*-0.23
2	0.41	0.24-0.70
3	1.22	0.71-2.09
4	3.57	2.10-6.02
5	10	6.03-16.13
6	25	16.14-36.60
7	50	36.61-63.39
8	75	63.40-83.86
9	90	83.87-93.97
10	97	93.98-100

<sup>a</sup>Values taken from the logistic function  $Y = \frac{100}{1 + 3^{(7-X)}}$  in which  $Y$  = percentage of affected fruit and  $X$  = scale value.

\*Detection limit of visual assessments in the field (one affected fruit from 2,500 observed fruit per tree).

**Table 2.** Incidence of anthracnose in five olive cultivars in the World Olive Germplasm Bank of Córdoba during 1997-98, 2005-06 and 2006-07.

Cultivar	Fruit-rot incidence (0-10)			Mean	Branch
	1997-98	2005-06	2006-07		dieback (0-5)
Frantoio	0.1 d*	0.0 d	0.1 d	<b>0.1 e</b>	<b>0.0 c</b>
Picual	3.5 c	1.0 c	4.7 c	<b>3.4 d</b>	<b>0.0 c</b>
Arbequina	4.5 c	3.7 bc	5.5 c	<b>4.9 c</b>	<b>0.14 b</b>
Lechín de Sevilla	8.3 b	5.3 b	7.1 b	<b>7.0 b</b>	<b>0.17 b</b>
Ocal	9.9 a	7.7 a	9.6 a	<b>9.2 a</b>	<b>1.38 a</b>
<b>Mean</b>	<b>6.5</b>	<b>5.1</b>	<b>6.1</b>	<b>5.7</b>	

\*Fruit-rot incidence was estimated using a 1-10 rating scale in which binary data (proportion of affected fruit) are normalized by applying the logit transformation of proportion. Scale values were directly subjected to analysis of variance and mean comparison tests.

Means with the same letter are not significantly different according to Fisher's protected LSD test at  $P = 0.05$ .

**Table 3.** Origin, age and susceptibility to anthracnosis of the olive cultivars evaluated in the World Olive Germplasm Bank of Córdoba (Spain).

ORIGIN	Cultivars		Susceptibility categories <sup>1</sup>					P <sup>2</sup> -value	R <sup>3</sup> /S
	(No.)	Year of plantation	HR	R	M	S	HS		
ALBANIA	8	1989-2002	3	0	4	1	0	0.8853	-
ALGERIA	2	1987-2002	0	1	1	0	0	0.7733	-
ARGENTINA	1	1995	0	0	0	0	1	0.4140	-
CHILE	1	1989	0	0	0	0	1	0.4140	-
CROATIA	7	1989-2002	3	0	1	3	0	0.8769	-
CYPRUS	4	2002	1	1	2	0	0	0.5831	-
EGYPT	5	1989-2002	2	2	0	1	0	0.0679	-
FRANCE	8	1987-2002	0	1	2	2	3	0.1124	-
GREECE	17	1987-2002	3	2	4	5	3	0.3729	-
IRAN	4	2002	0	0	3	1	0	0.1023	-
ISRAEL	5	1987-2002	1	0	0	3	1	0.3614	-
ITALY	21	1987-2002	9	4	3	3	2	0.0404	R
LEBANON	2	1987-1989	0	2	0	0	0	0.0833	-
MEXICO	7	2002	0	1	5	1	0	0.1648	-
MOROCCO	3	1987-1995	0	2	1	0	0	0.3458	-
PAKISTAN	1	2002	0	0	1	0	0	0.4140	-
PORTUGAL	6	1987-2002	0	1	2	3	0	0.2435	-
SPAIN	222	1987-2002	7	26	38	75	76	0.0000	S
SYRIA	31	1987-2002	2	3	2	18	6	0.0067	S
TUNISIA	7	1987-2002	2	2	0	0	3	0.3537	-
TURKEY	18	1987-2002	0	7	5	4	2	0.9244	-
USA	4	1992-2002	1	0	2	1	0	0.5403	-
<b>TOTAL</b>	<b>384</b>	<b>1992-2002</b>	<b>34</b>	<b>55</b>	<b>76</b>	<b>121</b>	<b>98</b>	<b>0.0000</b>	<b>S</b>

<sup>1</sup>HR = highly resistant (0 - 1.9 in the 0-10 rating scale), R = resistant (2 - 3.9), M = intermediate (4 - 5.9), S = susceptible (6 - 7.9), HS = highly susceptible (8 - 10).

<sup>2</sup>P-value of the chi-square test used to determine the dominance or non-dominance of resistant or susceptible cultivars.

<sup>3</sup>R = dominance of resistant cultivars, S = dominance of susceptible cultivars. - = no dominance of resistant or susceptible cultivars.

**Table 4.** Disease reaction of five selected olive cultivars inoculated with *Colletotrichum acutatum*<sup>a</sup>.

Cultivar	T <sub>0</sub> <sup>b</sup>	T <sub>50</sub> <sup>b</sup>	T <sub>100</sub> <sup>b</sup>	SAUDPC <sup>c</sup>
Frantoio	26.5 <sup>d</sup>	46.0	>84.0	28.5 e
Picual	19.0	38.4	70.0	54.2 d
Arbequina	10.8	19.0	47.0	72.8 c
Lechín de Sevilla	8.5	12.8	26.8	88.6 b
Ocal	5.8	9.5	22.3	97.1 a

<sup>a</sup>Detached fruit were sprayed with a conidial suspension ( $10^5$  conidia/ml) and incubated in humid chambers at  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  for 84 days. There were 100 inoculated fruit per cultivar. Controls were sprayed with water and remained disease free (data not shown).

<sup>b</sup>Disease development times: days from inoculation to the following three values of disease intensity index (DII):  $\text{DII} > 0$  (T<sub>0</sub>),  $\text{DII} = 50\%$  (T<sub>50</sub>), and  $\text{DII} = 100\%$  (T<sub>100</sub>). DII values were obtained by data interpolation.

<sup>c</sup>Standardized Area Under Disease Progress Curve calculated by trapezoidal integration of DII values expressed as percentage of a maximum theoretical curve.

<sup>d</sup>For each column, means with the same letter are not significantly different according to LSD test at  $P = 0.05$ .

**Table 5. Fruit-rot incidence and dieback severity in 384 cultivars in the World Olive Germplasm Bank of Córdoba (Spain).**

Cultivar	Origin	Plantation date	Fruit rot (0-10)	Branch dieback (0-5)	Susceptibility category
Abbadi	SYR	1997-06	8.5	0	HS
Abbadi Abou Gabra	SYR	1997-06	7.5	0	S
Abbadi Shalal	SYR	1999-06	7.5	0	S
Abou Choki	SYR	2002-02	4	0	M
Abou Kanani	SYR	1997-06	7.5	0	S
Abou Satl Mohazam	SYR	1997-07	6	0	S
Acebuche Caravaca	ESP	1997-08	4	0	M
Acebuchera	ESP	1997-09	10	1	HS
Adkam	SYR	1997-10	8	0	HS
Adramitini	GRC	1997-11	7	1	S
Aggezi Shami	EGY	1992-06	0	0	HR
Aglandau	FRA	1999-06	7	0	S
Agouromanakolia	GRC	1992-06	8.7	1	HS
Alameño Blanco	ESP	1995-02	6.5	0	S
Alameño Cabra	ESP	1987-03	6.7	1	S
Alameño Marchena	ESP	1989-01	3.3	0	R
Alameño Montilla	ESP	1989-01	8	1	HS
Alfafara	ESP	1989-01	4.1	0.7	M
Aloreña Atarfe	ESP	1992-06	8	0.5	HS
Aloreña Iznalloz	ESP	1995-02	2.5	0	R
Amargoso	ESP	1989-01	8	1	HS
Amyg. Nana	GRC	1992-06	6.4	0	S
Amygdalolia	GRC	1989-01	7.7	-	S
Arauco	ARG	1995-02	9	0	HS
Arbequina	ESP	1987-11	4.9	0.1	M
Arbosana	ESP	1989-01	3.3	0	R
Argudell	ESP	1999-06	7.5	0	S
Arroniz	ESP	1999-06	6.7	0	S
Ascolana Tenera	ITA	1989-01	6.4	0.5	S
Asnal	ESP	1989-01	7.1	1	S
Athalassa	CYP	2002-03	4	0	M
Ayrouni	LBN	1989-01	3	0	R
Ayvalik	TUR	1987-11	6.8	1	S
Azapa	CHL	1989-05	8.6	0.3	HS
Azul	ESP	1987-03	1.9	0	HR
Azulejo	ESP	1999-06	4	0	M
Barnea	ISR	1992-06	7	0	S
Barri	SYR	1999-06	7	0	S
Beladi o Sourì	LBN	1987-03	3.8	0	R
Belluti	TUR	1992-06	3.4	0	R
Bent al Kadi	SYR	2002-02	3	0	R
Beyaz Yaglik	TUR	1992-06	5	0	M

Biancolilla	ITA	2002-03	4	0	M
Bical	ESP	1989-01	2.4	0	R
Blanqueta	ESP	1987-03	7.1	-	S
Bodoquera	ESP	1999-06	6	0	S
Bolvino	ESP	1987-03	8.8	0.4	HS
Borriolenca	ESP	1987-03	9.1	1.7	HS
Bouteillan	FRA	1987-03	9.3	0	HS
Buga	HRV	1992-06	1.3	0	HR
Buidiego	ESP	1987-11	4	0	M
Caballo	ESP	1987-11	4.1	-	M
Cakir o Valanolia	TUR	1989-01	5.7	0.3	M
Callosina	ESP	1987-03	1.4	0	HR
Campanita Ecija	ESP	1987-03	6.3	-	S
Canetera	ESP	1990-03	3.8	0	R
Caninese	ITA	1987-11	0.7	0	HR
CañivanoN	ESP	1995-02	6	0	S
CañivanoN1	ESP	1987-11	8.7	0	HS
Carolea	ITA	1992-06	7.7	0.5	S
Carra. Albuquerque	ESP	1989-01	9.5	1.5	HS
Carra. Alcaudete	ESP	1987-03	4.3	0	M
Carra. Cañaverál	ESP	1997-06	4.5	0	M
Carra. Elvas	PRT	1997-06	3.7	0	R
Carra. Jumilla	ESP	1990-03	3.1	0.5	R
Carra. Sierra	ESP	1987-11	6.2	0	S
Carra. Lucena	ESP	1997-06	3.4	0	R
Carra. Porcuna	ESP	1999-06	4	0	M
Carrasquillo	ESP	1992-06	6.2	0.5	S
Castellana	ESP	1999-06	7.7	0	S
Cerezuela	ESP	1987-03	7.3	0	S
Chalchali	SYR	1992-06	8	1	HS
Chalkidikis	GRC	1987-03	4.2	0	M
Changlot Real	ESP	1987-03	4.5	0	M
Chemlal Kabilye	DZA	1987-03	2.9	0	R
Chemlali	TUN	1992-06	3.3	0	R
Chesna	ESP	1989-01	7.4	1.5	S
Chetoui	TUN	1987-03	1.9	0	HR
Chorreao Montefrio	ESP	1989-01	8.3	0	HS
Chorroo	ESP	1987-03	5.5	0	M
Chorroo Castro del Rio	ESP	1987-03	8.2	0.5	HS
Cipresino	ITA	1987-03	6.9	0	S
Cirujal	ESP	1989-01	7.5	0.5	S
Cobrancosa	PRT	1987-03	4.5	1	M
Coratina	ITA	1987-03	3	1	R
Corbella	ESP	1989-01	9.6	2	HS
Cordobes Arroyo de la luz	ESP	1999-06	7	0	S
Cordobes Aliseda	ESP	1997-06	5.8	0	M

Cordovil Castelo Branco	PRT	1997-06	7	0	S
Cordovil Serpa	PRT	1989-01	4.3	0.5	M
Corneja	ESP	1999-06	9	0	HS
Cornezuelo Jaen	ESP	1989-01	6.9	1	S
Cornicabra	ESP	1987-03	8.5	1	HS
Cornicabra Jerez Caballeros	ESP	1999-06	6	0	S
Cornicabra Merida	ESP	1989-01	9.5	1	HS
Cornicabra Murciana	ESP	1999-06	2.7	0	R
Cornicabra-1	ESP	1992-06	5.9	0.5	M
Corralones Andujar	ESP	1992-06	4.2	0	M
Crnica	HRV	1992-06	1.2	0	HR
Curivell	ESP	1999-06	4	0	M
Dan	SYR	1987-03	7.5	0.5	S
Datilero	ESP	1989-01	2.9	0.2	R
De Sal	ESP	1999-06	8	0	HS
Desconocida	ESP	1987-03	7.5	1	S
Doebli	SYR	1999-06	7	0	S
Dokkar	TUR	1999-06	3	0	R
Dolce	EGY	1992-06	2.6	0.5	R
Dolce Agogia	ITA	1987-11	0.1	0	HR
Domat	TUR	1987-03	5.4	-	M
Dulzal	ESP	1995-02	6.5	0	S
Dulzal Carmona	ESP	1987-03	9	0.5	HS
Dwarf D	USA	1992-06	5	0	M
Elmacik	TUR	1992-06	3.7	0	R
Empeltre	ESP	1987-03	0.9	0	HR
Enagua Arenas	ESP	1992-06	3.8	0	R
Erbek Yaglik	TUR	1992-06	7.7	0.5	S
Escarabajillo	ESP	1992-06	7	0.5	S
Escarab. Atarfe	ESP	1992-06	6.7	0	S
Escarab. Posadas	ESP	1987-03	6.1	0	S
Escarab. Ubeda	ESP	1987-03	5.5	0	M
Farga	ESP	1987-03	8.5	0	HS
Figueretes	ESP	1999-06	7	0	S
Fishomi	IRA	2002-02	4	0	M
Forastera Tortosa	ESP	1989-01	8.5	0	HS
Frantoio	ITA	1987-03	0.1	0	HR
Fulla Salze	ESP	1990-03	9.2	1.5	HS
Galega Vulgar	PRT	1987-03	6.7	0	S
Gatuno	ESP	1992-06	9.2	1.5	HS
Gaydoyrelia	GRC	1992-06	5.5	0	M
Genovesa	ESP	1999-06	5.5	0	M
Gerboui	TUN	1990-03	8.5	0.7	HS
Gordal Archidona	ESP	1992-06	6.8	0	S
Gordal Granada	ESP	1992-06	6.5	0.5	S
Gordal Hellin	ESP	1995-02	7	0	S



Gordal Velez Rubio	ESP	1992-06	7.7	0.5	S
Gordal Sevillana	ESP	1987-11	9	1	HS
Gordal Valle las Palmeras	MEX	2002-02	4	0	M
Gordalejo	ESP	1990-03	6.1	0	S
Grappolo o Leccio di Corno	ITA	1987-03	0.3	-	HR
Grit Eytini	TUR	1992-06	2.8	-	R
Grosal Cieza	ESP	1995-02	9	0	HS
Grosal Vimbodi	ESP	1999-06	7.5	0	S
Grossanne	FRA	1987-03	3.3	0	R
Habich. Baena	ESP	1987-03	9	0.5	HS
Habich. Grazalem	ESP	1990-03	6.4	0	S
Hamed	EGY	1992-06	6.5	0.3	S
Haouzia	MAR	1995-02	2.8	0	R
Hojiblanca	ESP	1987-03	8.8	1.5	HS
Imperial	ESP	1987-03	9.3	0	HS
Imperial Jaen	ESP	1987-03	8.7	1	HS
Istarska Bjelica	HRV	1992-06	1.8	0	HR
Itrana	ITA	1987-11	5.8	0	M
Izmir Sofralik	TUR	1987-03	9	0	HS
Jabali	SYR	2002-02	0	0	HR
Jabaluna	ESP	1989-01	8.3	1	HS
Jaropo	ESP	1987-03	8.9	1	HS
Jlot	SYR	1997-06	8	0	HS
Joanenca	ESP	1999-06	4.3	0	M
Kaesi	SYR	1989-01	7.3	1	S
Kalamon	GRC	1987-11	6.2	0	S
Kalokerida	GRC	1989-11	3.5	0	R
Kan Celebi	TUR	1992-06	2	0	R
Kato Drys	CYP	2002-03	4	0	M
Kelb et Ter	SYR	1997-06	6.9	0.5	S
Kerkiras	GRC	1997-06	3	0	R
Khalkhali	SYR	2002-02	7	0	S
Khashabi	SYR	2002-02	6	0	S
Kiraz	TUR	1992-06	5.4	0	M
Kiti	CYP	2002-03	2	0	R
Klirou	CYP	2002-03	0	0	HR
Klon	ALB	1999-06	5	0	M
Kolybada	GRC	1992-06	7	0	S
Konservolia	GRC	1987-11	5	-	M
Koroneiki	GRC	1987-03	1.4	-	HR
Kotruvsi	ALB	1999-06	5	0	M
Kusha	ALB	2002-02	0	0	HR
Lastovka	HRV	1990-03	6	0	S
Leccino	ITA	1987-03	5.5	1	M
Lechin Granada	ESP	1987-03	6.5	1	S
Lechin Sevilla	ESP	1987-03	7	0.2	S

Lentisca	ESP	1989-01	7.4	0	S
Levantinka	HRV	1990-03	6.7	0	S
Limoncillo	ESP	1987-03	8.9	1	HS
Lloron Atarfe	ESP	1989-01	9	1	HS
Lloron Iznalloz	ESP	1990-03	8.5	1	HS
Lloron Ronda	ESP	1989-01	8.7	1	HS
Llumeta	ESP	1999-06	3.8	0	R
Loaime	ESP	1989-01	8.8	1	HS
Lucio	ESP	1992-06	8.3	1	HS
Lucques	FRA	1987-03	8.1	0.5	HS
Mz. Cacerena	ESP	1987-03	5.3	0.2	M
Maarri	SYR	2002-02	4.5	0	M
Macho Jaen	ESP	1999-06	6.8	1	S
Machorron	ESP	1989-01	8	0	HS
Maelia	ISR	2002-03	1.3	0	HR
Mahati	SYR	1999-06	8.8	0.3	HS
Majhol	SYR	1999-06	3.3	0	R
Mz. Piedra Buena	ESP	1997-06	7.3	0	S
Mz. Abla	ESP	1992-06	4.7	0	M
Mz. Agua	ESP	1989-01	7.8	1	S
Mz. Almeria	ESP	1992-06	9.2	0	HS
Mz. Ayora	ESP	1999-06	3.3	0	R
Mz. Guadix	ESP	1992-06	6.9	0	S
Mz. Hellin	ESP	1995-02	2.8	0	R
Mz. Jaen	ESP	1987-03	8.9	1	HS
Mz. Montefrio	ESP	1989-01	3	0	R
Mz. San Vicent	MEX	2002-02	3	0	R
Mz. Sevilla	ESP	1987-03	8.6	1	HS
Mz. Tortosa	ESP	1987-03	6.9	0	S
Mz. Centro	ESP	1990-03	6.3	0	S
Mz. Piquito	ESP	1987-03	3.4	0	R
Mz. Picua	ESP	1999-06	3	0	R
Mz. Prieta	ESP	1997-06	7.5	0	S
Mz. Valle las Pal	MEX	2002-02	5	0	M
Mz. Huercal	ESP	1992-06	9.3	1	HS
Mz. Cabra	ESP	1995-02	8	0.3	HS
Mz. Santisteba	ESP	1992-06	7.8	0	S
Mari	IRA	2002-02	6	0.5	S
Marsaline	TUN	1989-01	8.3	0.7	HS
Marteño Carlota	ESP	1989-01	7	0	S
Masabi	SYR	2002-02	6	0	S
Mastoidis	GRC	2002-03	8	0	HS
Maurino	ITA	1987-03	3.5	0	R
Mavreya	GRC	1992-06	0.2	0	HR
Mawi Stanboli	SYR	1987-03	6.9	0.5	S
Mawi	SYR	1999-06	7	0	S

Megaritiki	GRC	1989-01	0.2	0	HR
Meloncillo	ESP	1992-06	8.8	1	HS
Memecik	TUR	1989-11	4.3	0	M
Menara	MAR	1995-02	5	0	M
Menya	ESP	1999-06	0.5	0	HR
Merhavia	ISR	1987-03	8.8	1	HS
Meski	TUN	1987-03	9	1	HS
Mision San Vicente	MEX	2002-02	4	0	M
Mision Moojeski	USA	2002-03	6.5	0	S
Mision Nieland	USA	2002-03	0	0	HR
Mixani	ALB	1999-06	4	0	M
Mollar Basto	ESP	1997-06	7.5	0.5	S
Mollar Cieza	ESP	1990-03	7.7	0.5	S
Moraiolo	ITA	1987-03	3.4	0	R
Moraiolo T. Corsini	ITA	1987-03	1.3	0	HR
Morejona	ESP	1987-03	5.9	0	M
Morisca	ESP	1987-03	8.3	0	HS
Morisca Mancor	ESP	1995-02	8	0	HS
Morona	ESP	1987-03	8	0.3	HS
Morrut	ESP	1987-11	4.6	0.2	M
Myrtolia	GRC	1992-06	4.5	0	M
Nabali	ISR	1989-01	6.1	0	S
Negral Sabiñan	ESP	1999-06	7.5	0	S
Negrillo Andujar	ESP	1999-06	6.5	0	S
Negrillo Arjona	ESP	1987-03	5.3	0	M
Negrillo Estepa	ESP	1987-03	7.2	1	S
Negrillo Iznalloz	ESP	1989-01	8.7	1	HS
Negrillo Carlota	ESP	1999-06	8.5	0	HS
Negrillo Redondo	ESP	1990-03	9.7	1	HS
Negro del Carpio	ESP	1992-06	6.5	0.5	S
Nev. Bl. Jaen	ESP	1987-03	8.7	0.5	HS
Nev. Bl. Luce	ESP	1989-01	5.3	0	M
Nev. San Vicente	MEX	2002-02	4	0	M
Nev. Santisteban	ESP	1989-01	8.9	1	HS
Nev. Negro Jaen	ESP	1987-03	6.5	0.5	S
Nev. Valle las Palmeras	MEX	2002-02	5	0	M
Nevado Azul	ESP	1987-03	8	0.5	HS
Nevado Basto	ESP	1989-01	7.6	1	S
Nevado Rizado	ESP	1992-06	7.4	0.5	S
Novo	ISR	2002-03	6	0	S
Oblica	HRV	1989-05	4.5	0	M
Ocal	ESP	1987-03	9.2	1.5	HS
Ojo Liebre	ESP	1989-01	8.7	1	HS
Ojua	ESP	1997-06	8	0	HS
Olea Ferruginea	PAK	2002-03	4.5	0	M
Olivo Mancha Real	ESP	1992-06	7.2	0.5	S

Olivo Maura	ESP	1989-01	6	0.5	S
Olivo M. Guadix	ESP	1992-06	8.7	1	HS
Olivo M. Santisteban Pto.	ESP	1987-11	6	0	S
Ouslati	TUN	1987-03	2	0	R
Pajarero	ESP	1987-11	5	0.5	M
Palomar	ESP	1989-01	8.2	0	HS
Palomillo	ESP	1999-06	9	0.5	HS
Patronet	ESP	1992-06	3	0.5	R
Pavo	ESP	1987-03	8.3	1	HS
Pecoso	ESP	1989-01	2.9	0	R
Pendolino	ITA	2002-03	2.9	0	R
Pequeña Casas Ibañez	ESP	1989-01	1.2	0	HR
Perafort	ESP	1999-06	7.5	0	S
Peranzana	ITA	2002-03	1	0	HR
Perillo Jaen	ESP	1987-11	1.4	0	HR
Picholine	FRA	1987-11	4.5	0	M
Picholine Marroqui	MAR	1989-03	3.6	0.1	R
Pico Limon	ESP	1987-03	4	0	M
Pico L. Grazalema	ESP	1990-03	7	0.3	S
Picual	ESP	2002-02	3.4	0	R
Picual Almeria	ESP	1995-02	7	0.5	S
Picual Estepa	ESP	1989-01	9.4	1.5	HS
Picual HC	ESP	2002-03	3.9	0	R
Picual HC1	ESP	1989-01	8.9	0.5	HS
Picual HO	ESP	2002-03	2	0	R
Picudo	ESP	1987-03	9.2	1.5	HS
Picudo BE	ESP	1997-06	10	0	HS
Picudo FR	ESP	1987-03	9.7	1	HS
Picudo Montoro	ESP	1992-06	8.4	1.5	HS
Piñonera	ESP	1999-06	1	0	HR
Plementa Bjelica	HRV	1989-05	6.3	0.5	S
Polinizador	MEX	2002-02	7	0	S
Pulazeqin	ALB	1989-11	6	0	S
Rachati	GRC	1992-06	8	0	HS
Racimal	ESP	1989-01	6.8	0	S
Racimal Jaen	ESP	1987-03	2.7	0	R
Rapasayo	ESP	1987-11	6	0	S
Razzola	ITA	1987-03	0.2	0	HR
Real Sevillana	ESP	1987-03	5	0	M
Rechino	ESP	1989-01	8.1	1.3	HS
Redon. Grazalema	ESP	1999-06	4	0	M
Redon. Logroño	ESP	2002-06	6.8	0	S
Reixonenca	ESP	1999-06	5	0	M
Rosciola	ITA	1987-11	0.6	0	HR
Royal Calatayud	ESP	1999-06	3.5	0	R
Royal Cazorla	ESP	1989-01	4.2	0	M

Royal Sabiñan	ESP	1999-06	5.5	0	M
Royal Villena	ESP	1999-06	4.8	0	M
S. George Greys	USA	1999-06	4	0	M
Sabatera	ESP	1989-01	4.8	0.3	M
Safrawi	SYR	1987-11	7.5	0.1	S
Salgar Redondo	ESP	1992-06	8.4	-	HS
Salonenque	FRA	1989-01	9	1.5	HS
Samsun Tuzlamalik	TUR	1992-06	6.5	0	S
Sandalio	ESP	1999-06	6	0	S
Sant Agostino	ITA	1987-03	8.5	-	HS
Sayfi	SYR	1999-06	9	1	HS
Selvatico	ITA	2002-03	1	0	HR
Sevillana Abla	ESP	1999-06	9	0.5	HS
Sevillano Jumilla	ESP	1989-01	3	0	R
Sevillano Santisteban Pto.	ESP	1992-06	6.4	0	S
Sevillanca	ESP	1987-03	8.4	1	HS
Sevillanca-1	ESP	1989-01	9.4	1	HS
Shami	SYR	1999-06	7.8	0.7	S
Shengeh	IRA	2002-02	4	0	M
Sigoise	DZA	1987-03	4.8	0	M
Sinop	TUR	1992-06	3	0	R
Sollana	ESP	1997-06	4	0	M
Sorani	SYR	1999-06	7	0	S
Stanboli	SYR	1999-06	7.5	0	S
Tanche	FRA	1987-03	4.7	0	M
Tempr. Calatayud	ESP	1987-03	8	0	HS
Tempr. Lucena	ESP	1995-02	6.4	0.7	S
Tempr. Yeste	ESP	1989-01	7.2	1.3	S
Temprano	ESP	1989-01	9	1.5	HS
Toffahi	EGY	1992-06	3.8	0	R
Toffahi-1	SYR	1999-06	1	0	HR
Torcio Cabra	ESP	1992-06	7	0	S
Torcio Huelma	ESP	1987-03	7	0.5	S
Toruno	ESP	1997-06	7	0	S
Trylia o Gemlik	TUR	1987-03	7.5	0	S
Ulliri BB	ALB	2002-02	4	0	M
Ulliri BT	ALB	1999-06	0.5	0	HR
Ulliri Kuq	ALB	1999-06	0.5	0	HR
Uovo Piccione	ITA	1987-11	10	1	HS
Uslu	TUR	1987-03	8.9	1.5	HS
Vallesa	ESP	1989-01	2.5	-	R
Vaneta	ESP	1990-03	4	-	M
Varudo	ESP	1992-06	7.1	0	S
Vera	ESP	1999-06	7	0	S
Verdal Alhama	ESP	1989-01	9.3	2.5	HS
Verdal Manresa	ESP	1989-01	8.3	1	HS

Verdala	ESP	1989-01	6.7	0.1	S
Verdale	FRA	1987-03	6.5	0	S
Verdalon	ESP	1989-01	9.4	2	HS
Verde Verdelho	PRT	1989-11	7.7	0	S
Verdial Badajoz	ESP	1997-06	7.3	0	S
Verdial Cadiz	ESP	1990-03	9.4	2.5	HS
Verdial Huevar	ESP	1987-11	6.3	0	S
Verdial Montefrio	ESP	1990-03	8.2	1	HS
Verdial Velez-Malaga	ESP	1997-06	4.3	0.2	M
Verdiell	ESP	1990-03	6.8	0.3	S
Verdilla Calatayud	ESP	1987-03	8	0.5	HS
Villalonga	ESP	1987-03	3	0	R
Vinyols	ESP	1999-06	5.5	0	M
Wardan	EGY	1992-06	1	0	HR
Yun Gelebi	TUR	1992-06	2.9	0	R
Zaity	SYR	1992-06	3	-	R
Zalmati	TUN	1987-03	0.5	0	HR
Zard	IRA	2002-02	4.5	0	M
Zarza	ESP	1987-03	7.3	0	S
Zarzariega Orcera	ESP	1987-03	4.6	0	M
<b>TOTAL 384 cultivars</b>		<b>Data analysis</b>	<b>CV=41.98%</b>		
			<b>SE=1.719</b>		

<sup>1</sup>Fruit-rot incidence was estimated using a 0-10 rating scale in which binary data (proportion of affected fruit) are normalized by applying the logit transformation of proportion. Scale values were directly subjected to analysis of variance and mean comparison tests.

<sup>2</sup>Branch dieback severity was estimated using a 0-5 rating scale.

<sup>3</sup>HR = highly resistant (0-1.9), R = resistant (2-3.9), M = intermediate (4-5.9), S = susceptible (6-7.9), HS = highly susceptible (8-10).

<sup>4</sup>CV = Coefficient of variation; SE = Standard Error for comparison ( $P = 0.05$ ).

## RESISTENCIA DEL ACEBUCHÉ A LA ANTRACNOSIS DEL OLIVO CAUSADA POR *COLLETOTRICHUM* SPP. Y SU POSIBLE ORIGEN

### 1. INTRODUCCIÓN

El olivo cultivado (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea* L.) ocupa principalmente la cuenca mediterránea, zonas subtropicales de Australia, sur de África y norte y sur de América. Actualmente, el 90% de las 8 millones de hectáreas cultivadas en el mundo se localizan en los países del Mediterráneo (FAO, 2010) y de éstas, unas  $1.5 \times 10^6$  ha se localizan en Andalucía, sur de España (Barranco, 2010). Recientemente, técnicas moleculares han permitido demostrar que en Andalucía se pueden distinguir tres grupos genéticos: i) el olivo cultivado, ii) el olivo silvestre o acebuche (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*), iii) y formas ferales del primero, es decir plantas procedentes de semillas de olivos cultivados (Muñoz-Díez, 2008; Belaj *et al.*, 2010). Las diferencias entre grupos son difusas debido principalmente a la interfertilidad entre ambas variedades botánicas, cultivada y silvestre (Belaj *et al.*, 2007; Besnard y Bervillé, 2000; Lumaret y Ouazzani, 2000). El acebuche es una especie anemófila que se reproduce sexualmente y sus semillas son dispersadas por pájaros (Herrera, 1995). Por el contrario, las variedades de olivo se propagan artificialmente de forma vegetativa (Rallo, 2005).

Los cultivares de olivo actuales son el resultado de procesos de selección empíricos de los individuos más sobresalientes de los acebuches, y cruces entre acebuches y cultivares (locales o introducido) o entre cultivares seguidos de un proceso de propagación vegetativa (Díez *et al.*, 2011; Rallo, 2005). Con excepción de las puntuales mutaciones somáticas, la selección se completa una vez que se han escogido los individuos más interesantes y se propagan clonalmente (Zohary, 2004). En general, la selección se ha basado en características agronómicas, principalmente resistencia a condiciones de estrés, producción, tamaño de la aceituna y contenido graso (Rallo, 2005; Zohary y Spiegel-Roy, 1975).

Desde que se identificaron los centros de origen de las plantas como aquellos donde existe una mayor diversidad genética de especies silvestres próximas, se iniciaron programas de mejora para incorporar o aumentar la frecuencia de genes de interés agrícola en las plantas cultivadas (Leppik, 1970). Si bien, las regiones, sean centro de origen o no, donde los procesos de coevolución planta-patógeno han sido más duraderos

son las más interesantes como fuente de genes de resistencia (Cubero, 2004; Lenné y Wood, 1991). Este es el caso del acebuche en Andalucía, región que fue refugio glacial para la especie y posible centro de domesticación (Breton *et al.*, 2006; Rubio *et al.*, 2006).

El acebuche ha sido considerado una fuente importante de genes de interés agrícola (Mulas, 1999; Mulas *et al.*, 2004), aunque nunca se ha utilizado en los programas de mejora genética de olivo cultivado. Este hecho puede deberse a varios motivos entre ellos: i) el acebuche y olivo son especies altamente heterocigóticas con una descendencia muy variable para cualquier carácter estudiado (Rallo, 2005), ii) los programas de mejora genética del olivo son relativamente recientes y aun no han incorporado genotipos silvestres como parentales (Rallo *et al.*, 2011), iii) muchos genes de interés para los mejoradores pueden encontrarse en variedades locales o poco conocidas, y iv) se desconoce el comportamiento de los genotipos de acebuche para muchos caracteres agronómicos de interés.

Recientemente, (Corella *et al.* 2008) describieron varios genotipos de acebuche que muestran altos niveles de resistencia a la Verticilosis causada por *V. dahliae*, aunque la mayoría de los genotipos evaluados fueron susceptibles al patógeno. En este caso, al tratarse de una traqueomicosis, la utilización de estos genotipos de acebuche como patrón para variedades de olivo cultivadas es inmediata siempre cuando exista una buena compatibilidad patrón-injerto (Porrás-Soriano *et al.*, 2003). En el caso del Repilo, la enfermedad foliar más importante del olivo causada por *Spilocaea oleagina*, los acebuches muestran un nivel de resistencia mas elevado que el olivo cultivado (Moral *et al.*, 2005); en cambio, no se conoce su resistencia/susceptibilidad a la Antracnosis la enfermedad más importante del fruto en olivo cultivado y que en ocasiones, puede afectar al acebuche (Moral *et al.*, 2009). Si bien, prospecciones sistemáticas realizadas han señalado la práctica ausencia de esta enfermedad en los acebuches andaluces (Muñoz-Díez, 2008), aunque no se han realizado test de patogenicidad y la comparación con cultivares de olivo de reacción conocida.

La Antracnosis del olivo está causada por dos especies de *Colletotrichum*, *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*. En Portugal y España, *C. acutatum* es la especie predominante con una escasa presencia de *C. gloeosporioides* (Martín y García-Figuéres, 1999; Tahlinhas *et al.*, 2005). Posteriormente, la especie *C. acutatum* s. l. ha sido subdividida



en 31 especies distintas, de las cuales *C. acutatum* s. s., *C. fiorinae*, *C. godetiae*, *C. rhombiforme*, *C. nymphaeae* afectan al olivo en todo el mundo (Damm *et al.*, 2012). En Andalucía, únicamente la especie *C. godetiae* ha sido identificada.

Los microorganismos comunes en el suelo o que infectan frutos pueden afectar a la supervivencia de las semillas o plántulas (Baker y Smith, 1966; George, 2009; Kirkpatrick y Bazzaz, 1979). Este hecho puede condicionar la selección natural del acebuche hacia resistencia/susceptibilidad a la Antracnosis. A pesar que se han realizado estudios de colonización de la aceituna utilizando distintos cultivares de olivo (Gomes *et al.*, 2009), se desconoce si el patógeno supera la barrera que supone el hueso (endocarpo), puede colonizar la semilla y afecta a su germinación, como ocurre en otros huéspedes (Britton y Redlin, 1995; Kirkpatrick y Bazzaz, 1979; Sinclair, 1991).

Los objetivos principales del presente trabajo son: (i) estudiar la susceptibilidad de distintos genotipos de acebuche procedente de diferentes zonas de Andalucía, y ii) estudiar el efecto de la infección por *Colletotrichum* spp. sobre las semillas y plántulas de olivo. Este trabajo se ha presentado parcialmente de forma preliminar en dos congresos (Moral *et al.*, 2009; Xavier *et al.*, 2012).

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Evaluación de la resistencia/susceptibilidad de acebuches**

#### **2.2. Material vegetal**

Durante el otoño-invierno de 2011 se recolectaron 45 muestras de frutos de acebuche (acebuchinas) en cinco provincias de Andalucía. Cada grupo estaba constituido por semillas (F1) procedentes de un acebuche individual. En total se recolectaron acebuchinas procedentes de 13 acebuches en la provincia de Cádiz, 9 en Córdoba, 9 en Huelva, 6 en Jaén y 8 en Sevilla. En todos los casos se recolectaron acebuchinas de genotipos que muestran características moleculares propias de la variedad botánica (Belaj *et al.*, 2010).

En el laboratorio se seleccionaron acebuchinas sanas en estado fenológico uno, verde-amarillento (Barranco y Rallo, 2005). Las acebuchinas se lavaron durante 10 min bajo corriente de agua. Posteriormente, se introdujeron en matraces de 1 L con Agua

Destilada Desionizada (ADD) y se añadieron seis gotas de Tween-20 por matraz. Éstos se pasaron al baño de ultrasonido durante 4 min. A continuación, se lavaron suavemente, se mantuvieron bajo corriente de agua durante 45 min, se sumergieron durante 1 min en solución al 10% de hipoclorito sódico (50 g Cl / L) y se aclararon con ADD estéril. Por último, los frutos se dejaron secar en la cámara de flujo laminar y se guardaron a 4°C para su inoculación al día siguiente.

### 2.3. Inoculación e incubación

Para la inoculación se utilizó el aislado Col-121 (*C. godetiae*; anteriormente *C. clavatum* o *C. acutatum* grupo A4), procedente de olivos afectados por Antracnosis en el Término Municipal (TM) de Montilla. Las aceitunas se inocularon con una suspensión  $10^5$  conidios/ml del patógeno, utilizando una suspensión distinta por repetición. La suspensión conidial se aplicó sobre las aceitunas mediante pulverización. Antes de ser inoculados, los frutos se situaron sobre cámaras húmedas. Éstas consistían en recipientes de plástico de  $22 \times 16 \times 10$  cm de profundidad, con una rejilla de plástico sobre la cual se colocó un papel que comunicaba con una capa de agua que cubría el fondo del recipiente. En cada cámara húmeda se situaron 34 aceitunas o aceitunas.

Para cada genotipo de acebuche se utilizaron tres cámaras húmedas (repeticiones) y seis en el caso de los cultivares. Los cultivares de referencia utilizados fueron: ‘Frantoio’ y ‘Picual’, considerados resistentes a la Antracnosis, y ‘Hojiblanca’, considerado susceptible (Moral y Trapero, 2009). En todos los casos se utilizaron el mismo número de frutos tratados con agua como testigo.

### 2.4. Evaluación

La evaluación de los síntomas se realizó semanalmente durante un mes utilizando una escala de severidad de 0-6 (0 = no síntomas, 1 = 1-25% superficie de la aceituna afectada, 2 = 26-50%, 3 = 51-75%, 4 = 76-99%, 5 = 100% aceituna jabonosa, 6 = aceituna momificada). Posteriormente, se calculó el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE). Además se calculó un Índice de Severidad de Enfermedad (DSI), obtenido al dividir la pendiente máxima de la curva logística, ajustada a los datos de severidad para cada momento de evaluación, por el tiempo en el que se alcanza el 50% de DSI según Moral y Trapero (2009).

### 3. Infección de endocarpos y semillas

#### 3.1. Material vegetal

Durante 2007 y 2008, aceitunas del cultivar susceptible ‘Hojiblanca’ asintomáticas y con síntomas característicos de Antracnosis, fueron recolectadas en la finca La Mina perteneciente al Instituto de Formación Agrícola y Pesquera de Andalucía (IFAPA) en Cabra, provincia de Córdoba (37.28 N, 4.26 W). La finca está situada en una comarca con un clima típicamente Mediterráneo con precipitación anual de 702 mm y verano muy seco (< 30 mm de lluvia desde Junio a Septiembre). Las prácticas culturales aplicadas eran las características del cultivo en Andalucía incluyendo la aplicación de fungicidas, principalmente de origen cúprico, para el control de enfermedades aéreas del olivar (Barranco *et al.*, 2008).

#### 3.2. Tratamiento de las aceitunas

##### *Endocarpos*

Doscientas aceituna sintomáticas y asintomáticas, cien de cada clase, fueron lavadas durante 15 min bajo corriente de agua y se desinfectaron con lejía comercial (50 g Cl / L) al 20% durante 1 min. Posteriormente, el mesocarpo de los frutos fue eliminado con ayuda de un escalpelo y el endocarpo se limpió cuidadosamente con un estropajo para eliminar los restos que pudiesen quedar adheridos a éste. A continuación, los endocarpos se volvieron a desinfectar con lejía al 40% durante 2 min y se dejaron secar. El ensayo se repitió dos veces en años consecutivos.

##### *Semillas*

Cien aceitunas sintomáticas y cien asintomáticas, fueron lavadas y desinfectadas con lejía al 20% durante 1 min y los endocarpos nuevamente desinfectados con lejía al 40% durante 2 min. Los endocarpos fueron cortados utilizando unos cortatubos, las semillas fueron extraídas con unas pinzas y desinfectadas con lejía al 10% durante 1 min. Posteriormente, se enjuagaron con ADD estéril y se dejaron secar. El ensayo se repitió en dos años consecutivos. Para garantizar que no se producía infección cruzada entre el endocarpo y la semilla, el ensayo anterior se repitió pero los endocarpos, después de ser desinfectados con lejía al 20%, se flamearon

utilizando alcohol durante unos 3 s. Además, se realizó una segunda prueba utilizando lejía 50% en la desinfestación del endocarpo y una duración del flameado de 6 s.

Finalmente, las semillas y endocarpos fueron cultivadas en placas de Petri con PDA acidificado y diluido (12 g PDA / L) que se incubaron a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  con fotoperiodo de 12 h. En todos los casos, se evaluaron las infecciones latentes de *Colletotrichum* spp., en las aceitunas asintomáticas utilizando la técnica de Paraquat (Moral *et al.*, 2010).

### 3.3. Evaluación

A los 7 días de incubación, se contabilizó el porcentaje de endocarpos y semillas de los cuales se había obtenido el *C.godetiae*. El patógeno se identificó atendiendo a la morfología de su colonia y en caso de duda se realizaron montajes para la identificación de los conidios típicos del hongo. Además, se evaluó la presencia del patógeno en la cavidad de la semilla en los endocarpos utilizando un microscopio estereoscópico.

## 4. Efecto en la germinación y desarrollo de la radícula

### 4.1. Material vegetal y germinación

Doscientas aceitunas del cultivar susceptible ‘Hojiblanca’ asintomáticas y con síntomas característicos de Antracnosis, cien de cada clase, fueron recolectadas nuevamente en la finca La Mina. Las aceitunas y endocarpos fueron desinfestados con lejía al 20 y 40%, respectivamente como se describe anteriormente. Las semillas desnudas se sometieron a un proceso de estratificación para su germinación. Para ello, se depositaron sobre placas de Petri con perlita húmeda (40 g de perlita y 100 ml de agua estéril) y se incubaron a  $14^\circ\text{C}$  en oscuridad durante 45 días (Santos-Antunes *et al.*, 2005). Posteriormente, las semillas fueron trasplantadas a contenedores con perlita estéril para el desarrollo del sistema radicular. Las semillas fueron regadas de forma alterna con agua estéril o solución Hoagland. A los 55 días del trasplante, se realizaron aislamientos de la radícula de 40 semillas (procedente de frutos sintomáticos y asintomáticos), diferenciando tres zonas (cuello, intermedia y ápice). De igual forma se procesaron todas las semillas de ambos tratamientos que mostraban necrosis radicular (Tabla 3).

### 4.2. Evaluación

A los 45 días de que se iniciase el proceso de estratificación y antes del trasplante, se evaluó el estado general de las semillas y se midió (mm) el tamaño de la radícula. Tras

el trasplante, se realizaron aislamientos del patógeno y se contabilizó el porcentaje de radículas infectadas por *Colletotrichum* spp. Además, las semillas y radículas fueron evaluadas detenidamente para detectar si éstas mostraban necrosis o acérvulos del patógeno.

## **5. Dinámica de infección en la aceituna**

### **5.1. Material vegetal**

Durante 2010, aceitunas sanas y en estado fenológico 2, envero (Barranco y Rallo, 2005), de los cvs. Hojiblanca y Frantoio, susceptible y resistente respectivamente (Moral y Trapero, 2009), fueron recolectadas en la finca La Venta del Llano perteneciente al IFAPA-Andalucía, situada en el TM de Mengibar, Jaén, debido a la menor presencia de la enfermedad. Las aceitunas seleccionadas se lavaron, desinfectaron, inocularon con una suspensión de  $10^5$  conidios/ml e incubaron de la forma descrita anteriormente. En total se inocularon 160 frutos por cultivar.

### **5.2. Seguimiento de la infección**

Para estudiar cómo el patógeno alcanza la semilla de la aceituna y establecer la dinámica de infección, se realizaron aislamientos a los 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 21 días de incubación. En cada momento de evaluación, se retiraron 20 frutos por cultivar y se realizaron aislamientos independientes en el exocarpo, mesocarpo, endocarpo (piel, pulpa y hueso, respectivamente) y semilla utilizando 5 aceitunas por tejido y cultivar. Para ello y con ayuda de un escalpelo se cortaron trozos unos  $3 \times 3 \times 3$  mm se depositaron sobre un papel de filtro estéril para eliminar el aceite y agua y se sembraron en placas de Petri con PDA acidificado. Las placas se sellaron e incubaron de la forma descrita y el porcentaje trozos de tejido con el patógeno se cuantificó a los 10 días de incubación. El experimento se repitió en 2011 aunque utilizado aceitunas en estado fenológico uno, verde-amarillento (Barranco y Rallo, 2005) y el seguimiento de la infección se realizó a los 2, 6, 12 y 21 días de incubación.

## **6. Susceptibilidad del sistema radicular de plántulas de olivo y acebuche a la infección**

Para estudiar la capacidad del patógeno de causar infecciones en el sistema radicular de las plántulas de olivo y acebuche se llevaron a cabo dos ensayos durante 2010 y 2011.

Para ello se germinaron testigos de semillas: acebuchinas, procedentes de polinización abierta; aceitunas de distintos cultivares, en polinización abierta; y aceitunas procedentes de cruzamientos dirigidos proporcionadas por la Unidad de Pomología del Dpto. de Agronomía (Tabla 1).

**Tabla 1.** Plántulas de olivo y acebuche inoculadas mediante inmersión del sistema radicular en una suspensión de conidios de *C.godetiae*.

Ensayo / año	Parental	Genotipo	Procedencia
I / 2010	HU102	Acebuche × libre	Huelva
	SE101	Acebuche × libre	Sevilla
	JA05	Acebuche × libre	Jaén
		Manzanilla de Sevilla × libre	
		Cornicabra × libre	
		Arbequina × libre	
	II / 2011	HU102	Acebuche × libre
AR3000		Acebuche × libre	Córdoba
		Arbosana × Koroneiki	
		Picual × Frantoio	
		Arbosana × Sikitita	

En el primero de los ensayos (2010), cuando las plántulas habían desarrollado 4 pares de hojas verdaderas, fueron inoculadas mediante inmersión del sistema radicular en una suspensión ( $10^5$  conidios / ml) de *C. godetiae* (aislado Col-121) durante 1 min (Figura 1).



**Figura 1.** Inoculación de raíces de plántulas de olivo y acebuche con una suspensión de conidios de *Colletotrichum godetiae* (izq.). Plántulas inoculadas y trasplantadas en perlita húmeda (drcha).

Posteriormente, las plántulas fueron trasplantadas a contenedores de plástico (4 × 4 × 6 cm) con perlita húmeda e incubadas a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  y fotoperiodo de 12 h. A los 7 días de incubación, las plántulas se extrajeron de la perlita para su posterior evaluación y

aislamiento del patógeno en PDA acidificado. Se utilizaron 25 plántulas por genotipo y testigo y el experimento se repitió 3 veces. En el segundo ensayo (2011), se realizó de la misma forma descrita aunque utilizando plántulas con un par de hojas vestigiales.

### **6.1. Evaluación**

En la primera de las inoculaciones, a los 7 días de incubación, se evaluó la severidad de síntomas radiculares de cada plántula utilizando una escala 0-3, donde 0 = ausencia de síntomas 1= síntomas ligeros 2= síntomas severos y 3 = necrosis completa y pérdida de gran parte de las raíces. Además se contabilizó el número de hojas nuevas y el sistema radicular fue secado a 45°C durante 48 h y pesado. En el segundo ensayo, se evaluó el peso fresco del total de la plántula y su raíz, el peso de la raíz seca y el número de pares de hojas desarrollados.

### **7. Análisis de los datos**

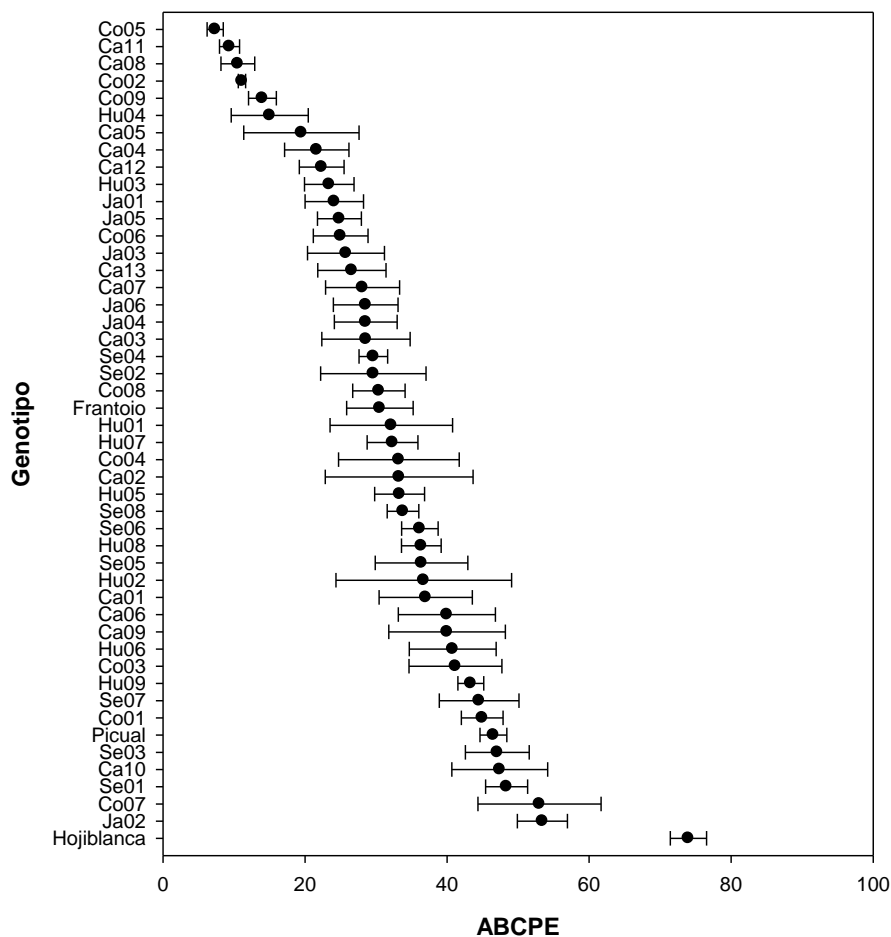
En el primero de los ensayos, el ABCPE del conjunto de acebuchinas medida se comparó con la resistencia que mostraban las aceitunas de cada uno de los cultivares de forma independiente mediante contrastes ortogonales. En el segundo experimento, el defecto del tipo de fruto, sintomático o asintomático, en la germinación de las semillas y el número de semillas que mostraban podredumbre se estudió utilizando una Chi-cuadrada. Además, se estudió el efecto del tipo de fruto en la longitud de la radícula (mm) mediante una t-student. En el último experimento del presente capítulo, se estudió el efecto de la inoculación (plántulas inoculadas o no) o la variedad botánica (acebuche o cultivar) en las variables dependientes (peso de la planta, peso seco o no de la raíz, número de pares de hojas y severidad de síntomas) mediante contrastes ortogonales. La variable dependiente peso (Y) se transformó como  $\text{Log}(Y + 0.5)$  para cumplir la normalidad y homogeneidad de varianzas. Finalmente, se estudiaron las relaciones entre variables dependientes mediante correlación de Pearson o de Spearman dependiendo del tipo de variables estudiada.

## **8. RESULTADOS**

### **8.1. Evaluación de la resistencia/susceptibilidad de acebuche**

Durante la recolección de las acebuchinas por Andalucía no se observaron síntomas de la Antracnosis en ningún caso. A pesar de ello, algunas acebuchinas testigo, 1 ó 2 frutos por acebuche (Ca04, Ca08, Co07, Ja05, Ja06 y Hu09), mostraron infecciones latentes.

En el caso de los frutos inoculados, los primeros síntomas de Antracnosis fueron observados en las aceitunas del cv. Hojiblanca a los 7 días de incubación. Éstos consistían inicialmente en manchas de color ocre, sobre las cuales el patógeno desarrolló acérvulos y conidios en masas de color anaranjado. La mayor parte de las acebuchinas y aceitunas inoculadas mostraron síntomas de Antracnosis a los 14 días de incubación, excepto las procedentes de los acebuches Ca08, Ca11 y Ja04 que no mostraron síntomas hasta los 21 días de incubación. Este retraso en la aparición de síntomas impidió un ajuste logarítmico adecuado de los datos de severidad sobre el tiempo. De ahí que el Índice de Severidad de la Enfermedad (DSI) no permitió una buena comparación de la resistencia de los genotipos.



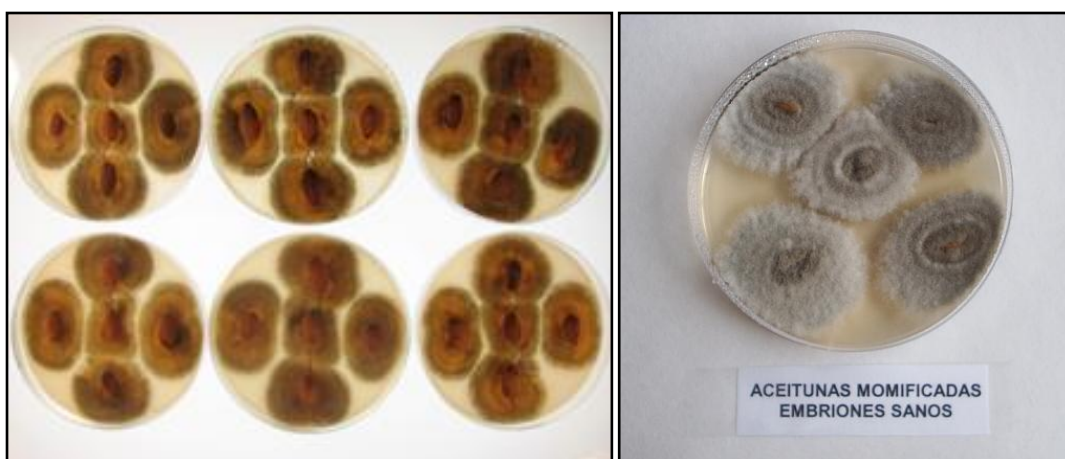
**Figura 2.** Área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) de frutos de 45 genotipo de acebuche y 3 cultivares inoculados con *Colletotrichum godetiae*. El punto representa la media de 102 frutos y las barras la desviación estándar.



En general, los genotipos de acebuche fueron resistentes a la Antracnosis. Únicamente cinco de ellos (Ca10, Co07, Ja02, Se01 y Se03) mostraron un ABCPE media superior a la mostrada por el cultivar resistente ‘Picual’, aunque en todos los casos inferior a la del cultivar susceptible ‘Hojiblanca’. Cuando se comparó el conjunto de los genotipos de acebuche con los cultivares se observó que las acebuchinas son significativamente más resistentes que las aceitunas de los cvs. Hojiblanca y Picual (contrastos ortogonales;  $P < 0.05$ ) y no se diferencian de las aceitunas del cultivar resistente Frantoio (contrastos ortogonales;  $P=0.7453$ , incluso 22 genotipos de acebuche mostraron un ABCPE media inferior a la mostrada por el cv. Frantoio (Figura 2).

### 9. Infección de endocarpos y semillas

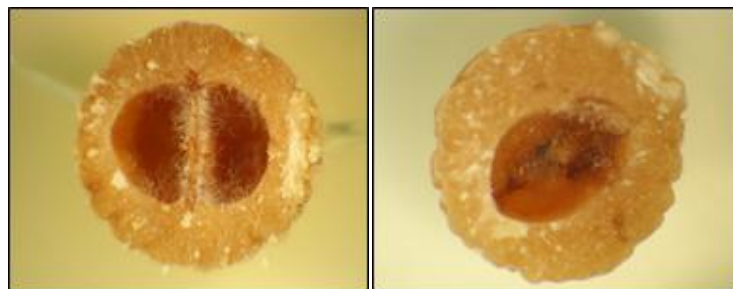
El patógeno fue fácilmente aislado de todos los endocarpos que procedían de aceitunas momificadas independientemente del método de desinfestación utilizado (Figura 3). Además, el patógeno fue aislado del 8% de los endocarpos de las aceitunas asintomáticos coincidiendo con el porcentaje de infecciones latentes que se detectó utilizando Paraquat. De los huesos también se aislaron distintos contaminantes destacando los géneros *Alternaria*, *Aureobasidium* y *Mucor*.



**Figura 3.** Aislamiento de *Colletotrichum* spp., de endocarpos (izq.) y semillas (drcha.) procedentes de aceitunas momificadas.

Además, pudimos detectar la presencia del micelio en el interior de los huesos identificándose el canal peduncular como punto de entrada del patógeno en el interior de la cavidad del hueso.

En todos los casos, el patógeno fue identificado por aislamiento en medio de cultivo PDA (Figura 4).



**Figura 4.** Micelio de *Colletotrichum* en la cavidad de la semilla del hueso de aceituna.

Las aceitunas del cv. Hojiblanca presentaron entre el 25 y 37% de semillas abortadas dependiendo de la muestra. Éstas se caracterizaron por mostrarse necrosadas, deshidratadas y de menor tamaño que las semillas completamente desarrolladas. Las semillas procedentes de aceitunas momificadas, cuyos huesos fueron desinfectados con lejía (ensayos I y II), mostraron casi en su totalidad (> 92 %) infecciones de *Colletotrichum* spp., independientemente de que fuese abortada o no. El patógeno también fue aislado de las semillas procedentes de frutos asintomáticos en porcentajes similares a los que se detectaron directamente en los frutos utilizando Paraquat (ensayo D). Cuando los huesos fueron flameados durante 3 s y desinfectados (ensayo III) hubo una disminución del aislamiento del patógeno de las semillas procedentes de los frutos momificados (59%), del resto de las muestras no se aisló *Colletotrichum* spp. Cuando el tiempo de flameado se prolongó hasta 6 s (ensayo IV), el patógeno no se aisló de ninguna de la muestras utilizadas (Tabla 2).

**Tabla 2.** Efecto del método de desinfestación en el aislamiento de *Colletotrichum* spp. de 100 semillas de olivo

Ensayo	Aceitunas	Tratamiento	Semillas ( <i>Colletotrichum</i> %)	
			Sanas	Abortadas
I	Asintomáticas	Desinfestación del fruto y endocarpo con lejía 20 y 40% respectivamente	69 (6)	31 (0)
	Momificadas		68 (97)	32 (100)
	Asintomáticas	Tratamiento del fruto con Paraquat e incubación	100 (8)	
II	Asintomáticas	Desinfestación del fruto y endocarpo con lejía 20 y 40% respectivamente	63 (15)	37 (5)
	Momificadas		69 (100)	31 (92)
III	Asintomáticas	Deshuesado, flameado (3 s) y lejía 20%	75(0)	25 (0)
	Momificadas		74 (59)	26 (0)
IV	Asintomáticas	Deshuesado, flameado (6 s) y lejía 50%	71 (0)	29 (0)
	Momificadas		69 (59)	31 (0)
	Asintomáticas	Tratamiento del fruto con Paraquat <sup>a</sup>	100 (9)	

<sup>a</sup>Tratamiento realizado según Moral *et al.*, 2010

### 10. Efecto en la germinación y desarrollo de la radícula

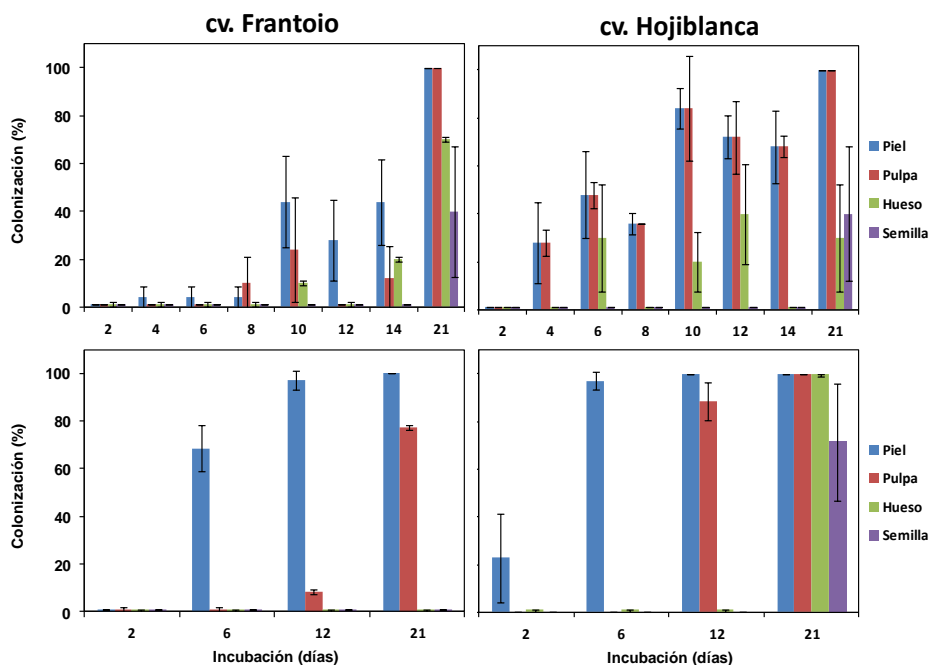
Debido a que no se detectaron diferencias significativas (Chi-cuadrado,  $P > 0.05$ ) entre las dos repeticiones del ensayo, los datos que se presentan a continuación son el promedio de ambas repeticiones. En las semillas procedentes de aceitunas asintomáticas, el patógeno causó la podredumbre de un 4% de las semillas sobre las cuales desarrollaron acérvulos y conidios en masa (Figura 5). De las restantes semillas, el 42% germinaron y desarrollaron una radícula sana después de 45 días de estratificación.

En el caso de las semillas procedentes de aceitunas con síntomas, el patógeno causó podredumbre de la semilla en un 11% de ellas (Figura 6). De las semillas sanas, el 54% no germinaron y el 46% restante germinaron. El patógeno causó la muerte de seis plántulas a producir podredumbre y necrosis de la radícula principal (Figura 7). El tipo de fruto no afectó significativamente ( $P = 0.5873$ ) al tamaño de la radícula, siendo en el caso de los frutos momificados de  $34 \pm 2.7$  mm y en el de los frutos asintomáticos  $31 \pm$

6 mm. Una vez trasplantadas a perlita húmeda y tras 55 días, *Colletotrichum* había causado necrosis generalizada los sistemas radiculares de dos y cuatro plántulas, procedentes de las aceitunas asintomáticas y sintomáticas respectivamente. El patógeno se aisló del sistema radical del 85% de las plántulas procedentes de aceitunas momificadas pero no de aquellos procedentes de frutos sanos. En general, *Colletotrichum* se aisló principalmente de la cofia de la radícula principal y en menor proporción de la zona intermedia de la raíz principal y el cuello de la plántula (Tabla 3).



**Figura 5.** Semillas de olivo con acérvulos y conidias de *Colletotrichum* junto a semillas sanas (Izq.) y semillas germinadas y afectadas por el patógeno junto a semillas germinadas y sanas (drcha.).



**Figura 6.** Porcentaje de tejidos de aceituna colonizados por *Colletotrichum godetiae* durante el proceso de infección. Aceitunas inoculadas de los cvs. Frantoio (resistente) y Hojiblanca (susceptible) en enero (superior) y verde-amarillentas (inferior). Las columnas representan la media de 25 trozos de fruto y las barras la desviación estándar.

Resumiendo, de las 200 semillas extraídas de las aceitunas momificadas, el patógeno causó la podredumbre de 22 de ellas; de las 82 semillas que germinaron, 6 mostraron necrosis aguda de la radícula principal que impidió su desarrollo; 4 plántulas mostraron un sistema radical necrosado y no terminaron su desarrollo y del 85% de las restantes se aisló el patógeno.

**Tabla 3.** Porcentaje de aislamiento de *Colletotrichum* de radículas de semillas de olivo procedentes de aceitunas con síntomas o no de Antracnosis

Tipo de fruto	Estado de la raíz	N	Zona de aislamiento	Nº semillas con <i>Colletotrichum</i> (%)
Asintomáticos	Sana	20	Cuello	0 (0)
			Intermedia	0 (0)
			Cofia	0 (0)
	Necrosada	2 <sup>a</sup>	Cuello	2 (100)
			Intermedia	2 (100)
			Cofia	2 (100)
Asintomáticos	Sana	20	Cuello	17 (85)
			Intermedia	17 (85)
			Cofia	17 (85)
	Necrosada	4 <sup>a</sup>	Cuello	3 (66)
			Intermedia	3 (66)
			Cofia	4 (100)

<sup>a</sup>Número total de radículas que mostraron necrosis 2 de 81 y 4 de 74

### 11. Dinámica de infección de la aceituna

El patógeno causó infección y desarrollo de síntomas en todos los tejidos (piel, pulpa, hueso y semilla) de las aceitunas de ambas variedades; aunque hubo un retraso sustancial en la expresión de síntomas en las aceitunas del cv. Frantoio respecto a las del cv. Hojiblanca. Por ejemplo, mientras que la mayoría de las aceitunas del cv. Hojiblanca mostraban podredumbre jabonosa entre la 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> semana de incubación, las del cv. Frantoio lo hacían pasada la 6<sup>a</sup> semana. Así mismo, en la primera de las inoculaciones, el patógeno fue aislado del 28% de los trozos de piel y pulpa de las aceitunas del cv. Hojiblanca a los 4 días de la inoculación. En ese momento, el patógeno había colonizado únicamente el 4% de la piel de las aceitunas cv. Frantoio y no fue aislado de la pulpa de estos frutos hasta los 8 días de incubación. En general, estas diferencias se mantuvieron hasta el día 21 cuando se igualaron.

Cuando los frutos se inocularon en estado fenológico 1 (verde-amarillentos) nuevamente hubo un retraso marcado en la velocidad de colonización del fruto en el cv. Frantoio respecto a 'Hojiblanca'. A los 12 días de incubación, el patógeno fue aislado

del 88 y 9% de los trozos de pulpa de las aceitunas de 'Hojiblanca' y 'Frantoio', respectivamente y a los 21 días únicamente había alcanzado el hueso y las semillas de las aceitunas del cv. Hojiblanca.

Nuevamente, las observaciones al microscopio estereoscópico permitieron detectar que el hueco del canal peduncular del fruto estaba colonizado por el patógeno, constituyendo este el punto de entrada del patógeno en la semilla.

## **12. Susceptibilidad del sistema radicular de plántulas de olivo y acebuche a la infección**

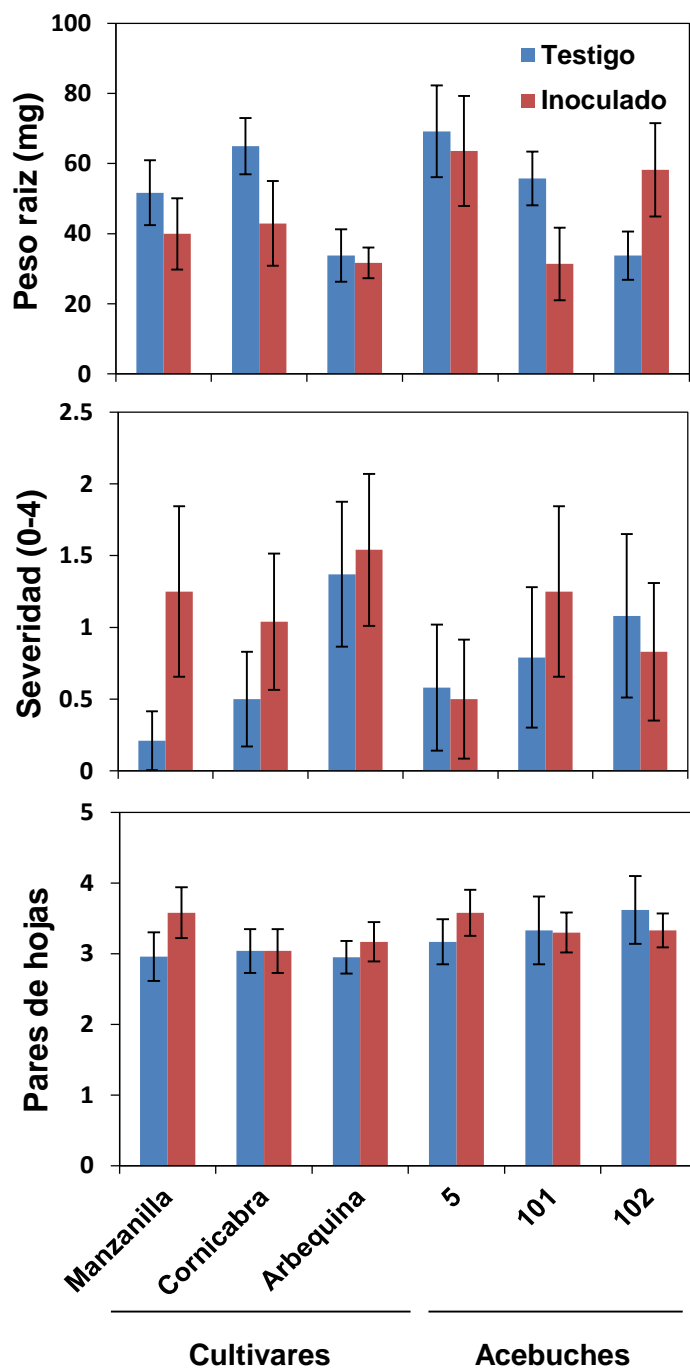
Las plántulas de olivo y acebuche que fueron inoculadas mediante inmersión del sistema radicular en una suspensión de conidios del patógeno mostraron distintos síntomas durante el periodo de incubación. El más común de todos fue la marchitez generalizada que afectó principalmente a plántulas procedentes de los cvs. Cornicabra y Arbequina. Otros síntomas observados fueron el abarquillamiento de las hojas y la muerte de la yema apical. Las raíces de las plántulas inoculadas mostraban necrosis generalizada y pérdida de parte de ellas y el patógeno fue aislado con facilidad de ellas.

El sistema radicular del conjunto de plántulas inoculadas tuvo un peso medio de 44 mg, en cambio el peso del sistema radicular de las plántulas testigo fue 51 mg, existiendo diferencias significativas (contrastes ortogonales,  $P = 0.0019$ ). Cuando se comparó la variedad botánica, acebuche vs olivo, el sistema radicular de las plántulas de acebuche, independientemente de que estuviesen inoculado o no, estaba significativamente ( $P = 0.0437$ ) más desarrollado que el de plántulas procedentes de olivos: 52 y 44 mg, respectivamente.

Aunque el sistema radicular de algunas plántulas testigo mostró alguna necrosis y lesiones, las plantas inoculadas mostraron un índice de severidad significativamente ( $P = 0.0094$ ) mayor (1.07) que las no inoculadas (0.76). Por el contrario no hubo diferencias significativas ( $P = 0.2274$ ) cuando se comparó la variedad botánica.

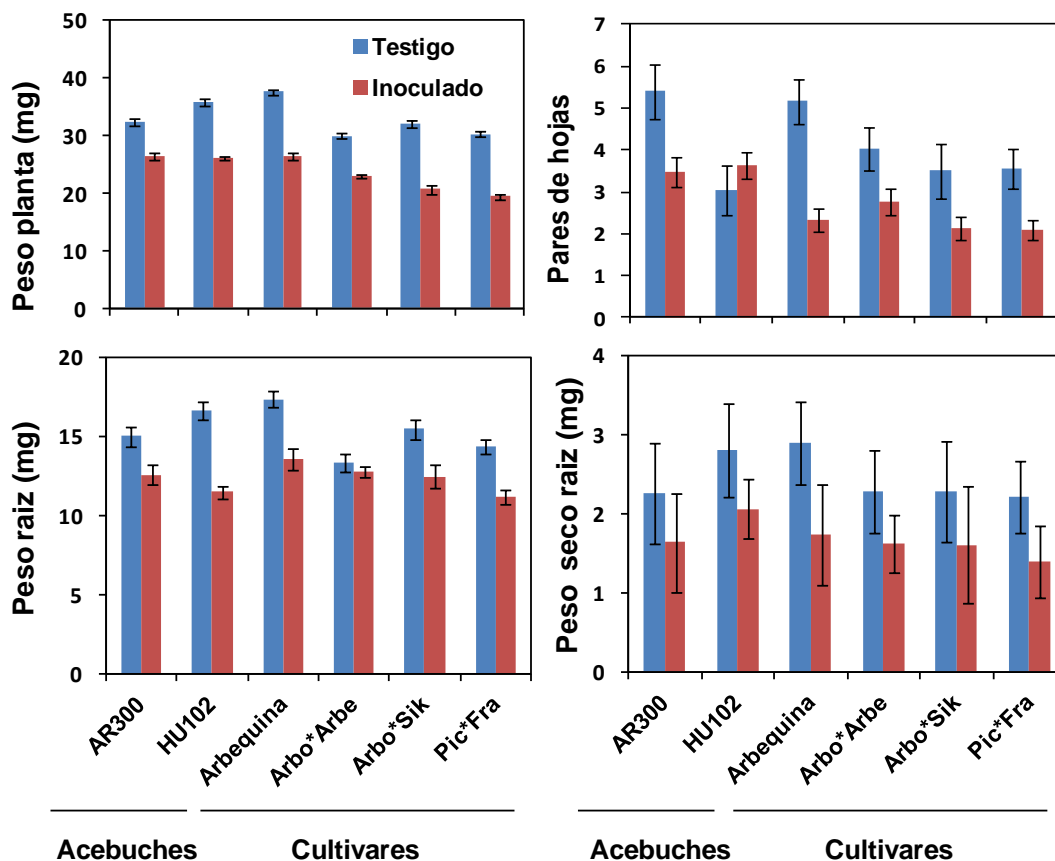
Por último, la inoculación no afectó ( $P = 0.0551$ ) al número de pares de hojas que mostraban las plántulas, pero sí lo hizo ( $P = 0.0011$ ) la variedad botánica. Así, las plántulas procedentes de acebuche y olivo desarrollaron 3.4 y 3.1 pares de hojas respectivamente durante el experimento. Cuando se estudió la correlaciones existentes

entre las variables dependientes estudiadas (peso del sistema radicular, valor de escala de severidad y número de pares de hojas) únicamente se obtuvo una correlación significativa y negativa (correlación de Spearman:  $r = - 0.5426$ ;  $P < 0.0001$ ) entre el índice de severidad de daños y el peso del sistema radicular de la plántula.



**Figura 7.** Efecto de la inoculación de raíces de olivo y acebuche con una suspensión de conidios de *Colletotrichum godetiae* en el peso del sistema radicular (mg), la severidad de síntomas (0-3) y el número de pares de hojas nuevas. Las columnas representan la media de 25 plántulas y las barras la desviación estándar.

En la segunda inoculación realizada utilizando plántulas más jóvenes, nuevamente el síntoma más común fue la marchitez general de la plántula seguida de defoliación. Este síntoma se observó sólo en las plántulas inoculadas destacando aquellas procedentes de cultivares. Además, el patógeno causó muerte de dos plántulas (*damping off*) procedentes de cv. Arbequina. La inoculación causó una disminución significativa ( $P < 0.0001$ ) en el peso de las plántulas que pasaron de 335 mg, en los testigos, a 237 mg en las inoculadas. Igualmente, se observaron diferencias significativas ( $P = 0.0041$ ) entre el peso de las plántulas de acebuche (302 mg) y el de las plántulas de los cultivares (275 mg). El patógeno afectó también significativamente ( $P < 0.0001$ ) al peso de la raíz que fue de 154 mg, en el caso de las plántulas testigo, y 123 mg para las inoculadas (Figura 8), aunque para esta variable no hubo efecto ( $P = 0.0765$ ) de la subespecie botánica.



**Figura 8.** Efecto de la inoculación de raíces de olivo y acebuche con una suspensión de conidios de *Colletotrichum godetiae* en el peso del sistema radicular (seco y fresco) y de la planta (mg), y el número de pares de hojas nuevas. Las columnas representan la media de 25 plántulas y las barras la desviación estándar.



Sin embargo, cuando se evaluó el efecto de la especie botánica y la inoculación en peso de la raíz seca y el número de pares de hojas desarrolladas ambas variables afectaron significativamente ( $P < 0.05$ ). Así, las plántulas testigo desarrollaron de media 4.1 pares de hojas frente a los 2.7 de las inoculadas y los acebuches desarrollaron 3.9 pares de hojas frente a los 3.2 de las plántulas procedentes de cultivares de olivo.

En este caso, las cuatro variables dependientes estudiadas (peso de la planta, peso de la raíz fresca o seca y número de hojas desarrolladas) estuvieron altamente correlacionadas entre sí ( $r > 0.300$ ;  $P < 0.0001$ ).

### 13. DISCUSIÓN

En este trabajo se estudia por primera vez la resistencia/susceptibilidad del acebuche a la Antracnosis causada por *Colletotrichum* spp. Los 45 genotipos de acebuche evaluados han mostrado un elevado nivel de resistencia a la infección por el patógeno coincidiendo con observaciones previas de campo (Moral *et al.*, 2005; Muñoz-Díez, 2008) y similar al que muestra el cultivar altamente resistente ‘Frantoio’ (Moral *et al.*, 2005; Moral y Trapero, 2009; Montiorini, 1956). Ello contrasta con el comportamiento de los cultivares que se muestran predominantemente susceptibles (Moral *et al.*, 2005; Moral y Trapero, 2009). En el caso de la Verticilosis, la mayoría de los genotipos de acebuche evaluados son susceptibles al patógeno, aunque se ha detectado un 9% de genotipos resistentes (Trapero, 2014). Algunos de los genotipos resistentes se han seleccionado como patrones (Bucini y Cirulli, 2011; Colella *et al.*, 2008; Trapero *et al.*, 2015). Hay que destacar que el acebuche coloniza principalmente suelo de zonas forestales montañosas y, que aunque *V. dahliae* es un saprófito facultativo frecuente en el suelo, la presión de inóculo en las zonas ocupadas por el acebuche suele ser baja. Los suelos con poblaciones del patógeno alta suelen ser aquellos que albergan o han albergado especies herbáceas, cultivadas o no, susceptibles a *V. dahliae* como el algodón (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011; Jiménez-Díaz *et al.*, 2012). Por el contrario, muchos acebuchales de Andalucía están situados en zonas especialmente propicias para el desarrollo de enfermedades aéreas debido a alta pluviometría y temperaturas suaves (Muñoz-Díez, 2008) y donde éstos patógenos han podido ejercer una elevada presión de selección. Este hecho puede explicar que predominen los genotipos de acebuche resistentes al Repilo y a la Antracnosis (Moral *et al.*, 2005), aunque en este último caso esta característica es aún más marcada.

La domesticación del olivo cultivado a partir del acebuche se ha descrito como un proceso de selección multilocal (Bernard et al., 2001) dirigido a la selección de caracteres agronómicos como tamaño de fruto, producción y contenido oleico (Rallo, 2005; Zohary y Spiegel-Roy, 1975). Durante el proceso de domesticación las plantas han sufrido el denominado “síndrome de domesticación” que les ha llevado, entre otras cosas, a una pérdida de adaptaciones defensivas y a incrementar su susceptibilidad a enfermedades y plagas (Hammer, 1984; Purseglove, 1981). En el caso del olivo, la domesticación ha acarreado cambios morfológicos y fisiológicos en las hojas y brotes los que han dado lugar a un “desarme debido a la domesticación” y haciendo al olivo más susceptible al ramoneo que el acebuche (Massei y Hartley, 2000). La posible selección hacia un mayor rendimiento graso y menor contenido en polifenoles relacionados con un mayor amargor en el aceite pero con importantes implicaciones en la defensa contra patógenos (Prusky, 1996), ha podido disminuir los mecanismos de defensa de la aceituna respecto a las acebuchinas.

En el presente trabajo, especulamos con que la presión de selección hacia resistencia a la Antracnosis en las masas forestales de Acebuche, se ha visto incrementada por el efecto negativo del patógeno sobre la germinación de la semilla y desarrollo de las plántulas. En las inoculaciones realizadas el patógeno colonizó, además de la epidermis y mesocarpo del fruto como previamente había sido descrito (Gomes *et al.*, 2009), el endocarpo y alcanzó la semilla a través del canal peduncular del hueso. La mayor resistencia del cv. Frantoio se tradujo en un retraso en la colonización de los tejidos del fruto respecto al cv. Hojiblanca. Una vez que el patógeno alcanzó la semilla afectó a su viabilidad al causar podredumbre de la semilla, y necrosis de la radícula primaria o del sistema radicular desarrollado. Aunque esta es la primera vez que se demuestra la capacidad de *Colletotrichum* de infectar las semillas y el sistema radicular de plántulas de olivo, distintas especies de este género infectan semillas de diversas especies y pueden causar *damping-off* (Britton y Redlin, 1995; George, 2009; Kirkpatrick y Bazzaz, 1979; Sinclair, 1991). En nuestros experimentos, nuevamente hubo un marcado efecto de la variedad botánica siendo el sistema radicular de las plántulas de acebuche más resistente que el de las plántulas de olivo y además muestran una mayor capacidad de desarrollo.

Además de la presión de selección hacia resistencia que *Colletotrichum* ha podido ejercer en las masas de acebuche al afectar a la viabilidad de las semillas y plántulas de

esta especie, el mayor tamaño de las aceitunas respecto a las acebuchinas disminuye también su capacidad de dispersión por las aves, ya que las mismas especies de pájaros tienden a depredar (picar) las aceitunas, mientras que pueden actuar como diseminadores de acebuchinas al tragarse éstas, de menor tamaño (Alcántara *et al.*, 2000; Rey *et al.*, 1997). Además, diversos estudios ecológicos con aves frugívoras han demostrado que la podredumbre de frutos causada por hongos tiene importantes consecuencias en la palatabilidad pudiendo influir poderosamente en las tasas de dispersión de las semillas, causando una selección hacia resistencia (Janzen, 1977; 1979; 1980). Este hecho no ha sido demostrado en el olivo, aunque durante el seguimiento de epidemias de Antracnosis durante 4 años (Moral *et al.*, 2005, Muñoz-Díez, 2008, Moral y Trapero, 2012), hemos observado que algunas especies de pájaros frugívoros [ejemplo, la curruca capirotada (*Sylvia atricapilla*)] seleccionan las aceitunas sanas desechando las que muestran podredumbre. Cabe destacar que el género *Colletotrichum* ha sido descrito como uno de los causantes de podredumbre que afectan negativamente al consumo de frutos por parte de pájaros frugívoros (Cipollini y Stiles, 1992; Martin *et al.*, 1993). Todo ello puede explicar la elevada resistencia de los acebuches al patógeno.

La utilización del acebuche como fuente de genes de interés para el olivo ha sido propuesta previamente (Mulas, 1999; Mulas *et al.*, 2004) debido a la interfertilidad de ambas variedades botánicas (Belaj *et al.*, 2007; Besnard y Bervillé, 2000; Lumaret y Ouazzani, 2000). En este trabajo se identifica el acebuche como una fuente importante de resistencia a la Antracnosis, aunque actualmente existen cultivares de olivo que han mostrado también un elevado nivel de resistencia y poseen otras características agronómicas apreciables como tamaño del fruto y contenido oleico (Moral y Trapero, 2009).

El presente trabajo describe el comportamiento del acebuche a la Antracnosis, la enfermedad más importante del olivo. Además describe la capacidad del patógeno para causar infección en las semillas de olivo y afectar a su viabilidad. Por último, se especula con los motivos que han llevado al elevado nivel de resistencia del acebuche.

## 14. CONCLUSIONES

1. No se han detectado acebuchinas afectadas de Antracnosis en condiciones de campo aunque algunos 6 de los 45 genotipos estudiados han mostrado un porcentaje bajo (< 0,6%) de acebuchinas con infecciones latentes.
2. Los 45 genotipos de acebuche evaluados pueden clasificarse como resistentes o altamente resistentes a la Antracnosis.
3. El patógeno, en su proceso de infección del fruto, coloniza todos los tejidos de éste (epidermis, mesocarpo, endocarpo y semilla), alcanzando la semilla a través del canal peduncular que hay en el endocarpo.
4. El patógeno puede afectar a la germinación de las plántulas causando la podredumbre de la semilla y necrosando la radícula primaria o sistema radicular desarrollado.

La inoculación de las raíces de las plántulas con *C. godetiae* causa disminución del desarrollo del sistema aéreo y radicular de éstas y, en ocasiones, muerte de la plántula (*damping-off*). Si bien hay un marcado efecto de la especie botánica siendo las plántulas de acebuche más resistentes que las procedentes de cultivares.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alcántara, J.M., Rey, P.J., Sánchez-Lafuente, A. M., Valera, F. 2000. Early effects of rodent post-dispersal seed predation on the outcome of the plant seed disperser interaction. *Oikos* 88: 362-370.
- Baker, K.F., Smith, S.H. 1966. Dynamics of seed transmission of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 4: 311-334.
- Barranco, D. 2010. Variedades y patrones. Páginas 63-89 in: *El Cultivo del Olivo*. D. Barranco, R. Fernández-Escobar, y L. Rallo, eds. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Barranco, D., Rallo, L. 2005. Épocas de floración y maduración. Páginas 283-292 in: *Variedades de olivo en España*. L., Rallo, D., Barranco, J: M., Caballero, C., Del Rio, C., A., Martín, J., Tous, e I., Trujillo, eds. Junta de Andalucía-Consejería de Agricultura y Pesca. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y Mundi-

- Prensa, Madrid.
- Belaj, A., Muñoz-Díez, C., Baldoni, L., Porceddu, A., Barranco, D., Satovic, Z. 2007. Genetic diversity and population structure of wild olives from North-Western Mediterranean assessed by SSR markers. *Ann. Bot.* 100: 449-458.
- Belaj, A., Muñoz-Díez, C., Baldoni, L., Satovic, Z., Barranco, D. 2010. Genetic diversity and relationships of wild and cultivated olives at regional level in Spain. *Sci. Hortic.* 124: 323-330.
- Besnard, G., Baradat, P., Bervillé, A. 2001. Genetic relationships in the olive (*Olea europaea* L.) reflect multilocal selection of cultivars. *Theor. App. Genet.* 102: 251-258.
- Besnard, G., Bervillé, A. 2000. Multiple origins for Mediterranean olive (*Olea europaea* L-ssp. *europaea*) based upon mitochondrial DNA polymorphisms. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences, Sciences de la Vie – Life Sciences* 323: 173-181.
- Breton, C., Tersac, M., Bervillé, A. 2006. SSR genetic diversity in wild olive (oleaster, *Olea europaea* L.) suggests several Plio-Pleistocene refuge zones in the Mediterranean basin and gene flow with olive. *J. Biogeogr.* 33: 1916-1928.
- Britton, K.O., Redlin, S.C. 1995. Damping-off of flowering dogwood seedlings caused by *Colletotrichum acutatum* and *Fusarium oxysporum*. *Plant Dis.* 79: 1188.
- Bubici, G., Cirulli, M. 2011. Verticillium wilt of olives. Páginas 191-222. In: Olive diseases and disorders. L. Schena, G. E. Agosteo, S. O., Cacciola. eds. Research Signpost, Kerala, India.
- Cipollini, M.L., Stiles, E.W. 1992. Antifungal activity of ripe ericaceous fruits-phenolic-acid interactions and palatability for dispersers. *Biochem. Syst. Ecol.* 20: 501-514.
- Colella, C., Miacola, C., Amenduni, M., D'Amico, M., Bubici, G., Cirulli, M. 2008. Sources of verticillium wilt resistance in wild olive germplasm from the Mediterranean region. *Plant Pathol.* 57: 533-539.
- Cubero, J.I. 2004. Modelos genéticos de resistencia. Páginas 39-75 in: Resistencia genética patógenos vegetales. F. Nuez, M. Pérez de la Vega, J. M. Carrillo eds.

- Sociedad Española de Ciencias Hortícolas y Sociedad Española de Genética, Valencia.
- Damm, U., Cannon, P.F., Woudenberg, J.H. C, Crous, P.W. 2012. The *Colletotrichum acutatum* species complex. Stud. Mycol. 73: 37-113.
- Díez, C.M., Trujillo, I., Barrio, E., Belaj, A., Barranco, D., Rallo, L. 2011. Centennial olive trees as a reservoir of genetic diversity. Ann. Bot. 108: 797-807
- Food and Agriculture Organization of The United Nations (FAO). 2010. Fao stat Agriculture Data. Published online by FAO, Italy.
- George, R.A.T. 2009. Vegetable Seed Production. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Gomes, S., Prieto, P., Martins-Lopes, P., Carvalho, T., Martin, A., Guedes-Pinto, H. 2009. Development of *Colletotrichum acutatum* on resistant and susceptible *Olea europaea* L. cultivars: A Microscopic Analysis. Mycopathologia 168: 203-211.
- Hammer, K. 1984. Das domestications syndrome. Kulturpflanze 32: 11-34.
- Herrera, C. 1995. Plant-vertebrate seed dispersal systems in the Mediterranean: ecological, evolutionary, and historical determinants. Annu. Rev. Ecol. Syst. 26: 705-727.
- Janzen, D.H. 1977. Why fruits rot, seeds mold, and meat spoils. Am. Nat. 111: 69-82.
- Janzen, D.H. 1979. New horizons in the biology of plant defenses. Páginas 331-350 in: Herbivores and their interaction with secondary plant metabolites. G. A. Rosenthal y D. H. Janzen, eds.. Academic Press, NY, USA
- Janzen, D. H. 1980. When is it coevolution? Evolution 34: 611-612.
- Kirkpatrick, B., Bazzaz, F. 1979. Influence of certain fungi on seed germination and seedling survival of four colonizing annuals. J. Appl. Ecol. 16: 515-527.
- Lenné, M., Wood, D. 1991. Plant diseases and the use of wild germplasm. Annu. Rev. Phytopathol 29: 35-63.
- Leppik, E.E. 1970. Gene centers of plants as sources of disease resistance. Annu. Rev. Phytopathol. 8: 323-44.

- Lumaret, R., Ouazzani, N. 2001. Plant genetics. Ancient wild olives in Mediterranean forests. *Nature* 413: 700.
- Martin, L., Cipollini, M.L., Stiles, E.W. 1993. Fruit rot, antifungal defense, and palatability of fleshy fruits for frugivorous birds. *Ecology* 74: 751-762.
- Martín, M.P., García-Figueres, F. 1999. *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* cause anthracnose on olives. *Eur. J. Plant Pathol.* 105: 733-741.
- Massei, G. Hartley, S.E. 2000. Disarmed by domestication? Induced responses to browsing in wild and cultivated olive. *Oecologia* 122: 225-231.
- Montironi, R.A. 1956. Olivo. Frantoio variedad resistente a la Antracnosis. Pulverizaciones recomendables en montes de olivo. *Idia* 106: 176-177.
- Moral, J., Ávila, A., López-Doncel, L. M., Alsalimiya, M., Oliveira, R., Gutiérrez, F., Navarro, N., Bouhmidi, K., Benali, A., Roca, L., Trapero, A. 2005. Resistencia a los Repilos de distintas variedades de olivo. *Vida Rural* 208: 34-40.
- Moral, J., Cherifi, F., Muñoz-Díez, C., Xaviér, C. J., Trapero-Casas, A. 2009a. Infection of olive seeds by *Colletotrichum acutatum* and its effect on germination. *Phytopathology* 99: 88.
- Moral, J., Oliveira, R., Trapero, A. 2009b. Elucidation of the disease cycle of olive anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology* 99: 548-556.
- Moral, J., Trapero, A. 2009. Assessing the susceptibility of olive cultivars to anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum*. *Plant Dis.* 93: 1028-1036.
- Mulas, 1999. Characterization of olive wild ecotypes. *Acta Hort.* 474: 121-124
- Mulas, M., Fadda, A., Cauli, E. 2004. Prime osservazioni su cloni di oleastro (*Olea europaea* var. *sylvestris* Hoff. E Link) selezionati per l'utilizzo forestale. *Italus Hortus* 4: 214-217.
- Muñoz-Díez, C. 2008. Prospección, diversidad genética y conservación de ejemplares monumentales y poblaciones silvestres de olivo (*Olea europaea* L.). Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba, España.
- Noble, M., Richardson, M.J. 1968. An Annotated List of Seed-borne Diseases. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK.

- Porras-Soriano, A., Soriano-Martin, M.L., Porras-Piedra, A. 2003. Grafting olive cv. Cornicabra on rootstocks tolerant to *Verticillium dahliae* reduces their susceptibility. *Crop Prot.* 22: 369-374.
- Prusky, D. 1996. Pathogen quiescence in postharvest diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34: 413-434.
- Purseglove, J.W. 1981. *Tropical Crops-Dicotyledons*. Longman Group LTD, Essex, UK.
- Rallo, L. 2005. Variedades de olivo en España: una aproximación cronológica. in: Rallo L, Caballero JM, Del Rio C, Martin A, Tous J, Trujillo I, eds. *Variedades de olivo en España*. Madrid: Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Rey, P.J., Gutiérrez, J.E., Alcántara, J.M., Valera, F. 1997. Fruit size in Wild Olives: implications for avian seed dispersal. *Funct. Ecol.* 11: 611-618.
- Rivas-Martínez, S. 1982. Etages bioclimatiques, secteurs chorologiques et series de végétation de l'Espagne méditerranéenne. *Ecol. Mediterr.* 8: 175-288.
- Rubio, R., Besnard, G., Schönswetter, P., Balaguer, L., Vargas, P. 2006. Extensive gene flow blurs phylogeographic but not phylogenetic signal in *Olea europaea* L. *Theor. App. Genet.* 113: 575-583.
- Santos-Antunes, A.F., León, L. De la Rosa, R. Alvarado, J., Mohedo, A., Trujillo, I., Rallo, L., 2005. The length of the juvenile period in olive as influenced by vigour of the seedlings and the precocity of the parents. *Hort Science* 40: 1213-215.
- Sinclair, J.B. 1991. Latent infection of soybean plants and seeds by fungi. *Plant Dis.* 75: 220-224.
- Talhinhas, P., Sreenivasaprasad, S., Neves-Martins, J., Oliveira, H. 2005. Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2987-2998.
- Trapero, C., Rallo, L., López-Escudero, F.J., Barranco, D., Díez, C.M. 2015. Variability and selection of *Verticillium* wilt resistant genotypes in cultivated olive and in the olea genus. *Plant Pathology* 64: 890-900.



Trapero, C. 2014. Selección de variedades y patrones de olivo resistente a la Verticilosis. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba.

Xaviér, C.J., Moral, J., Cherefi, F., Díez, C.M., Trapero, A. 2012. Resistencia del acebuche a la Antracnosis del olivo causada por *Colletotrichum* spp. y su posible origen. XVI congreso de la Sociedad Española de Fitopatología Málaga: 403 pp.

Zohary, D. 2004. Unconscious selection and the evolution of domesticated plants. *Econ. Bot.* 58: 5-10.

Zohary, D., Hopf, M. 1994. Domestication of plants in the old world. Clarendon Press. Oxford. UK.

Zohary, D., Spiegel-Roy, P. 1975. Beginning of fruit growing in the old world. *Science* 187: 319-327.



## PAPEL DEL CALCIO EN EL CONTROL DE LA ANTRACNOSIS

### 1. INTRODUCCIÓN

Una de las funciones principales del calcio es el refuerzo de la pared celular, proporcionándole rigidez e integridad y estimulando el crecimiento celular, ya que a diferencia de otros macronutrientes, una alta proporción de este elemento está localizado en las paredes celulares. El calcio también aporta estabilidad a la membrana plasmática interviniendo en la selectividad y permeabilidad de iones y en la tolerancia a salinidad (Marschner, 1995; White y Broadley, 2003; Conn y Gilliam, 2010). En el suelo, el calcio interacciona con otros elementos como el sodio o el potasio. En el caso de las plantas cultivadas, la relación calcio-potasio es menor que en las plantas silvestres, ya que los cationes potásicos son escasamente lixiviados al quedar fuertemente retenidos en el complejo de cambio, acumulándose en los suelos que son regularmente fertilizados (Monge *et al.*, 1994). El incremento de potasio en el complejo de cambio da lugar a un efecto antagónico sobre la absorción de calcio y magnesio (Jackobsen *et al.*, 1993; Taylor y Francis, 2009). Aun así, el adecuado contenido de potásico en el suelo, es importante para asegurar el aumento de tamaño de los frutos (Fallahi *et al.*, 2010; Stino *et al.*, 2011) y garantizar el equilibrio entre el ácido y el contenido de azúcares (Hudina y Štampar, 2005; Sánchez, 2007).

Las raíces absorben el calcio disponible en forma de catión divalente ( $\text{Ca}^{++}$ ), que se encuentra en equilibrio con las partículas del suelo, dependiendo de la capacidad de intercambio catiónico, el pH y la tasa de mineralización (McLaughlin y Wimmer, 1999). En la planta se mueve particularmente por el xilema, activado por la transpiración y la presión de la raíz (Bangerth, 1979; Ho *et al.*, 1993; Taylor y Locascio, 2004).

Los frutos con una concentración adecuada de calcio, mejoran su capacidad de almacenamiento al incrementar la resistencia de los tejidos vegetales (Hirschi, 2004) y reducen la incidencia de fisiopatías en el pre y post-cosecha como se observado en aguacate, kiwi, manzana, tomate y uva (Ferguson y Watkins, 1989; Cutting y Bower, 1989; Witney *et al.*, 1990; Saure, 1996; Ho y White, 2005; Thorp *et al.*, 2003; Ferguson *et al.*, 2003; Ciccarese *et al.*, 2013). El contenido de calcio en la planta, varía entre 0,1 - 5% de su peso seco, dependiendo de la especie, del órgano de la planta y de las condiciones de crecimiento (Dieter, 1984).

El calcio, una vez localizado en los órganos de la planta, es relativamente inmóvil o su movimiento a otras partes de la planta, es muy lento o casi nulo. Esto explica que las partes de la planta en crecimiento activo, como el caso de los frutos en desarrollo, necesiten mayor suministro de calcio y requieren mantener una humedad adecuada en el suelo (Epstein, 1973; Chiu y Bould, 1977; Monge *et al.*, 1994; Rahman y Punja, 2007).

El calcio posee un papel esencial en la interacción planta-patógeno ya que: puede afectar a la germinación de las esporas de los patógenos (Warwar y Dickman, 1996); incrementa la resistencia de los tejidos vegetales a la infección al estar ligado al pectato en la lámina media (Seymour *et al.*, 1993; Lara *et al.*, 2004); disminuye la capacidad de las fitotoxinas excretadas por los patógenos, como las poligalacturonasa encargadas de degradar el pectato (Conway y Sams, 1984; Conway *et al.*, 1988; Volpin y Elad, 1991; Kaile *et al.*, 1992; Tobías *et al.*, 1993; Elad, 1997); y actúa como elemento esencial en los procesos de hipersensibilidad como mensajero secundario (Zocchi y Mignani, 1995; Grant *et al.*, 2000; White y Broadley, 2003).

Entre los patógenos que afectan a la aceituna destacan las especies del género *Colletotrichum* que causan la Antracnosis (Moral *et al.*, 2014). En su ciclo de patogénesis, la germinación de los conidios de *Colletotrichum* spp., es imprescindible para que se produzca infección del tejido del huésped y se desarrolla la enfermedad (Warwar y Dickman, 1996). En el caso del género *Colletotrichum*, sus conidios forman, por lo general, apresorios a lo largo del tubo germinativo. Éstos son también estructuras básicas de infección aunque puede producirse penetración directa a través del tubo germinativo.

En patosistemas similares a la Antracnosis del olivo, como en caso de manzana/*Colletotrichum* spp. Varios compuestos de calcio, entre ellos, cloruro de calcio, propionato de calcio, y silicato de calcio inhiben la germinación de conidios de *Colletotrichum* spp. Además, el cloruro de calcio y el propionato de calcio inhiben el crecimiento del tubo germinativo de los conidios, cuando son aplicados en concentraciones de calcio a 1000 µg/mL (Biggs, 1999). En el caso de la Antracnosis de la fresa, la aplicaciones de fósforo y calcio incrementan la resistencia de la fruto al patógeno, mientras que el potasio y el nitrógeno la disminuyen (Nam *et al.*, 2006). En la Antracnosis del olivo, se ha detectado una relación positiva entre el contenido del calcio

en el fruto y su resistencia a *Colletotrichum* spp. (Morales-Mosquera, 2010). Aunque son necesarios más estudios que refuercen estas observaciones preliminares.

En la presente Tesis Doctoral se estudia: i) el efecto del calcio en el crecimiento micelial y la germinación de los conidios de *Colletotrichum* spp.; ii) el efecto de las aplicaciones de calcio en la resistencia de la aceituna al patógeno en condiciones controladas y en condiciones de campo; iii) efecto y aplicaciones de quelatantes y de cloruro de calcio en la resistencia/susceptibilidad del fruto; y iv) efecto de la relación entre la concentración de carbonato cálcico en suelo, calcio en aceitunas y la susceptibilidad/resistencia a *Colletotrichum* spp.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Efecto de los compuestos de calcio en el crecimiento micelial

### 2.2. Material utilizado

Puesto que la capacidad de desarrollo micelial en medio de cultivo puede asociarse a la capacidad de colonización de un sustrato. En este experimento, se estudió el efecto de cuatro compuestos de calcio en el desarrollo micelial del patógeno.

Los aislados de *Colletotrichum* spp. utilizados proceden de distintas variedades de olivo y fueron obtenidos a partir de los muestreos realizados de aceitunas afectadas por Antracnosis (Tabla 1).

**Tabla 1:** Aislados de *Colletotrichum* spp. estudiados.

Aislados	Especie	Huésped	Tejido Afectado	Cultivar	Procedencia
Col- 104	<i>C. godetiae</i>	Olivo	Fruto	Picudo	Cabra, Córdoba
Col- 116	<i>C. nymphae</i>	Olivo	Fruto	Moraiolo	Monte, Perugia Italia
Col- 152	<i>C. godetiae</i>	olivo	Fruto	Arbequina	Puebla de Guzmán, Huelva
Col- 121	<i>C. godetiae</i>	Olivo	Fruto	Hojiblanca	Montilla, Córdoba

### 2.3. Preparación de los aislados

Los aislados se recuperaron del banco de cultivos puros conservados en tubos inclinados con medio Agar-Patata-Dextrosa (PDA) y aceite de parafina a 4°C. Utilizando un asa de siembra flameada se pasaron a placas de Petri con PDA ácido en forma de zigzag y se incubaron a 23±2°C bajo 12 h de luz y de oscuridad y flujo luminoso de 40 µE / m<sup>2</sup>s durante 4-5 días. Seguidamente, se realizó una siembra puntual en PDA ácido y a los 4 días y una siembra masal en PDA. Las placas se sellaron con cinta adhesiva (Parafilm) al que se practicaron pequeñas aperturas para favorecer la aireación y esporulación masiva del hongo y fueron incubadas en la cámara de crecimiento en las condiciones descritas.

### 2.4. Productos empleados.

Se evaluaron cuatro compuestos cálcicos (Tabla 2) según su capacidad para inhibir el crecimiento micelial de patógeno.

**Tabla 2:** Compuestos de calcio evaluados por su actividad antifúngica

Las dosis utilizadas se refieren a la dosis del producto comercial; **m.a.:** materia activa;

Compuestos de Calcio	M.A (%)	Formulado	Dosis	Casa Comercial
	Ca %			
Carbonato de Calcio	40.0	CaCO <sub>3</sub>	2,5 mg/L	PANREAC
Cloruro de Calcio	27.2	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	3,6 mg/L	PANREAC
Propinado de Calcio	29.4	C <sub>6</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> Ca	3,4 mg/L	FLUKA
Silicato de Calcio	34.4	CaSiO <sub>3</sub>	2,9 mg/L	SIGMA-ALDRICH

Las dosis utilizadas se refieren a la dosis del producto comercial; **m.a.:** materia activa; **Ca.:** concentración de calcio.

Los cuatro compuestos se evaluaron a dosis entre 600 y 1000 ppm. Asimismo, se incluyó un testigo en todos los casos. Las dosis se eligieron buscando una dosis baja que apenas inhibiera el crecimiento del hongo y una dosis alta que causara su inhibición total (Tabla 3). En general, las distintas dosis se prepararon por diluciones seriadas. Todos los productos fueron solubles en agua, por lo que no fue necesario añadir ningún tipo de disolvente adicional.

**Tabla 3:** Productos y dosis utilizadas para evaluar la inhibición del crecimiento micelial y germinación de conidios de *Colletotrichum godetiae*.

Compuestos de Calcio	Dosis (ppm)			
		Crecimiento Micelial		Germinación de Conidios
Carbonato de Calcio	0	600	900	1000
Cloruro de Calcio	0	600	900	1000
Propionato de Calcio	0	600	900	1000
Silicato de Calcio	0	600	900	1000

Las características de cada producto se indican en la Tabla 2.

## 2.5. Preparación de los medios de cultivo

### A: (PDA): Agar-Patata-Dextrosa

Para evaluar la inhibición causada por los compuestos cálcicos, se comparó el crecimiento de la colonia del patógeno en PDA y en PDA más el compuesto. Para la realización de este medio se utilizó 39 g del producto comercial (PDA; Difco Laboratories, Detroit) para preparar 1 L medio.

### B: (PDA ácido): Agar-Patata-Dextrosa

El medio de Agar Patata Dextrosa acidificado (PDA ac) se preparó de la misma manera que el PDA sólo que en este caso se añadió ácido láctico [85% (vol/vol) a 2.5 mL por L de medio)].

### C: PDA + Producto

Para cada producto y dosis se prepararon 300 mL del medio a evaluar. Para ello, en un matraz de 500 mL se vertieron 290 mL de ADD y la cantidad PDA correspondiente a 300 mL. Esta mezcla se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 min. Posteriormente, se añadieron 10 mL de ADD con los compuestos de calcio correspondientes. Las distintas concentraciones del producto se obtuvieron por diluciones seriadas.

## 2.6. Siembra e inoculación de los medios de cultivo

Con un sacabocados de 7 mm de diámetro se extrajeron discos de PDA procedentes de la periferia de la colonia del patógeno en crecimiento activo. Los discos se situaron en el

centro de las placas de Petri de 9 cm de diámetro con el medio de cultivo. Para cada producto y dosis se hicieron tres repeticiones (placas) y el ensayo se repitió dos veces. Finalizada la siembra, las placas de Petri se sellaron con Parafilm y se incubaron a  $22\pm 1^\circ\text{C}$  bajo 12 h de luz/ 12 h de oscuridad.

## 2.7. Evaluación del crecimiento micelial

El crecimiento micelial del hongo se evaluó a los 7 y 14 días después de la siembra midiéndose el diámetro de la colonia. Al ser colonias de tipo elipsoidal o irregular, se midieron los diámetros mayor y menor con un calibre digital y posteriormente, se calculó el diámetro medio. El diámetro se expresó en mm/día.

## 3. Efecto de los compuestos de calcio en la germinación de conidios

### 3.1. Material utilizado

La germinación de los conidios de *Colletotrichum* spp, es imprescindible para que se produzca infección del tejido del huésped y desarrollo de la enfermedad. Muchos de los compuestos de calcio inhiben principalmente la germinación de los conidios. De ahí, que evaluar esta capacidad sea uno de los métodos tradicionales de evaluar la efectividad de fungicidas comerciales. En el caso del género *Colletotrichum*, sus conidios forman, por lo general, uno o varios apresorios en el tubo germinativo. Éstos son también estructuras básicas de infección.

Para estudiar el efecto de los compuestos de calcio sobre la germinación de conidios se utilizaron los aislados Col-104 y Col-116. Estos aislados fueron seleccionados por su origen y las características de sus colonias así como también por su alto poder de germinación en los ensayos preliminares (Tabla 1).

### 3.2. Preparación del inóculo

Los aislados de *Colletotrichum* spp., se prepararon de forma similar a la descrita en el apartado anterior. Para la realización de la suspensión de conidios, se seleccionó una placa bien esporulada y se vertieron aproximadamente 10 ml de ADD estéril sobre el contenido de la placa y se raspó con un asa de vidrio. La suspensión de conidios se ajustó a  $2\times 10^5$  con/mL y posteriormente, al diluir la solución con los compuestos de calcio a evaluar, se obtuvo una suspensión final de  $1\times 10^5$  con/mL. La suspensión se depositó en un portaobjetos que se introdujo en el interior de una placa de Petri con



Agar Agua que hacía de cámara húmeda. Esto permite evaluar la germinación mediante su observación en el microscopio ya que se obtienen conidios aislados en los que resulta fácil identificar la emisión del tubo germinativo y la formación de los apresorios.

### **3.3. Compuestos evaluados**

Para evaluar la germinación de conidios del patógeno se realizaron dos ensayos y se utilizaron los compuestos de calcio que se muestran en la (Tabla 3). En el primer ensayo se evaluaron de forma independiente los aislados Col-104 y Col-116 (Tabla 1). En el segundo ensayo se evaluaron los aislados Col-104 y Col-121 y los compuestos cálcicos fueron seleccionados según Biggs (1999).

### **3.4. Preparación de los compuestos de calcio**

Las dosis evaluadas se eligieron de acuerdo con datos de pruebas anteriores. Se evaluaron dosis que abarcaban desde una dosis baja, la cual no afectaba a la germinación de los conidios, hasta una dosis alta que inhibía totalmente su germinación.

Para las compuestos de calcio se evaluó una sola dosis de 1000 ppm que se suponía que iba a inhibir 100% la geminación de conidios (Biggs, 1999). Para cada producto se preparó un testigo con ADD estéril.

Las distintas dosis de los compuestos de calcio se prepararon a partir de la concentración más alta considerada en cada caso, siguiendo las indicaciones respecto a la riqueza del producto comercial y posteriormente por diluciones seriadas con ADD estéril se prepararon las restantes concentraciones. Se prepararon dos repeticiones de cada una de las dosis del fungicida de forma similar a la descrita.

### **3.5. Incubación de las suspensiones de conidios**

El período de incubación fue de 24 h a  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  con fotoperiodo de 12 h luz/12 h de oscuridad. Transcurrido este tiempo, los portaobjetos se retiraron de las cámaras húmedas y en cada excavación se colocó una gota de fucsina ácida en lactofenol, con el fin de detener la germinación de los conidios. De esta forma, las muestras quedaron preparadas para realizar las observaciones microscópicas posteriores.

### 3.6. Evaluación de la germinación de los conidios

Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron observaciones al microscopio eligiendo siempre un campo de visión en el que todos los conidios pudieran ser evaluados y no existieran agrupaciones. Se seleccionaron, al azar, 120 conidios para cada dosis, contando los conidios germinados, los no germinados y la presencia de apresorios. El conteo de los conidios se realizó a 400 aumentos. Posteriormente, se calculó el porcentaje de germinación de los conidios (**G**) y de formación de los apresorios (**AP**). El porcentaje de germinación (**G**) correspondió al número de conidios germinados con respecto al número total de conidios y el porcentaje de apresorios (**AP**) correspondió al número de conidios con apresorios con respecto al número total de conidios germinados.

## 4. Efecto de la aplicación de cloruro de calcio

Para evaluar el efecto del cloruro de calcio en la Antracnosis, se realizaron dos experimentos: uno en condiciones semicontroladas, un umbráculo situado en la Universidad de Córdoba y un segundo ensayo en un olivar comercial, situado en el Término Municipal (TM) de Peraleda del Zaucejo, Provincia de Badajoz. En ambos casos se utilizó el cultivar moderadamente susceptible 'Arbequina'.

### 4.1. Experimento en umbráculo

Se utilizaron plántones cv. Arbequina de 3 años de edad y procedentes de un vivero comercial de Córdoba. Los plántones fueron trasplantados en macetas de plásticos de 7 L, con una mezcla de turba rubia granulada de 0-20 mm al 40%, fibra de coco al 30%, sustrato al 15%, perlita al 15%, y osmocote, un fertilizante compuesto de pequeños gránulos de nutrientes NPK [14:16:18]. El riego consistió en dos riegos a la semana de 15 min cada uno, se utilizó goteros de 4 L/h manteniendo húmedo el sustrato la mezcla durante todo el ensayo (Tabla 4).

Los plántones fueron tratados mediante pulverización con una solución de cloruro de calcio a 5 g/L. Los tratamientos se realizaron semanalmente utilizando una mochila de tratamiento Matabi Style. Se dispusieron de cuatro tratamientos distintos, con 13 repeticiones (árboles) por tratamiento y el diseño experimental fue completamente al azar.

**Tabla 4:** Análisis de la turba utilizada

Determinación	SMF (Muestra fresca)	SMS (Muestra seca)
Humedad %	64.4	-----
Mat. Org. total Oxidación	26.42	74.2
Nitrógeno Total %	0.14	0.38
Relación Carbono/Nitrógeno	113.26	113.26
Fosforo (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) %	0.10	0.27
Potasio (K <sub>2</sub> O) %	0.25	0.71
Calcio (CaO) %	0.15	0.41
Magnesio (MgO) %	0.12	0.33
Boro (ppm)	15.13	42.50
Hierro (ppm)	610.54	1715.00
Manganeso (ppm)	28.72	80.67
Cobre (ppm)	3.79	10.66
Zinc (ppm)	3.56	10.00
Azufre (%)	0.01	0.04
Sodio (%)	0.10	0.27

#### 4.1.1. Tratamientos de los plantones

- 1) - Julio – octubre (tratada hasta final de campaña, octubre)
- 2) - Julio – septiembre (tratada hasta septiembre)
- 3) - Septiembre – octubre
- 4) - Testigo (sin tratar)

#### 4.1.2. Medida de calcio en el fruto

Para comprobar si los tratamientos realizados incrementaban la concentración de calcio en el fruto, se midió en aceitunas testigo y tratadas de julio - septiembre mediante espectrofotometría de absorción atómica (Fernández-Hernández *et al.*, 2010). Para ello, se siguió el siguiente protocolo:

**1º-** Se tomaron cinco muestras independientes por tratamiento (no tratadas y tratadas de julio-septiembre). Cada muestra estaba formada por cinco aceitunas. De cada muestra se tomó el peso fresco.

2º- Las aceitunas se lavaron con agua durante 2 min y en ADD durante otros 2 min, se secaron en cámara de flujo laminar sobre papel de filtro, se deshuesaron y se pesó la pulpa.

3º- Las muestras se colocaron en sobres de papel y se secaron a 80°C durante 4 días.

4º- Posteriormente se volvió a pesar, y con ayuda de un mortero de cristal se trituraron las muestras secas, hasta formar una masa.

5º- Seguidamente, 0.5 g se colocaron en crisoles de barro fino de 4 cm y se calcinaron a 600°C durante 18 h.

6º- Finalmente, las cenizas de cada muestra se vertieron en un tubo de ensayo con 10 mL de ácido clorhídrico (0.1 N) y se procedió el análisis con un patrón de 5 ppm.

#### **4.1.3. Inoculación e incubación**

Paralelamente, se recogieron 20 aceitunas por cada olivo del experimento (repetición) que se situaron de forma independiente en cámaras húmedas. Posteriormente, las aceitunas fueron inoculadas con una suspensión de esporas del aislado Col-152 (Tabla 1). En todos los casos se utilizaron el mismo número de aceitunas tratadas con agua como testigo.

#### **4.2. Experimento de campo**

Este ensayo se desarrolló se en un olivar comercial de 363 ha conocido como “El Río” y localizado en el TM de Peraleda del Zaucejo en la Provincia de Badajoz. Localidad situada a unos 38° 28' 28" latitud norte y 5° 33' 57" longitud oeste. Los suelos de este ensayo son luvisoles asociados a cambisoles eútricos desarrollados sobre pizarras, esquistos, cuarcitas y algunos materiales ígneos, y pH 5.9. Los olivos tenían 5 años de edad y estaban situados en un marco de plantación de 4 x 2 m formando un seto. Los árboles se mantuvieron en sistema de no-laboreo y en condiciones de riego. El riego consistía en riego por goteo enterrado que permitía suministrar a un riego de apoyo de abril a octubre de unos 1000 m<sup>3</sup>/ha.

Se marcaron 20 olivos, de los cuales 10 árboles fueron tratados con cloruro de calcio y los otros 10 árboles (testigos) no fueron tratados. El diseño del experimento fue completamente al azar dejando al menos un olivo guarda entre cada dos árboles del experimento.

Los tratamientos se realizaron mediante pulverización semanal de una solución de cloruro de calcio a razón de 5g/L. Los tratamientos se realizaron desde el estado fenológico 0 (verde intenso hasta el envero), utilizando una mochila de tratamiento Matabi Style. Durante la realización del experimento no se realizaron tratamientos con fungicidas para favorecer el desarrollo de la Antracnosis.

#### **4.2.1. Tratamientos de las muestras**

Se recogieron muestras de aceitunas para realizar el análisis de contenido de calcio en fruto, mediante el método de espectrofotometría de absorción atómica descrito en el apartado anterior. En este caso, para cada tratamiento (tratadas con cloruro de calcio y testigo sin tratar) se recogieron cinco sub-muestras constituidas por 20 aceitunas cada una después del último tratamiento del experimento.

#### **4.2.2. Inoculación e incubación**

Debido a la ausencia de enfermedad en condiciones de campo, las aceitunas fueron inoculadas. Además, para diferenciar entre el efecto del calcio externo e interno de las aceitunas tratadas, éstas se sometieron a dos tratamientos diferenciados:

**1º-** Las muestras de aceitunas tratadas se lavaron en agua corriente durante 45 min se repartieron en matraces de 1 L, se cubrieron con ADD estéril y se añadieron 2 gotas de Tween-20/L. Los matraces se mantuvieron durante 5 min en el baño de ultrasonidos. Seguidamente las aceitunas se aclararon durante 15 min y se desinfestaron en matraces de 1 L con lejía comercial (20g Cl/L) al 20% durante 1 min, se enjuagaron con ADD estéril y se dejaron secar sobre papel de filtro en la cámara de flujo laminar. Finalmente, las aceitunas se colocaron en cámaras húmedas y se inocularon con una suspensión de conidios de  $10^5$  con/mL y se incubaron a  $22\pm 2^\circ\text{C}$ .

**2º-** Las muestras de aceitunas tratadas sin lavar y sin desinfectar fueron inoculadas con una suspensión de conidios de  $10^5$  con/mL, y tras la inoculación se incubaron a  $22\pm 2^\circ\text{C}$ .

**3º-** Las muestras del testigo se lavaron, se desinfestaron, se secaron y se inocularon según el método descrito en el primer punto.

#### **4.2.3. Evaluación**

Las evaluaciones se realizaron durante cinco semanas consecutivas tras la inoculación. Para cada aceituna se determinó la severidad de síntomas mediante una escala de 0-6 en

función del porcentaje de fruto afectado donde 0= sin síntomas, 1 = 1-25% superficie de la aceituna afectada, 2 = 26-50%, 3 = 51-75%, 4 = 76-99%, 5 = 100% aceituna con podredumbre jabonosa y 6 = aceituna momificada (Moral *et al.*, 2008).

## **5. Efecto de las aplicaciones de agentes quelatantes y cloruro de calcio en la susceptibilidad del fruto.**

El quelato es la asociación de un “agente quelatante” con un catión metálico, es una molécula que es capaz de estabilizar el catión. Entre los quelatos de uso en agricultura destaca el EDDHA [2-2-hydroxyphenyl glycine] (Álvarez-Fernández *et al.*, 2003).

Debido a la dificultad para incrementar el contenido en calcio en las aceitunas mediante aplicaciones exógenas de cloruro de calcio, en este experimento se intentó disminuir el contenido del calcio de la aceituna mediante la aplicación de EDDHA. El objetivo específico fue evaluar el efecto del cloruro de calcio y la aplicación de EDDHA en aceitunas del cultivar altamente susceptible ‘Hojiblanca’.

### **5.1. Material vegetal y fúngico**

Aceitunas verde-amarillentas (estado fenológico 1) del cv. Hojiblanca fueron recogidas en un olivar comercial. En el laboratorio se seleccionaron aceitunas sanas, se lavaron con agua durante 45 min, se repartieron en matraces de 1 L, se cubrieron con ADD estéril y se añadieron 2 gotas de Tween-20/L. Los matraces se mantuvieron durante 5 min en el baño de ultrasonidos para eliminar los restos de fungicida que pudiesen traer del campo. A continuación, las aceitunas se aclararon con agua durante 15 min y fueron desinfectadas sumergiéndolas en agua con lejía comercial (20g Cl/L) al 20 % durante 1 min. Finalmente, las aceitunas se enjuagaron con ADD estéril y se dejaron secar sobre papel de filtro en la cámara de flujo laminar.

### **5.2. Preparación del inóculo**

La preparación del inóculo se realizó como se describe en el anterior apartado 2.2 En estos experimentos se utilizó el aislado Col-152 de *C. godetiae* (Tabla 1).

### **5.3. Experimento I (2010)**

En el experimento I se realizaron los siguientes tratamientos:

- 1- Las aceitunas se pulverizaron con una solución (5g/L) de cloruro de calcio y se dejaron secar sobre papel de filtro en la cámara de flujo laminar durante 1 h.
- 2- Las aceitunas se sumergieron en una solución (5g/L) de cloruro de calcio durante 24 h y se dejaron secar sobre papel de filtro en la cámara de flujo laminar durante 1 h.
- 3- Las aceitunas se sumergieron en una solución (5g/L) de cloruro de calcio durante 24 h, se lavaron con ADD y se dejaron secar sobre papel de filtro en cámara de flujo laminar durante 1 h.
- 4- Las aceitunas se sumergieron en la solución (0.32 g / L) de EDDHA (97% riqueza) durante 24 h. Posteriormente, se lavaron con ADD estéril y se dejaron secar sobre papel de filtro en la cámara de flujo laminar durante 1 h.

En todos los casos, las aceitunas fueron inoculadas con una suspensión de conidios de ( $10^5$  con/mL) y se incubaron a  $18\pm 2^\circ\text{C}$  de temperatura en cámaras húmedas hasta el desarrollo de síntomas. Como testigo se utilizaron aceitunas tratadas con ADD estéril.

#### 5.4. Experimento II (2011)

El experimento II fue similar al experimento I, la suspensión del producto quelatante fue calentada a  $35^\circ\text{C}$  durante 1 h buscando mejorar la solubilidad del producto en el agua. El resto de los tratamientos usados fueron iguales a los descritos en el experimento I.

En ambos experimentos, se dispusieron 25 aceitunas por cada cámara húmeda y se utilizaron tres cámaras húmedas por tratamiento (repeticiones) y cinco tratamientos incluyendo el testigo.

**5.5. Evaluación** se realizó de forma análoga a la descrita en el anterior apartado 4.2.3.

#### **6. Relación entre la concentración de carbonato cálcico en el suelo, calcio en aceitunas y la susceptibilidad a *Colletotrichum* spp.**

Una de las formas, más eficaces de controlar la Antracnosis, es la utilización de cultivares resistentes. La resistencia, a su vez, está muy relacionada con el estado de maduración del fruto, la concentración de compuestos fenólicos (Moral *et al.*, 2008; Moral *et al.*, 2015) y, posiblemente, la concentración de calcio en el fruto (Moral y Trapero, 2009).

Debido a la dificultad de incrementar el contenido de calcio en la aceituna mediante aplicaciones exógenas véase en “Efecto de la aplicación de cloruro de calcio”. El objetivo de este estudio fue correlacionar la concentración de contenido de calcio y la susceptibilidad a la enfermedad.

### 6.1. Material vegetal

Durante los años de 2009-10, a lo largo de Andalucía y el Algarve (Sur de Portugal) se recolectaron aceitunas del cultivar moderadamente resistente ‘Arbequina’ y suelos en 27 olivares con características edafoclimáticas distintas. Las muestras se trasladaron al laboratorio para la realización de los distintos estudios.

### 6.2. Tratamiento de las muestras

Las aceitunas se separaron en dos sub-muestras en enero (estado fenológico 1). Para cada parcela, una de las sub-muestras de aceitunas fue lavada y 75 aceitunas de ésta, es decir 25 aceitunas por cámara húmeda (repetición), se inocularon como se ha descrito anteriormente. La inoculación se realizó con una suspensión de conidios ( $10^5$  conidios/mL) del aislado Col-152 de *C. godetiae* (Tabla 1). En todos los casos se dispuso de una cámara húmeda de aceitunas sin inocular (testigo). Finalmente las aceitunas se situaron en cámaras húmedas y fueron incubadas a  $22\pm 1^\circ\text{C}$ .

Paralelamente, la segunda sub-muestra de las aceitunas y las muestras de suelo se enviaron al laboratorio (C. M. Europa, SL ubicado en el Término Municipal de Martos, Jaén, [www.cmeuropa.com](http://www.cmeuropa.com)) y se le realizó análisis de contenido de calcio, mediante espectroscopia atómica, y de humedad mediante el método de gravimetría.

Igualmente a las muestras de suelo se le realizaron análisis de contenido de caliza activa mediante el método del calcímetro y pH mediante el método potenciométrico (Anónimo, 1998; Tabla 5).



**Tabla 5:** Análisis de caliza activa, pH, calcio y humedad en suelos y aceitunas de 27 olivares con características edafoclimáticas distintas.

Parcela	Suelo			Fruto	
	Localidad	Caliza (%)	pH	Ca (%)	Humedad (%)
1	Portugal	26.77	8.34	1.04	51.93
2	Portugal	40.77	8.38	1.08	53.48
3	Portugal	74.78	8.25	0.73	48.69
4	Portugal	46.00	7.85	0.48	52.77
5	Portugal	44.50	8.32	0.67	49.06
6	Portugal	41.44	8.41	0.62	54.33
7	Portugal	40.94	8.02	0.62	48.03
8	Portugal	17.67	8.15	0.73	60.66
9	Portugal	53.04	8.11	0.95	53.65
10	Portugal	48.11	8.25	0.52	53.23
11	Portugal	22.35	8.28	0.69	59.83
12	Portugal	55.42	8.34	0.58	54.70
13	Portugal	13.20	8.03	1.10	57.89
14	Portugal	28.49	8.33	0.58	50.45
15	Portugal	33.99	8.22	0.86	46.41
16	Cabra (Córdoba)	46.03	8.31	0.69	51.61
17	Mengibar (Jaén)	40.50	7.84	0.53	53.09
18	Merina 0	21.86	8.27	0.77	60.65
19	Merina 2	14.04	8.32	0.70	61.04
20	Merina 1	8.32	8.12	1.49	54.76
21	Rozuelos	49.27	8.4	0.55	52.55
22	Bco Mdial- IFAPA (Córdoba)	17.47	8.35	0.98	55.49
23	Montilla (Córdoba)	48.26	8.38	0.57	54.25
24	Las Yolis	56.69	8.47	0.59	49.14
25	Santa Gemma	5.98	8.42	0.58	49.76
26	Las Monjas Écija (Sevilla)	49.42	8.41	0.59	52.48
27	S1-Jerez de la Frontera (Cádiz)	4.17	8.49	0.51	49.33

### 6.3. Evaluación

Para cada aceituna se determinó semanalmente la severidad de síntomas mediante una escala 0-6, en función del porcentaje de fruto cubierto por *Colletotrichum* (Moral, *et al.*, 2008). Con los valores semanales de la severidad media de los síntomas en frutos de cada repetición, se obtuvo el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) del experimento. Además, se determinó el porcentaje de frutos afectados (incidencia) y la media de severidad de cada parcela.

### 6.4. Análisis de los datos

Para estudiar el efecto de los compuestos de calcio en el crecimiento micelial y la germinación de conidios y formación de apresorios, para cada producto de compuestos de calcio se calcularon la inhibición relativa de crecimiento, germinación y formación de apresorios.

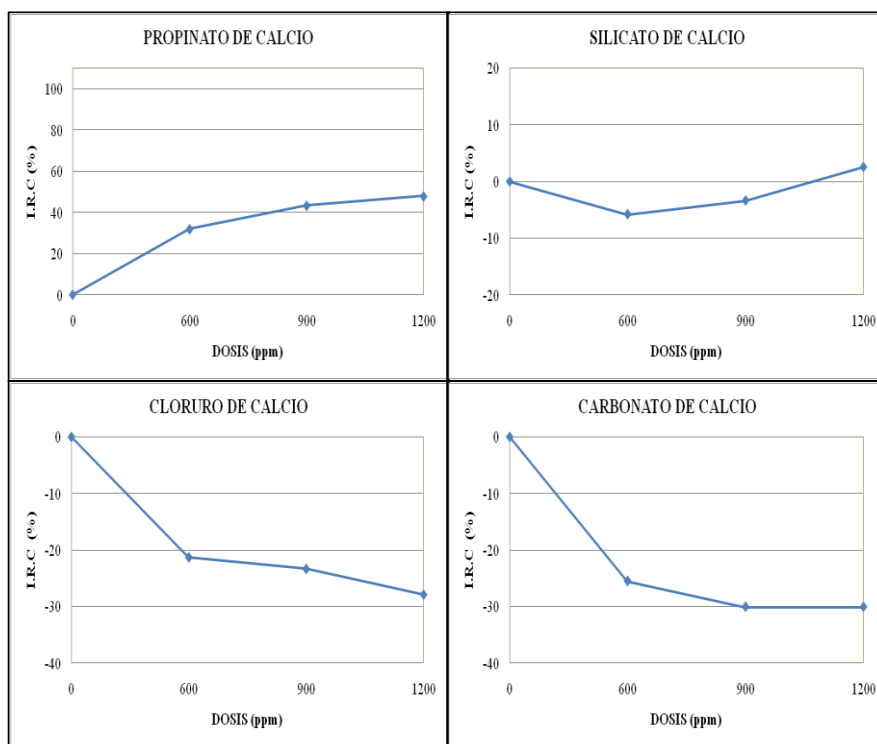
Asimismo, a los datos de inhibición relativa de la germinación y formación de apresorios se les aplicó el test Probit mediante el programa SPSS (Le Ora Software Inc., CA, USA, 2008), calculándose la  $DI_{50}$  y  $DI_{90}$ .

Los datos fueron sometidos a una t-student o un análisis de la varianza (ANOVA) completamente al azar. Se ha comprobado la igualdad de varianzas según el test de Bartlett y la normalidad según el test de Shapiro-Wilk a nivel de significación ( $P \geq 0.05$ ). La comparación de los valores medios se realizó según el test LSD o HSD de Tukey a nivel de probabilidad del 5 % (Steel y Torrie, 1985). Finalmente, la relación entre el conjunto de las variables del estudio (ABCPE, Incidencia, concentración de calcio en el fruto, pH, etc.) fue estudiada mediante correlación de Pearson. Los datos se analizaron con el programa informático Statistix® 9 (Analytical Software, 2009).

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Efecto de los compuestos de calcio en el crecimiento micelial

La inhibición relativa del crecimiento (IRC) micelial del aislado Col-104 para los distintos compuestos de calcio y dosis evaluadas se muestra en la Figura 1. Tres de los compuestos de calcio evaluadas (silicato de calcio, cloruro de calcio y carbonato de calcio) favorecieron el crecimiento micelial del patógeno. Únicamente el propionato de calcio causó inhibición del crecimiento micelial del patógeno. Así, a dosis de 1200 ppm, causó una inhibición próxima al 44% del crecimiento micelial. La  $DI_{50}$  para el propionato de calcio fue 1111 ppm.



**Figura 1.** Inhibición relativa del crecimiento (IRC) micelial del aislado Col-104 de *Colletotrichum godetiae* en agar patata dextrosa con distintas concentraciones de compuesto de calcio. Cada punto representa el valor medio de tres repeticiones.

### 7.2. Efecto de sales de calcio en la germinación de conidios

En este apartado se estudió el efecto de varios compuestos de calcio en la germinación y formación de los apresorios del patógeno.



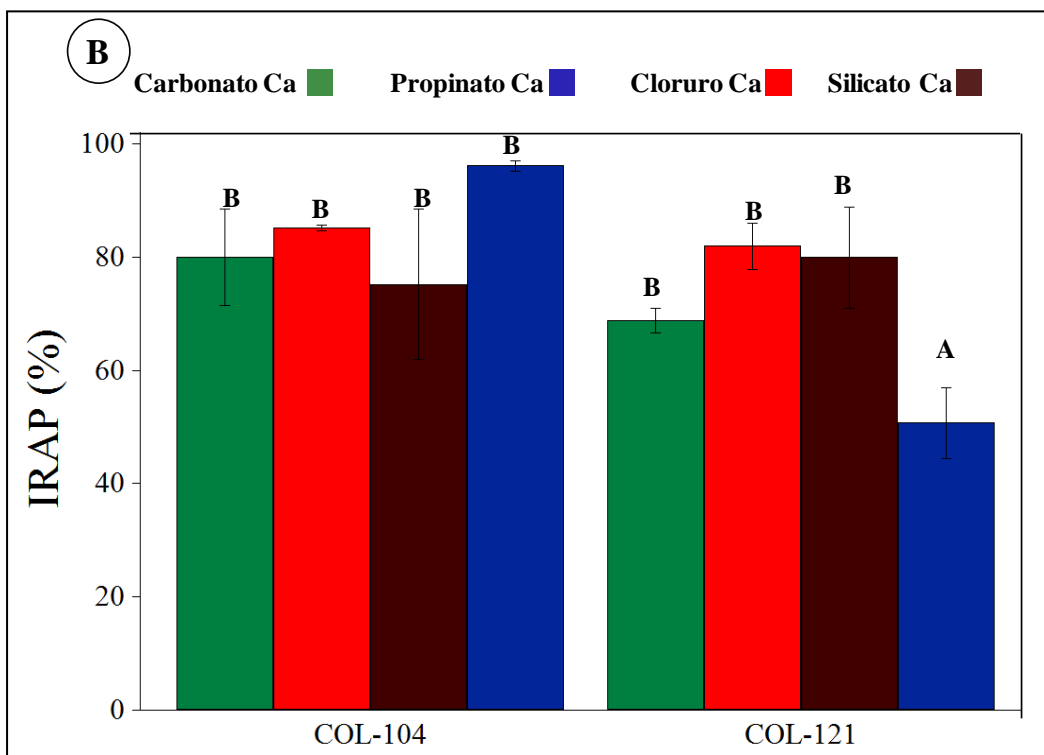
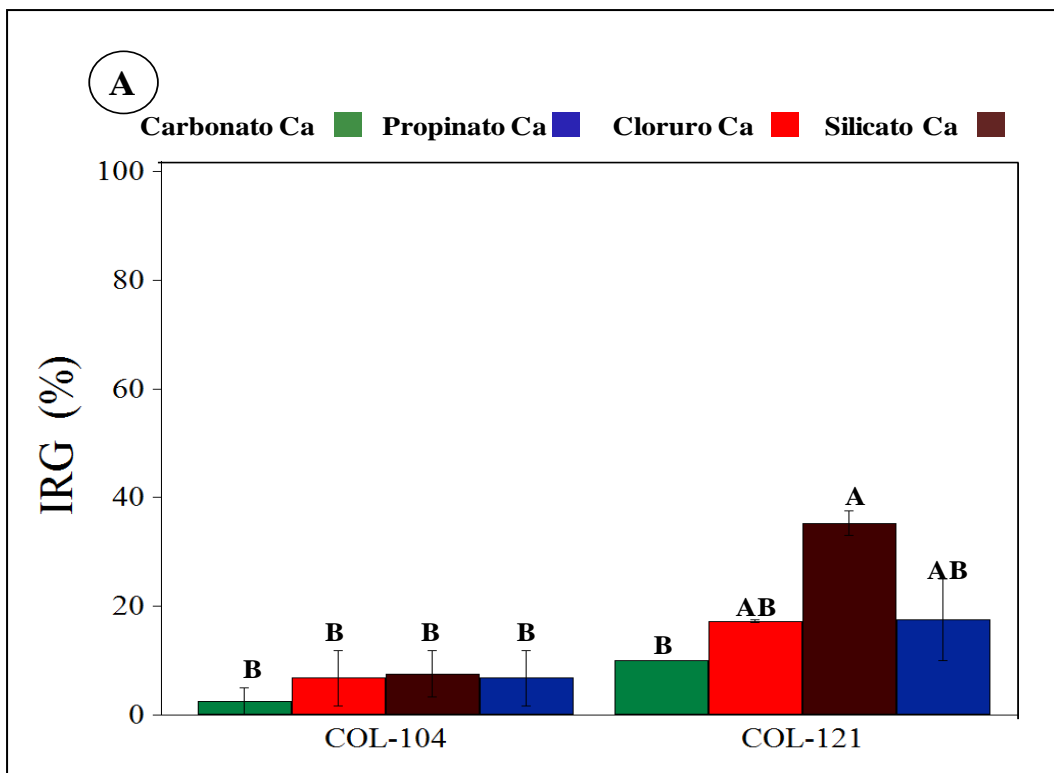
**Figura 2.** Características morfológicas de *Colletotrichum godetiae*. **A)** Conidios sín-germinar. **B)** Conidios germinados mostrando tubo germinativo, conidia secundaria y apresorio.

Cuando se estudió el efecto de los compuestos de calcio (1000 ppm de Ca) sobre la inhibición relativa de germinación de los conidios (IRG) de los aislados Col-104 y Col-121, se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre productos y aislados pero no en su interacción. El aislado Col-121 se mostró significativamente ( $P = 0.038$ ) más sensible a las sales de calcio que el aislado Col-104.

En general, ninguna de las sales de calcio causó una inhibición de la germinación mayor del 40% (Figura 3A). Entre los productos evaluados, el menos eficaz fue carbonato de calcio con un 6.27% de IRG, seguido propionato de calcio y cloruro de calcio con un 12 y 12.1% de IRG, respectivamente. El silicato de calcio fue el producto que causó mayor inhibición sobre el aislado Col-104 con un 21.4% de IRG.

Cuando se estudió el efecto de las sales de calcio (1000 ppm de Ca) sobre la inhibición relativa de la formación de apresorios (IRAP), no se observaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre productos, pero sí entre aislados y para la interacción productos y aislados ( $P < 0.05$ ). En este caso el aislado Col-121 se mostró más tolerante que el aislado Col-104.

El producto más efectivo fue el silicato de calcio que causó un 83.5% de IRAP seguido por cloruro de calcio, propionato de calcio y por último carbonato de calcio con un 73.4% de IRAP (Figura 3B).



**Figura 3.** A) Inhibición relativa de la germinación de conidios (IRG). B) Inhibición relativa de la formación de apresorios (IRAP) de los aislados Col-104 y Col-121 de *Colletotrichum godetiae*, causada por distintos compuestos de calcio.

En general, las sales de calcio evaluadas afectaron de forma notable a la formación del apresorio del patógeno causando una inhibición próxima al 80%. Por el contrario, el

efecto de las sales de calcio sobre la germinación de los conidios no fue muy marcado aunque hubo interacción entre los aislados. Así, el aislado Col-121 mostró valores significativamente mayores de IRG que el aislado Col-104 para el conjunto de las sales evaluadas.

### 7.3. Efecto de la aplicación de cloruro de calcio

#### 7.3.1. Experimento en umbráculo

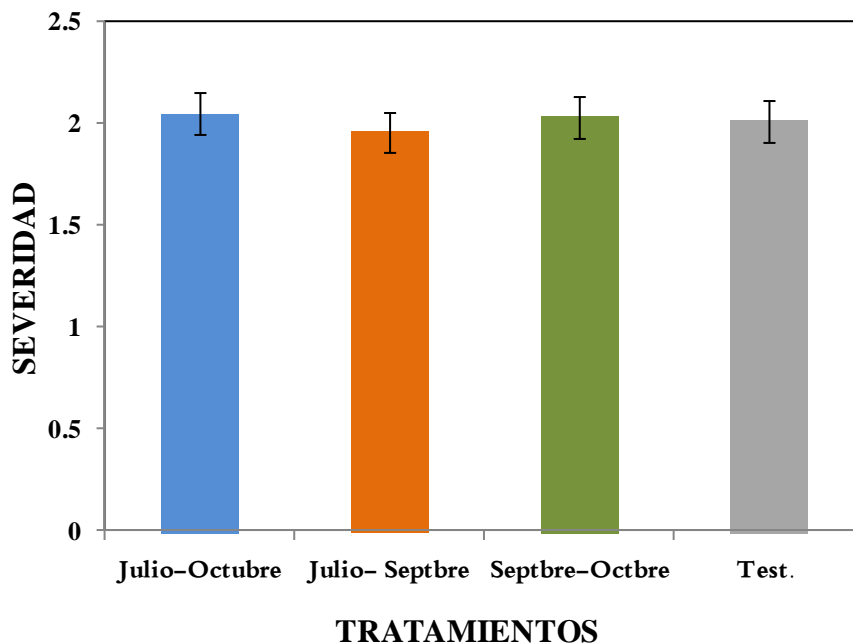
Durante la evaluación sobre el efecto del cloruro de calcio en el desarrollo de la Antracnosis, no se detectaron síntomas de enfermedad en los plantones de olivo.

Las aceitunas tratadas con cloruro de calcio y las no tratadas e inoculadas, mostraron los primeros síntomas a los 7 días de incubación. Éstos consistían en manchas de color ocre sobre las cuales el patógeno desarrolló acérvulos y conidios en masas de color anaranjado.

Los datos del contenido de calcio en el fruto evaluados por el método de espectrofotometría de absorción atómica no mostraron diferencias (*t- student*;  $P > 0.05$ ) significativas entre los plantones tratados de julio a septiembre y no tratados (Tabla 6). Respecto a la severidad de síntomas, no se observaron diferencias significativas ( $P= 0.0594$ ) entre los tratamientos realizados (Figura 4).

**Tabla 6:** Datos de los parámetros analizados de aceitunas tratadas (julio-Stbre) y no tratadas con cloruro de calcio del cv. Arbequina.

Muestra Umbráculo	Fresco (g)	Fresco/fruto (g)	Sin hueso (g)	Seco (g)	Seco/Fruto (mg)	Seco/ Sin hueso (g)	Calcio ppm	Calcio % P. Seco
<b>Testigo</b>	6.4540 ±0.5236	1.2100 ± 0.1144	3.3660 ± 0.3181	0.8400 ± 0.1012	0.1640 ± 0.0201	0.5100 ± 0.0044	2.5600 ± 0.3460	0.2540 ± 0.0360
<b>Tratado</b>	6.5300 ±0.2178	1.3020 ± 0.0435	3.3400 ± 0.1543	0.8020 ± 0.0671	0.1560 ± 0.0133	0.5180 ± 0.0086	2.7940 ± 0.2587	0.2740 ± 0.0268

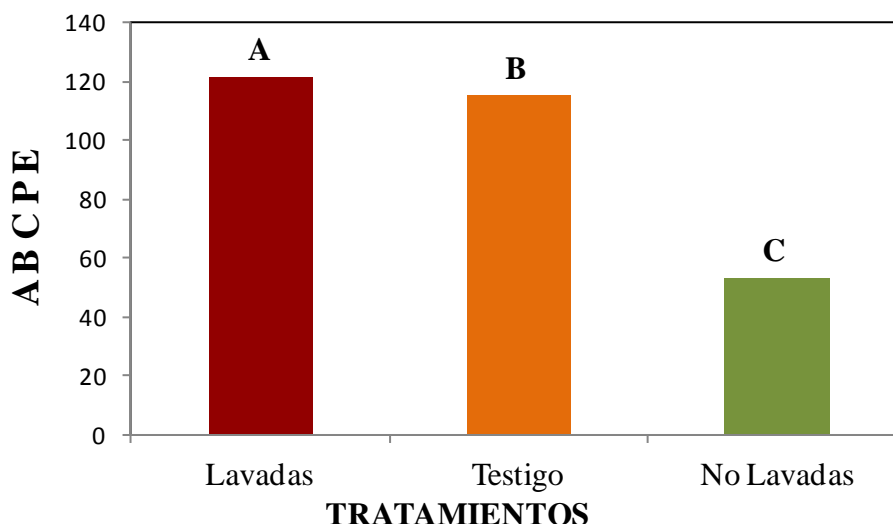


**Figura 4.** Efecto del cloruro de calcio en la severidad de síntomas de la Antracnosis causada por *Colletotrichum godetiae* en aceitunas del cv. Arbequina tratadas semanalmente durante tres periodos.

### 7.3.2. Experimento en Campo

En condiciones de campo, no se observaron frutos naturalmente afectados por la Antracnosis, por lo que las aceitunas se recolectaron al final de la campaña y se inocularon artificialmente. Las aceitunas inoculadas mostraron los primeros síntomas de a los 7 días de incubación. El ABCPE fue significativamente ( $P < 0.001$ ) menor en las aceitunas tratadas con cloruro de calcio y no lavadas que en las aceitunas tratadas y lavadas. Las aceitunas testigo, que fueron lavadas e inoculadas, mostraron un comportamiento intermedio aunque próximo a las aceitunas tratadas y lavadas (Figura 5).

Los datos del contenido de calcio en el fruto obtenidos por el método de espectrofotometría de absorción atómica no mostraron diferencias (*t-student*;  $P > 0.05$ ) significativas entre los plantones tratados y no tratados (Tabla 7).



**Figura 5:** Efecto del cloruro de calcio en el Área Bajo Curva de Progreso de la Enfermedad (ABCPE) de la Antracnosis causada por *Colletotrichum godetiae* en aceitunas del cv. Arbequina. Se diferenciaron tres tratamientos de las aceitunas: tratadas con Ca y lavadas (Lavadas), tratadas con Ca y no lavadas (No lavadas) y sín tratar con Ca y lavadas (Testigo).

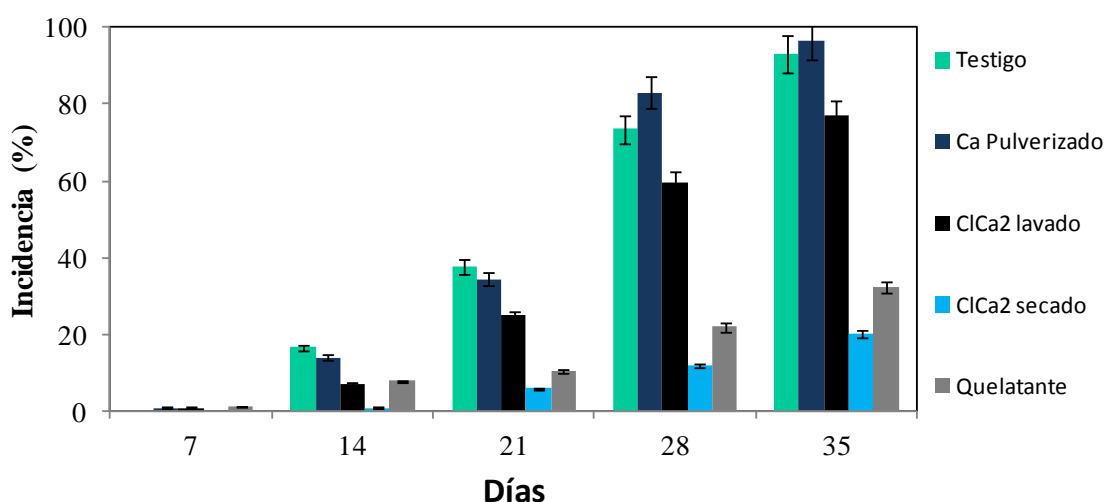
**Tabla 7.** Datos de los parámetros analizados de aceitunas tratadas y no tratadas (campo) con cloruro de calcio del cv. Arbequina.

Muestra Campo	Fresco (g)	Fresco/ Fruto (g)	Fresco/Sin Hueso (g)	Seco (g)	Seco/ Fruto(mg)	Seco/ Sin hueso (g)	Calcio ppm	Calcio% P. Seco
<b>Testigo</b>	28.020 ± 2.0001	1.4000 ±0.1001	14.020 ± 0.9987	5.3980 ±0.6677	0.2700 ± 0.0341	0.5060 ± 0.0024	1.0840 ± 0.1131	0.1080 ± 0.0107
<b>Tratado</b>	27.600 ± 2.6224	1.2800 ±0.0632	13.820 ±1.3078	5.3040 ±0.9317	0.2660 ± 0.0461	0.5060 ± 0.0040	1.1720 ± 0.1215	0.1180 ± 0.0111



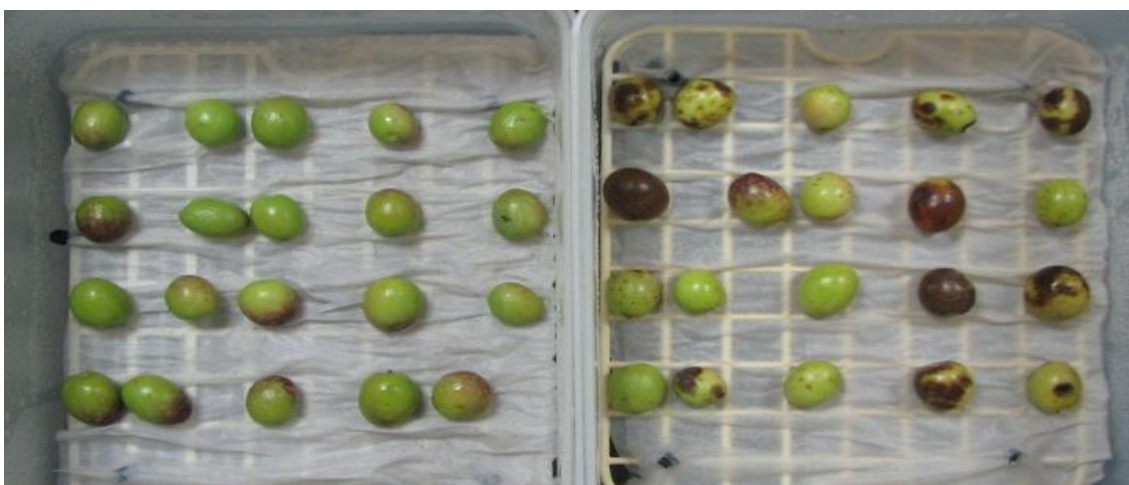
## 8. Efecto de agentes quelatantes y cloruro de calcio en la susceptibilidad de la aceituna

Los primeros síntomas se observaron a los 14 días de inoculación en aceitunas de los tratamientos pulverizadas con cloruro de calcio, sumergidas en cloruro de calcio y lavadas y sumergidas en EDDHA. En cambio, las aceitunas que fueron sometidas a inmersión en cloruro de calcio y secadas antes de la inoculación no mostraron síntomas de la enfermedad hasta los 21 días. El ANOVA del ABCPE mostró que los frutos tratados con cloruro de calcio y secados y aquellos tratados con el agente quelatante mostraron una ABCPE significativamente menor ( $P < 0.05$ ) al resto de los tratamientos que no se diferenciaron entre sí (Figura 6).

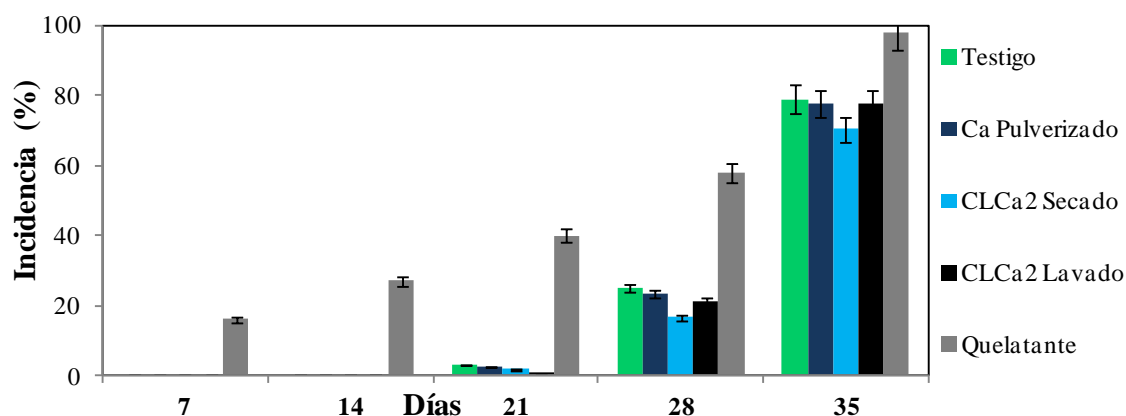


**Figura 6.** Evolución de la incidencia (%) de aceitunas cv. Hojiblanca tratadas e inoculadas con *Colletotrichum godetiae*. Cada columna se representa la media de 75 aceitunas y las barras representan la desviación estándar.

En el segundo experimento, para mejorar la solubilidad del EDDHA se utilizó agua caliente. En este caso, los primeros síntomas se observaron a los 7 días de la inoculación en las aceitunas tratadas con la solución del agente quelatante. Las aceitunas de este tratamiento mostraron un ABCPE significativamente ( $P < 0.001$ ) mayor que el resto de los tratamientos que no se diferenciaron entre sí.



**Figura 7.** Aceitunas del cv. Hojiblanca sumergidas en  $Cl_2Ca$  e inoculadas (izqda) y aceitunas sumergidas en EDDHA e inoculadas con *Colletotrichum godetiae* (drcha).



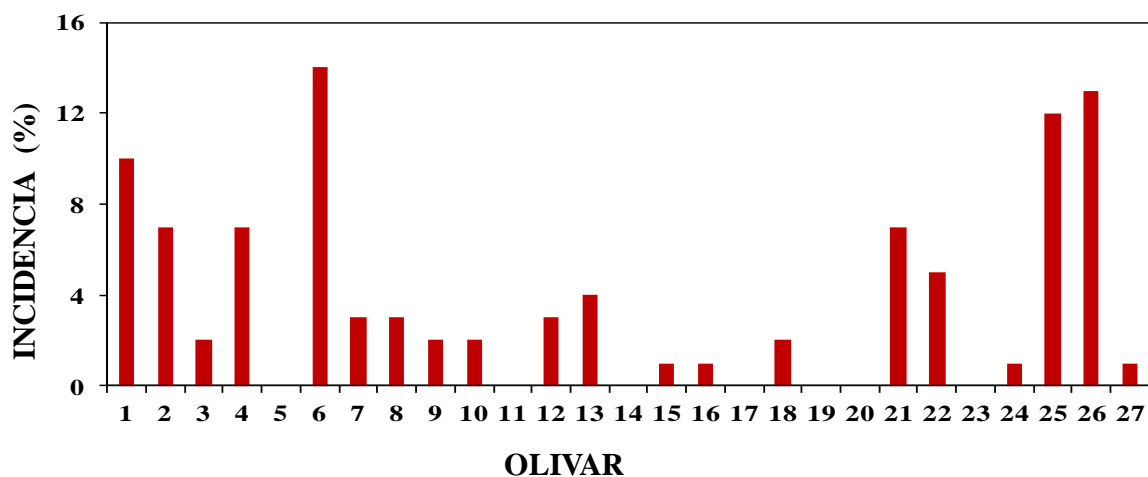
**Figura 8.** Evolución de la incidencia (%) de aceitunas cv. Hojiblanca tratadas e inoculadas con *Colletotrichum godetiae*. Cada columna se representa la media de 75 aceitunas y las barras representan la desviación estándar.

Las aceitunas que habían sido tratadas con el quelatante, fueron significativamente ( $P < 0.05$ ) más susceptible al patógeno, que las no tratadas mostrando un periodo de incubación más corto y mayor severidad de síntomas (Figura 8).

### 9. Relación entre la concentración de carbonato cálcico en el suelo, calcio en aceitunas y la susceptibilidad a *Colletotrichum* spp.

El análisis de suelo y aceituna reveló una elevada variabilidad en el contenido de calcio entre los olivares de Andalucía y Portugal. Así, la caliza varió entre 4.17 y 74.17% de las parcelas 27 y 7, respectivamente. De forma similar, el contenido en calcio de la aceituna varió entre 0.51 y 1.10% de las parcelas 27 y 7 respectivamente. Aunque cuando ambas variables se estudiaron en el conjunto de parcelas la correlación no resultó significativa ( $r = -0.346$ ;  $P = 0.077$ ).

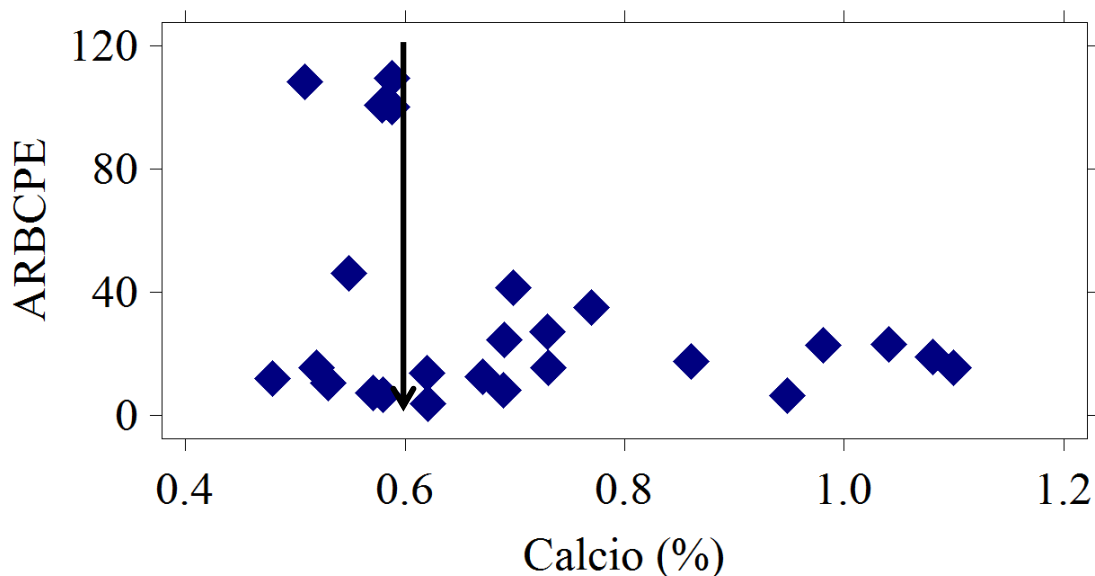
Durante la recolección de las muestras de aceitunas no se observaron síntomas de la enfermedad en ninguna de los 27 olivares del estudio. Aun así, durante el periodo de evaluaciones de las aceitunas testigos, en 13 de los 20 olivares (65%) se detectaron infecciones latentes. Por tanto, únicamente en siete olivares (1, 2, 4, 6, 21, 25 y 26) no se detectaron infecciones latentes de *Colletotrichum* spp. Cabe destacar que el umbral de detección de este estudio fue un 4%. Los olivares que destacaron por la elevada incidencia de infecciones latentes (> 12%) fueron las parcelas 6, 25 y 26 (Figura 9).



**Figura 9.** Infecciones latentes (%) de *Colletotrichum* spp. 27 olivares del cv. Arbequina.

Para eliminar el efecto de las infecciones naturales en las aceitunas inoculadas, aquellas que mostraron síntomas durante los primeros 14 días fueron eliminadas de los análisis. Este periodo fue seleccionado en base al periodo de latencia para el cv. Arbequina establecida en trabajos previos del grupo. Los síntomas consistían en manchas de color ocre, sobre las cuales el patógeno desarrolló acérvulos y conidios en masa de color

anaranjado. En general no se obtuvo una correlación clara entre la Incidencia y ABCPE (%) y el porcentaje de caliza activa del suelo o el contenido en calcio del fruto. Aun así, puede apreciarse que las cuatro muestras de aceituna que mostraron mayor severidad de síntomas poseían un contenido de calcio inferior a 0.6%. Igualmente, ninguna muestra con un contenido en calcio mayor de 0.6% mostró un valor del ABCPE superior a 45 unidades (Figura 10).



**Figura 10.** Relación entre la severidad de síntomas de Antracnosis y el contenido de calcio en aceitunas con *Colletotrichum godetiae*. La severidad de síntomas esta expresada por el Área Relativa Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (ARBCPE).

## 10. DISCUSIÓN

La Antracnosis causada por *Colletotrichum* spp. es la enfermedad más importante del fruto del olivo. El patógeno causa la podredumbre de la aceituna madura y desecación de ramas. Además, los aceites procedentes de aceitunas afectadas muestran pésimas cualidades organolépticas (Moral *et al.*, 2014). Actualmente se calcula que esta enfermedad causa una pérdidas anuales en España de unos 75 millones de € (Moral *et al.*, 2009).

El control de la Antracnosis se basa principalmente en la utilización de fungicidas cúpricos, ya que la mayoría de los fungicidas orgánicos tienen limitado su utilización en post-floración al ser liposolubles (Moral y Trapero, 2009). Además, los aislados de *Colletotrichum* que afectan a olivo son más tolerante al  $\text{Cu}^{++}$  que los aislados de *Spilocaea oleaginea* y *Pseudocercospora cladosporioides*, agentes causales del

Repilo y Emplomado, respectivamente (Roca *et al.*, 2007). En esta situación, la aplicación de compuestos no liposubles con capacidad fungicida o que incrementen la resistencia de la aceituna son una alternativa de gran interés a los fungicidas convencionales.

La aplicación de compuestos ricos en  $\text{Ca}^{++}$  pueden mejorar el control de la Antracnosis causando un bajo impacto ambiental. La aplicación de compuestos cálcicos a las hojas y frutos, e incluso al suelo, reduce la severidad de síntomas de numerosas enfermedades de importancia como la Alternaria del manzano (Biggs *et al.*, 1993), la Mancha gris de los cítricos (Mondal y Timmer, 2003), o el Oidio de la vid (Gadoury *et al.*, 1994). La aplicación de compuestos cálcicos también se ha utilizado para controlar enfermedades causadas por especies de *Colletotrichum* de pre y post-cosecha (Biggs, 1999; Conway *et al.*, 2004). En el caso del olivo, hemos observado graves epidemias de Antracnosis asociadas a suelos ácidos de la sierra norte de Sevilla y el Algarve portugués (Moral y Trapero, 2009). Posteriormente, se observó una relación lineal y negativa entre el contenido de calcio del fruto (%) y la severidad de síntomas causados por *Colletotrichum*, aunque en un número limitado de muestras (Morales-Mosquera, 2010). Por lo tanto, son necesarios estudios que permitan establecer claramente el efecto del calcio en la Antracnosis del olivo.

Desde los años 60 se conoce el  $\text{Ca}^{++}$  es esencial en el desarrollo hifal de los hongos filamentosos (Griffin, 1966). Estudios posteriores, utilizando productos quelatantes e inhibidores de calmodulina (CaM), proteína receptora del  $\text{Ca}^{++}$ , demostraron que también juega un papel esencial en la germinación de las esporas y formación del apesorio en distintas especies fúngicas (Warwar y Dickman, 1996; Lee *et al.*, 1998). Por el contrario, altas concentraciones de calcio se han asociado a la inhibición de la germinación de esporas en distintos hongos fitopatógenos como *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, o *P. digitatum* (Wisniewski *et al.*, 1995; Droby *et al.*, 1997). En este trabajo, las sales de calcio afectaron de forma notable a la formación de los apesorios del patógeno causando una inhibición próxima al 80%. En cambio, su efecto sobre la germinación de conidios del patógeno fue escaso. Similares resultados fueron obtenidos por Uhm *et al.* (1998) que observaron una elevada inhibición de la formación de apesorios en *C. gloeosporioides* causada por cloruro de calcio. En los ensayos realizados con planta, la aplicación foliar de cloruro de calcio no causó un incremento significativo del calcio en las aceitunas. Resultados similares obtuvo Morales-Mosquera

(2010) quién no observó incremento del calcio en las aceitunas de olivos tratados con nitrato cálcico aplicado al suelo. Este hecho puede deberse a la falta de movilidad del calcio (Baeyens, 1970), siendo los tejidos en crecimiento activo (fruto y brotes, principalmente) los que muestran, con mayor facilidad, deficiencia de este elemento (Cramer *et al.*, 1985). En general, esta situación se agrava en condiciones de estrés hídrico, ya que el calcio se mueve arrastrado en el xilema por el flujo de agua debido a la transpiración. Por el contrario, otros elementos como el nitrógeno y el potasio se mueven gracias a la actividad fisiológica. Por tanto, los órganos de las plantas que transpiran mucho reciben importantes suministros de calcio y aquellos que transpiran poco (frutos, yemas, ápices, etc.) suelen tener bajo contenido en calcio. En el floema, a su vez, la concentración de calcio es baja (Baeyens, 1970). Este modo de transporte diferencial entre nutrientes tiene por resultado que la falta de calcio se manifiesta en primer lugar en las hojas superiores, mientras que cuando hay carencia de N-P-K suelen ser las inferiores las sintomáticas (Lagerwerff y Eagle, 1962).

Debido a la dificultad en incrementar la concentración de calcio en las aceitunas mediante aplicaciones exógenas, se realizó un muestreo en 27 olivares buscando un rango alto de concentración de calcio en el fruto y que nos permitiera establecer una relación entre éste y la resistencia a la Antracnosis. Aunque no se detectó una relación clara entre la concentración de calcio y la resistencia, todas las muestras que se mostraron altamente susceptibles contenían un porcentaje de calcio inferior a 0.6 %. Morales-Mosquera (2010) detectó una correlación lineal y negativa entre la concentración de calcio en el fruto y su resistencia a la Antracnosis. Cabe destacar que las diferencias observadas a concentración de calcio en el fruto se debieron a la diferencia entre los suelos de las dos fincas de estudio (El Río y Vega del Soto, situadas en Peraleda del Zaucejo y Pedro Abad, respectivamente) más que a las distintas dosis de fertilización cálcica.

En las aceitunas tratadas con EDDHA fueron significativamente más susceptibles al patógeno. Aunque desconocemos si el incremento de susceptibilidad se debió a la disminución de calcio en el fruto y/o también a la extracción de otros cationes por parte del agente quelatante. En el presente trabajo, el efecto más claro del calcio se observó, en las aceitunas tratadas con cloruro de calcio e inoculadas, este efecto se perdía cuando las aceitunas eran lavadas antes de la inoculación indicando que se trata de un efecto protector del tratamiento, posiblemente al afectar a la formación de los apresorios de los conidios.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Álvarez-Fernández, A.P., Anigua, P., Abadía, J., Abadía, A. 2003: Effects of Fe deficiency chlorosis on yield and fruit quality in peach (*Prunus persica* L. Batsch). *J. Agric. Food. Chem.* 51: 5738-5144.
- Anónimo, 1998. Método oficiales de análisis atómico, Tomo III. Ministerio de Agricultura, Madrid.
- Baeyens, J. 1970. Nutrición de las plantas de cultivo (Fisiología aplicada a las plantas agrícolas). Ed. Lemos, Madrid.
- Bangerth, F. 1979. Calcium-related physiological disorders of plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 17: 97–122.
- Biggs, A.R. 1999. Effects of calcium salts on apple bitter rot caused by two *Colletotrichum* spp. *Plant Dis.* 83: 1001-1005.
- Chiu, T.E., Bould, C. 1977. Sand-culture studies on the calcium nutrition of young apple trees with particular reference to bitter pit. *J. Hortic. Sci.* 52: 19-28.
- Ciccarese, A., Stellacci, A.M., Gentilese, G., Rubino, P. 2013. Effectiveness of pre- and post-veraison calcium applications to control decay and maintain table grape fruit quality during storage. *Postharvest Biol. Tec.* 75: 135–141.
- Conn, S., Gilliam, M. 2010. Comparative physiology of elemental distributions in plants. *Ann. Bot.* 105: 1081–1102.
- Conway, W.S., Sams, C.E. 1983. Calcium infiltration of golden delicious apples and its effect on decay. *Phytopathology* 73: 1068-1071.
- Conway, W.S., Leverentz, B., Janisiewicz, W.J., Blodgett, A.B., Saftner, R.A., y Camp, M.J. 2004. Integrating heat treatment, biocontrol and sodium bicarbonate to reduce postharvest decay of apple caused by *Colletotrichum acutatum* and *Penicillium expansum*. *Postharvest Biology and Technology*, 34(1): 11-20.
- Conway, W.S. y Sams, C.E. 1984. Possible mechanisms by which post-harvest calcium treatment reduces decay in apples. *Phytopathology* 74: 208-210.
- Conway, W.S., Gross, K.C., Boyer, C.D. y Sams, C.E. 1988. Inhibition of *Penicillium expansum* polygalacturonase activity by increased apple cell wall calcium. *Phytopathology* 78: 1052-1055.
- Cramer, G.R., Läuchli, A., Polito, V.S. 1985. Displacement of Ca<sup>2+</sup> by Na<sup>2+</sup> from the plasmalemma of root cells. *Plant Physiol.* 79: 207-211.

- Cutting, J.G.M., Bower, J.P. 1989. The relationships between basipetal auxin transport and calcium allocation in vegetative and reproductive flushes in avocado. *Sci. Hortic-Amsterdam* 41: 27–34.
- Dieter, P. 1984. Calmodulin and calmodulin-mediated process in plants. *Plant Cell Environ.* 7: 371-380.
- Droby, S., Wisniewski, M.E., Cohen, L. Weiss, B., Touitou, D., Eilam, Y. & Chalutz, E. 1997. Influence of calcium chloride on *Penicillium digitatum*, grapefruit peel tissue and biocontrol activity of *Pichia guilliermondii*. *Phytopathology* 87 (3): 310-315.
- E. Monge, J. Val, M. Sanz, A. Blanco y L. Montañés 1994. Calcium as a nutrient for plants. The bitter pit in apple. *An. Estac. Exp. Aula Dei Z Zaragoza* 21(3): 189-201.
- Elad, Y. 1997. Responses of plants to infection by *Botrytis cinerea* and novel means involved in reducing their susceptibility to infection. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 73: 381-422.
- Epstein, E.1973. Flow in the phloem and the immobility of calcium and boron: A new hypothesis in support of an old one. *Experientia* 29: 133-136.
- Fallahi, E., B. Fallahi, G.H. Neilsen, D. Neilsen, and F.J. Peryea. 2010. Effects of mineral nutrition on fruit quality and nutritional disorders in apples. *Acta Horticulturae* 868: 49-60.
- Ferguson, I. B., Thorp, T. G., Barnett, A. M., Boyd, L. M., Triggs, C.M. 2003: Inorganic nutrient concentrations and physiological pitting in “Hayward” kiwifruit. *J. Hortic. Sci. Biotech.* 78: 497–504.
- Ferguson, I.B., y Watkins, C.B. 1989: Bitter Pit in Apple Fruit, in Janick, J. (eds.): *Horticultural Reviews*, Vol.11. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA: 289–355.
- Fernández –Hernández, A., 2010. Determinación del contenido de elementos minerales en aceituna mediante espectrofotometría de absorción atómica. *Spanish Journal of Agricultural Research= Revista de Investigación Agraria*, vol. 8, no 4: 1183-1190).
- Grant, J.J., Yun, B.W., y Loake, G.J. 2000. Oxidative burst and cognate redox signalling reported by luciferase imaging: Identification of a signal network that functions independently of ethylene, SA, and Me-JA but is dependent on MAPKK activity. *Plant J.* 24: 569–582.
- Griffin, D.H. 1966. Effect of electrolytes on differentiation in *Achyla* sp. *Plant Physiol.* 41: 1254–1256.
- Hirschi, K.D. 2004. The calcium conundrum. Both versatile nutrient and specific signal. *Plant Physiol.* 136: 2438–2442.



- Ho, L.C., Belda, R., Brown, M., Andrews, J., Adams, P., 1993. Uptake and transport of calcium and the possible causes of blossom-end rot in tomato. *J. Exp. Bot.* 44: 509–518.
- Ho, L.C., White, P. J. 2005. A cellular hypothesis for the induction of blossom-end rot in tomato. *Ann. Bot.* 95: 571–581.
- Hudina, M. y F. Štampar, 2005. The correlation of the pear (*Pyrus communis* L.) cv. Williams' yield quality to the foliar nutrition and water regime. *Acta Agriculturae Slovenica* 85(2): 179-185.
- Jakobsen S.T. 1993a. Interaction between plant nutrients. III. Antagonism between Potassium, Magnesium and Calcium. *Acta Agric. Scand.* 43: 1-5.
- Kaile, A., Pitt, D. y Kuhn, P.J. 1992. Calcium toxicity, protoplast viability and the role of calcium in soft-rot of *Brassica napus* due to *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 40: 49-62.
- Lagerwerff, J.V., Eagle, H.E. 1962. Transpiration-relation to ion uptake by beans from saline-substrates. *Soil Sc.* 93, 420-430.
- Lara, I., García, P. y Vendrell, M. 2004. Modifications in cell wall composition after cold storage of calcium-treated strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) fruit. *Postharvest Biology and Technology* 34(3): 331.
- Lee, S.C. y Lee, Y.H. 1998. Calcium/calmodulin-dependent signaling for appressorium formation in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol. Cell* 8: 698-704.
- Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2º Edition. 889. Academic Press. London.
- McLaughlin, S.B., Wimmer, R. 1999: Ca physiology and terrestrial ecosystem processes. *New Phytol.* 142: 373–417.
- Moral J, Xaviér C, Roca LF, Romero J, Moreda W, Trapero A. 2014. La Antracnosis del olivo y su efecto en la calidad del aceite. *Grasas Aceites* 65 (2): e028. doi: <http://dx.doi.org/10.3989/gya.110913>.
- Moral, J., Alsalimiya, M., Roca, L. F., Díez, C. M., León, L., de la Rosa, R., Barranco, D., Rallo, L., and Trapero, A. 2015. Relative susceptibility of new olive cultivars to *Spiloea oleagina*, *Colletotrichum acutatum*, and *Pseudocercospora cladosporioides*. *Plant Dis.* 99: 58-64.

- Moral, J., Bouhmidi, K., Trapero, A. 2008. Influence of fruit maturity, cultivar susceptibility, and inoculation method on infection of olive fruit by *Colletotrichum acutatum*. *Plant Dis.* 92: 1421-1426.
- Moral, J., Y Trapero, A. 2009. Resistencia del olivo a la Antracnosis causada por *Colletotrichum* spp. *Bol. SEF* 66: 22-30.
- Morales-Mosquera, J. 2010. Influencia de la aplicación de nitrato de calcio en el olivo. Trabajo Profesional Fin de Carrera, ETSIAM, Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain, 215.
- Nam, M.H., Jeong, S.H., Lee, Y.S., Choi, J.M. 2006. Effects of nitrogen, phosphorus, potassium and calcium nutrition on strawberry Anthracnose. *Wiley Online Library. Plant Pathology* 55: 246–249.
- Rahman, M., y Punja, Z.K. 2007. Calcium and plant disease. In: *Mineral nutrition and plant disease*. MN, USA, APS Press, St. Paul, PP. 79-93.
- Sánchez, E.E. 2007. Nutrición mineral y fertilización de frutales en hojas caducas: 397-431. In Sozzi G.O. (ed.) *Árboles frutales: Ecofisiología, cultivo y aprovechamiento* Editorial Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- Saure, M. C. 1996: Reassessment of the role of calcium in development of bitter pit in apple. *Aust. J. Plant Physiol.* 23: 237–243.
- Seymour, G., Taylor, J. & Tucker, G. 1993. Introduction. In: *Biochemistry of Fruit Ripening*. Chapman & Hall, London.
- Steel, R.G.D., Torrie, J.H. 1985. *Bioestadística*. 2ª Ed. McGraw-Hill, Bogotá. 622.
- Stino, R.G., A.T. Mohesen, M.M. Yehia, and M.A. El-Wahab. 2011. Enhancing the productivity and fruit quality of le Conte pear via growth regulators, nutrients and amino acids. *Journal of Horticultural Science and Ornamental Plants* 3(1): 65-74.
- Taylor y Francis, 2009. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B- Soil & Plant Science*. The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark.
- Taylor, M. D., Locascio, S.J. 2004 Blossom-end rot: a calcium deficiency. *J. Plant Nutr.* 27: 127–139.
- Thorp, T.G., Ferguson, I.B., Boyd, L.M., Barnett, A.M. 2003: Fruiting position, mineral concentration and incidence of physiological pitting in Hayward' kiwifruit. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 78: 505–511.
- Tobias, R.B., Conway, W.S., Sams, C.E., Gross, K.C. & Whitaker, B.D. 1993. Cell wall composition of calcium-treated apples inoculated with *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*, 32: 35-39.

- Uhm, Kwang Heum, Ahn, Il Pyung, Kim, Soonok & Lee, Yong Hwan 2003. Calcium/calmodulin-dependent signalling for prepenetration development in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytopathology* 93 (1): 82-87.
- Victor warwar, y Martin, B. Dickman, Department of Plant Pathology, University of Nebraska, Lincoln, Nebraska 68583. Applied and environmental microbiology, Jan. 1996: 74–79 Vol. 62, No.1 0099-2240/96/\$04.0010. Copyright q 1996. American Society for Microbiology.
- Volpin, H. y Elad, Y. 1991. Influence of calcium nutrition on susceptibility of rose flowers to botrytis blight. *Phytopathology* 81: 1390-1394.
- White, P., Broadley, M.R. 2003: Calcium in plants. *Ann. Bot.* 92: 487–511.
- Wisniewski, M.E., Droby, S., Chalutz, E. & Eilam, Y., 1995. Effect of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> on *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* in vitro and on the biocontrol activity of *Candida oleophila*. *Plant Pathology*, 44 (6): 1016-1024.
- Witney, G.W., Hofman, P.J., Wolstenholme, B.N. 1990: Mineral distribution in avocado trees with reference to calcium cycling and fruit quality. *Sci. Hortic.* 44: 279–291.
- Zocchi, G. y Mignani, I., 1995. Calcium Physiology and Metabolism in Fruit Trees. *Acta Horticulturae* 383: 15-23.



## **EVALUACIÓN EN CAMPO DE FUNGICIDAS, SALES DE CALCIO Y EXTRACTOS VEGETALES PARA EL CONTROL DE LA ANTRACNOSIS DEL OLIVO CAUSADA POR *COLLETOTRICHUM* SPP.**

### **RESUMEN**

La Antracnosis del olivo, causada por distintas especies de *Colletotrichum* está considerada la enfermedad más importante de fruto de este cultivo en la mayoría de la regiones olivares del mundo. El control de la enfermedad se basa principalmente en el uso de productos cúpricos. En muchos casos estos productos se están utilizando de manera poco racional existiendo pocas alternativas a estos fungicidas.

En nuestros experimentos se han evaluado: los fungicidas, hidróxido de cobre, sulfato de cobre, oxiclورو de cobre, sulfato tribásico de cobre, piraclostrobin, trifloxistrobin, kresoxim-metil, tebuconazol, las mezclas hidróxido de cobre/kresoxim-metil, hidróxido de cobre/mancozeb, y oxiclورو/trifloxistrobin; las sales de calcio, cloruro de calcio y hidróxido de calcio; y los productos biológicos, jabón potásico y extractos vegetales y cítricos. Todos los experimentos se han realizado en campo para determinar su efectividad contra esta enfermedad.

Los ensayos realizados durante los años 2006/07/09 y 2010 en dos campos experimentales mostraron que los tratamientos realizados con fungicidas cúpricos a principios de otoño fueron los más efectivos para el control de la enfermedad. La mezcla oxiclورو de cobre/trifloxistrobin aplicada en otoño, puede ser una alternativa a los tratamientos cúpricos, y el tebuconazol es un producto efectivo contra el patógeno aunque su uso está limitado a la primavera. Los resultados derivados de este trabajo permitirán un uso más racional de los fungicidas en el control de la Antracnosis del olivo.

### **1. INTRODUCCIÓN**

La Antracnosis del olivo causada por *Colletotrichum* spp., es la enfermedad más importante del fruto del olivo (*Olea europaea* L.) (Andrés, 1991; Graniti, *et al.*, 1993; Talhinhos, *et al.*, 2005; Moral *et al.*, 2008). El principal efecto que causa es la podredumbre de las aceitunas, asociada con una notable pérdida de peso y su caída prematura originando aceites de elevada acidez y nula calidad organoléptica (“aceites colorados”) (Andrés, 1991). Las pérdidas atribuidas a la enfermedad en España

alcanzan unos 90 millones de euros por año siendo especialmente importante en zonas húmedas donde predominan cultivares susceptibles (Moral *et al.*, 2008).

En el sur de España, el hongo puede sobrevivir desde el invierno hasta el otoño siguiente en las aceitunas momificadas que quedan en el árbol (Mateo-Sagasta, 1968; Moral y Trapero, 2012). Los frutos que caen al suelo y no se recolectan son destruidos por insectos, pájaros u otros invasores secundarios, o bien son enterrados con las labores, por lo que su participación en la generación de nuevo inóculo juega un papel secundario (Graniti *et al.*, 1993). Por tanto, las aceitunas momificadas en el árbol son la principal fuente de inóculo para las infecciones primaverales, aunque también pueden ser fuente de inóculo durante el otoño ya que la viabilidad de los conidios embebidos en la masa mucilaginosa es superior a un año (Moral y Trapero, 2012). Posteriormente, las infecciones primaverales permanecen latentes hasta que las aceitunas empiezan a enverar durante el otoño-invierno siguiente (Sergeeva *et al.*, 2008; Moral *et al.*, 2009).

Además de la podredumbre del fruto, el patógeno causa marchitez y muerte de ramitas. En Andalucía, este segundo síndrome se ha asociado a la movilización de toxinas por parte del patógeno desde las aceitunas afectadas a las hojas y ramas del árbol, por lo tanto el patógeno muestra escasa capacidad patogénica en estos tejidos (Moral *et al.*, 2009). En las zonas donde se dan ataques directos en ramas y hojas como en el sur de Italia el hongo sobrevive en ellas y puede producir inóculo durante todo el año, por lo que el ciclo de patogénesis es diferente al que resulta de considerar exclusivamente los ataques al fruto (Martelli, 1961).

La esporulación del patógeno en las aceitunas afectadas se produce cuando la humedad relativa es elevada (>90%). Las salpicaduras causadas por las gotas de lluvia constituyen el principal vehículo de dispersión de los conidios, ya que éstos no se dispersan por el aire (Trapero y Blanco, 2008; Moral y Trapero, 2012). Además, es necesario la presencia agua libre (lluvia, rocío) en la superficie de los frutos para que germinen los conidios. La germinación y la posterior infección de las aceitunas se produce entre 10 y 30°C, siendo el óptimo de 17 a 19.5°C (Moral *et al.*, 2012).

La estrategia de control de la Antracnosis del olivo está basada principalmente en el uso de fungicidas de origen cúprico (Roca *et al.*, 2007a; 2007b). En España, la dependencia de estos fungicidas se agudiza ya que el uso de fungicidas orgánicos está muy limitado durante el otoño, debido a que la mayoría son liposolubles existiendo la posibilidad de

que se absorban en el aceite del fruto ya que durante el otoño está finalizando la lipogénesis. Aunque los productos cúpricos han sido incluidos en la directiva 91/414/CEE, se prevén a corto o medio plazo limitaciones de uso, sobre todo en relación a la cantidad de cobre aplicado por hectárea y año.

Por lo tanto, el primer reto a afrontar es el de la optimización de los tratamientos, especialmente en lo referente a umbrales de enfermedad, momento de aplicación y dosis de producto (Trapero *et al.*, 2009) ya que existen pocos estudios que aborden estos aspectos. Prota (1995) recomienda la aplicación de los fungicidas antes del inicio del periodo de infección durante el otoño. Un tratamiento otoñal puede servir para proteger la aceituna de *Colletotrichum* spp.; aunque años con abundantes lluvias otoñales y para variedades tardías podrían ser necesarios más de un tratamiento (Trapero y Blanco, 2008). Asimismo, al no conocerse la importancia epidemiológica de las infecciones de primavera no pueden recomendarse tratamientos fungicidas durante este período.

La efectividad de los fungicidas no cúpricos en el control de la Antracnosis es aun si cabe menos conocida. En general, algunos fungicidas protectores orgánicos como mancozeb, captan o tiram han dado buen resultado en condiciones de laboratorio (Pedret *et al.*, 2002; Oliveira, 2003; Agalliu, 2009). Actualmente, algunos de estos fungicidas están registrados para su uso en olivar mezclados con cobre (hidróxido cúprico más mancozeb y oxiclóruo de cobre más mancozeb) (Anónimo, 2011). No obstante, su comportamiento en condiciones de campo es poco conocido. Igualmente es necesario evaluar la eficacia en condiciones de campo de nuevos compuestos formulados con cobre micronizado con efecto translaminar (Freeman y McIntyre, 2008). Estos nuevos compuestos pueden permitir un ahorro sustancial de Cu-metálico además de poseer mayor efecto curativo.

El calcio (Ca) es un catión divalente alcalino relacionado con el incremento de la resistencia de las células vegetales a ciertos microorganismos (Rahman y Punja, 2007). Este hecho se ha corroborado en varios estudios que certifican que las sales de calcio dan buenos resultados en el control de esta enfermedad en frutales (Biggs, 1999; Shifeng *et al.*, 2008). En el caso del olivo, se ha observado que la resistencia de la aceituna a la infección por *C. acutatum* está directamente relacionada con su concentración de calcio (Moral y Trapero, 2009b; véase capítulo IV). Aun así, las sales

de calcio no han sido evaluadas en condiciones de campo en el olivar en comparación con fungicidas convencionales.

El principal objetivo del presente Capítulo de Tesis Doctoral es evaluar la eficacia de fungicidas cúpricos, orgánicos y sales de calcio en el control de la Antracnosis del olivo en condiciones de campo. Además se evalúan distintos momentos de aplicación. Los resultados derivados del presente trabajo ayudarán a realizar un uso más racional de los fungicidas en el olivar andaluz.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Campos experimentales

Dos campos comerciales situados en la provincia de Córdoba y en donde la Antracnosis es endémica fueron seleccionados. El primer olivar, denominado “La Fuente Rosa”, se encuentra situado en el Término Municipal (TM) de la Rambla (37° 36’N, 4° 44’W; altitud 354 m). Esta finca posee suelo de textura arcillosa y olivos de 2 pies y 30 años de edad del cultivar susceptible ‘Hojiblanca’. El marco de plantación es de 10 × 10 m y los árboles tienen riego de apoyo mediante un sistema de goteo enterrado.

El segundo campo seleccionado, denominado “Las Minas”, pertenece al Instituto de Formación Agrícola y Pesquera de Andalucía (IFAPA) y se encuentra en TM de Cabra (37° 28’N, 4° 27’W, altitud 538 m). “Las Minas” se encuentra ubicado en la zona de transición entre las comarcas de Campiña Alta y Subbética de Cabra. El suelo de este olivar es calizo-arenoso y los olivos son de un pie y de 20 años de edad del cultivar susceptible ‘Picudo’. Éstos se encuentran plantados en condiciones de secano y su marco de plantación es de 7 × 7 m.

En ambos campos, el número de frutos con infecciones latentes de *Colletotrichum* spp., fue determinado anualmente usando el herbicida N,N'-dimethyl-4,4'-dicloruro bipyridinium dichloride (Paraquat). Para ello, a principios de septiembre, se recogieron 300 frutos de cada una de las parcelas experimentales, se lavaron, desinfectaron usando lejía y alcohol y se sumergieron en el mencionado herbicida (Moral *et al.*, 2009). Finalmente se cuantificó la incidencia de frutos con infecciones latentes del patógeno (Figura 1d).



En 2010 en “Las Minas”, y debido a la casi ausencia de epidemia de los años previos, se situaron 4 aceitunas momificadas del cv. Vera en el interior de una bolsa de malla de nailon (36 cuadrados/cm<sup>2</sup>) en la copa de cada árbol para incrementar el inóculo. El resto de los años, el inóculo que intervino en las epidemias fue el inóculo que de forma natural generó el patógeno.

Los datos meteorológicos de todos los años de estudio se obtuvieron de las estaciones climáticas situadas en el IFAPA de Cabra y el IFAPA de Córdoba y se puede consultar en: [www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/](http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/).

### 3. Evaluación de la incidencia de la enfermedad

La incidencia de frutos con inequívocos síntomas de Antracnosis en cada árbol se evaluó utilizando una escala (0 = ausencia de frutos afectados; 10 = ausencia de frutos sanos) previamente validada (Moral y Trapero, 2009a). En el año 2007, y debido a que el porcentaje de frutos afectados al finalizar el ensayo fue muy bajo y no existía diferencias de tamaño entre los árboles, se realizó un conteo directo de los frutos afectados en cada árbol utilizando un contador manual. La evaluación se realizó atendiendo a la franja de copa que quedaba entre 1 y 2 metros por encima del suelo dando la vuelta alrededor del árbol. El evaluador utilizó unos 5 min por árbol.

En los años que no hubo desarrollo epidémico de la enfermedad y no se situó en el campo inóculo externo (2007/09), un mes después del último tratamiento se recogieron 25 aceitunas de cada unidad experimental (árbol). Las aceitunas se depositaron en cámaras húmedas y se inocularon con una suspensión de 10<sup>5</sup> conidios/ml de *C. godetiae* (aislado Col-133). Los frutos inoculados se mantuvieron a 18±2°C con 12 h de fotoperiodo de luz fluorescente (350 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) durante 35 días. La severidad de síntomas fue evaluada semanalmente con una escala 0-5 (0 = fruto sin síntomas visibles; 5 = fruto completamente momificado con abundantes conidios dispuestos en una matriz gelatinosa) previamente validada (Moral *et al.*, 2008).

En el año 2010, un mes después del último tratamiento, se recogieron 100 frutos de cada unidad experimental. Los frutos tratados fueron directamente incubados sobre perlita estéril al 100% de humedad relativa y se mantuvieron a 18±2°C en oscuridad durante 35 días. En este año se contabilizó el porcentaje de frutos afectados de cada tratamiento.

#### 4. Tratamientos

En todos los años, los tratamientos se realizaron en otoño excepto en 2007 durante el cual se realizó un tratamiento en primavera y varios durante el verano con sales de calcio. En general, y dependiendo del año, se evaluaron fungicidas cúpricos, orgánicos y mezclas de ambos. Además, durante 2006 se evaluaron dos sales de calcio. En 2009/10 también se evaluaron un extracto vegetal y un jabón potásico. El número de tratamientos, momento y productos utilizados se indica en las Tablas 1 y 2. Todos los años se dejaron el mismo número de árboles testigo (no tratados) que tratados. Los campos se manejaron de forma convencional incluidos dos tratamientos de fungicidas cúpricos a finales del invierno principios de primavera para el control de Repilo y Emplomado (Roca *et al.*, 2007a).

Los tratamientos se aplicaron a las máximas dosis recomendadas por el fabricante y quedan especificados en las Tablas 1 y 2. En el caso de las sales de calcio se aplicaron a concentración de 1 g / L. El caldo aplicado por árbol fue de 10 litros, en la finca “La Fuente Rosa” y de 5 litros en la finca “Las Minas” debida a la diferencias de tamaño entre los árboles. La maquinaria utilizada fue una cuba portátil de 100 l modelo Anipal (25 bares de presión máxima y boquilla de 1,2 mm). Las aplicaciones de los productos fueron realizadas durante días sin viento y no lluviosos para evitar deriva y lavado del producto (Figura 1c)

#### 5. Análisis de los datos

El diseño experimental en todos los ensayos fue en bloques al azar. Las variables dependientes evaluadas en los respectivos ensayos (ABCPE, N° de frutos afectados/árbol, o porcentaje de frutos afectados) fueron sometidas a una Análisis de la Varianza (ANOVA) en bloques al azar utilizando como variable independiente el tratamiento. En todos los casos, antes de realizar el ANOVA se comprobó la igualdad de varianzas según el test de Bartlett y la normalidad según el test de Shapiro-Wilk a nivel de significación  $P= 0.05$ . Al porcentaje de frutos con síntomas se le aplicó la transformación angular ( $Y = \arcseno \sqrt{(X/100)}$ ) cuando fue necesario para cumplir los preceptos anteriores. La comparación de medias de los tratamientos se realizó utilizando el test LSD de Tukey ( $P = 0.05$ ). Los datos se analizaron con el programa informático Statistix® 9 (Analytical Software, 2009).

**Tabla 1.** Productos fungicidas y sales de calcio evaluados durante los años 2006 y 2007 para el control de Antracnosis en olivos de la variedad Hojiblanca en la finca “La Fuente Rosa”, situada en el término municipal de La Rambla, Córdoba.

Ensayo/año	Tratamiento	Grupo Químico	Materia Activa	Producto Comercial	Dosis (%) <sup>1</sup>	Momento de aplicación (nº de aplicaciones) <sup>2</sup>
I/2006	2	Cúprico	Hidróxido de Cobre	Funguran	0,4	Otoño (1)
I/2006	3	Cúprico + Estrobirulina	Hidróxido de Cobre + kresoxim-metil	Funguran + Estroby	0,4 + 0,02	Otoño (1)
I/2006	4	Cúprico + Ditiocarbamato	Hidróxido Cúprico + Mancozeb	Funguran + Pennfluid	0,4 + 0,6	Otoño (1)
I/2006	5	Cúprico	Oxícloruro de cobre	Herocupergran	0,25	Otoño (1)
I/2006	6	Cúprico	Oxícloruro de Cobre	Nordox	0,3	Otoño (1)
I/2006	7	Cúprico	Sulfato Cuprocálcico	C. Bordolés	0,2	Otoño (1)
II/2007	2	Cúprico	Hidróxido de Cobre	Funguram	0,4	Otoño (1)
II/2007	3	Cúprico	Hidróxido de Cobre	Funguram	0,4	Primavera (1) + Otoño (1)
II/2007	4	Estrobirulina	Piraclostrobin	Cabrio	0,04	Primavera (1) + Otoño (1)
II/2007	5	Triazol	Tebuconazol	Folicur	0,06	Primavera (1) + Otoño (1)
II/2007	6	Cúprico	Oxícloruro de Cobre	Cuproflow	0,4	Primavera (1) + Otoño (1)
II/2007	7	Sal de Calcio	Cloruro de Calcio	Panreac	1 g/l	Primavera (1) + Verano(4) + Otoño (1)
II/2007	8	Sal de Calcio	Hidróxido de Calcio	Panreac	1 g/l	Primavera (1) + Verano(4) + Otoño (1)

<sup>1</sup>El gasto medio de caldo aplicado por árbol fue de 10 litros.

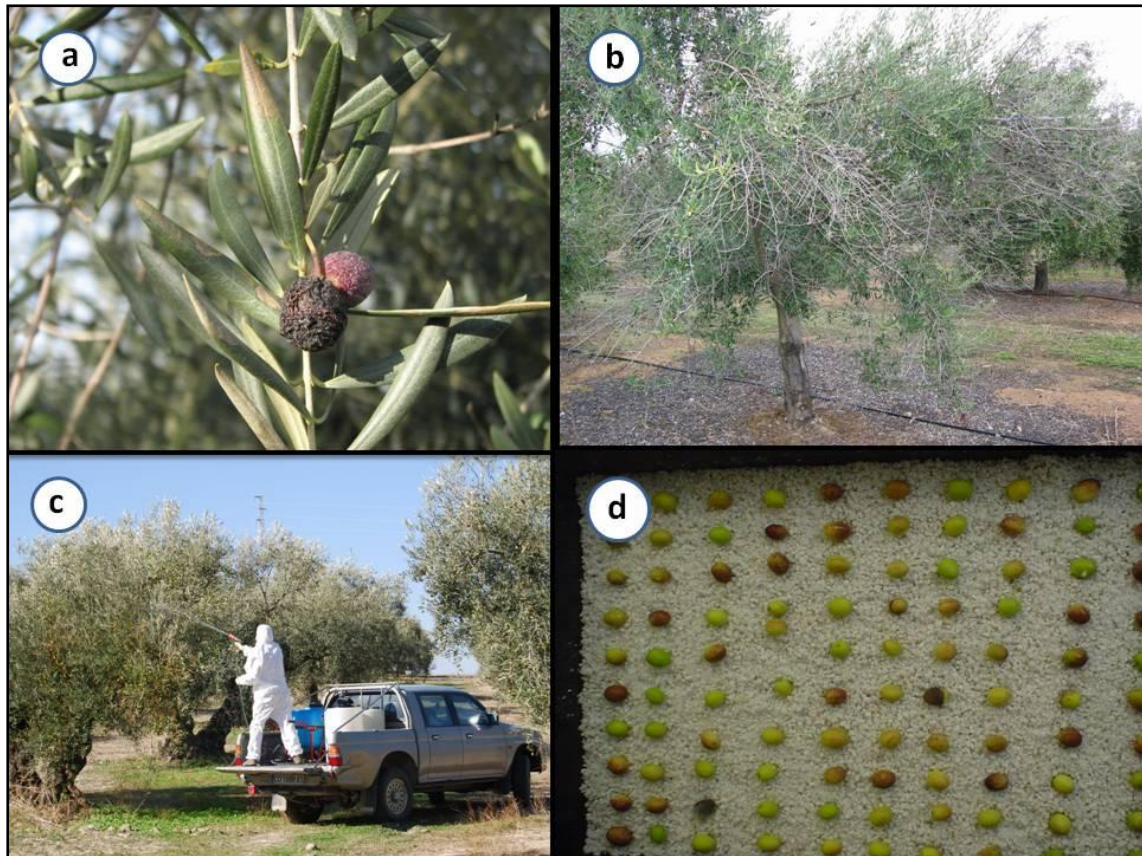
<sup>2</sup>Entre paréntesis se especifica el número de aplicaciones

**Tabla 2.** Productos fungicidas y extractos vegetales, evaluados durante los años 2009 y 2010 para el control de Antracnosis en olivos del cv. Picudo en la finca "Las Minas" situada en el IFAPA de Cabra, Córdoba.

Ensayos	Tratamiento	Grupo Químico	Materia Activa	Producto Comercial	Dosis (%) <sup>1</sup>	Momento de aplicación (nº de aplicaciones) <sup>2</sup>
III/IV	2	Cúprico	Oxicloruro de cobre	Cuproflow	0,4	Otoño (2)
III/IV	3		Extracto de Cítrico	Bio 150 Cítrico	0,4	Otoño (2)
III/IV	4	Estrobirulina	Trifloxistrobin	Flint	0,01	Otoño (2)
III/IV	5	Triazol	Tebuconazol	Folicur	0,06	Otoño (2)
III/IV	6	Cúprico	Sulfato tribásico de Cobre	Curex	0,5	Otoño (2)
III/IV	7	Cúprico + Estrobirulina	Oxicloruro de Cobre + Trifloxistrobin	Cuproflow + Flint	1/3 de la dosis + 0,01	Otoño (2)
III/IV	8		Extractos vegetales	Fruitcare	0,75l/Ha	Otoño (2)
III/IV	9		Jabón Potásico	Biofungi	2	Otoño (2)
III/IV	0	Cúprico	Sulfato Cuprocálcico	Caldo bordelés	0,2	Otoño (2)

<sup>1</sup>El gasto medio de caldo aplicado por árbol fue de 5 litros.

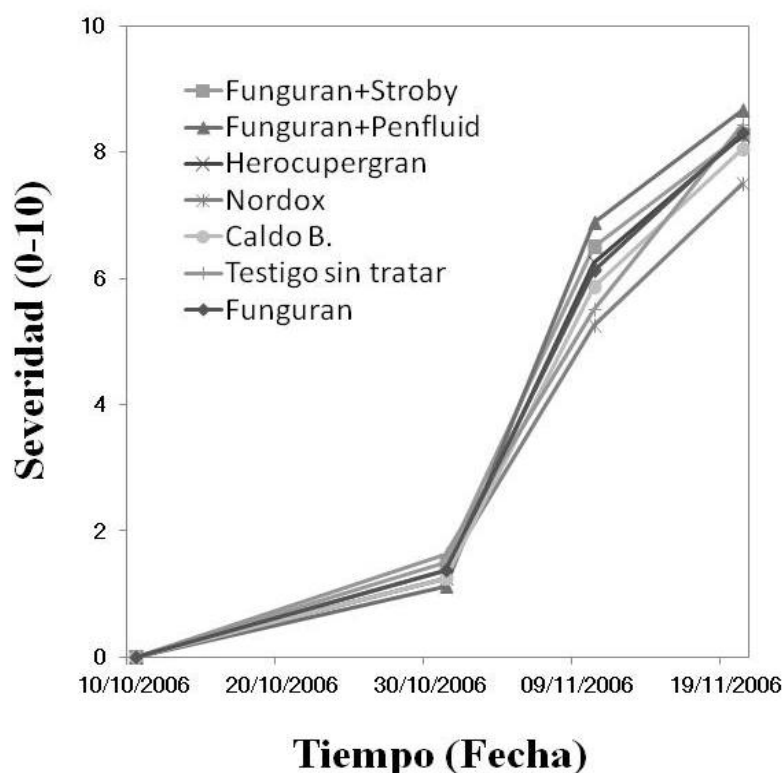
<sup>2</sup>Entre paréntesis se especifica el número de aplicaciones.



**Figura 1.** A) Síndrome de podredumbre de frutos causado por *Colletotrichum* spp. en olivo cv Hojiblanca. B) Desección de ramas en un olivo cv. Hojiblanca causada por *Colletotrichum* spp. C) Aplicación del tratamiento en la finca “La Fuente Rosa”. D) Incubación de aceitunas del cv. Hojiblanca para la detección de infecciones latentes.

## 6. RESULTADOS

Únicamente hubo desarrollo epidémico de la Antracnosis durante el primer año de estudio 2006. Durante los tres años restantes, 2007, 2009 y 2010, el desarrollo de la enfermedad fue muy escaso y sólo se detectaron algunos frutos afectados en el campo (< 40 aceitunas por árbol) durante 2007. Este hecho obligó a realizar inoculaciones artificiales en condiciones controladas (2007 y 2009) o aumentar de forma artificial el inóculo en el campo (2010) mediante la introducción de frutos momificados.



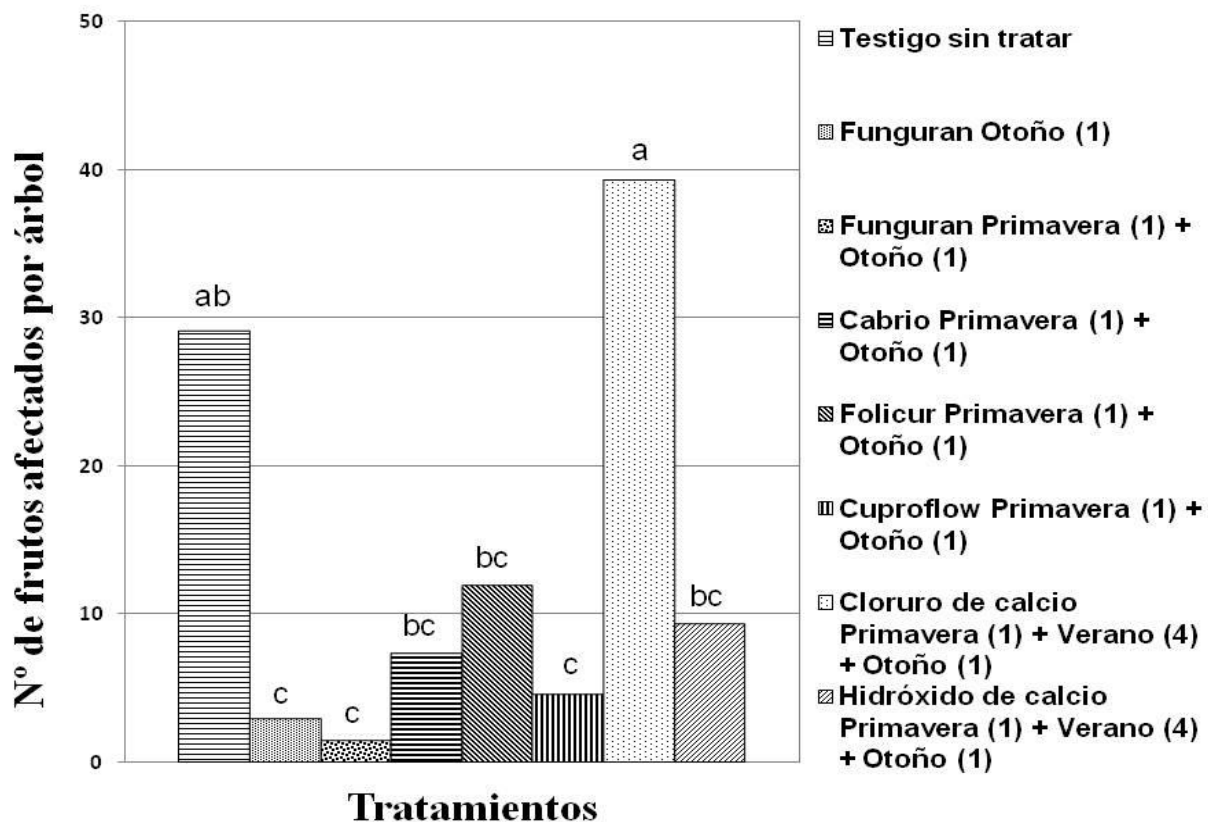
**Figura 2.** Progreso temporal de la severidad de síntomas causada por *Colletotrichum* spp., en olivos del cv. Hojiblanca en la finca “La Fuente Rosa” durante el otoño de 2006. Los puntos representan el valor medio de la severidad de síntomas de 6 árboles tratados con distintos fungicidas (Tabla 1).

En 2006, los primeros síntomas en condiciones de campo se observaron a finales de octubre. En general, los síntomas se iniciaban por la zona apical o peduncular del fruto. Éstos consistían en manchas de color ocre redondeadas sobre las cuales el patógeno desarrollaba acérvulos (cuerpos fructíferos). Los acérvulos en condiciones húmedas emitían una gran cantidad de conidios embebidos en una matriz mucilaginosa

anaranjada. El síntoma continuaba hasta cubrir el fruto por completo que terminaba por momificarse cuando la temperatura aumentaba. Durante ese año el primer tratamiento se realizó en la última semana de octubre debido a que las semanas anteriores hubo abundantes precipitaciones que impidieron su realización.

En ese momento, el porcentaje de aceitunas con infecciones latentes fue del 45%. A partir de entonces hubo un desarrollo explosivo de la epidemia que en 39 días pasó de pocos frutos afectados (valor de escala 1 = 0.14 %) al ~75% (valor de escala 8) de aceitunas con infecciones visibles (Fig. 2). Ninguno de los tratamientos realizados causó una disminución significativa ( $P = 0.5018$ ) del porcentaje de frutos afectados respecto al testigo sin tratar.

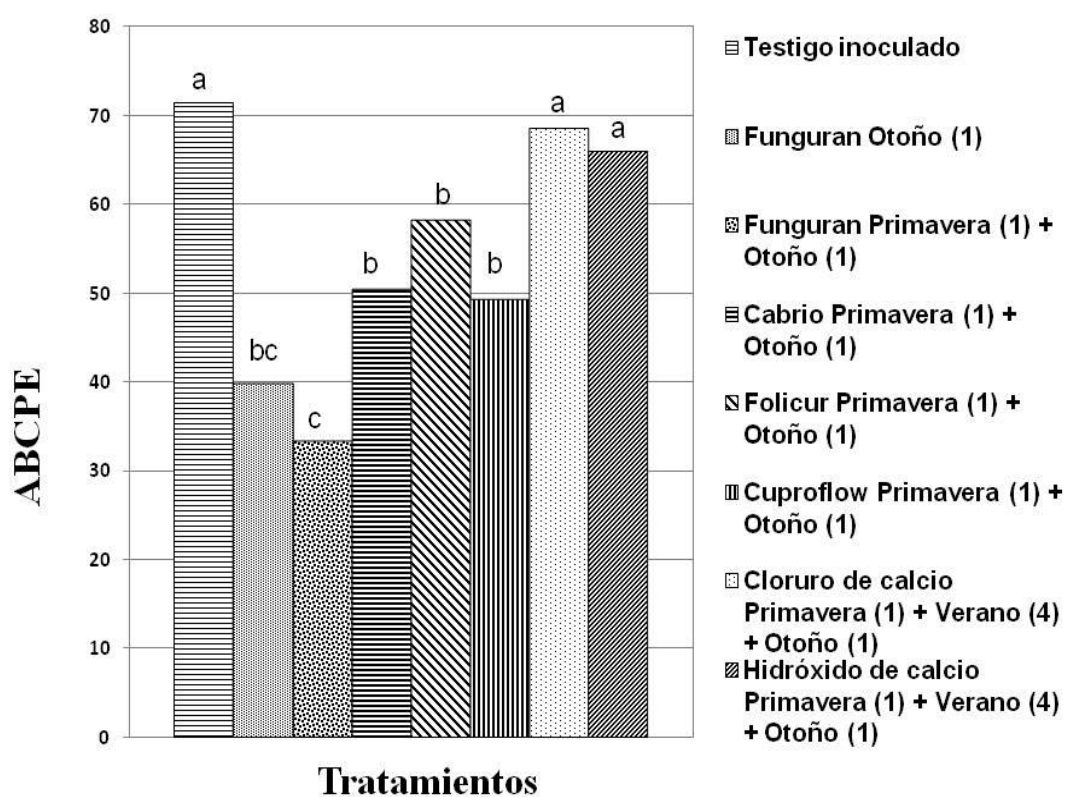
Durante el otoño del año siguiente (2007) hubo un descenso acusado de la precipitación pasando de 223,6 mm durante los meses de septiembre, octubre y noviembre de 2006 a 161,8 mm durante los mismos meses de 2007. Este hecho influyó en el porcentaje de aceitunas con infecciones latentes que en el momento de la realización de los tratamientos fue del 2%. Cuando se cuantificó el número de frutos con síntomas inequívocos de la enfermedad únicamente los árboles tratados con hidróxido de cobre (Funguran; en otoño o en primavera y otoño) y con oxiclورو de cobre (Cuproflow; en primavera y otoño) mostraron una disminución significativa ( $P < 0,05$ ) respecto a los árboles testigo no tratados (Fig. 3). Los árboles que mostraron una incidencia de aceitunas afectadas más baja fueron los tratados con hidróxido de cobre en primavera y otoño (Funguran) aunque este tratamiento sólo se diferenció significativamente ( $P < 0,05$ ) del cloruro de calcio y el testigo sin tratar.



**Figura 3:** Número de frutos afectados por *Colletotrichum* spp., en olivo cv. Hojiblanca tratados con diferentes fungicidas (Tabla 1) en la finca “La Fuente Rosa” en diferentes épocas del año 2007. Las barras representan la media de aceitunas de 7 árboles. Barras con la misma letra no difieren significativamente ( $P = 0,05$ ) según el test LSD protegido de Fisher.



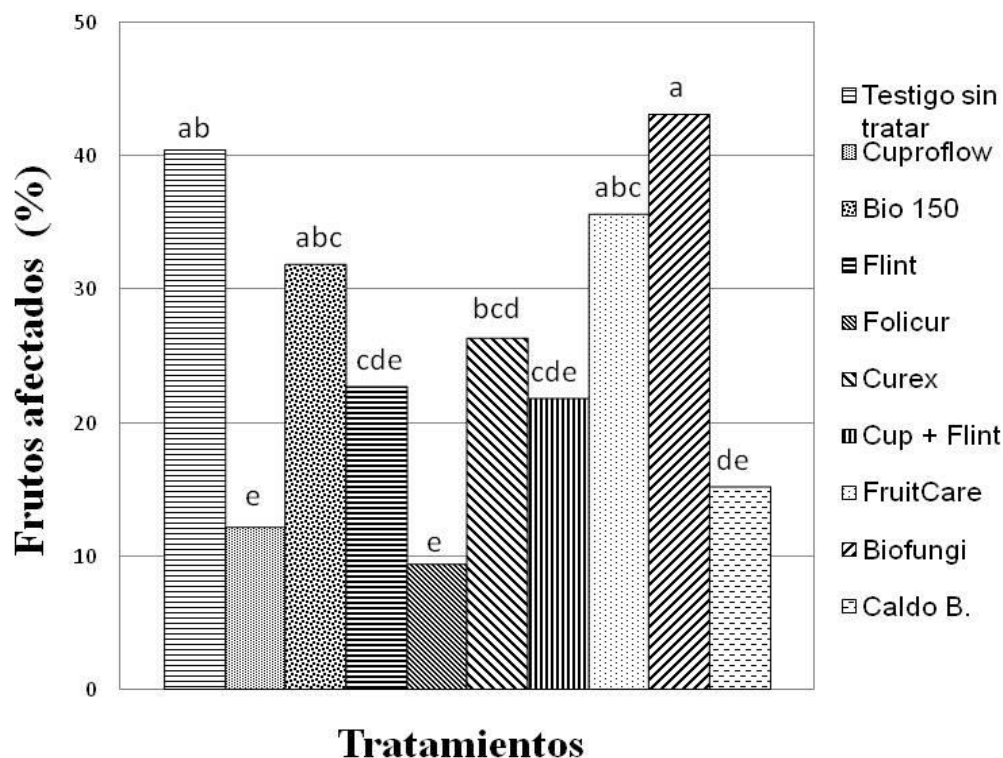
En la evaluación realizada en condiciones controladas, la mayoría de los productos evaluados causaron una disminución significativa ( $P < 0,05$ ) de la severidad de síntomas en las aceitunas respecto al testigo sin tratar. Sólo las aceitunas tratadas con las dos sales de calcio (cloruro de calcio e hidróxido de calcio) no se diferenciaron significativamente ( $P > 0,05$ ) de las testigo sin tratar (Figura 4). Nuevamente en condiciones controladas, las aceitunas procedentes de árboles tratados con hidróxido de cobre (Funguran; otoño o primavera y otoño) fueron las que mostraron una reducción significativamente ( $P > 0.05$ ) mayor de síntomas.



**Figura 4:** Área bajo la curva progreso de la enfermedad (ABCPE) de aceitunas del cv. Hojiblanca tratadas con distintos fungicidas (Tabla 1) y sales de calcio en la finca “La Fuente Rosa” en distintas épocas del año 2007 e inoculadas con el aislado Col-133 de *Colletotrichum acutatum*. Las barras representan la media de 200 aceitunas por tratamiento. Barras con la misma letra no difieren significativamente ( $P = 0,05$ ) según el test LSD protegido de Fisher.

Los dos años restantes, 2009 y 2010, se caracterizaron por ser de escasa pluviometría (113,4 mm en 2009) o precipitación mal repartida (220,6 mm en 2010 concentrados en pocos eventos a finales de noviembre) durante el otoño. Este hecho influyó en el escaso desarrollo epidémico de la enfermedad no llegándose a detectar frutos con infecciones latentes del patógeno. En 2009 sólo se pudieron evaluar los fungicidas sulfato cuprocálcico (Caldo Bordelés), trifloxistrobin (Flint) y tebuconazol (Folicur) en condiciones controladas de laboratorio. De éstos, únicamente el tratamiento realizado con tebuconazol (Folicur) causó una disminución significativa ( $P = 0,0019$ ) de la enfermedad respecto al testigo inoculado.

En 2010, cuando se evaluó el efecto de los distintos productos sobre las infecciones latentes que mostraban las aceitunas recogidas durante enero, todos los productos causaron una reducción significativa ( $P = 0,0231$ ) del porcentaje de infecciones latentes (Figura 5) excepto los tres productos registrados en agricultura ecológica: extracto de cítricos (Bio 150), jabón potásico (Biofungi) y extracto vegetal (Fruitcare). Las aceitunas tratadas con tebuconazol (Folicur) fueron las únicas que mostraron un porcentaje de frutos afectados menor del 10%, aunque este tratamiento no mostró diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) con los tratamientos trifloxistrobin (Flint), oxiclورو de cobre (Cuproflow) más trifloxistrobin (Flint), sulfato cuprocálcico (Caldo Bordelés) y oxiclورو de cobre (Cuproflow).



**Figura 5:** Porcentaje de frutos afectados por *Colletotrichum* spp., del cv. Picudo tratados con distintos fungicidas y productos de origen biológico en el campo experimental “Las Minas” de la estación experimental del IFAPA de Cabra. Los frutos fueron evaluados en condiciones controladas de laboratorio. Las barras representan la media de 800 aceitunas. Barras con la misma letra no difieren significativamente ( $P = 0,05$ ) según el test LSD protegido de Fisher.

## 7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluaron en dos fincas experimentales (Las Minas y La Fuente Rosa), 7 productos cúpricos, 3 mezclas entre fungicidas cúpricos y orgánicos o estrobirulinas, 1 fungicida del grupo químico de los triazol, 2 estrobirulinas y 3 productos de origen biológicos, para el control de la Antracnosis del olivo causada por varias especies de *Colletotrichum*.

La evaluación utilizando plántones del huésped o en condiciones de campo está considerada como una estrategia eficaz para determinar la eficacia de productos fungicidas para el control de enfermedades causadas por hongos (Knight, *et al*, 1997). El principal problema de la evaluación de productos fungicidas en condiciones de

campo sin embargo, es la dependencia del desarrollo epidémico de la enfermedad. Este hecho se agrava en el caso de la Antracnosis del olivo ya que se pueden alternar años con fuerte epidemias con años de una completa ausencia de ésta (Moral y Trapero, 2012). Durante los 4 años del presente trabajo únicamente hubo desarrollo epidémico de la Antracnosis en el primer año de estudio. Este hecho estuvo relacionado con la cuantía de las precipitaciones acaecidas durante los meses de riesgo que van desde septiembre a noviembre (Moral et al., 2012; Moral y Trapero, 2012). En los años que el desarrollo epidémico de la enfermedad permitió una evaluación más eficiente de los productos utilizados (2007 y 2010), el tebuconazol (Folicur) y los fungicidas cúpricos (sulfato cuprocálcico, oxiclورو de cobre, hidróxido de cobre) fueron los que permitieron un control más eficiente de la enfermedad. Estos resultados, apoyan el uso común de fungicidas cúpricos para el control de enfermedades aéreas en las zonas olivareras de todo el mundo (Miller, 1949; Bourbos y Skodridakis, 1993; Teviotdale *et al.*, 1995; Iannotta *et al.*, 2002; Roca *et al.*, 2007a, Trapero y Blanco, 2008, Moral y Trapero, 2009b). De forma similar, Pennisi *et al.*, 1993, en ensayos de campo realizados contra la Antracnosis, detectaron que el sulfato cuprocálcico, es el producto más eficiente cuando se compara con el ziram, miclobutanil, bitertanol, metiram, hexaconazol y bitertanol. En nuestras condiciones, el sulfato tribásico de cobre (Curex) ha mostrado una eficacia menor que el resto de los fungicidas aunque está recomendado como producto para el control de esta enfermedad (Anónimo, 2011).

Las mezclas de productos cúpricos con kresoxim-metil (Stroby, BASF) o fungicidas orgánicos también han sido evaluadas en otros estudios. Según Viruega y Trapero (2002), este tipo de mezcla permite un control eficiente del Repilo del olivo. Para el control de la Antracnosis del olivo Oliveira (2003) evaluó distintos fungicidas sobre aceitunas inoculadas artificialmente con *C. acutatum* observando que la mezcla de hidróxido cúprico más tebuconazol permitía una protección efectiva en las aceitunas debido al efecto sinérgico entre ambas materias activas. En nuestros ensayos las mezclas hidróxido de cobre más kresoxim-metil (Stroby) y hidróxido de cobre más mancozeb (Pennfluid, Nufarm) no mejoraron el control de la enfermedad respecto al testigo no tratado. Este hecho estuvo influido por el elevado porcentaje de aceitunas con infecciones latentes (45%) en el momento del tratamiento ya que el efecto de los productos cúpricos es principalmente protector (Roca *et al.*, 2007a; 2007b). Como ha sido mencionado anteriormente, ese año la precipitación acumulada durante el otoño fue

de 251,2 mm repartidos de manera homogénea, y la temperatura media en la finca osciló entre 23,6 y 11 °C entre los meses de octubre y noviembre, temperaturas que coinciden con los rangos de infección (10-25) determinados por Jurado (2010) en condiciones artificiales. Por tanto, debido a las condiciones climáticas, a la presencia de infecciones latentes, a la susceptibilidad de la variedad y a la temprana maduración de los frutos (Moral *et al.*, 2012; Moral y Trapero, 2012), la epidemia fue explosiva no detectándose efecto de los productos utilizados.

En 2010, en cambio, en la finca “Las Minas” la mezcla oxiclورو de cobre (Cuproflow) más trifloxistrobin (Flint) sí que causó una disminución significativa de los valores de severidad respecto al testigo no tratado coincidiendo con observaciones previas con mezclas de kresoxim-metil más metiram; kresoxim-metil más cobre, maneb y zineb para el control del Repilo (Viruega y Trapero, 2002); e hidróxido cúprico más folpet para el control de la Antracnosis (Oliveira, 2003).

Los productos penetrantes o sistémicos como tebuconazol y trifloxistrobin pueden ser útiles contra Antracnosis constituyendo un complemento a los fungicidas cúpricos. Pedret *et al.*, (2002) evaluaron distintos fungicidas como método preventivo de control de Antracnosis, para lo cual inocularon frutos previamente tratados. En estos estudios la diclofluanida, folpet, ziram, tiram y captan causaron una disminución importante de síntomas en las aceitunas respecto al testigo no tratado. Agalliu (2009) comprobó utilizando una metodología similar que el tebuconazol y trifloxistrobin son eficaces en el control de la Antracnosis del olivo en condiciones controladas. Según nuestro conocimiento, en el presente trabajo, se evalúa el tebuconazol (Folicur) y trifloxistrobin (Flint) por primera vez para condiciones de campo mostrándose, en general, como fungicidas eficaces contra esta enfermedad. Desafortunadamente, los triazoles, al igual que la mayoría de fungicidas orgánicos, son liposolubles y por tanto, existe la posibilidad de que se absorban en el aceite. De ahí que su uso esté muy limitado cuando la aceituna está en fase de lipogénesis (Moral y Trapero, 2009b).

El calcio puede mostrar efecto en el control de algunas enfermedades causadas por hongos al poseer efecto anti-fúngico inhibiendo la actividad de enzimas excretadas por los patógenos y al reforzar la estructura de la pared celular de los tejidos del huésped (Rahman y Punja, 2007). A pesar de ello, en este estudio, las sales de calcio (cloruro de calcio e hidróxido de calcio) no han sido efectivas en el control de la Antracnosis.

Agillau (2009), evaluó 4 sales de calcio (silicato de calcio, cloruro de calcio, propinato de calcio y carbonato de calcio) en condiciones controladas llegando a resultados similares a los nuestros aunque observó una inhibición de la formación de los apresorios de los conidios del patógeno próxima al 80%. Previamente Giménez (2011) observó que aceitunas que habían sido tratadas con sales de calcio mostraban menos severidad de síntomas que los frutos control. En condiciones naturales, se ha observado que el contenido de calcio de la aceituna está positivamente relacionado con la resistencia que muestra ésta al patógeno (Moral y Trapero, 2009b, véase capítulo IV). Posiblemente, el calcio aplicado en condiciones de campo o a las aceitunas directamente no sea utilizado por las células de la pared de la aceituna ya que se trata de un elemento altamente inmóvil (Fernández-Escobar, 2008).

En condiciones controladas, Agalliu (2009) detectó ausencia de actividad fungicida en varios extractos de productos vegetales de forma similar a nosotros cuando se evaluaron productos elaborados con extractos vegetales, entre ellos de cítricos, y jabón potásico.

El momento de aplicación de productos químicos contra la Antracnosis del olivo depende de la persistencia del fungicida, del tipo de enfermedad, del ambiente, de la susceptibilidad del cultivar, del estado de madurez de las aceitunas y del nivel de infección existente. Actualmente, se recomienda realizar un tratamiento a principios de otoño aunque en años con abundantes lluvias otoñales y para variedades tardías podría recomendarse más de uno (Roca *et al.*, 2007a; 2007b; Trapero y Blanco, 2008). Moral *et al.*, (2010) demostraron que tras las primeras lluvias de finales de verano principios de otoño, los frutos momificados que quedan en el árbol se hidratan aumentando enormemente el inóculo en las momias, siendo aconsejado realizar un primer tratamiento en este momento debido al carácter protector de los fungicidas cúpricos. Martelli y Piglionica (1961) estudiaron el efecto de los tratamientos con sulfato cuprocálcico durante la primavera. Estos autores solamente obtuvieron una reducción significativa de la enfermedad en uno de los tres años estudiados. En nuestro caso, los tratamientos realizados en “La Fuente Rosa” con distintos fungicidas durante otoño y primavera-otoño han permitido demostrar que las aplicaciones primaverales no mejoran el control de la enfermedad si son comparadas con las realizadas únicamente otoño. Aunque Moral *et al.*, (2008) apuntan que las aplicaciones primaverales pueden tener efecto en el control de la enfermedad los años con otoños muy secos debido al carácter oligocíclico de la enfermedad.

Los resultados obtenidos en este estudio confirman que los tratamientos al inicio del otoño con fungicidas cúpricos permiten un control eficiente de la Antracnosis del olivo. La aplicación en otoño con trifloxistrobin (Flint) o su mezcla con oxiclورو de cobre (Cuproflow), puede ser una alternativa a los tratamientos basados únicamente con productos cúpricos, ya que este tipo de mezclas están registradas actualmente en el olivar (Anónimo, 2011) y pueden tener cierto efecto curativo cuando por algún motivo se han realizado los tratamientos después de la infección.

El presente trabajo establece las bases para un uso más racional de los productos fungicidas aplicados contra la Antracnosis del olivo.

## **8. CONCLUSIONES**

1. Los fungicidas cúpricos, hidróxido de cobre (Funguram), oxiclورو de cobre (Cuproflow) y sulfato cuprocálcico (Caldo Bordolés) aplicados de forma preventiva, permiten un control eficiente de la Antracnosis del olivo aunque en años con abundantes precipitaciones dicho efecto parece insuficiente para controlar la enfermedad.
2. El fungicida tebuconazol (Folicur) permite un control eficiente de la antracnosis del olivo aunque únicamente puede ser aplicado durante la primavera.
3. La aplicación de trifloxistrobin (Flint) o su mezcla con oxiclورو de cobre (Cuproflow) puede ser una alternativa a la estrategia basada únicamente en tratamientos con productos cúpricos.
4. El momento de aplicación más eficiente para el control de la Antracnosis del olivo es al inicio del otoño.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Agalliu, G. 2009. Evaluación de Fungicidas para el control de la antracnosis del olivo causada por *Colletotrichum acutatum*. Trabajo profesional fin de Master, ETSIAM, Universidad de Córdoba. 122 pp.
- Andrés, F., de 1991. Enfermedades y plagas del Olivo. Riquelme y Vargas Ediciones S.L., Jaén, Spain.
- Anónimo, 2011. <http://www.marm.es/es/agricultura/temas/medios-de-produccion/productos-fitosanitarios/registro/menu.asp>. [Consulta: 03/09/2011].
- Biggs, A.R. 1999. Effects of calcium salts on apple bitter rot caused by two *Colletotrichum* spp. Plant Dis. 83: 1001-1005.
- Bourbos, V.A., Skoudridakis, M.T., 1993. Efficacite de quelques fongicides cupriques à l'égard de *Spilocaea oleagina*. EPPO Bull. 23: 393-397.
- Fernandez-Escobar, R. 2008. Fertilización. En: El cultivo del olivo. D. Barranco, R. Fernandez-Escobar, L. Rallo, eds. Coedición Junta de Andalucía /Mundiprensa, Madrid: 245-265.
- Freeman, M.H., C.R. McIntyre, 2008. A Comprehensive Review of Copper Based Wood Preservatives with a Focus on New Micronized or Dispersed Copper Systems. Prod. J. 58: 6-27.
- Giménez, C.R. 2011. Sales de calcio para el control de Antracnosis y molestado en aceitunas. Proyecto fin de Carrera, ETSIAM, Universidad de Córdoba: 120-187.
- Graniti, A., Frisullo, S., Pennisi, A.M., Magnano di San Lio, G. 1993. Infections of *Glomerella cingulata* on olive in Italy. EPPO Bull. 23: 457- 465.
- Iannotta, N., Monardo, D., Perri, L., 2002. Effects of different treatments against *Spilocaea oleagina* (Cast.) Hugh. Acta Hort. 586: 741-744.
- Knight, S.C., Anthony, V.M., Brady, A.M., Greenland, A.J., Heaney, S.P., Murray, D.C., Powell, K.A., Schulz, M. A., Spink, C.A., Worhington, P.A., Youle, D., 1997. Rationale and perspectives on the development of fungicides. Annu. Rev. Phytopathol. 35: 349-372.



- Mateo-Sagasta, E. 1968. Estudios básicos sobre *Gloeosporium olivarum* Alm. (Deuteromiceto Melanconial). Bol. Patol. Veg. Entomol. Agric. 30: 31-135.
- Martelli, G.P. 1961. Acervuli di *Gloeosporium olivarum* Alm. su foglie di olivo. Phytopath. Medit. 1: 31-43.
- Martelli, G.P., Piglionica, V. 1961. Tre anni di lotta contra la Lebbra delle olive in Puglia. Phytopath. Medit. 3: 101-112.
- Miller, H.N. 1949. Development of the leaf spot fungus in the olive leaf. Phytopathol. 39: 403-410.
- Moral, J., Bouhmidi, K., Trapero, A. 2008. Influence of fruit maturity, cultivar susceptibility, and inoculation method on infection of olive fruit by *Colletotrichum acutatum*. Plant Dis. 92: 1421-1426.
- Moral, J., Oliveira, R., Trapero, A. 2009. Elucidation of the disease cycle of olive Anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum*. Pytopathol. 99: 548-556.
- Moral, J., Trapero, A. 2009a. Assessing the susceptibility of olive cultivars to anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum*. Plant Dis. 93: 1028-1036.
- Moral, J., Trapero, A. 2009b. Resistencia del olivo a la Antracnosis. Boletín de la Sociedad Española de Fitopatología 66: 22-30.
- Moral, J., Jurado-Bello, J., Sánchez, M.I., Oliveira, R., and Trapero, A. 2012. Effect of temperature, wetness duration, and planting density on olive anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. Phytopathology 102: 974-981.
- Moral, J., Trapero, A. 2012. Mummified fruit as a source of inoculum and disease dynamics of olive anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. Phytopathology 102: 982-989.
- Oliveira, R. 2003. Etiología y control químico de la Aceituna Jabonosa causada por *Colletotrichum* spp. Tesis doctoral, ETSIAM, Universidad de Córdoba. 260 pp.
- Pedret, T.E., García-Figueres, F., Duatis M.J. 2002. Continuación de los bioensayos sobre la eficacia de diferentes fungicidas contra *Colletotrichum acutatum*,

- causante de las aceitunas jabonosas. Años 2000-2001. Fruticultura profesional, 89: 150-156.
- Pennisi, M., Agosteo, G.E., Grasco, S. 1993. Chemical control of olive rot caused by *Glomorella cingulata*. EPPO Bull. 23: 467-472.
- Prota, U., 1995. Le malattie dell'olivo. Inform. Fitopatol. 45: 16-26.
- Rahman, M., Punja, Z.K., 2007. Calcium and plant disease. In Mineral nutrition and plant disease, eds. L.E. Datnoff, W.H. Elmer, and D.M. Huber, 79-93. St. Paul, MN. APS Press.
- Roca, L.F., Moral, J., Viruega, J.R., Ávila, A., Oliveira, R., Trapero, A. 2007a. Copper fungicides in the control of olive diseases. Olea 26: 48-50.
- Roca, L.F., Viruega, J.R., Ávila, A., Oliveira, R., Marchal, F., Moral, J., Trapero, A. 2007b. Los fungicidas cúpricos en el control de las enfermedades del olivo. Vida Rural 256: 52-56.
- Sergeeva, V., Nair, N.G., Spooner-Hart, R. 2008. Evidence of early flower infection in olives (*Olea europaea*) by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* causing anthracnose disease. Australasian Plant Dis. Notes, 3: 81-82.
- Shifeng, C., Yonghua, Z., Shuangshuang, T., Kaituo W. 2008. Improve control of anthracnose rot in loquat fruit by a combination treatment of *Pichia membranifaciens* with CaCl<sub>2</sub>. International Journal of Food Microbiol. 126: 216-220.
- Talhinhas, P., Sreenivasaprasad, S., Neves-Martins, J., and Oliveira, H. 2005. Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. Appl. Environ. Microbiol. 71: 2987-2998.
- Teviotdale, B.L., Sibbet, G.S., Harper, D.H., 1989. Control of olive leaf spot by copper fungicides. Appl. Agric. Res. 4: 185-189.

Trapero, A., Blanco, M.A. 2008. Enfermedades. En: El cultivo de olivo. D. Barranco, R. Fernández-Escobar, L. Rallo, eds. Coedición Junta de Andalucía/Mundi-Prensa, Madrid. 595-656.

Trapero, A., Roca, L.F., Moral, J., López-Escudero, F.J., Blanco-López, M.A. 2009. En enfermedades del olivo. *Phytoma* 209: 18-28.

Viruega, J.R., Trapero, A., 2002. Efficacy of kresoxim-methyl against olive leaf spot caused by *Spilocaea oleagina*. *Acta Hort.* 586: 801-804.

## DISCUSIÓN GENERAL

La Antracnosis del olivo, causada por distintas especies de *Colletotrichum*, es la enfermedad más importante del fruto de este cultivo en la mayoría de las regiones olivereras del mundo. En Andalucía, las especies más frecuentes asociadas a la Antracnosis pertenecen al complejo *C. acutatum* s.l. La enfermedad muestra dos síndromes característicos, el primero es la podredumbre del fruto “Aceituna jabonosa” que avanza hasta afectar el fruto completo y termina momificándose (Mateo-Sagasta, 1968; Moral y Trapero, 2009b). El segundo síndrome es la muerte y desecación de ramas que está asociado a las toxinas que produce el patógeno en las aceitunas afectadas que se movilizan a las ramas (Martelli, 1960; Zachos y Makris, 1963; Azevedo, 1976; Moral *et al.*, 2009c). Además, los aceites que se originan de aceitunas afectadas muestran elevada acidez y pésima calidad. A pesar de su importancia, la información disponible sobre esta enfermedad es aún muy limitada, lo que ha motivado la realización de este trabajo de tesis doctoral, el cual forma parte de las líneas de investigación del grupo de Patología Agroforestal de la Universidad de Córdoba, que en los últimos 10 años han abordado cuestiones generales sobre la biología, epidemiología, control y efecto en la calidad del aceite de la Antracnosis del olivo. La revisión bibliográfica realizada revela, entre otros aspectos, que de 34 artículos científicos publicados en la última década, 19 artículos (55.9%) fueron realizadas en España por el citado grupo de investigación, 7 artículos (20.6%) en Italia, 4 artículos (11,8%) en Portugal, 3 artículos (8,9%) en Australia y 1 artículo (2,9%) en Túnez. Entre las carencias más importantes sobre el conocimiento de esta enfermedad destacan los mecanismos de patogénesis y resistencia de los cultivares de olivo, el efecto de la infección del fruto sobre la calidad del aceite y el control integrado de la enfermedad (Moral *et al.*, 2014).

En lo que respecta a la resistencia del olivo a la Antracnosis, las evaluaciones en condiciones de campo del Banco Mundial de Germoplasma de Olivo de Córdoba (WOGBC), han permitido determinar una gradación continua de susceptibilidad en los cultivares de olivo, desde muy resistentes a altamente susceptibles a la enfermedad. En algunos casos estas evaluaciones se complementaron con inoculaciones artificiales. Antes de la realización de este trabajo, la información disponible acerca de la resistencia de cultivares de olivo era muy limitada. Con frecuencia, esta información está basada en

datos contradictorios debido a errores de identificación de cultivares y la confusión entre síntomas causados por distintos patógenos (Mateo-Sagasta, 1968; Moral *et al.*, 2005). Uno de los factores que condiciona la resistencia de los cultivares es la madurez del fruto, ya que cuando el fruto está sobremaduro todos los cultivares resultan susceptibles. Otros factores que influyen son la interacción de la especie del patógeno-cultivar y la existencia de grupos de virulencia o razas del patógeno (Moral y Trapero, 2009b; Xaviér *et al.*, 2010). Por ello, un objetivo prioritario de las investigaciones del grupo de Patología Agroforestal de la Universidad de Córdoba fue el desarrollo de los métodos de evaluación de la susceptibilidad o resistencia en condiciones controladas y de campo (Moral y Trapero, 2009). La aplicación de estos métodos ha permitido evaluar 384 cultivares en las parcelas principales del WOGBC, los cuales se han agrupado en cinco categorías de susceptibilidad/resistencia. La distribución de los 384 cultivares en estas categorías y los cultivares representativos de cada una de ellas son: 34 (8.9%) altamente resistentes ('Frantoio'), 55 (14.35) resistentes ('Picual'), 76 (19.8%) moderadamente susceptibles ('Arbequina'), 121 (31.5%) susceptibles ('Lechín de Sevilla') y 98 (25.5%) altamente susceptibles ('Ocal'). Esta información es de gran valor para futuras plantaciones de olivo, en los programas de mejora de olivo y para el manejo integrado de la enfermedad en plantaciones ya establecidas.

Los acebuches han sido considerados una fuente importante de genes de interés agrícola (Mulas, 1999; Mulas *et al.*, 2004), aunque no se han utilizado en los programas de mejora genética de olivo cultivado. Este hecho pudo deberse a que el acebuche y el olivo cultivado son especies altamente heterocigóticas con una descendencia variable en los caracteres estudiados (Rallo, 2005). Además, los programas de mejora del olivo son muy recientes, por lo que aún no se han utilizado genotipos silvestres como parentales (Rallo, 2011). Por ello, se desconoce el comportamiento de los genotipos de acebuche para muchos caracteres de interés agronómico. La falta de información respecto a la susceptibilidad de los acebuches a la Antracnosis (Moral *et al.*, 2009), ha motivado que se realizaran prospecciones de campo en Andalucía, donde no se han observado síntomas de esta enfermedad (Moral *et al.*, 2005; Muñoz-Díez, 2008). Por ello, se estudió la resistencia de 45 genotipos de acebuche y la posible transmisión del patógeno a la semilla. En consonancia con las observaciones de campo, los acebuches evaluados han mostrado un elevado nivel de resistencia a la infección por el patógeno, igual o superior al que muestra el cultivar altamente resistente Frantoio. A pesar de ello, hay

que resaltar que los acebuchales andaluces se sitúan en zonas propicias para el desarrollo de enfermedades aéreas debido a alta pluviometría y temperaturas suaves en donde estos patógenos han podido ejercer una elevada presión de selección. Nuestros resultados sugieren que la presión de selección hacia resistencia a la Antracnosis en las masas forestales de Acebuche se ha incrementado por el efecto negativo del patógeno sobre la germinación de la semilla y la nascencia de las plántulas. Además, la dispersión de las acebuchinas por las aves puede verse disminuida ya que algunas especies de pájaros no consumen las aceitunas o acebuchinas afectadas por la Antracnosis.

Los compuestos de calcio ejercen funciones de refuerzo de la pared celular, proporcionándole rigidez e integridad, estimulando el crecimiento celular, ya que a diferencia de otros macronutrientes, una alta proporción de este elemento está localizado en las paredes celulares. El calcio también aporta estabilidad a la membrana plasmática interviniendo en la selectividad y permeabilidad de iones y en la tolerancia a salinidad (Marschner, 1995; White y Broadley, 2003; Conn y Gilliam, 2010). Asimismo, el calcio es importante en la interacción planta-patógeno, ya que puede afectar a la germinación de las esporas de los patógenos (Warwar y Dickman, 1996), aumenta la resistencia de los tejidos vegetales a la infección al estar ligado al pectato en la lámina media (Seymour *et al.*, 1993; Lara *et al.*, 2004) y disminuye la capacidad de las fitotoxinas excretadas por los patógenos en degradar el pectato (Conway y Sams, 1984; Conway *et al.*, 1988; Volpin y Elad, 1991; Kaile *et al.*, 1992; Tobías *et al.*, 1993; Elad, 1997). Los compuestos cálcicos se están utilizando para el control de la Antracnosis del manzano, debido a que inhiben la actividad de enzimas y toxinas excretadas por el patógeno y refuerzan la pared celular de los tejidos del fruto (Rahman y Punja, 2007). El desconocimiento existente sobre el papel del calcio en la Antracnosis del olivo, nos llevó a estudiar el efecto de tratamientos de calcio sobre la respuesta a la enfermedad de varios cultivares. Aunque, las aplicaciones exógenas de calcio en aceitunas, tanto en condiciones controladas como en campo, no han permitido un control de la enfermedad posiblemente debido a la inmovilidad de este elemento (Pérez, 2011), se ha observado que existe una relación lineal positiva entre el contenido en calcio de las aceitunas y su resistencia a la Antracnosis (Morales-Mosquera, 2010). Ello podría explicar que la enfermedad sea endémica en áreas de suelos ácidos como la Sierra Norte de Sevilla y algunas comarcas de Huelva y sur de Portugal, en los que el contenido en calcio del fruto es bajo (Moral y Trapero, 2009). Asimismo, se ha

observado que el efecto de calcio, en aceitunas tratadas con cloruro de calcio e inoculadas, se perdía cuando las aceitunas eran lavadas antes de la inoculación indicando que se trata de un efecto protector del tratamiento.

En años epidémicos, el control de la enfermedad se basa principalmente en el uso de productos cúpricos, siendo la aplicación de estos fungicidas en otoño la medida de control más utilizada (Civantos, 1999; Trapero y Blanco, 2008). Por ello, se ha evaluado en condiciones de campo el efecto de diferentes fungicidas contra la Antracnosis del olivo. Los compuestos cúpricos evaluados (hidróxidos, óxidos, oxicluros y sulfatos) han mostrado cierta eficacia contra la enfermedad, con excepción del sulfato tribásico de cobre que resultó menos eficaz. Estos resultados apoyan el uso común de fungicidas cúpricos en todas zonas olivareras de todo el mundo (Miller, 1949; Bourbos y Skodridakis, 1993; Teviotdale *et al.*, 1995; Iannotta *et al.*, 2002; Roca *et al.*, 2007a, Trapero y Blanco, 2008, Moral y Trapero, 2009b).

En el caso de los productos penetrantes o sistémicos, se ha observado que existe una elevada eficacia del tebuconazol, aunque su uso está limitado a prefloración. Las estrobilurinas, como el kresoxim-metil o el trifloxistrobin, también han resultado útiles contra la Antracnosis, siendo un complemento a los fungicidas cúpricos (Pedret *et al.*, 2002; Viruega y Trapero, 2002). También se han observado una buena eficacia de las mezclas de compuestos cúpricos y orgánicos, como el oxiclورو de cobre y propineb o trifloxistrobin y el hidróxido cúprico y folpet (Pérez, 2011). En este estudio se confirma que los tratamientos al inicio del otoño con fungicidas cúpricos permiten un control eficiente de la Antracnosis del olivo. La aplicación en otoño con trifloxistrobin, o su mezcla con oxiclورو de cobre, puede ser una alternativa a los tratamientos basados únicamente con productos cúpricos. Asimismo, el uso de nuevos compuestos de baja concentración de cobre son de especial interés ya que permitirían reducir la cantidad de cobre aplicada, cuyo límite máximo permitido actualmente es de 6 Kg/ha al año en la Unión Europea (E.E.C, 2007; Trapero *et al.*, 2007, Cacciola *et al.*, 2012).

## CONCLUSIONES GENERALES

1. La revisión bibliográfica de la Antracnosis del olivo nos ha permitido profundizar en los conocimientos científicos actuales y dilucidar las lagunas existentes sobre la biología, epidemiología, control y efecto en la calidad del aceite. De un total de 34 artículos científicos publicados en los últimos 10 años, 19 de ellos se han realizado en España, 7 en Italia, 4 en Portugal, 3 en Australia y 1 en Túnez. (Capítulo I).
2. Las evaluaciones en condiciones de campo, realizadas durante 1997-2008 en las parcelas principales del Banco Mundial de Germoplasma de Olivo de Córdoba, han permitido evaluar 384 cultivares y se han establecido 5 categorías de susceptibilidad/resistencia: altamente resistentes (8.9%), resistentes (14.3%), moderadamente susceptibles (19.8%), susceptibles (31.5%) y altamente susceptibles (25.5%). Los cultivares representativos de cada uno de estos grupos son Frantoio, Picual, Arbequina, Lechín de Sevilla y Ocal, respectivamente. Capítulo II).
3. Se ha observado una correlación lineal positiva entre la incidencia de frutos afectados y la severidad del puntisecado de ramas, pero esta relación no se cumple para un número considerable de cultivares. Asimismo, la incidencia de frutos afectados ha mostrado una correlación lineal negativa con el contenido en fenoles totales y en oleuropeína, pero igualmente esta correlación no es válida para algunos cultivares. (Capítulo II).
4. Los 45 genotipos de acebuches evaluados por su susceptibilidad a la Antracnosis del olivo han mostrado un alto nivel de resistencia al patógeno, confirmando la ausencia de enfermedad observada en los acebuchales prospectados. No obstante, algunas de las acebuchinas muestreadas (< 6%) mostraron infecciones latentes. (Capítulo III).
5. En las aceitunas infectadas, el patógeno coloniza todos los tejidos del fruto alcanzando la semilla y afectando a su viabilidad. Ello podría explicar la elevada prevalencia de la resistencia a la Antracnosis en los acebuches. (Capítulo III).
6. La inoculación con el patógeno de las raíces de plántulas procedentes de semillas causó muerte de plántulas y necrosis del sistema radicular, siendo más resistentes las plántulas de acebuche que las procedentes de cultivares de olivo. (Capítulo III).
7. Existe una relación lineal negativa entre el contenido en calcio de las aceitunas y su resistencia a la Antracnosis, lo que podría explicar que la enfermedad sea endémica en



áreas de suelos ácidos como la Sierra Norte de Sevilla y algunas comarcas de Huelva y del sur de Portugal. (Capítulo IV).

8. Las aplicaciones exógenas de calcio en fruto, tanto en condiciones controladas como en campo, no han permitido un control adecuado de la enfermedad posiblemente debido a la inmovilidad de este elemento. (Capítulo IV).

9. En aceitunas tratadas con cloruro de calcio e inoculadas, el calcio mostró un efecto protector de la infecciones, ya que la protección se perdía cuando las aceitunas eran lavadas antes de la inoculación. (Capítulo IV).

10. Los compuestos cúpricos (hidróxidos, óxidos, oxiclорuros y sulfatos) aplicados al principio del otoño han mostrado cierta eficacia contra la enfermedad, con excepción del sulfato tribásico de cobre que resultó menos eficaz. (Capítulo V).

11. De los fungicidas orgánicos evaluados, el tebuconazol presentó mayor eficacia, aunque no está autorizado su uso en otoño. También resultaron eficaces el trifloxistrobin y las mezclas de cobre con trifloxistrobin, folpet o propineb. Estos tratamientos podrían ser una alternativa al uso exclusivo de productos cúpricos, permitiendo una reducción en la cantidad de cobre aplicada por ha. (Capítulo V).

## BIBLIOGRAFIA

- Alcántara, J. M., Rey, P.J., Sánchez-Lafuente, A. M., Valera, F. 2000. Early effects of rodent post-dispersal seed predation on the outcome of the plant seed disperser interaction. *Oikos* 88:362-370.
- Azevedo, A.R. 1976. *A defesa sanitaria da oliveira em Portugal*. Instituto Nacional de Investigação Agrária, Oeiras, Portugal.
- Bourbos, V.A., Skoudridakis, M.T., 1993. Efficacite de quelgues fongicides cupriques à l'égard de *Spilocaea oleagina*. *EPPO Bull.* 23: 393-397.
- Cacciola, S.O., Faedda, R., Sinatra, F., Agosteo, G.E., Schena, S., Frisullo, S., Magnano di San Lio G. 2012. Olive Anthracnose. *J. Plant Pathol.* 94, 29-44.
- Conn, S., Gilliam, M. 2010: Comparative physiology of elemental distributions in plants. *Ann. Bot.* 105: 1081–1102.
- Conway, W.S. y Sams, C.E. 1984. Possible mechanisms by which post-harvest calcium treatment reduces decay in apples. *Phytopathology* 74: 208-210.
- Conway, W.S., Gross, K.C. Boyer, C.D. y Sams, C.E. 1988. Inhibition of *Penicillium expansum* polygalacturonase activity by increased apple cell wall calcium. *Phytopathology* 78: 1052-1055.
- Elad, Y. 1997. Responses of plants to infection by *Botrytis cinerea* and novel means involved in reducing their susceptibility to infection. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 73: 381-422.
- Eurostat, 2007. The use of plant protection products in the European Union: data 1992–2003. Statistical book. European Communities, Luxembourg.
- Iannotta, N., Monardo, D., Perri, L., 2002. Effects of different treatments against *Spilocaea oleagina* (Cast.) Hugh. *Acta Hortic.* 586: 741-744.
- Kaile, A., Pitt, D. y Kuhn, P.J. 1992. Calcium toxicity, protoplast viability and the role of calcium in soft-rot of *Brassica napus* due to *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 40: 49-62.
- Lara, I., García, P. y Vendrell, M. 2004. Modifications in cell wall composition after cold storage of calcium-treated strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) fruit. *Postharvest Biology and Technology* 34(3). 331.
- Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2° Edition. 889 pp. Academic Press. London.

- Martelli, G.P. 1960. Primo contributo alla conoscenza della biologia di *Gloeosporium olivarum* Alm. *Phytopathol. Medit.* 1: 31-43.
- Mateo-Sagasta, E. 1968. Estudios básicos sobre *Gloeosporium olivarum* Alm. (Deuteromiceto Melanconial). *Bol. Patol. Veg. Entomol. Agric.* 30: 31-135.
- Miller, H.N., 1949. Development of the leaf spot fungus in the olive leaf. *Phytopathol.* 39: 403-410.
- Moral, J., Ávila, A., López-Doncel, L.M., Alsalimiya, M., Oliveira, R., Gutiérrez, F., Navarro N., Bouhmidi, K., Benali, A., Roca, L., Trapero, A. 2005. Resistencia a los Repilos de distintas variedades de olivo. *Vida Rural* 208: 34-40.
- Moral, J., Oliveira, R., Trapero, A. 2009c. Elucidation of disease cycle of olive anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology* 99: 548-556.
- Moral, J., Trapero, A. 2009b. Resistencia del olivo a la Antracnosis causada por *Colletotrichum* spp. *Boletín SEF* 66: 22-30.
- Moral, J., Trapero, A. 2009b. Resistencia del olivo a la Antracnosis causada por *Colletotrichum* spp. *Boletín SEF* 66: 22-30.
- Moral, J., Trapero, A. 2009. Assessing the susceptibility of olive cultivars to anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum*. *Plant Dis.* 93:1028-1036.
- Moral, J., Trapero, A. 2009b. Resistencia del olivo a la Antracnosis. *Boletín de la Sociedad Española de Fitopatología* 66: 22-30.
- Moral, J., Trapero, A. 2012. Mummified fruit as a source of inoculum and disease dynamics of olive anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. *Phytopathology* 102: 982-989.
- Mulas, 1999. Characterization of olive wild ecotypes. *Acta Hort.* 474: 121-124.
- Mulas, M., Fadda, A., Cauli, E. 2004. Prime osservazioni su cloni di oleastro (*Olea europaea* var. *sylvestris* Hoff. E Link) selezionati per l'utilizzo forestale. *Italus Hortus* 4: 214-217.
- Muñoz-Díez, C. 2008. Prospección, diversidad genética y conservación de ejemplares monumentales y poblaciones silvestres de olivo (*Olea europaea* L.). Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba, España.
- Pedret T. E., García-Figueres, F., Duatis M. J. 2002. Continuación de los bioensayos sobre la eficacia de diferentes fungicidas contra *Colletotrichum acutatum*, causante de las aceitunas jabonosas. Años 2000-2001. *Fruticultura profesional*, 89: 150-156.
- Pérez, M. (2011). Evaluación en campo de fungicidas, sales de calcio y extractos vegetales para el control de la antracnosis del olivo causada por *Colletotrichum* spp. Trabajo Profesional Fin de Máster, ETSIAM, Córdoba.

- Rahman, M., y Punja, Z.K. 2007. Calcium and plant disease. *Mineral nutrition and plant disease*. APS Press, St. Paul, 79-93. St. Paul. Department of Biological Sciences, Simon Fraser University, 8888 University Drive, Burnaby, British Columbia, V5A 1S6 Canada.
- Rallo, L. 2005. Variedades del olivo en España: una aproximación cronológica. in Rallo L, Barranco D, Caballero JM, del Río C, Martín A, Tous J, Trujillo I (Eds) *Variedades del olivo en España*. Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa, Madrid: 15-44.
- Rey, P. J., Gutiérrez, J. E., Alcántara, J. M., Valera, F. 1997. Fruit size in Wild Olives: implications for avian seed dispersal. *Funct. Ecol.* 11: 611-618.
- Roca, L.F., Moral, J., Viruega, J.R., Ávila, A., Oliveira, R., Trapero, A. 2007a. Copper fungicides in the control of olive diseases. *Olea* 26: 48-50.
- Seymour, G., Taylor, J. & Tucker, G. 1993. Introduction. In: *Biochemistry of Fruit Ripening*. Chapman & Hall, London.
- Teviotdale, B.L., Sibbet, G.S., Harper, D.H. 1989. Control of olive leaf spot by copper fungicides. *Appl. Agric. Res.* 4: 185-189.
- Tobias, R.B., Conway, W.S., Sams, C.E., Gross, K.C. & Whitaker, B.D. 1993. Cell wall composition of calcium-treated apples inoculated with *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*, 32: 35-39.
- Trapero, A., Blanco, M.A. 2008. Enfermedades. En: El cultivo de olivo. D. Barranco, R. Fernández-Escobar, L. Rallo, eds. Coedición Junta de Andalucía/Mundi-Prensa, Madrid. pp. 595-656.
- Viruega, J.R., Trapero, A., 2002. Efficacy of kresoxim-methyl against olive leaf spot caused by *Spilocaea oleagina*. *Acta Hort.* 586: 801-804.
- Volpin, H. y Elad, Y. 1991. Influence of calcium nutrition on susceptibility of rose flowers to botrytis blight. *Phytopathology* 81: 1390-1394.
- White, P., Broadley, M.R. 2003: Calcium in plants. *Ann. Bot.* 92: 487-511.
- Xaviér, C.J., Moral, J., Trapero, 2010. Caracterización de la virulencia de *Colletotrichum acutatum*, agente de la Antracnosis del olivo. XV Congreso SEF (Vitoria).
- Zachos, D.G., Makris, S.A. 1963. Recherches sur le *Gloeosporium olivarum* en Grèce. II. Symptomatologie de la maladie. III. Epidémiologie de la maladie. *Ann. Inst. Phytopathol. Benaki*, 5: 128-130.