

Épocas de aislamiento de *Verticillium dahliae* Kleb en olivar en la provincia de Sevilla

F. MONTES, J. I. PÁEZ, J. M. VEGA y M. E. DUHART

Los síntomas producidos por la Verticilosis del olivo (V.O.) y la facilidad con la que el patógeno puede ser aislado de árboles enfermos describen ciclos estacionales, influyendo en la fiabilidad del diagnóstico de la enfermedad. Para determinar la época más adecuada para efectuar los análisis de laboratorio se han recogido mensualmente muestras de árboles con V.O. entre marzo de 1994 y diciembre de 1996, en una parcela de olivar de la provincia de Sevilla. La aparición de síntomas en campo y el porcentaje de análisis positivos en laboratorio fueron máximos en los meses de marzo a junio, mínimos en los de verano e invierno, y tuvieron un ligero incremento durante el mes de septiembre. El patógeno fue aislado con más facilidad en el momento de mostrarse los síntomas. Los árboles se dividieron en dos grupos según fuera o no posible volver a aislar *V. dahliae* Kleb en las primaveras siguientes. A partir de los datos presentados se demuestra la importancia de la época de muestreo en el diagnóstico de V.O., determinándose, para nuestra zona, el momento adecuado en un cultivar susceptible y en condiciones de cultivo conducentes al desarrollo de la enfermedad.

F. MONTES, J. I. PÁEZ, J. M. VEGA y M. E. DUHART: Laboratorio de Sanidad Vegetal. Junta de Andalucía. Apartado de correos 121, 41089 Montequinto (Sevilla).

INTRODUCCIÓN

La Verticilosis del olivo (V.O.) es una enfermedad causada por *Verticillium dahliae* Kleb que produce dos tipos de síndromes bien definidos y denominados «Decaimiento lento» y «Decaimiento rápido» o «Aoplejía» (ZACHOS, 1963; BLANCO-LÓPEZ, *et al.*, 1984).

Una de las características de estos síndromes en los países de clima mediterráneo es la estacionalidad con que se presentan a lo largo del año, lo cual se asocia a la facilidad con que el patógeno se puede aislar de los brotes o ramas afectadas y por ello con el diagnóstico de la enfermedad. Esta estacionalidad tiene además importancia desde el punto de vista del diseño de medidas de control dada su implicación con la inactivi-

dad del hongo en determinadas épocas, con la posible necesidad de nuevas reinfecciones y con la recuperación natural de plantas enfermas, procesos que se relacionan con el grado susceptibilidad-resistencia en la respuesta varietal (WILHELM y TAYLOR, 1965; BLANCO-LÓPEZ *et al.*, 1990; BLANCO-LÓPEZ y JIMÉNEZ-DÍAZ, 1995).

Si bien parece clara entre los diversos autores la aceptación de la estacionalidad de los síntomas, hay cierta disparidad respecto a la del aislamiento del patógeno, debido posiblemente a las distintas condiciones geográficas, de patotipos y cultivares con que se han realizado los trabajos publicados. Así en Italia, mientras CIRULLI (1981), en Puglia aísla el hongo fácilmente durante todo el año de árboles de la variedad muy susceptible S. Agostino; RAGAZZI *et al.*,

(1987) en Toscana y partiendo del cultivar Marailo, encuentra un ciclo con máxima frecuencia en primavera y progresiva disminución hasta llegar al mínimo en invierno. THASSANOPOULUS *et al.*, (1979) en Grecia, cita fluctuaciones estacionales pero lo aísla con cierta facilidad durante todo el año, indicando como causa la elevada sensibilidad de algunas variedades como Konservolia y Kalamon.

Dado el número creciente de muestras recibidas en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de Sevilla (D.G. de la Producción Agraria) que requieren el diagnóstico de V.O., se planteó el presente trabajo para determinar, en las condiciones de cultivo de nuestra zona, la época de aislamiento del patógeno, a fin de dar normas sobre los momentos más adecuados para efectuar los muestreos de forma que sean más fiables los resultados de los análisis en laboratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

El seguimiento de olivos afectados por V.O. se efectuó en una parcela representativa del nuevo olivar de verdeo del término

municipal de La Rinconada, Sevilla, plantada en 1989 de cultivar Manzanillo en suelo con cultivo previo de hortalizas sensibles a Verticilosis, con riego por goteo, marco 7×6 m y cultivo intensivo, circunstancias conducentes al desarrollo de la enfermedad.

Los síntomas de la misma eran obvios en marzo de 1994, momento en que comenzaron las prospecciones, las cuales se realizaron mensualmente hasta diciembre de 1996, excepto en el mes de julio de dicho año. Cada prospección consistió en la observación de un número variable de árboles con un recorrido de unos 400 m, que abarcaba unos 120 árboles en la primera visita, y que se fue ampliando hasta observar unos 700 árboles en una superficie de unas 3 ha.

Las visitas se hicieron la tercera semana de cada mes, seleccionando los árboles avistados con síndrome de V.O., los cuales eran muestreados y marcados para su seguimiento en los meses posteriores a no ser que fueran abandonados a causa de su muerte y arranque o de otras actuaciones del agricultor destinadas a intentar en muchos de los casos la recuperación de decaimientos debidos a V.O.

En el cuadro 1 y figura 1, se reflejan el número de árboles seleccionados y muestrea-

Cuadro 1.—Número de árboles de Nueva selección y Total muestreados cada año y mes

Mes	1994		1995		1996	
	N	T	N	T	N	T
Enero	—	—	2	21	0	42
Febrero	—	—	0	21	0	42
Marzo	6	6	1	22	0	42
Abril	6	11	19	41	0	40
Mayo	8	19	1	37	0	37
Junio	3	23	6	34	0	36
Julio	1	24	2	35	—	—
Agosto	2	26	0	34	0	38
Septiembre	1	27	4	47	0	38
Octubre	0	22	1	43	0	38
Noviembre	0	19	0	43	0	38
Diciembre	0	18	0	43	0	38

(N) Número de árboles seleccionados cada mes en función de sus síntomas de V.O.

(T) Número Total de árboles muestreados y analizados en laboratorio.

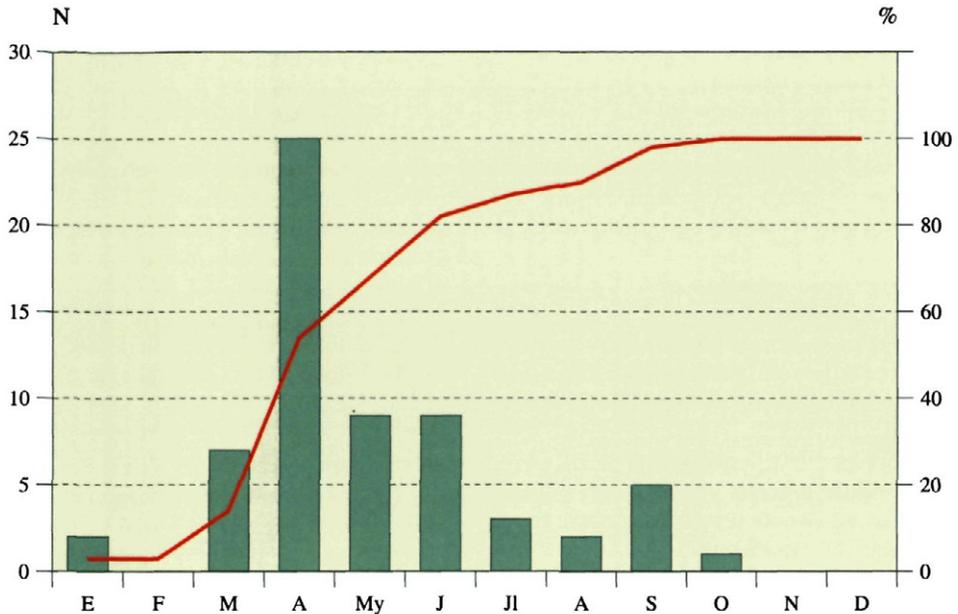


Fig. 1.—Número total de árboles seleccionados en cada mes durante el período de muestreo (N) y su porcentaje acumulado (%)

dos por primera vez en cada fecha (N) y el número total de los que se tomaron muestras para su análisis en laboratorio (T). Se seleccionaron 63 árboles entre marzo 1994 y octubre 1995, abandonándose 25 en algún momento y muestreándose un número variable cada mes, que osciló entre los 6 iniciales y los 38 finales con un máximo de 47 en la visita de septiembre 1995.

En cada caso se recogieron brotes y ramitas afectadas que fueron cortadas en 28 secciones o astillas de unos 5 mm, lavadas con agua corriente, tratadas con Hipoclorito sódico 2% durante 1 minuto y distribuidas en tres placas Petri con PDA y una con Agar-agua, que se incubaron en oscuridad a 22-23 °C y se observaron a los 4 y 7 días para determinar la presencia de *V. dahliae* Kleb., (JIMÉNEZ-DÍAZ y MONTES-AGUSTÍ, 1974).

Los árboles fueron clasificados en los tres grupos siguientes:

– «Abandonados»: Árboles seleccionados y muestreados que fueron abandonados en algún momento.

– «Recuperados»: Árboles de los cuales si se aisló *V. dahliae* Kleb fue sólo en el momento de la selección o en los meses inmediatos y que en cierto aspecto se podrían considerar como «Recuperados», al menos durante el resto del período de seguimiento.

– «Cíclicos»: Árboles en los cuales se aisló *V. dahliae* Kleb en el momento de la selección y en las siguientes campañas, y que consideramos como «Cíclicos», durante el período de seguimiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección de árboles sintomáticos

El número de árboles seleccionados por la presencia de síntomas (N), fue máximo en los meses de marzo a junio de cada año

(cuadro 1), en que se eligieron un total de 50 árboles (79%). A partir de octubre y durante los meses de invierno dichas selecciones fueron escasas o nulas.

En la figura 1 se exponen el total de árboles de nueva elección en cada mes para los tres años que duró el muestreo, quedando de manifiesto la rápida acumulación de los mismos durante la primavera-principios de verano.

Este ciclo en la selección es reflejo de la aparición de síntomas en campo y coincide con las fechas de desarrollo del síndrome de «Decaimiento lento» (JIMÉNEZ-DÍAZ *et al.*, 1984) aunque también se vieron ramas con el síntoma de corteza morada, propio de «apoplejía», y a ella seguramente se debieron parte de las muertes y talas severas que nos obligaron a abandonar 25 árboles durante el período de seguimiento.

Análisis de los árboles muestreados

El cuadro 2 muestra los resultados de los análisis realizados a los árboles seleccionados por primera vez en cada fecha y el por-

centaje de aislamientos positivos realizados. Vemos una alta frecuencia (78%) de aislamientos del hongo al analizar árboles muestreados en el primer mes de su selección, porcentaje que se mantiene en las dos campañas (85% y 72%) y que se eleva al 92% cuando consideramos solo el período comprendido entre los meses de marzo a junio, mientras que entre julio y noviembre solo en 1 de los 11 árboles de nueva selección (9%) se aisló el patógeno.

Cuando se estudian los resultados del total de los análisis realizados cada mes (cuadro 3 y fig. 2) se ve una disminución en el porcentaje de análisis positivos que pasan del 33% en 1994 al 7% en 1996, debido a la mayor repercusión de los árboles «Recuperados», a la no elección de nuevos árboles con síntomas en desarrollo y a una mayor «Resistencia» asociada a la edad (BLANCO *et al.*, 1990), pero conservándose siempre la máxima frecuencia de aislamiento entre los meses de marzo a junio en que hay 132 de los 172 análisis que dieron resultado positivo a lo largo de toda la prospección (77%).

Del cuadro 3 se deduce que en todos los años hubo algún mes en que no se aisló el

Cuadro 2.—Resultado de los análisis de árboles de nueva selección en cada año y mes

Mes	1994		1995		Total	
	+/N	(%)	+/N	(%)	+/N	(%)
Enero	—	(—)	2/2	(100)	2/2	(100)
Febrero	—	(—)	0/0	(—)	0/0	(—)
Marzo	6/6	(100)	1/1	(100)	7/7	(100)
Abril	6/6	(100)	18/19	(95)	24/25	(96)
Mayo	7/8	(88)	1/1	(100)	8/9	(89)
Junio	3/3	(100)	4/6	(67)	7/9	(78)
Julio	1/1	(100)	0/2	(0)	1/3	(33)
Agosto	0/2	(0)	0/0	(—)	0/2	(0)
Septiembre	0/1	(0)	0/4	(0)	0/5	(0)
Octubre	0/0	(—)	0/1	(0)	0/1	(0)
Noviembre	0/0	(—)	0/0	(—)	0/0	(—)
Diciembre	0/0	(—)	0/0	(—)	0/0	(—)
Total	23/27	(85)	26/36	(72)	49/63	(78)

(+) Número de Aislamientos positivos en los árboles de Nueva selección muestreados y analizados en cada mes y año.
(N) Número de árboles de Nueva selección muestreados y analizados en cada mes y año

Cuadro 3.-Resultado de los análisis del número total de árboles muestreados en cada año y mes

Mes	1994		1995		1996		Total	
	+/NT	(%)	+/NT	(%)	+/NT	(%)	+/NT	(%)
Enero	-	(-)	5/21	(24)	0/42	(0)	5/63	(8)
Febrero	-	(-)	7/21	(33)	4/42	(10)	11/63	(17)
Marzo	6/6	(100)	3/22	(14)	3/42	(7)	12/70	(17)
Abril	11/11	(100)	25/41	(61)	5/40	(12)	41/92	(45)
Mayo	16/19	(84)	16/37	(43)	5/37	(13)	37/93	(40)
Junio	20/23	(87)	18/34	(53)	4/36	(11)	42/93	(45)
Julio	2/24	(8)	0/35	(0)	-	(-)	2/59	(3)
Agosto	0/26	(0)	1/34	(3)	2/38	(5)	3/98	(3)
Septiembre	6/27	(22)	0/47	(0)	3/38	(8)	9/112	(8)
Octubre	0/22	(0)	0/43	(0)	4/38	(10)	4/103	(4)
Noviembre	0/19	(0)	1/43	(2)	0/38	(0)	1/100	(1)
Diciembre	3/18	(17)	0/43	(0)	2/38	(5)	5/99	(5)
Total	64/195	(33)	76/421	(18)	32/429	(7)	172/1045	(16)

(+) Número de Aislamientos positivos en el Total de árboles muestreados y analizados en cada mes.
 (NT) Número Total de árboles muestreados y analizados en cada mes.

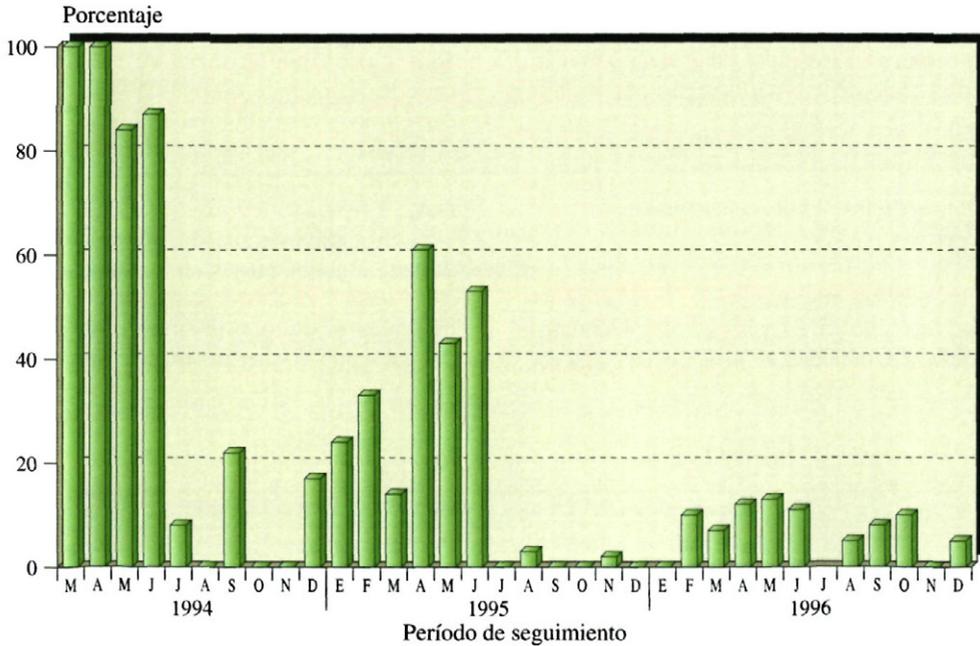


Fig. 2.-Porcentaje de árboles con aislamiento positivo respecto a los árboles analizados en cada mes.

patógeno (agosto, octubre y noviembre de 1994; julio, septiembre, octubre y diciembre de 1995; enero y noviembre de 1996), pero al totalizar por meses, en todos ellos hubo análisis positivo en algún caso, obteniendo el mínimo en el mes de noviembre (1%) y el máximo en los meses de abril y junio (45%). Al igual que otros autores (THASSANOPOULUS *et al.*, 1979; CIRULLI, 1981; RAGAZZI *et al.*, 1987), en nuestras condiciones hemos conseguido aislar el hongo, al menos de un árbol, durante todos los meses del año, aunque con distinta frecuencia.

RAGAZZI *et al.*, (1987), en el N. de Italia encontró que la probabilidad de aislamiento del patógeno disminuía progresivamente de verano a invierno, mientras que WILHELM y TAYLOR (1965) trabajando con la variedad manzanillo en California, aíslan el hongo de forma poco frecuente en julio y agosto, nula en septiembre y muy frecuente al final de invierno y primavera.

En Sevilla, con la misma variedad manzanillo hemos observado un ciclo de aislamiento del patógeno con un máximo en los meses de marzo a junio y mínimo en invierno, pero con mayor frecuencia en septiembre respecto a los meses del verano con lo cual el ciclo difiere del descrito por los autores citados.

Análisis de los árboles clasificados en grupos

Los árboles muestreados se dividieron en tres grupos de 25, 21 y 17 árboles «Abandonados», «Recuperados» y «Cíclicos» (fig. 3).

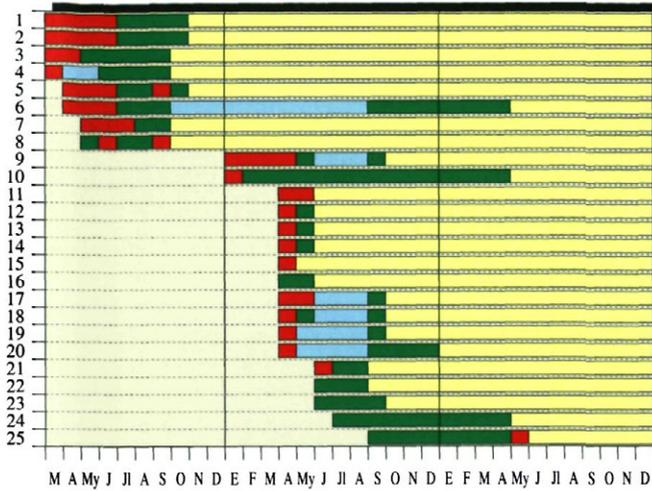
Al estudiar los resultados de los análisis de cada grupo de árboles, fig. 3, vemos que en el momento de seleccionar un árbol por síntomas obvios de V.O. fue muy fácil el aislamiento del patógeno, lo cual se consiguió en 19/25 casos (76%) en el grupo de árboles «Abandonados», 16/21 (76%) en el grupo de árboles «Recuperados» y 14/17 (82%) en el grupo de árboles «Cíclicos». Además, en los árboles «Recuperados», los aislamientos positivos se concentraron más en los meses de marzo a junio (20:1) que en los otros dos grupos (cuadro 4), lo cual ratifica la importancia del momento del muestreo, dado que en este tipo de árboles puede que no se produzca la aparición de nuevos síntomas.

VIGOUROUX (1975) aisló fácilmente el hongo (90%) de las partes vivas del árbol por debajo de la zona seca, pero después de algunos meses el aislamiento le resultó difícil e imposible al cabo de un año, atribuyéndolo a la inactividad del hongo en el xilema del árbol. Al igual que VIGOUROUX (1975) hemos obtenido una frecuencia de aislamientos máxima cuando las tomas se efectuaban en el momento en que los síntomas aparecieron por primera vez («síntomas frescos») pudiendo después disminuir o hacerse imposible debido al ciclo estacional o al proceso de «recuperación» (WILHELM y TAYLOR, 1965; BLANCO-LÓPEZ y JIMÉNEZ-DÍAZ, 1995).

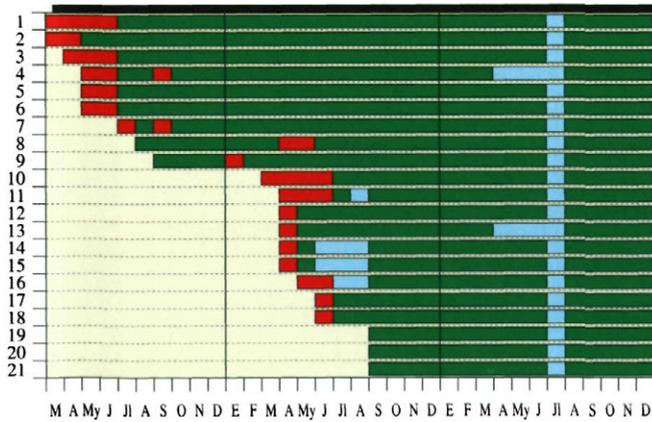
La dificultad de aislamiento del patógeno durante algunos meses en Andalucía podría estar influenciada por las condiciones ambientales desfavorables para el desarrollo del patógeno, lo que justificaría la recupera-

Cuadro 4.—Resultado de los análisis de los grupos de árboles según épocas del año

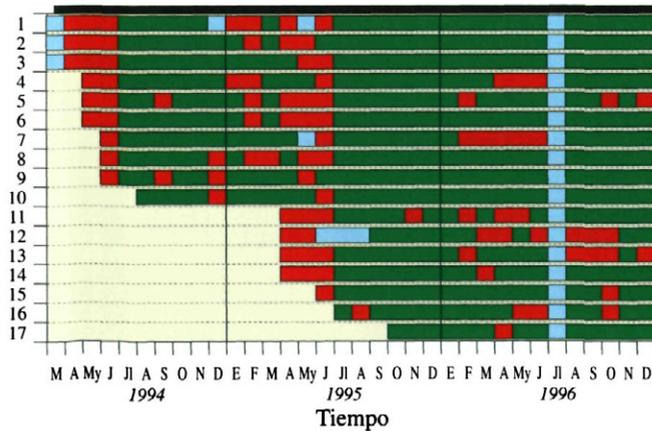
	N.º Aislamientos +/N.º árboles analizados y su Porcentaje (%)		
	Marzo a Junio	Resto del año	Relación
“Abandonados”	35/60 (58%)	6/74 (8%)	7:1
“Recuperados”	30/152 (20%)	4/329 (1%)	20:1
“Cíclicos”	65/136 (48%)	29/294 (10%)	5:1
Total	130/348 (37%)	39/697 (6%)	6:1



“Árboles abandonados”



“Árboles recuperados”



“Árboles cíclicos”

- Aislamiento positivo de *V. dahliae*
- Aislamiento negativo de *V. dahliae*
- Árbol abandonado
- Árbol sin analizar en esa fecha

Fig. 3.-Resultados de los análisis de cada árbol clasificados en grupos.

ción de la planta explicada por distintos autores debido a la compartimentalización o muerte del patógeno por la formación del nuevo xilema (BLANCO-LÓPEZ y JIMÉNEZ-DÍAZ, 1995).

CONCLUSIONES

Las prospecciones de Verticilosis del olivo (V.O) efectuadas durante tres años en un olivar de verdeo, var. Manzanillo, en cultivo intensivo en la provincia de Sevilla, en los que durante las dos primeras campañas se seleccionaron árboles que presentaban síntomas en desarrollo, nos permiten deducir las siguientes conclusiones:

- La aparición máxima de síntomas coincidió con los meses de marzo a junio, de primavera y principio de verano, que se corresponden con fechas de desarrollo del síndrome denominado «Decaimiento lento» por diversos autores, aunque en la parcela muestreada también se observaron síntomas correspondientes al síndrome de «Apoplejía» teniendo que abandonar una tercera parte de los árboles seleccionados.

- Cuando se analizaban los árboles muestreados por primera vez en laboratorio el aislamiento del patógeno fue mucho más fácil que en los muestreos efectuados en los meses siguientes. La presencia de «síntomas

frescos» facilita el diagnóstico en laboratorio de la enfermedad.

- Se ha obtenido un ciclo anual en la frecuencia del aislamiento del V.O. con un máximo en los meses de marzo a junio, con un valor intermedio en el mes de septiembre y valores mínimos en los de verano e invierno, lo cual no coincide con lo descrito por otros autores. De ello se deduce que los meses de primavera y principio de verano son los más adecuados para efectuar los análisis para el diagnóstico de la Verticilosis del olivo en nuestras condiciones.

- Los árboles en seguimiento fueron divididos en tres grupos que denominamos «Abandonados», «Cíclicos» y «Recuperados», concentrándose en todos ellos los aislamientos positivos en los meses de primavera, pero esta concentración fue máxima en los árboles «Recuperados», lo cual ratifica la importancia de elegir bien la época de muestreo para el diagnóstico de V.O en nuestras condiciones.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los Srs. Nieto y Guillén las facilidades dadas para la realización de los trabajos en la Hacienda Guzmán. A Pedro Torrent por su asistencia técnica en informática y a Carmen Contreras por su ayuda en laboratorio y campo.

ABSTRACT

MONTES, F.; PÁEZ, J. I.; VEGA, J. M.* & DUHART, M. E., 1997: Isolation time of *Verticillium dahliae* Kleb from olive trees in Sevilla (Spain). *Bol. San. Veg. Plagas*, **23**(3): 439-447.

Symptoms produced by *Verticillium* wilt on olive trees and readiness the pathogen can be isolated from diseased trees makes a seasonal cycle on which diagnostic depends on. A plot in the Sevilla province was sampled monthly between March 1994 to December 1996, to determine the most adequate time that samples from diseased trees must be analysed. The greatest fresh field symptoms development and positive fungus isolations in laboratory analysis were from March to June and the smallest one during summer and winter months with a slight increase during September. The easiest fungus isolation was when first symptoms development were obvious. The following springs, isolation depends on whether the tree is recovered from *Verticillium* wilt or not.

Key words: *Verticillium dahliae*, olive tree, isolation moment, diagnostic, time, *Olea europea*.

REFERENCIAS

- BLANCO-LÓPEZ, M. A.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. y CABALLERO, J. M., 1984: Symptomatology, incidence and distribution of *Verticillium* wilt of Olive trees in Andalusia. *Phytopath. Medit.*, **23**: 1-8.
- BLANCO-LÓPEZ, M. A.; RODRÍGUEZ-JURADO, D. y JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M., 1990: Incidence and seasonal variation of *Verticillium* wilt in olive orchards. Proc. 5th International *Verticillium* symposium, Leningrad, USSR: 5.
- BLANCO-LÓPEZ, M. A. y JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M., 1995: Una propuesta de lucha integrada contra la Verticilosis del olivo. *Fruticultura Profesional*, **70**: 52-59.
- CIRULLI, M., 1981: Attuali coagnizion sulla Verticilliosi dell'olivo. *Informatore Fitopatol.*, **1-2**: 101-105.
- JIMÉNEZ-DÍAZ, R. y MONTES-AGUSTI, F., 1974: Notas sobre *Verticillium dahliae* Kleb, causante de marchitez en diversos huéspedes. An INIA Ser. Prot. veg. **4**: 11-18.
- JIMÉNEZ-DÍAZ, R.; BLANCO-LÓPEZ, M. A. y CABALLERO, J. M., 1984: La verticilosis del olivo en Andalucía. Agente, Sintomatología y Distribución. Junta de Andalucía. Cons. Agr. y Pesca. Comunicaciones Agrarias. Ser.: *Prot. Veg.*, **1**: 32.
- RAGAZZI, A.; PARRINI, C.; MESTURINO, L. y DELLAVALLE FEDI, I., 1987: Epidemiologia di *Verticillium dahliae* Kleb su olivo. 1.º contributo. *Rivista di Patologia Vegetale*, **S IV**, **23**: 132-139.
- THANASSOULOPOULOS, C. C.; BIRIS, D. A. y TJAMOS, E. C., 1979: Survey of *Verticillium* wilt of olive trees in Greece. *Plant Disease Reporter*, **63**: 936-940.
- VIGOUROUX, A., 1975: *Verticillium dahliae*, agent d'un deperissement de l'olivier en France. *Ann. Phytopathol.*, **7**(1): 37-44.
- WILHELM, S. y TAYLOR, J. B., 1965: Control of *Verticillium* wilt of olive through natural recovery and resistance. *Phytopathology*, **55**: 310-316.
- ZACHOS, D. G., 1963: La Verticilliose de l'olivier en Grèce. *Ann. Inst. Phytopath. Benaki, N. S.*, **5**: 105-107.

(Aceptado para su publicación: 30 de junio de 1997)