

## Comparación de métodos de diagnóstico de *Verticillium dahliae* en olivo: aislamiento en medio de cultivo y PCR

B. MORERA, J. I. PÁEZ, J. M<sup>a</sup>. VEGA, F. MONTES

El aislamiento de *Verticillium dahliae* en medio de cultivo está muy asociado a la presencia de síntomas, siendo la primavera y principios de verano la mejor época para su aislamiento. Plantas de olivo asintomáticas pueden estar infectadas por el patógeno y por ello es necesario el desarrollo de métodos de diagnóstico adecuados para su detección en las mismas.

El objetivo de este trabajo era poner a punto un método para la detección de *V. dahliae* que pudiera ser utilizado en el Plan experimental de certificación de plantas de olivo en Andalucía. En los últimos años se han descrito algunas parejas de iniciadores de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) utilizados para el diagnóstico o la caracterización de las distintas especies de *Verticillium*. El método seleccionado consiste en una "nested-PCR" que amplifica una región de 140 pb de ADN mitocondrial solo en el caso de *V. dahliae*. Para comprobar la eficacia de este método se comparó con el de aislamiento en medio de cultivo y se observó su comportamiento en las distintas estaciones del año en muestras de olivos infectados naturalmente, con y sin síntomas.

Se usó el método con ADN extraído de cultivos monospóricos y de material vegetal de varias plantas con síntomas de verticilosis, obteniéndose en todos los casos el fragmento de ADN esperado. Para comparar los dos métodos se analizaron 560 muestras de las cuales 441 eran asintomáticas, 74 tenían síntomas frescos y 45 síntomas antiguos y estaban muy secas. El método de PCR resultó claramente más eficaz en la detección del patógeno en muestras asintomáticas y en muestras sintomáticas muertas. En las muestras sintomáticas vivas la frecuencia de detección por PCR fue también mejor que por aislamiento en medio de cultivo.

El número de positivos obtenidos por PCR, aunque era mayor que por cultivo, también sufría un descenso en los meses de invierno y verano, siendo por tanto la primavera y el otoño las fechas más adecuadas para la detección de este patógeno.

El método de PCR resultó ser más sensible que el de aislamiento en medio de cultivo por lo que se propone su uso en el Plan experimental para la obtención y control de variedades certificadas de plantas de vivero de olivo en Andalucía.

B. MORERA: Servicio de Producción Agrícola. Laboratorio de Sanidad Vegetal. Apdo. 121 41089 Montequinto (Sevilla)

J.I. PÁEZ, J.M<sup>a</sup>. VEGA, F. MONTES: Servicio de Sanidad Vegetal. Laboratorio de Sanidad Vegetal. Apdo. 121 41089 Montequinto (Sevilla).

E-mail: patologia.lvsve.cap@juntadeandalucia.es

**Palabras clave:** *Verticillium dahliae*, PCR, diagnóstico, olivo, certificación

### INTRODUCCIÓN

La verticilosis, causada por *V. dahliae*, es una de las enfermedades más importantes del olivo ya que puede causar pérdidas severas en la producción y en algunos casos la

muerte del árbol. Las principales medidas de control para evitar la dispersión de la enfermedad a nuevas zonas son el uso de material de propagación sano y el establecimiento de nuevas plantaciones en suelos libres del patógeno.

El uso de material de plantación sano requiere la detección temprana de plantas infectadas. El diagnóstico de hongos de infección vascular en huéspedes leñosos por aislamiento en medio de cultivo en ciertas épocas del año se vuelve muy complicado, si no imposible. MONTES *et al.* (1997) determinaron que la aparición máxima de síntomas se produce en los meses de marzo a junio y que la presencia de síntomas frescos o recientes facilitaba el diagnóstico de la enfermedad por aislamiento de *Verticillium dahliae* en medio de cultivo. La necesidad de la existencia de síntomas limita el aislamiento a unos meses del año. Por este motivo sería de gran interés poder detectar *V. dahliae* con técnicas más sensibles que no requieran la presencia de síntomas.

En los últimos años se han usado varias técnicas moleculares para el diagnóstico y la caracterización de muchos hongos. Particularmente en el caso del género *Verticillium* se han clonado y secuenciado fragmentos de su genoma que han facilitado el diseño de iniciadores para la detección e identificación de las distintas especies por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).

El ADN mitocondrial de este género se conserva en muchas regiones, pero aún así proporciona el mejor criterio para la caracterización genética de sus especies (TYPAS, 2000). LI *et al.* (1994) describen un método de “nested-PCR” que utiliza iniciadores diseñados a partir de ADN mitocondrial para la detección específica de *V. dahliae*. Otros investigadores utilizan iniciadores de PCR diseñados a partir de ARN ribosómico (NAZAR *et al.*, 1991, MOUKHAMEDOV, 1994, ROBB *et al.*, 1993 y VOLOSSIUK *et al.*, 1995) lo que les permite distinguir a *V. dahliae* de *V. albo-atrum* y otros *Verticillium*. También se ha podido distinguir entre los patotipos de *V. dahliae*, defoliante y no defoliante, a partir de plantas de olivo infectadas artificial y naturalmente en una “duplex-nested-PCR” (MERCADO-BLANCO *et al.*, 2001, 2002, 2003).

El objetivo de este trabajo era poner a punto un método para la detección de *V. dahliae* que pudiera ser utilizado en el “Plan

experimental para la obtención y control de variedades certificadas de plantas de vivero de olivos” en la Comunidad Autónoma de Andalucía. Dado que el Reglamento técnico de control y certificación (R.D. 1678/1999) en el caso del olivo requiere la detección de *V. dahliae*, independientemente de su patotipo, nos decantamos por estudiar la eficacia del método de “nested-PCR” de LI *et al.* (1994). Para ello nos planteamos compararlo con el método tradicional de aislamiento en medio de cultivo en muestras de olivos, infectados naturalmente, con y sin síntomas y ver su comportamiento en las distintas estaciones del año.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diagnóstico mediante aislamiento de *V. dahliae* en medio de cultivo.

Para el aislamiento del hongo, se cortaron rodajas de ramas de olivo que se lavaron con agua corriente, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2% durante 1 minuto y se dejaron secar en una cabina de flujo laminar. Una vez secas, se sembraron en PDA y Agar-agar, se incubaron a 23°C en oscuridad y se observaron a partir del cuarto día al microscopio óptico. De estos aislamientos se prepararon cultivos monospóricos que se usaron en las pruebas posteriores. Los cultivos se mantuvieron en PDA a la temperatura descrita.

Los aislamientos se conservaron tanto en forma de microesclerocios en talco (MWANZA, 2002), como en cultivos en PDA conservados a -20°C en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de Sevilla.

### Diagnóstico mediante “nested-PCR”

#### Extracción del ADN de micelio del hongo y de tejido vegetal

Para obtener el ADN del hongo se trituraron 40 mg de micelio de *V. dahliae* y se extrajo el ADN con el método comercial EZNA Plant Mini-Prep kit (Omega-Biotech, Doraville, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para obtener el ADN del vegetal se cortaron trozos de ramas de olivo con o sin sínto-

mas de verticilosis de aproximadamente 1 cm de diámetro en rodajas de 1 a 2 mm de grosor y se trituraron en mortero en bolsas individuales. De este material se usaron 40 mg para la extracción por el mismo método utilizado para el micelio.

#### Doble reacción en cadena de la polimerasa (nested-PCR)

Se utilizaron los iniciadores y los programas de PCR descritos por LI *et al.* (1994) con algunas modificaciones. Se realizó una primera reacción de amplificación con la pareja de iniciadores externos NMS1/NMS2 seguida de una segunda amplificación en la que se utilizó como ADN molde 2.5  $\mu$ l de la primera amplificación y los iniciadores internos VMSP1/VMSP2. Según los autores, en la primera reacción se amplifica un fragmento de un gen de ADNr mitocondrial (600-700 pb) que permite la detección de ascomycetos, *Fusarium* y *Verticillium*, pero no la diferenciación entre ellos. En la segunda reacción se amplifica una región de 140 pb en el caso de que se trate de *V. dahliae* y no se amplifica si se trata de otro hongo, incluyendo a otras especies del género *Verticillium* (*V. albo-atrum*, *V. tricorpus*, *V. fungicola* y *V. lateritium*). Todas las amplificaciones se realizaron mediante reacciones individuales con "Ready to go PCR Beads" (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, U. K.)

en un termociclador Techne DNA (modelo Progene; Cambridge, U. K.) en un volumen de 25  $\mu$ l. La concentración de los iniciadores en la reacción fue de 0.8  $\mu$ M. El programa de la amplificación externa consistió en 5 min a 94°C de desnaturalización inicial seguidos de 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C y 1 min a 72°C con una extensión final a 72°C durante 10 min. El programa de la amplificación interna consistió en 5 min a 94°C seguidos de 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C y 2 min a 72°C con una extensión final a 72°C durante 10 min. En cada experimento se utilizaron los pertinentes testigos positivos y negativos.

Después de la amplificación los fragmentos de ADN se separaron por tamaños mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio y se visualizaron con radiación UV.

#### **Comparación de la eficacia de los métodos de diagnóstico**

Para comparar el método de detección de *V. dahliae* por PCR y el de aislamiento en medio de cultivo se analizaron 560 muestras (Cuadro 1), de las cuales 140 muestras provenían de 20 olivos de un ensayo de seguimiento de verticilosis en campo. El seguimiento se efectuó en una parcela del término municipal de Dos Hermanas (Sevilla), plan-

Cuadro 1. Detección de *V. dahliae* por aislamiento en medio de cultivo y por PCR en muestras de olivo. Número y porcentaje de análisis con resultado positivo en muestras con diferente sintomatología.

Síntomas	Origen muestras	Muestras analizadas	Positivos	Positivos			
				Cultivo		PCR	
				Nº	(%)	Nº	(%)
Asintomáticas	Certificación <sup>1</sup>	381	59	3	(5)	59	(100)
	Ensayo <sup>2</sup>	60	15	6	(40)	12	(80)
<b>Total asintomáticas</b>		<b>441</b>	<b>74</b>	<b>9</b>	<b>(12)</b>	<b>71</b>	<b>(96)</b>
Sintomáticas vivas	Consulta <sup>3</sup>	39	22	16	(73)	21	(95)
	Ensayo <sup>2</sup>	35	33	31	(94)	32	(97)
<b>Total sintomáticas vivas</b>		<b>74</b>	<b>55</b>	<b>47</b>	<b>(85)</b>	<b>53</b>	<b>(96)</b>
Sintomáticas Muertas	Ensayo <sup>2</sup>	45	37	7	(19)	37	(100)
<b>Total</b>		<b>560</b>	<b>166</b>	<b>63</b>	<b>(38)</b>	<b>161</b>	<b>(97)</b>

<sup>1</sup> Muestras procedentes del Plan experimental de certificación de plantas de olivo en Andalucía. <sup>2</sup> Muestras procedentes del ensayo de seguimiento de verticilosis en campo. <sup>3</sup> Muestras de consulta recibidas en el laboratorio.

tada en el año 2000 con olivos de la variedad 'Hojiblanca' en un suelo con historia de cultivo previo de algodón, en el que se habían observado síntomas de verticilosis, con riego por goteo y marco 7 x 5. En una superficie de 1.5 has se seleccionaron 10 parejas de olivos situados uno al lado del otro, siendo uno asintomático y el otro sintomático. Entre marzo y septiembre de 2003 se tomaron muestras mensuales.

Otras 381 muestras provenían de olivos de viveros de distintas localidades andaluzas y de la colección del Banco Mundial de Germoplasma de Olivo del CIFA de Córdoba. Se tomaron desde septiembre de 2002 hasta abril de 2003 en árboles candidatos a producir material inicial para certificación. Las 39 muestras restantes eran muestras de consulta recibidas en el laboratorio, procedentes de árboles con síntomas y/o sospechosos de estar atacados por la verticilosis.

Estas 560 muestras se agruparon en muestras asintomáticas, sintomáticas vivas y sintomáticas muertas. Se hizo esta distinción dentro de las sintomáticas dado que el diagnóstico de *Verticillium dahliae* en muestras de olivo que se encuentran demasiado secas suele ser complicado. Se consideraron 441 muestras asintomáticas entre las que se encontraban las 381 de certificación y 60 del ensayo de campo. Las muestras sintomáticas vivas se correspondían a las 39 muestras de consulta y 35 muestras del ensayo de campo. Muchas de las muestras tomadas en el ensayo de campo estaban completamente secas; el número total de estas muestras fue de 45.

#### **Muestras analizadas por estaciones**

Se hizo un seguimiento a lo largo del año para determinar si los resultados por PCR eran independientes de la estación en que se hace la toma de la muestra.

Se contabilizaron los resultados obtenidos de las muestras recibidas del Banco Mundial de Germoplasma desde septiembre de 2002 hasta julio de 2003 y los del ensayo de seguimiento en campo desde marzo hasta septiembre de 2003. Se analizaron un total de 690 muestras.

## **RESULTADOS**

### **Detección de *V. dahliae* por PCR a partir de material vegetal**

En experimentos previos se determinó que el método de Li *et al.* (1994) era el más apropiado para nuestro objetivo ya que era más sensible que los otros métodos (NAZAR *et al.*, 1991, MERCADO-BLANCO *et al.*, 2001, 2002) cuando se utilizaba material vegetal.

Se utilizaron los iniciadores de PCR descritos por Li *et al.* (1994) con ADN extraído de cultivos monospóricos de *V. dahliae* aislado de 12 muestras de olivo y se obtuvieron los fragmentos de ADN esperados. De la primera amplificación se obtenía un fragmento de unos 600 pb y de la segunda un fragmento de 140 pb (Figura 1).

Cuando se utilizó material vegetal con síntomas de verticilosis también se obtuvo el fragmento de ADN esperado. Se detectó en las mismas muestras de olivo de las que previamente se había aislado el hongo en medio de cultivo.

### **Comparación de la eficacia de los métodos de aislamiento en medio de cultivo y PCR en muestras de olivo**

Para comparar la eficacia de ambos métodos se analizaron un total de 560 muestras agrupadas según sus síntomas. Los resultados obtenidos por los dos métodos se resumen en el Cuadro 1.

**Muestras asintomáticas:** de las 381 muestras asintomáticas procedentes del Plan experimental de certificación se obtuvieron 59 positivos. En la figura 3 se presenta un ejemplo de los resultados positivos y negativos obtenidos en este tipo de muestras. De los 59 positivos 3 se habían obtenido por los dos métodos, 56 solo por PCR y en ningún caso se obtuvieron positivos por cultivo que fueran negativos por PCR. De las 60 muestras asintomáticas analizadas en el ensayo de seguimiento de la verticilosis en campo 15 dieron resultado positivo. De estas muestras 3 dieron por los dos métodos, 9 solo por PCR y 3 solo por cultivo (Cuadro 1).

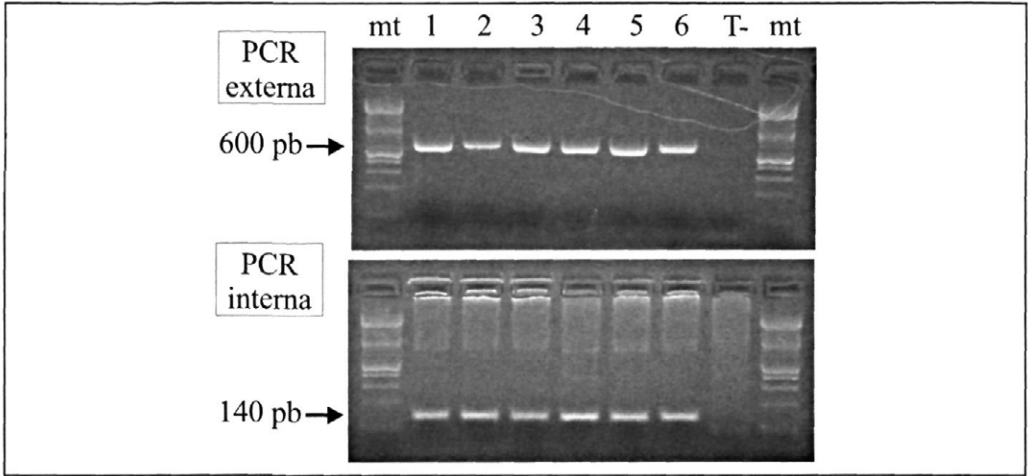


Figura 1. Fragmentos de ADN obtenidos en las dos amplificaciones de la “nested-PCR” a partir de ADN de micelio de *V. dahliae* aislado de varias muestras de olivo (carriles 1-6). mt: marcador de tamaño. T-: testigo negativo sin ADN.

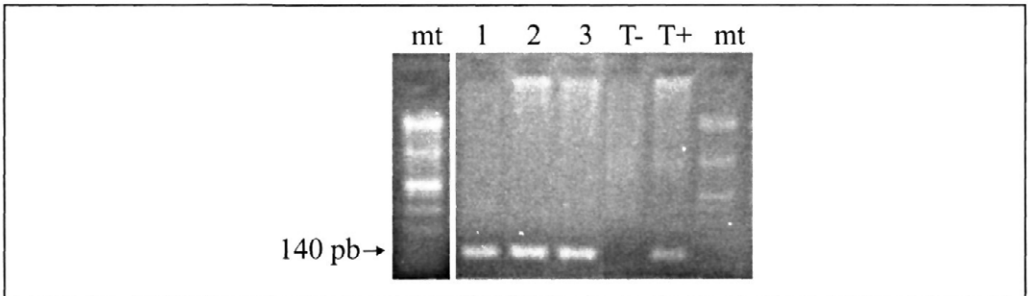


Figura 2. Detección de *V. dahliae* en plantas con síntomas de la enfermedad. Fragmentos de ADN obtenidos tras la segunda amplificación de la “nested-PCR” a partir de ADN extraído de tres muestras de ramas de olivo (carriles 1-3). mt: marcador de tamaño, T-: testigo negativo sin ADN, T+: testigo positivo con ADN de *V. dahliae* extraído de un cultivo monospórico.

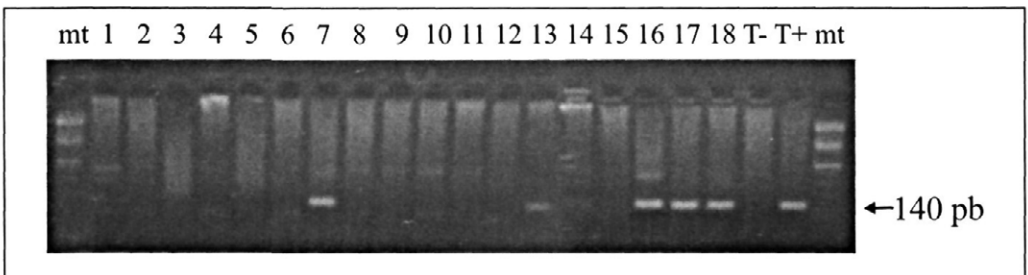


Figura 3. Detección de *V. dahliae* en muestras de olivos sin síntomas del Plan experimental de certificación de plantas de olivo en Andalucía. Fragmentos de ADN obtenidos tras la segunda amplificación de la “nested-PCR” a partir de ADN extraído de 18 muestras de olivo (1-18), mt: marcador de tamaño, T-: testigo negativo sin ADN, T+: testigo positivo con ADN de *V. dahliae* extraído de un cultivo monospórico.

**Muestras sintomáticas verdes:** de un total de 39 muestras sintomáticas verdes recibidas en el laboratorio para consulta, 22 resultaron ser positivas en la detección de *V. dahliae*. De estas 22 muestras 15 dieron positivo tanto por cultivo como por PCR, 6 dieron positivo por PCR y negativo por cultivo y 1 dio positivo por cultivo y negativo por PCR. De las 35 muestras sintomáticas verdes del ensayo de campo, 33 fueron positivas. Se detectó el patógeno en 30 muestras por los dos métodos, en 2 solo por PCR y en 1 solo por cultivo (Cuadro 1). Es interesante destacar que en los casos de árboles que desarrollaron la enfermedad durante el ensayo de seguimiento de la verticilosis en campo se continuó detectando el patógeno tras la aparición de síntomas: en medio de cultivo se aisló el patógeno durante los tres meses siguientes, mientras que por PCR se siguieron obteniendo resultados positivos hasta la finalización del ensayo (seis meses).

**Muestras sintomáticas secas:** en el ensayo de campo se observaron síntomas frescos

hasta el mes de mayo incluido, a partir de ese momento las muestras se tomaron de ramas secas por la falta de síntomas frescos. El patógeno se detectó por PCR en el 100% de las muestras secas y solo en el 19% por aislamiento en medio de cultivo (Cuadro 1). Es notable que por PCR se detectaba en ramas que llevaban secas hasta 5 meses mientras que por aislamiento en cultivo nunca se detectó en ramas que llevaran secas más de un mes.

#### Análisis estacional

Para determinar si los resultados obtenidos por PCR eran independientes de la estación se consideraron las muestras del ensayo de seguimiento de la verticilosis en campo desde marzo hasta septiembre de 2003. El número de muestras positivas obtenidas por PCR era mayor que el obtenido por aislamiento en medio de cultivo en todos los meses, excepto en el primero que fue igual. En los resultados de PCR se observó un máximo en los meses de abril a julio, seguido de un descenso en los meses de verano (Figura 4).

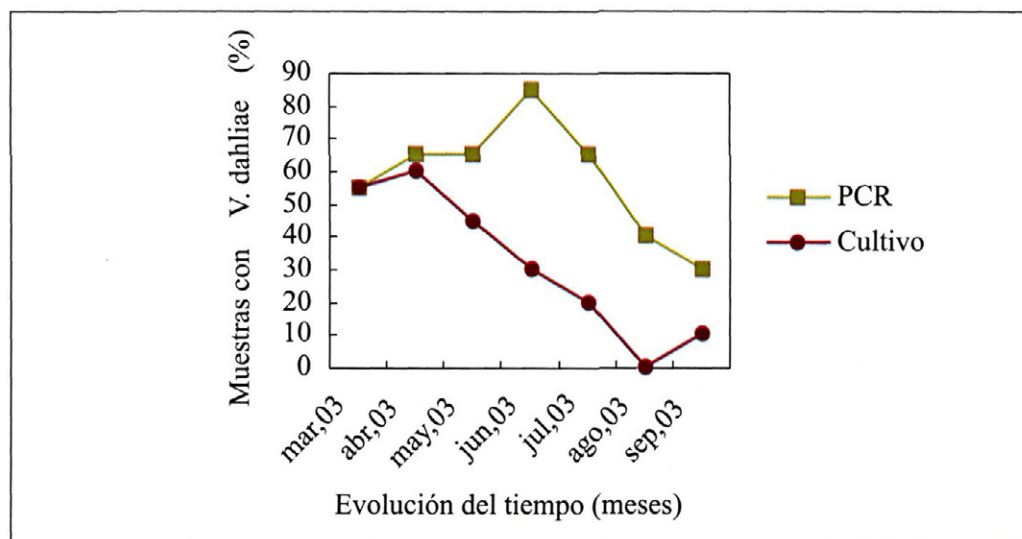


Figura 4. Detección de *V. dahliae* en árboles con y sin síntomas por aislamiento del patógeno en medio de cultivo y por PCR. Se representa el porcentaje de muestras del ensayo de seguimiento en campo que dieron resultado positivo en cada método desde marzo hasta septiembre de 2003. Se analizaron 20 muestras al mes.

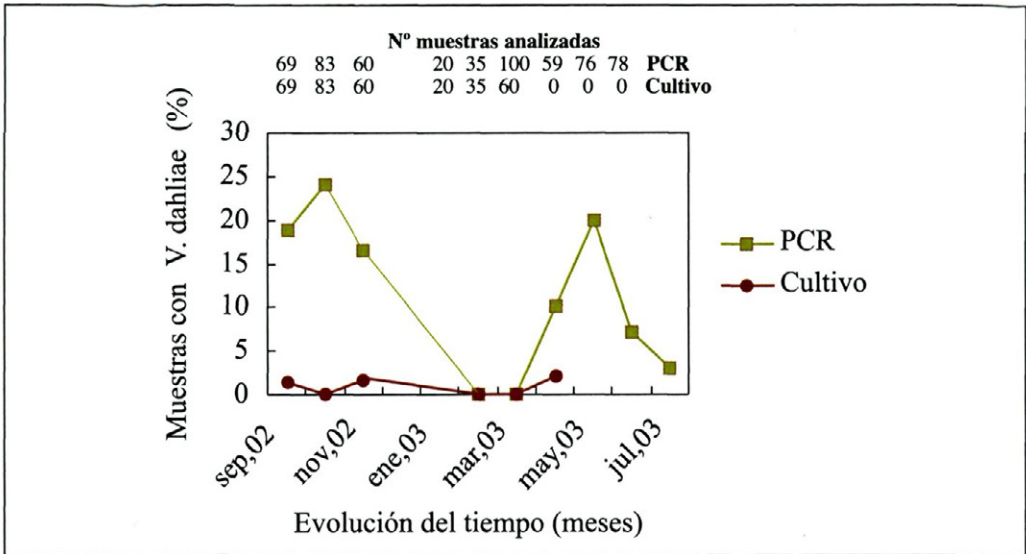


Figura 5. Detección de *V. dahliae* en árboles sin síntomas por aislamiento del patógeno en medio de cultivo y por PCR. Se representa el porcentaje de muestras del Plan experimental de certificación que dieron resultado positivo en cada método desde septiembre de 2002 hasta julio de 2003 y el número de muestras analizadas cada mes.

Por otro lado se contabilizaron los resultados obtenidos de las muestras recibidas del Banco Mundial de Germoplasma de Córdoba desde septiembre de 2002 hasta julio de 2003. En este caso también se observó un efecto de las estaciones sobre los resultados de PCR, obteniéndose un máximo de casos positivos en los meses de otoño y primavera y un mínimo en invierno y verano (Figura 5).

**DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

Se han empleado técnicas moleculares para detectar *Verticillium albo-atrum* en alfalfa (NAZAR *et al.*, 1991) y tomate (ROBB *et al.*, 1993) y *V. tricorpus* en patata (MOUKHAMEDOV *et al.*, 1994). También en patata se ha detectado *V. dahliae* por PCR (HEINZ y PLATT, 2000). En todos estos casos se trata de plantas herbáceas. La detección de patógenos por PCR en plantas leñosas como el olivo suele dar problemas dado los altos niveles en compuestos fenólicos y otros inhibidores que presentan estas plantas (BERTOLINI *et al.*, 1998). En olivo se han utilizado

los iniciadores de PCR que distinguen los patotipos defoliante y no defoliante (MERCADO-BLANCO 2001, 2002, 2003). El método descrito por LI *et al.* (1994) solo se ha usado con ADN extraído de cultivos puros de *V. dahliae* aislado de numerosas especies vegetales. Los resultados de este trabajo indican que este método es válido para plantas leñosas como el olivo y el ciruelo. Además, por resultados de experimentos no presentados en este trabajo, nos consta que el método es también útil para la detección de *V. dahliae* en muestras de tejido vegetal de ciruelo, algodón y berenjena y en muestras de suelo.

La presencia de síntomas y el grado de antigüedad de éstos son factores a tener en cuenta a la hora de diagnosticar la presencia de *V. dahliae* en olivo por aislamiento en medio de cultivo. MONTES *et al.* (1997) encontraron que la frecuencia máxima de aislamientos en medio de cultivo coincidía con las fechas de mayor aparición de síntomas. Nuestros resultados indican que el diagnóstico por PCR no depende tanto de la

presencia de síntomas, siendo la detección más sensible que por el método de cultivo en todos los casos, aunque de forma más clara en las muestras asintomáticas y en las muestras sintomáticas muertas.

Una de las características de los síntomas de la verticilosis en los países mediterráneos es la estacionalidad con que se presentan a lo largo del año, lo cual se asocia a la facilidad con que se puede aislar el patógeno de las ramas afectadas. Se ha descrito una máxima frecuencia de aislamientos en medio de cultivo durante los meses de marzo a junio, coincidiendo con la mayor aparición de síntomas, valores medios en septiembre y mínimo en los meses de verano e invierno (MONTES *et al.*, 1997). Nuestros resultados coinciden con los de estos autores lo que confirma que el diagnóstico de la verticilosis en olivo es más fiable en los meses de primavera, principios de verano y otoño que en el resto del año.

El método de PCR ha dado mayor número de resultados positivos que el método tradicional a lo largo de todo el año. Aún así las temperaturas extremas (invierno, verano) provocaban un descenso en la detección del patógeno con ambas técnicas. Se podría concluir que la técnica de PCR descrita en este trabajo aún siendo más eficaz en la detección

del patógeno que el aislamiento en medio de cultivo sigue sin resolver el problema de la estacionalidad en el diagnóstico de *V. dahliae* en olivo. De modo que, a pesar de la mejora que supone el método de PCR, sigue siendo importante tener en cuenta el momento de la toma de muestra para tener un diagnóstico adecuado.

El método de PCR descrito resulta ser más sensible que el de aislamiento en medio de cultivo tanto en muestras sintomáticas como en asintomáticas, por lo que se propone su uso en el "Plan experimental para la obtención y control de variedades certificadas de plantas de vivero de olivos" en la Comunidad Autónoma de Andalucía.

## AGRADECIMIENTOS

A N. Fernández, P. Holgado e I. Abascal por el diseño y aporte de muestras del "Plan experimental para la obtención y control de variedades certificadas de plantas de vivero de olivos en la comunidad Autónoma de Andalucía". A la propiedad de la finca que nos cedió la parcela para el ensayo de seguimiento de verticilosis en campo. A N. Delgado y M.C. Contreras por su ayuda en laboratorio y campo.

## ABSTRACT

MORERA B., J. I. PÁEZ, J. M<sup>a</sup>. VEGA, F. MONTES. 2005. Comparison of *Verticillium dahliae* diagnostic methods in olive tree: isolation in culture media and PCR. *Bol. San. Veg. Plagas*, 31: 267-275.

Isolation of *Verticillium dahliae* by culture media is associated to symptoms presence. The best seasons for isolation are spring and early summer. Nonsymptomatic olive plants can be infected as well, so, development of diagnostic methods suitable for detection of the pathogen makes sense at this point.

The objective of this study was to develop a method for *V. dahliae* detection to be used in "Experimental plan of olive plant certification in Andalucía". Last years some PCR (Polymerase Chain Reaction) primers have been used for diagnostic and characterization of different species of *Verticillium*. A PCR method was selected that consists in a nested-PCR that amplifies a 140 bp region of mitochondrial rDNA only if *V. dahliae* is present in the sample. Method efficiency was checked by comparing it with traditional method of culture media isolation and analysing the seasonal evolution with naturally infected olive samples, with and without symptoms.

Firstly, DNA isolated from monospore cultures and from some symptomatic plants tissues was used and the expected size fragment was obtained in all cases. Secondly, to compare both methods, 560 samples were analysed. 441 samples were nonsymptomatic, 74 samples had fresh symptoms and 45 samples had old symptoms and their plant tissues were dry. PCR method was more effective detecting the pathogen in symptomless sam-



ples and in death symptomatic samples. In symptomatic fresh samples PCR detection frequency was also better than using culture media isolation method.

Despite the fact that the amount of PCR positives has been greater than culture positives, they decreased in winter and summer, confirming spring and autumn as the best seasons to detect this pathogen.

PCR method was more sensitive than culture media isolation method, so it has been proposed as reference method in the "Experimental plan for obtention and control of certificated cultivars of nursery olive plants in Andalucía".

**Key words:** *Verticillium dahliae*, PCR, diagnostic, olive tree, certification program

## REFERENCIAS

- BERTOLINI, E.; FADDA, Z.; GARCIA, F.; CELADA, B.; OLMOS, A.; GORRIS, M.T.; DEL RIO, C.; CABALLERO, J.; DURAN-VILA, N.; CAMBRA, M., 1998: Virosis del olivo detectadas en España. Nuevos métodos de diagnóstico. *Phytoma-España* 102:191-193.
- HEINZ, R.A.; PLATT, H.W., 2000: Improved DNA extraction method for *Verticillium* detection and quantification in large-scale studies using PCR-based techniques. *Can. J. Plant. Pathol.* 22:117-121.
- LI, K.N.; ROUSE, D.I.; GERMAN, T.L., 1994: PCR primers that allow intergeneric differentiation of Ascomycetes and their application to *Verticillium* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 60:4324-4331.
- MERCADO-BLANCO, J.; RODRÍGUEZ JURADO, D.; PÉREZ ARTÉS, E.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M., 2001: Detection of the nondefoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in infected olive plants by nested PCR. *Plant Pathology* 50: 609-619.
- MERCADO-BLANCO, J.; RODRÍGUEZ-JURADO, D.; PÉREZ-ARTÉS, E.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M., 2002: Detection of the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in infected olive plants by nested PCR. *European Journal of Plant Pathology* 108:1-13.
- MERCADO-BLANCO, J.; RODRÍGUEZ-JURADO, D.; PARRILLA-ARAUJO, S.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M., 2003: Simultaneous detection of the defoliating and nondefoliating *Verticillium dahliae* pathotypes in infected olive plants by duplex, nested polymerase chain reaction. *Plant Disease* 87 (12): 1487-1494.
- MONTES, F.; PÁEZ, J.I.; VEGA, J.M.; DUHART, M.E., 1997: Épocas de aislamiento de *Verticillium dahliae* Kleb en olivar en la provincia de Sevilla. *Bol. San. Veg. Plagas* 23: 439-447.
- MOUKHAMEDOV, R., HU, X., ROBB, J., 1994: Use of polymerase chain reaction-amplified ribosomal intergenic sequences for diagnosis of *Verticillium tricorpus*. *Phytopathology* 84:256-259.
- MWANZA, C., 2002: Control de *Verticillium dahliae* en el suelo mediante la aplicación de residuos orgánicos. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba. 245 pp.
- NAZAR, R.N.; HU, X.; SCHMIDT, J.; CULHAM, D.; ROBB, J., 1991: Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39:1-11.
- ROBB, J., MOUKHAMEDOV, R., HU, X., PLATT, H., NAZAR, N.R., 1993: Putative subgroups of *Verticillium albo-atrum* distinguishable by PCR-based assays. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 43:423-436.
- TYPAS, M.A., 2000: Molecular characterization of *Verticillium* species. En "Advances in *Verticillium* research and disease management" Ed. Tjamos EC, Rowe RC, Heale JB, Fravel DR. APS Press.
- VOLOSSIUK, T.; ROBB, E.J.; NAZAR, R.N., 1995: Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms. *App. Environ. Microbiol.* 11:3972-3976.

(Recepción: 29 julio 2004)

(Aceptación: 7 febrero 2005)