

LAS INVESTIGACIONES DEMUESTRAN QUE LA EXTENSIÓN DE LA VERTICILOSIS PUEDE PRODUCIRSE POR LAS HOJAS DE ÁRBOLES DEFOLIADOS

# Dispersión de la verticilosis a través de las hojas de olivos infectadas por el patotipo defoliante

Rafael M. Jiménez Díaz<sup>1,2</sup>, Dolores Rodríguez Jurado<sup>2</sup>, Blanca B. Landa del Castillo<sup>2</sup>, José L. Trapero Casas<sup>2</sup>, y Juan A. Navas Cortés<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba.

<sup>2</sup> Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC. Alameda del Obispo. Córdoba.

**Las hojas de olivos infectados por el patotipo defoliante de *Verticillium dahliae* contribuyeron a extender la verticilosis de 2 a 123 árboles en una plantación de Arbequina de alta densidad, regada por goteo y no labrada, en un periodo de cuatro años. La tasa de aparición de olivos enfermos fue máxima durante invierno-primavera y los árboles enfermos mostraron una distribución en rodales cuyo número y tamaño aumentó en el tiempo sugiriendo un proceso contagioso a partir de árboles afectados.**

La verticilosis del olivo, causada por el hongo *Verticillium dahliae*, fue primeramente diagnosticada en España en 1979, en olivares experimentales del actual IFAPA en Córdoba y poco más tarde se informó acerca de su amplia distribución en las principales provincias olivareras en Andalucía (Blanco López *et al.*, 1983). La elevada incidencia y severidad de los ataques entonces detectados no originó entonces, ni aparentemente en fechas inmediatas posteriores, mayor preocupación en el sector oleícola, a pesar de las llamadas de atención por parte de los expertos sobre verticilosis en relación con la potencial significación de la enfermedad asociada a los cambios tecnológicos que se estaban produciendo para la modernización de la producción oleícola en España (ejemplo, propagación viverista del material de plantación, regadío, intensificación en la densidad de plantas, etc.). Por el contrario, la extensión y gravedad que han alcanzado los ataques de la verticilosis del olivo durante la última década (actualmente diagnosticada al menos en Aragón, Castilla-La Mancha, la Comunidad Valenciana, y las Islas Baleares, además de todas las provincias andaluzas), particularmente en plantaciones jóvenes de regadío, han creado justificada alarma en el sector oleícola y demanda de conocimientos y tecnologías para el control eficiente de esta enfermedad.

Aunque resulta comprensible el deseo del olivicultor de que la enfermedad se pueda controlar eficientemente mediante intervenciones simples sobre el árbol enfermo, hasta ahora no existe evidencia cientí-

fica convincente de que la aplicación de productos químicos (fungicidas o no) en olivares afectados de verticilosis ofrezca expectativas para el control de la enfermedad. Por el contrario, el conocimiento científico que se viene produciendo durante los últimos años sobre la naturaleza etiológica y epidemiológica de la verticilosis del olivo, indican convincentemente que esta enfermedad es de naturaleza compleja y que su control ha de basarse fundamentalmente en la aplicación de medidas de lucha previas a la plantación en una estrategia de manejo integrado (Jiménez Díaz *et al.*, 2003; Tjamos, 1993).

Entre las varias características de la verticilosis del olivo en Andalucía que dificultan su control merecen destacarse:

La prevalencia de una población de *V. dahliae* (denominada patotipo defoliante, D) patogénicamente diferenciada por la capacidad de causar la caída extensa de hojas verdes, asintomáticas, de algodón y olivo (que no se produce en olivos infectados por el patotipo no defoliante, ND) y eventualmente la muerte de la planta infectada (Jiménez Díaz *et al.*, 1998; Jiménez Díaz, 2007).

La versatilidad de medios mediante los que se puede dispersar el patógeno en general, y el patotipo defoliante en particular, que al menos incluyen:

- Plantones infectados.
- Desplazamiento de suelo infestado mediante aperos, maquinaria, vehículos, agua de riego a pié, etc.

**El incremento plurianual de la incidencia de infecciones por el patotipo D en la parcela de estudio, y la distribución agregada y expansión de los rodales de árboles enfermos en ella, podrían resultar de la dispersión de suelo infestado y/o hojas infectadas caídas de árboles enfermos a través de la plantación y la subsiguiente infección de nuevos olivos por el inóculo contenido en aquéllos. nuestra hipótesis al respecto es en favor del papel del inóculo contenido en las hojas caídas de árboles infectados por *V. dahliae* D en la extensión de la verticilosis en la parcela**



**Foto 1.** Olivo Arbequina de cuatro años infectado por el patotipo defoliante de *Verticillium dahliae* fotografiado en diciembre de 2000. Obsérvense la intensa defoliación de ramas y brotes y las hojas verdes caídas sobre el suelo bajo la copa como consecuencia de la infección.

la parcela (i.e., 0,17% de los árboles), y el número de olivos afectados aumentó de manera inesperada en la estación de cultivo siguiente. Por ello, durante los cuatro años que siguieron a la plantación se determinó la incidencia (porcentaje de olivos enfermos respecto del total) de verticilosis en la parcela a intervalos de 1 mes y la posición de cada árbol enfermo se localizó en la parcela en cada fecha de observación. Además la infección de la planta por *V. dahliae* se confirmó mediante aislamiento del hongo de brotes sintomáticos en cultivo puro y los cultivos obtenidos se identificaron y caracterizaron en los patotipos D y ND mediante marcadores de ADN específicos de ellos en ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) multiplex (Mercado-Blanco *et al.*, 2003a).

En el curso de los cuatro años de estudio, el número de olivos enfermos se incrementó de los tres inicialmente diagnosticados (dos por el patotipo D y uno por el ND) en noviembre de 1999 hasta 141 (i.e., 7,83% de los árboles) distribuidos a través de la parcela en julio de 2003, de los cuales 123 (87,2%) estaban infectados por el patotipo D y 18 (12,8%) por el ND. En los árboles infectados por el patotipo D se produjo la caída extensa de hojas verdes asintomáticas, que eventualmente originó la defoliación completa y muerte de ramas en olivos afectados, entre final del otoño y principio del invierno (**foto 1**). Por el contrario, los árboles infectados por el patotipo

• Desplazamiento de restos de plantas enfermas y de cosechas de cultivos afectados (particularmente algodón).

• Distribución de agua de riego infestada por el patógeno (Easton *et al.*, 1969; Rodríguez Jurado y Bejarano, 2007; Wilhelm y Taylor, 1965; Thanassouloupoluos, 1980; 1993).

Diversos investigadores observaron que las hojas senescentes de olivos afectados por la verticilosis (presumiblemente infectados por el patotipo ND) contienen microesclerocios del patógeno (que son las estructuras mediante las que el hongo puede sobrevivir prolongadamente en el suelo y originar infección de la planta) y especularon que dichas hojas infectadas podrían constituir una fuente de inóculo eficiente en el desarrollo de verticilosis del olivo (Tjamos y Botseas, 1987; Tjamos y Tsougriani, 1990). Sin embargo, tal hipótesis no había sido contrastada experimentalmente hasta ahora. En este artículo presentamos resultados de investigaciones realizadas en un olivar de alta densidad, regado por goteo y manejado según las prácticas de no laboreo que demuestran el potencial de las hojas de olivo caídas de árboles infectados por el patotipo D de extender la verticilosis en un olivar (Navas-Cortés *et al.*, 2008)

## Escenario experimental

El estudio se realizó desde octubre de 1999 a mayo de 2003, en un olivar Arbequina de 4,6 ha establecido en julio de 1997 en un suelo afisol de una parcela rectangular uniforme, nivelada, sita en la finca del IFAPA, Alameda del Obispo, Córdoba. Esta parcela no había sido cultivada con plantas susceptibles a *V. dahliae* y carecía de historia de verticilosis en los quince años anteriores a la plantación. La plantación se realizó con plantones auto-enraizados de un año de edad a una densidad de 408 árboles/ha (3,5 x 7 m). El olivar se regó mediante dos goteros por árbol separados 10-20 cm del tronco y la infestación de plantas arvenses en la parcela se controló mediante tratamientos con glifosato entre las líneas de árboles.

## Distribución y extensión espacio-temporal del patógeno

A pesar de las cautelas arriba mencionadas en el establecimiento de la plantación para evitar el desarrollo de verticilosis, en noviembre de 1999, 27 meses después de la plantación, se diagnosticaron 3 árboles afectados próximos entre sí en uno de los márgenes laterales de

ND manifestaron un síndrome de apoplejía (necrosis de brotes y ramas de progresión basípeta, cuyas hojas enrolladas y de color castaño permanecían adheridas a aquéllos) principalmente a final del invierno, o de decaimiento lento (momificado de flores y necrosis de inflorescencias junto con necrosis de hojas en brotes sintomáticos que cayeron excepto por las situadas en el extremo distal) en primavera (**foto 2**). Mientras que la mayoría de los árboles enfermos infectados por el patotipo ND aparecieron durante la estación de cultivo que siguió a la primera detección (i.e., 1999/2000, 3er verde de olivos de cuatro años), de manera que sólo 4 de los 18 infectados por *V. dahliae* ND mostraron síntomas durante el periodo 2001/02; el síndrome de defoliación que originó la infección por *V. dahliae* D continuó afectando a nuevos árboles durante las cuatro estaciones de cultivo de estudio (**figura 1**). Además, el incremento del número acumulado de olivos enfermos (expresado en porcentaje) en el tiempo durante el periodo 1999/2003 se ajustó adecuadamente ( $R^2 > 0,98$ ) a un modelo teórico de crecimiento logístico de sigmoide múltiple, tanto para los ataques de los síndromes D y ND individualizados como para el conjunto de olivos afectados de verticilosis en la parcela (**figura 1**, arriba). Esto permitió estimar la tasa con que fueron apareciendo los árboles enfermos por unidad de tiempo, que fue máxima en el periodo de final de invierno-principio de primavera y mínima durante el de verano-otoño e indicó el desarrollo de cuatro 'oleadas'



Foto 2. Arbequina de cuatro años infectado por el patotipo no defoliante de *Verticillium dahliae* fotografiado en mayo de 2000. Obsérvanse la extensa muerte de flores y algunas hojas amarillentas o necróticas.

de infección distintivas en el caso del patotipo D, y de sólo dos para el patotipo ND (estaciones de cultivo 1999-2000 y 2001-2002), en las que además los valores máximos de dicha tasa fueron inferiores y ocurrieron con notable retraso con respecto a los olivos infectados por el patotipo D (**figura 1**, abajo).

El patrón de crecimiento logístico de la verticilosis en el olivar del estudio no corresponde al que caracteriza a las enfermedades causadas por patógenos residentes en el suelo (como es el caso de *V. dahliae*) que originan un solo ciclo de infección y presentan un crecimiento monomolecular (i.e., incremento de enfermedad en el tiempo de tasa decreciente). Este cambio en el patrón de desarrollo epidémico también se ha observado en otras enfermedades causadas por hongos de suelo, asociado con circunstancias que favorecen extremadamente el desarrollo de la enfermedad (por ejemplo, ambiente muy favorable para la infección, cultivar muy susceptible a la enfermedad, etc.). El desarrollo logístico de la verticilosis del olivo en contraposición con el modelo de crecimiento monomolecular implica una aceleración de la enfermedad durante los primeros estados de la epidemia, que puede ser debido a modificaciones en el proceso de progreso de la enfermedad inducidos por ambiente favorable para la verticilosis en la parcela de estudio y también la alta susceptibilidad de la variedad Arbequina a la infección por el patotipo D de *V. dahliae* indicada tanto por los resultados de este estudio en condiciones de campo como por inoculaciones experimentales en condiciones controladas (López-Escudero et al., 2004; Mercado-Blanco et al., 2003b).

El desarrollo de las epidemias de verticilosis en la parcela también se examinó en un contexto espacial, así como conjuntamente en términos espacial y temporal. El análisis espacial se realizó a tres niveles de escala:

1. Análisis de secuencias ordinarias en el que se estima la agregación entre plantas enfermas adyacentes en las líneas o columnas de una matriz de olivos enfermos mediante el contraste Z del porcentaje de líneas o columnas que contienen agregación de árboles enfermos.

2. Análisis de la agregación de árboles enfermos en grupos de olivos de tamaño variable [2 (2x1), 4 (2x2), 8 (2x4) y 16 (4x4)] mediante la distribución beta-binomial.

3. Análisis de índices de distancia (SADIE) que considera la fortaleza y orientación entre los grupos anteriores con árboles enfermos, y el patrón espacial se cuantifica utilizando las coordenadas (ubicación) de los grupos y el número de olivos enfermos por grupo para medir el mínimo esfuerzo total necesario para forzar una distribución en la que los

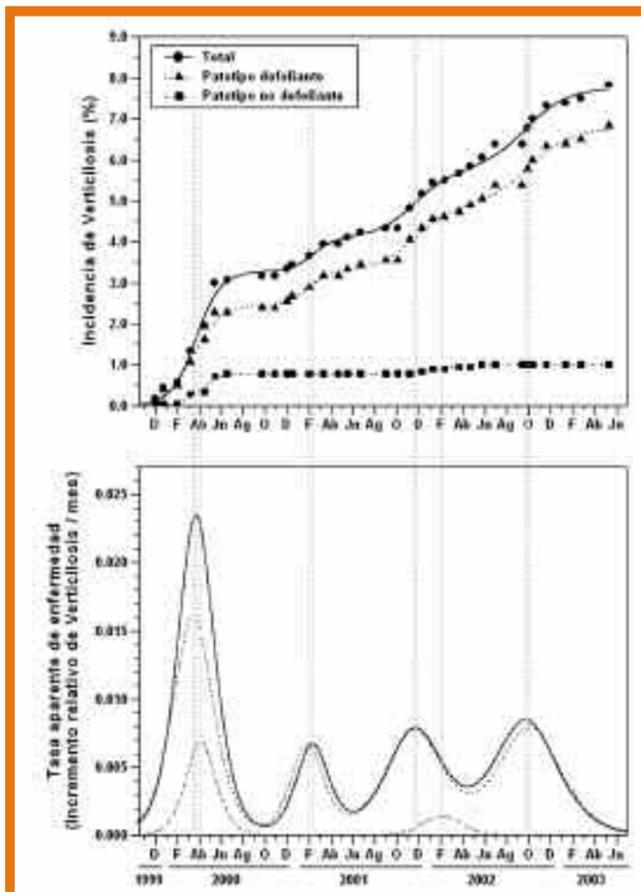
árboles enfermos estén espaciados lo más regularmente que sea posible. El análisis espacio-temporal se realizó utilizando SADIE para determinar la asociación de agrupaciones espaciales de árboles enfermos entre pares de periodos de tiempo en los que se estudió el incremento de la incidencia de verticilosis en la parcela. Similarmente, en cada período experimental se utilizó el índice de agregación SADIE para comparar la distribución espacial de árboles enfermos infectados por el patotipo D o ND.

Mientras que los olivos afectados de verticilosis no mostraron al principio un patrón de distribución discernible en la parcela, desde final del invierno de 2000 hasta el final del estudio los nuevos árboles enfermos aparecieron más frecuentemente adyacentes a los ya enfermos, dando lugar a la formación de focos de rodales de árboles afectados a través de la parcela, y dicho patrón de agregación fue indicado por los varios tipos de análisis utilizados (**figura 2**). Además, el patrón de agregación entre olivos enfermos fue claramente discernible entre aquéllos que estaban infectados por el patotipo D, y la extensión de dicha agregación aumentó gradualmente con el tiempo, mientras que los árboles infectados por el patotipo ND mostraron una distribución aleatoria en la parcela. Estos resultados respecto de la agrupación de árboles sucesivamente enfermos indica que la infección de un árbol influye sobre la infección de árboles inmediatos adyacentes y dicha influencia es más intensa entre los árboles que se encuentran cercanos en una línea comparada con la que ocurre entre árboles que se encuentran en líneas diferentes.

La distribución según un patrón de agrupación de los olivos de la parcela infectados por el patotipo D de *V. dahliae* no es extraña en enfermedades causadas por patógenos que residen en el suelo. Dicho patrón puede corresponder a la distribución agrupada de los microesclerocios en el suelo que constituyen el inóculo primario para las epidemias, pero también puede ser consecuencia de infecciones secundarias originadas por la dispersión de inóculo efectivo desde los focos primarios de enfermedad hasta plantas sanas. Potencialmente, la dispersión de *V. dahliae* en un olivar puede tener lugar mediante la dispersión de sus propágulos contenidos en el suelo por el agua de riego en movimiento, así como por la dispersión de hojas infectadas. La distribución no agregada de los árboles infectados por el patotipo ND sugiere que éste pudo ser introducido en la parcela en plantas infectadas asintomáticas.

## Figura 1.

Progreso temporal de la verticilosis del olivo durante cuatro años consecutivos en una parcela de olivo Arbequina situada en la finca Alameda del Obispo del IFAPA en Córdoba, ajustada a un modelo logístico de sigmoide múltiple.

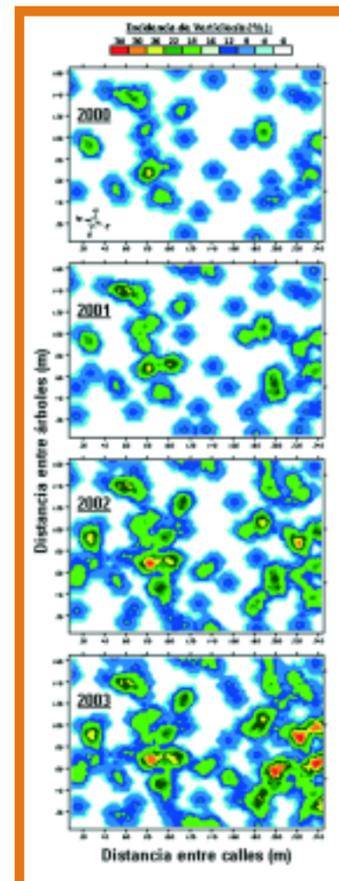


Arriba. Curvas de progreso de enfermedad observada (símbolos) y estimadas por el modelo (líneas).

Abajo. Tasa aparente de enfermedad estimada por el modelo (Navas-Cortés et al. 2008).

## Figura 2.

Mapas de distribución espacial de incidencia de verticilosis en la primavera de los años 2000, 2001, 2002 y 2003 en una parcela de olivo Arbequina situada en la finca Alameda del Obispo del IFAPA en Córdoba



Los ejes indican la distancia en metros entre árboles con el eje de ordenadas y en la dirección de las calles (Navas-Cortés et al. 2008).

**Foto 3.** Defoliación de plantones de olivo Cornicabra de catorce meses de edad que crecieron en ambiente natural, durante ocho meses, en suelo estéril infestado artificialmente con un triturado de hojas caídas de olivos Arbequina infectados por el patotipo defoliante de *Verticillium dahliae*. A la izquierda un plantón de Cornicabra testigo que creció en suelo no infestado (D. Rodríguez Jurado y R. M. Jiménez Díaz; datos no publicados).



Esta interpretación se basa en la escasa incidencia global de dichas infecciones en la parcela (i.e., 1% del total de olivos), así como en que los árboles enfermos estaban distribuidos individualmente en la misma sin que se observara expansión de las infecciones a partir del 1º año del estudio ni indicación alguna de formación de rodales. Además, es respaldada por la diversidad genética que identificamos entre los aislados ND obtenidos de los olivos enfermos, cuando el ADN de ellos se analizó mediante ensayos PCR basados en amplificación arbitraria de secuencias de microsatélites (MP-PCR) (Navas-Cortés *et al.*, 2008). Alternativamente, las infecciones por el patotipo ND podrían derivar de inóculo presente en el suelo de la parcela antes de la plantación. En este caso, la cantidad de dicho inóculo debería haber sido extremadamente alta dado el escaso potencial de los microesclerocios del patotipo ND para establecer infecciones sintomáticas en olivo, lo cual es cuestionable en razón de la prolongada ausencia de cultivo huésped de *V. dahliae* y de verticilosis en la parcela.

Esta interpretación se basa en la escasa incidencia global de dichas infecciones en la parcela (i.e., 1% del total de olivos), así como en que los árboles enfermos estaban distribuidos individualmente en la misma sin que se observara expansión de las infecciones a partir del 1º año del estudio ni indicación alguna de formación de rodales. Además, es respaldada por la diversidad genética que identificamos entre los aislados ND obtenidos de los olivos enfermos, cuando el ADN de ellos se analizó mediante ensayos PCR basados en amplificación arbitraria de secuencias de microsatélites (MP-PCR) (Navas-Cortés *et al.*, 2008). Alternativamente, las infecciones por el patotipo ND podrían derivar de inóculo presente en el suelo de la parcela antes de la plantación. En este caso, la cantidad de dicho inóculo debería haber sido extremadamente alta dado el escaso potencial de los microesclerocios del patotipo ND para establecer infecciones sintomáticas en olivo, lo cual es cuestionable en razón de la prolongada ausencia de cultivo huésped de *V. dahliae* y de verticilosis en la parcela.

## Las hojas verdes caídas infectadas como vehículo de la dispersión

El incremento plurianual de la incidencia de infecciones por el patotipo D en la parcela de estudio, y la distribución agregada y expansión de los rodales de árboles enfermos en ella, podrían resultar de la dispersión de suelo infestado y/o hojas infectadas caídas de árboles enfermos a través de la plantación y la subsiguiente infección de nuevos olivos por el inóculo contenido en aquéllos. La dispersión de inóculo del patógeno en el suelo por agua superficial es de escasa significación, y posiblemente pueda ser restringida a la ocasionada por el agua de lluvia dada la uniformidad y nivelación de la parcela y el riego por goteo que se utilizó durante los 4 años de estudio.

Por el contrario, nuestra hipótesis al respecto es en favor del papel del inóculo contenido en las hojas caídas de árboles infectados por *V. dahliae* D en la extensión de la verticilosis en la parcela. La mayor agregación de la enfermedad entre árboles adyacentes en una línea, comparada con la de los árboles ubicados en líneas diferentes, puede ser debida a que la distancia entre los primeros (3,5 m) fue menor que la existente entre los segundos (7 m). Nuestra hipótesis se fundamenta en el potencial que hemos estimado en dichas hojas caídas como fuente de inóculo para la verticilosis del olivo, que es indicada por los siguientes datos:

1. El gran número de hojas verdes infectadas por *V. dahliae* D que caen de los olivos enfermos.
2. La capacidad de dichas hojas de originar infección y enfermedad en plantones Arbequina de siete meses de edad, y Cornicabra de catorce meses, que crecieron en suelo estéril infestado artificialmente con un triturado de ellas y se incubaron en condiciones naturales en la parcela (**foto 3**).

Nuestras observaciones en la parcela indicaron que durante el periodo de noviembre de 2001 a mayo de 2002 se produjo una caída media de 5.580 hojas por mes y árbol, de las cuales un promedio del 67,7% estaban infectadas por el patógeno (Rodríguez-Jurado y Jiménez-Díaz, datos no publicados). Un papel similar al descrito ha sido referido en las verticilosis del falso platanero y del fresno causadas por *V. dahliae*, pero no había sido demostrada hasta ahora en la verticilosis del olivo (Hiemstra, J. 2000.; Rijkers *et al.*, 1992). En condiciones naturales, la infección de olivos favorecida por las hojas infectadas puede ser llevada a cabo por conidias y/o microesclerocios del patógeno que se forman en gran número y sobreviven, respectivamente, hasta seis semanas en hojas que se depositaron sobre el suelo bajo los olivos y a los 3-5 meses en hojas que se enterraron cercanas a las zonas de goteo bajo los mismos (Rodríguez-Jurado y Jiménez-Díaz, datos no publicados). La eficiencia de dichos inóculos para la infección de la planta puede ser auspiciada por la humectación del suelo que proporcionan los goteros y la elevada densidad de raíces absorbentes susceptibles (< 0,5 mm de diámetro) que se forman en el perfil de 20 cm en una zona hasta 1 m del tronco del árbol (Fernández *et al.*, 1991).

## Consideraciones finales

Las evidencias directas e indirectas que proporcionan los resultados de nuestro estudio demuestran convincentemente que infecciones iniciales e incipientes de plantones de olivo por el patotipo defoliante de *V. dahliae* pueden originar epidemias severas de verticilosis en olivares jóvenes de regadío y alta densidad en un corto periodo de tiempo. Este hecho es de particular relevancia en virtud de la extensa dispersión del patotipo D en las principales provincias olivareras de Andalucía durante los últimos años, que se encuentra presente en Granada, Huelva, Jaén, Córdoba y Sevilla y es el dominante en las poblaciones de *V. dahliae* que infectan olivo en estas tres últimas (Jiménez Díaz, 2007).

Que las infecciones sean originadas por el patotipo D tiene significación adicional, por la posibilidad de que el patógeno sea dispersado a distancias relativamente amplias desde el olivar afectado a otros olivares libres de la enfermedad mediante hojas infectadas que caen prontamente y en gran cantidad de los árboles enfermos. Este medio de dispersión ha podido desempeñar un papel importante en la introducción del patotipo D en el olivar de nuestro estudio, que creemos tuvo lugar previamente al establecimiento de la plantación por la dispersión de hojas de algodón infectadas por el patógeno desde una parcela distante cerca de 100 m. Esta parcela ha sido repetidamente cultivada de algodón susceptible a la verticilosis hasta dos años antes de la plantación y está infestada con elevada densidad de inóculo de *V. dahliae* D (J. Bejarano Alcázar, comunicación personal). De hecho, el análisis mediante ensayos MP-PCR de la diversidad genética en muestras representativas de aislados del patógeno de los olivos infectados y de aislados de *V. dahliae* obtenidos del suelo de la parcela cultivada de algodón, demostró que dichas poblaciones comparten el mismo perfil genético (Navas-Cortés *et al.*, 2008). ■

### Agradecimientos

Los autores (RMJD, BBLC, JLTC, JANC) son miembros del Grupo de investigación AGR 136 "Sanidad Vegetal" del PAIDI, Junta de Andalucía. Las investigaciones de los autores referidas en este artículo han sido financiadas por el proyecto QKL5-CT de la Unión Europea y ayudas de investigación del PAIDI.

### Bibliografía

Existe una amplia bibliografía a disposición de los lectores en [redaccion@eumedia.es](mailto:redaccion@eumedia.es)