

## Dispersión de *Verticillium dahliae* en el agua utilizada para el riego de olivares en Andalucía

D. RODRÍGUEZ-JURADO, J. BEJARANO-ALCÁZAR

El incremento en severidad de las epidemias de Verticilosis del olivo (VO) ha ocurrido de manera paralela a la implantación del riego en nuevas plantaciones y en plantaciones de olivar tradicional en Andalucía. El agua de riego puede influir sobre la VO por actuar como vehículo de dispersión de los propágulos de *Verticillium dahliae*. Por todo ello, los objetivos planteados en esta investigación han consistido en determinar y cuantificar la presencia de *V. dahliae* en el agua utilizada para el riego de olivares en Andalucía, y estudiar la evolución temporal de los niveles de dichos propágulos durante la temporada de riego. Se han prospectado un total de 33 campos de olivo afectados por la Verticilosis en las provincias de Jaén y Sevilla en los años 2004 (5 y 18, respectivamente) y 2005 (7 y 14, respectivamente), siendo 11 de los campos comunes en ambos años de muestreo. En cada campo, se analizaron 2-8 muestras de 0,5 L de agua de riego obtenidas desde Marzo hasta Julio del año 2004, y 3-4 muestras de 1000 L de agua recolectadas desde Febrero hasta Abril del año 2005. *V. dahliae* se aisló sólo de las muestras de agua analizadas en el año 2005. El patógeno se recuperó del agua de riego del 85,7% de los campos prospectados en cada provincia, que representaron el 87,5 y 80% del total de campos regados con agua de pozo y agua superficial embalsada de origen en el río Guadalquivir, respectivamente. Independientemente de su origen, el agua de riego de ambas provincias estuvo infestada por propágulos de *V. dahliae* que, según su tamaño, se diferenciaron en esclerocios ( $\geq 20 \mu\text{m}$ ) y micropropágulos ( $< 20$  y  $\geq 1,2 \mu\text{m}$ ). Los micropropágulos se recuperaron del agua de riego de un porcentaje mayor de campos que utilizaron agua infestada (78%) y en mayores cantidades promedio (3158,9 micropropágulos/1000 L) que los esclerocios (44% y 1,5 esclerocios/1000 L, respectivamente). Entre los campos que emplearon para regar agua infestada por *V. dahliae*, la incidencia de campos con agua contaminada por esclerocios varió de 0 a 33% durante la temporada de riego y no siguió un patrón temporal reconocible, mientras que el porcentaje de campos con agua infestada por micropropágulos alcanzó un máximo de 33% en Jaén y 75% en Sevilla en la segunda y primera quincena de Marzo, respectivamente, y disminuyó progresivamente durante los muestreos de primavera.

D. RODRÍGUEZ-JURADO, J. BEJARANO-ALCÁZAR. Área de Protección de Cultivos, IFAPA Centro "Alameda del Obispo" (CICE, Junta de Andalucía). Avda. Menéndez Pidal s/n. 14080 Córdoba (España). E-mail: dolores.rodriguez.jurado.ext@juntadeandalucia.es

**Palabras clave:** Verticilosis, olivo, fuente de inóculo, epidemiología, control.

### INTRODUCCIÓN

La Verticilosis, inducida por el hongo de suelo *Verticillium dahliae* Kleb., está considerada la enfermedad más importante del olivo en la mayoría de los países donde este cultivo reviste importancia económica (JIMÉ-

NEZ-DÍAZ *et al.*, 1998). En España, la Verticilosis del olivo (VO) fue diagnosticada por vez primera en 1975 en parcelas experimentales establecidas en Córdoba (CABALLERO *et al.*, 1980). Prospecciones sistemáticas realizadas en 1980-1983 indicaron que el 25% de 100 olivares supervisados al azar en Andalu-

cía estaban afectados por la VO, siendo la enfermedad más predominante en las provincias de Córdoba y Jaén que en Granada y Sevilla (BLANCO-LÓPEZ *et al.*, 1984). Inspecciones fitopatológicas posteriores han puesto de manifiesto que la VO se ha extendido y agravado considerablemente en Andalucía en los últimos 20 años, y que en ello ha influido de manera considerable la existencia previa de la Verticilosis del algodónero en esta Comunidad Autónoma (BEJARANO-ALCÁZAR y PÉREZ-ARTÉS, 2002). Prospecciones efectuadas durante el periodo 1994-1996 en plantaciones jóvenes de olivar afectadas por el síndrome conocido como "seca", señalaron la presencia de Verticilosis en el 36,0% de 139 campos muestreados (SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 1998). En estudios llevados a cabo recientemente en las provincias de Granada (RODRÍGUEZ *et al.*, 2004) y Jaén (BEJARANO ALCÁZAR, 2005a) se ha estimado la incidencia actual de plantaciones enfermas en estas provincias en el 14 y 30%, respectivamente. No se han realizado evaluaciones de las pérdidas de rendimiento ocasionadas por la VO en España, pero en Grecia éstas han sido cifradas en el 1% de la producción (THANASSOULOPOULOS *et al.*, 1979), en tanto que en olivares de regadío en Israel se han indicado reducciones del 75-89% en la producción de fruto de árboles afectados del cv. Picual (LEVIN *et al.*, 2003).

El aumento señalado en la importancia de la VO en Andalucía podría ser consecuencia, entre otros factores, de la dispersión de variantes patogénicas de *V. dahliae* muy virulentas. Los aislados del hongo existentes en Andalucía se diferencian en dos patotipos principales denominados Defoliante (D) y No Defoliante (ND), que son alta y moderadamente virulentos, respectivamente, en algodónero y olivo (BEJARANO-ALCÁZAR *et al.*, 1996; RODRÍGUEZ JURADO, 1993; SCHNATHORST y SIBBET, 1971). El patotipo ND está presente a lo largo del Valle del Guadalquivir al menos desde 1983, en tanto que el patotipo D permaneció restringido a campos de algodónero en la zona baja del Valle (Marismas del Guadalquivir, Sevilla) hasta

1985, desde donde se ha extendido progresivamente hasta las áreas de dicho cultivo en las zonas central y alta del Valle (provincias de Córdoba y Jaén) (BEJARANO-ALCÁZAR y PÉREZ-ARTÉS, 2002), habiendo sido detectado recientemente en plantaciones de olivar (BEJARANO-ALCÁZAR, 2005b; MERCADO-BLANCO *et al.*, 2003). Actualmente, el patotipo D está presente también en olivares en Andalucía fuera del Valle del Guadalquivir (provincia de Granada) (MERCADO-BLANCO *et al.*, 2003; RODRÍGUEZ *et al.*, 2004) y en zonas de cultivo de alcachofa en la Comunidad Valenciana (JIMÉNEZ-DÍAZ *et al.*, 2006). La dispersión del patotipo D hasta áreas en las que tradicionalmente se cultiva olivo es de gran importancia porque las infecciones por este patotipo pueden ser letales para las variedades de olivo de mayor difusión en España (RODRÍGUEZ-JURADO *et al.*, 1993; LÓPEZ-ESCUADERO *et al.*, 2004).

En el incremento observado en la gravedad de los ataques de la VO en Andalucía ha influido también en gran medida la aplicación de prácticas de cultivo intensivas, entre las que destaca especialmente el riego. La superficie de olivar en regadío ha experimentado un aumento significativo en Andalucía, debido al establecimiento de nuevas plantaciones con sistemas intensivos de cultivo y a la reconversión de olivares de secano a riego. En la actualidad, el olivar es el cultivo con mayor superficie de regadío en Andalucía, estimada en 317.634 ha en 2004 (ANÓNIMO, 2006), de las que alrededor del 70,5% se riega con aguas superficiales y el 24% emplea aguas subterráneas (PASTOR MUÑOZ-COBO, 2005). El olivar en regadío es especialmente importante en las provincias de Jaén (179.955 ha) y Sevilla (54.383 ha), donde se concentra el 73,8% de la superficie de olivar en regadío de Andalucía (ANÓNIMO, 2006). Se ha indicado que el riego es una práctica de cultivo que incrementa la incidencia y severidad de las Verticilosis que afectan a diversas plantas hortícolas como coliflor (XIAO y SUBBARAO, 2000), patata (ARBOGAST *et al.*, 1999) y tomate (HARRINGTON y DOBINSON, 2000), así como a algodo-

nero (HUISMAN y GRIMES, 1989) y olivo. La influencia del riego sobre el desarrollo de la VO fue destacada por primera vez en Italia (CIRULLI, 1981; RUGGIERI, 1948). Estudios posteriores en España (BLANCO-LÓPEZ *et al.*, 1984), Marruecos (SERRHINI y ZEROUAL, 1995) y Siria (AL-AHMAD y MOSLI, 1993), pusieron de manifiesto que la incidencia de la VO es mayor en regadío que en secano, estimándose porcentajes medios de árboles enfermos de 40, 21 y 13% en regadío, y de 17, 9 y 4,5% en secano en los respectivos países citados. Asimismo, en prospecciones aleatorias realizadas en Andalucía, se observó una incidencia de campos de olivar afectados por la VO del 71% en regadío frente al 13% en olivares de secano (BLANCO-LÓPEZ *et al.*, 1984).

El agua de riego puede influir sobre la VO de diferentes maneras, entre las cuales destaca su papel como vehículo de dispersión de los propágulos de *V. dahliae* desde balsas, pozos y campos infestados a acuíferos, ríos y/u otros campos, o dentro del mismo campo (EASTON *et al.*, 1969). Se ha demostrado que el agua de riego procedente de campos con cultivos hortícolas susceptibles infectados por *V. dahliae* puede transportar propágulos del hongo con potencial infectivo suficiente para causar síntomas de Verticilosis en olivos sanos localizados en campos libres del patógeno (THANASSOULOPOULOS *et al.*, 1980). En el mismo sentido, se ha informado de la infestación de suelos vírgenes sometidos a inundaciones periódicas durante varios años con el agua procedente de un campo adyacente infestado con *V. dahliae* y cultivado con algodón (ASHWORTH y ZIMMERMAN, 1976). En ninguno de los estudios mencionados se determinó el tipo de propágulos del hongo que intervino en la dispersión, aunque se considera que los esclerocios son la principal estructura de supervivencia de *V. dahliae*, puesto que las conidias y el micelio vegetativo tienen una persistencia relativamente breve en suelos naturales en ausencia de plantas huésped (GALANOPOULOS y TRIBE, 1974; GREEN, 1960; SCHREIBER y GREEN, 1962). La presencia y dispersión de *V. dah-*

*liae* en el agua utilizada para el riego de olivares en Andalucía, podría explicar en gran medida la repentina aparición de árboles enfermos que se observa frecuentemente tras la implantación del riego en plantaciones de olivar tradicionales sin antecedentes previos de Verticilosis, y la rápida propagación de la enfermedad en plantaciones de olivar en regadío. El efecto devastador de la Verticilosis en olivares de regadío mantiene en alerta y preocupación continua al Sector Olivarero andaluz, y en concreto a las Comunidades de Regantes, por la amenaza creciente que representa esta enfermedad para el cultivo del olivo. Esta situación y la presencia de *V. dahliae* en una muestra de agua de riego recolectada en el año 2003 en una finca de olivar afectada por la Verticilosis en la provincia de Sevilla (Bejarano-Alcázar, datos no publicados), nos motivaron a abordar el presente trabajo cuyos objetivos consistieron en determinar y cuantificar los propágulos de *V. dahliae* de diferente tamaño presentes en el agua utilizada para el riego de olivares en las provincias andaluzas de Jaén y Sevilla, y estudiar la evolución temporal de los niveles de dichos propágulos durante la temporada de riego.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Selección de campos experimentales

Los campos de olivar utilizados en este estudio estuvieron distribuidos por las principales áreas de cultivo del olivo en las provincias de Jaén y Sevilla y comprendieron una diversidad de cultivares que incluyó Picual en Jaén y Sevilla, y Gordal, Hojiblanca y Manzanilla en Sevilla. Estos campos se seleccionaron por ser regados con agua subterránea o con agua superficial embalsada procedente del río Guadalquivir, y estar presuntamente afectados por la Verticilosis. La Verticilosis se diagnosticó en los campos mediante el aislamiento de *V. dahliae* a partir de olivos supuestamente afectados por la enfermedad. Para ello, en Enero y Febrero de 2004 y 2005 se recogieron 3-5 ramas de 0,5-1,0 cm de diámetro de

cada uno de 5 olivos sintomáticos en cada campo, y se llevaron al laboratorio para su procesamiento inmediato o después de 24 h de conservación a 4°C. El extremo proximal de cada rama (20 cm) fue desprovisto de la corteza externa, lavado bajo agua de grifo durante 0,5 h y descortezado completamente con la ayuda de un bisturí estéril. De cada rama descortezada se cortaron cuatro trozos de 0,3-0,5 cm según su grosor, que fueron desinfectados superficialmente en una solución de lejía comercial con 50 g de cloro activo por litro al 10% en agua durante 1,5 min, lavados dos veces en agua destilada estéril y secados entre papel de filtro estéril. Los trozos se dispusieron en placas Petri conteniendo Agar Agua enmendado con clorotetraciclina HCl (AAC, 1L de agua destilada, 20 g de agar, 30 mg de clorotetraciclina HCl), y se incubaron a 24°C en oscuridad durante 14 días. Las colonias fúngicas se observaron microscópicamente a los 9 y 14 días para la identificación de *V. dahliae* en base a la formación de conidióforos verticilados y microesclerocios característicos de la especie (HAWKSWORTH y TALBOYS, 1970). Cuando la identificación lo requirió, se obtuvieron cultivos puros sobre AAC.

## 2. Prospecciones de agua en el año 2004

### 2.1. Muestras de agua de riego

Se muestreó el agua empleada para el riego en un total de 23 campos de olivar en los que la Verticilosis fue diagnosticada en este estudio, 5 de ellos situados próximos a la localidad de Begíjar en la provincia de Jaén, y los otros 18 distribuidos en las localidades de Estepa (6), La Roda de Andalucía (2), Marchena (3), Morón de la Frontera (3) y Osuna (4) pertenecientes a la provincia de Sevilla (Cuadro 1). Todos los campos de Jaén utilizaron para regar agua superficial almacenada en balsa procedente del río Guadalquivir, mientras que todos los campos localizados en Sevilla emplearon agua subterránea obtenida de un pozo situado en cada campo. El sistema de riego utilizado fue siempre por goteo.

En cada uno de los campos con pozo seleccionados en la provincia de Sevilla se tomaron 2-8 muestras de 1 L de agua de riego durante el periodo comprendido entre el 17 de Marzo y el 1 de Julio. En los campos localizados en Jaén, regados con agua superficial embalsada, se recogieron 4 muestras de 1 L de agua de riego, 3 de ellas entre el 19 de Marzo y el 24 de Abril y una última muestra el 3 de Julio. Las muestras de agua se obtuvieron combinando cuatro submuestras de 250 ml de agua tomadas de goteros que suministraban el riego a diferentes olivos afectados por la enfermedad, exceptuando parte de las muestras de agua de los campos de Sevilla, que se tomaron directamente del pozo al no estar funcionando en ese momento el sistema de riego a causa de las lluvias ocurridas ese año. Las muestras se tomaron tras dejar transcurrir un tiempo de bombeo suficiente para asegurar que no se recogía agua estancada. En total se recolectaron 120 muestras de agua, de las que 100 procedieron de los campos regados con agua de pozo y 20 de los campos regados con agua superficial. Las muestras de agua se recogieron en envases de plástico estériles cerrados herméticamente, y se trasladaron inmediatamente al laboratorio donde se conservaron a 4°C en oscuridad durante un periodo máximo de 48 h hasta su análisis.

### 2.2. Análisis de las muestras de agua

Las muestras de agua de riego fueron analizadas para detectar y cuantificar los propágulos viables de *V. dahliae* de diferente tamaño presentes en ellas. Para ello, 0,5 L de cada muestra de agua fueron filtrados a través de un filtro de malla de nailon de 20  $\mu$ m de tamaño de poro y 47 mm de diámetro (Millipore Iberica, S.A., España) utilizando una bomba de vacío. Este filtro es adecuado para retener en su superficie los esclerocios de *V. dahliae*, cuyo tamaño en suelos infestados naturalmente se ha estimado que es mayoritariamente superior a 37-38  $\mu$ m (ASWORTH *et al.*, 1972; SMITH y ROWE, 1984), y dejar pasar propágulos del patógeno de pequeño tamaño denominados en adelan-

Cuadro 1. Campos de olivo regados por goteo y afectados de Verticilosis seleccionados para muestrear el agua de riego en el año 2004, ordenados según el origen geográfico y la procedencia del agua de riego.

Campo <sup>a</sup>	Origen geográfico		Procedencia del agua de riego <sup>b</sup>
	Localidad	Provincia	
<b>C1-04</b>	Estepa	Sevilla	Pozo
<b>C2-04</b>	Estepa	Sevilla	Pozo
C3-04	Estepa	Sevilla	Pozo
<b>C5-04</b>	Estepa	Sevilla	Pozo
<b>C6-04</b>	Estepa	Sevilla	Pozo
<b>C7-04</b>	Estepa	Sevilla	Pozo
<b>C4-04</b>	La Roda de Andalucía	Sevilla	Pozo
C33-04	La Roda de Andalucía	Sevilla	Pozo
<b>C25-04</b>	Marchena	Sevilla	Pozo
C34-04	Marchena	Sevilla	Pozo
C35-04	Marchena	Sevilla	Pozo
<b>C24-04</b>	Morón de la Frontera	Sevilla	Pozo
C26-04	Morón de la Frontera	Sevilla	Pozo
C27-04	Morón de la Frontera	Sevilla	Pozo
C10-04	Osuna	Sevilla	Pozo
<b>C11-04</b>	Osuna	Sevilla	Pozo
<b>C12-04</b>	Osuna	Sevilla	Pozo
<b>C14-04</b>	Osuna	Sevilla	Pozo
C28-04	Begíjar	Jaén	Río Guadalquivir
C29-04	Begíjar	Jaén	Río Guadalquivir
C30-04	Begíjar	Jaén	Río Guadalquivir
C31-04	Begíjar	Jaén	Río Guadalquivir
C32-04	Begíjar	Jaén	Río Guadalquivir

<sup>a</sup> Los campos que se indican en negrita se seleccionaron también para los muestreos del agua de riego en el año 2005.

<sup>b</sup> Se utilizó para el riego agua subterránea obtenida de un pozo situado en cada campo o agua superficial embalsada procedente del río Guadalquivir en cada una de las localidades indicadas.

te “micropropágulos”, consistentes probablemente en su mayor parte en conidias, las cuales presentan un tamaño comprendido entre 1,4-3,2 x 2,5-8,0  $\mu\text{m}$  (HAWKSWORTH y TALBOYS, 1970; SMITH, 1965), aunque también podrían incluir fragmentos de micelio vegetativo o de esclerocios. Las partículas retenidas en el filtro fueron resuspendidas en 5 ml de agua estéril mediante sonicado durante 10 min y, tras agitar la suspensión obtenida, alícuotas de 1 ml de la misma fueron distribuidas uniformemente sobre la superficie de cada una de 5 placas Petri conteniendo medio de cultivo semiselectivo para *V. dahliae* Agar Polipectato Sódico modifi-

cado (APSM) (BUTTERFIELD y DEVAY, 1977). Para la detección cuantitativa de los micropropágulos de *V. dahliae* de tamaño inferior a 20  $\mu\text{m}$ , alícuotas de 1 ml del agua que había pasado a través del filtro de nailon de 20  $\mu\text{m}$  se distribuyeron sobre cada una de 20 placas Petri conteniendo APSM. Las placas se incubaron a 24°C en oscuridad durante 14 días, y se observaron en un microscopio estereoscópico (x15) para determinar el número de colonias de *V. dahliae* desarrolladas. Los resultados se expresaron como el número de esclerocios o de micropropágulos viables de *V. dahliae* por 1000 L de agua.

Cuadro 2. Campos de olivo regados por goteo y afectados de Verticilosis seleccionados para muestrear el agua de riego en el año 2005, ordenados según el origen geográfico y la procedencia del agua de riego.

Campo <sup>a</sup>	Origen geográfico		Procedencia del agua de riego <sup>b</sup>
	Localidad	Provincia	
C20-05	Begíjar	Jaén	Pozo
C23-05	Marmolejo	Jaén	Pozo
<b>C1-05</b>	Estepa	Sevilla	Pozo
<b>C2-05</b>	Estepa	Sevilla	Pozo
<b>C5-05</b>	Estepa	Sevilla	Pozo
<b>C6-05</b>	Estepa	Sevilla	Pozo
<b>C7-05</b>	Estepa	Sevilla	Pozo
<b>C4-05</b>	La Roda de Andalucía	Sevilla	Pozo
<b>C25-05</b>	Marchena	Sevilla	Pozo
<b>C24-05</b>	Morón de la Frontera	Sevilla	Pozo
C8-05	Osuna	Sevilla	Pozo
C9-05	Osuna	Sevilla	Pozo
<b>C11-05</b>	Osuna	Sevilla	Pozo
<b>C12-05</b>	Osuna	Sevilla	Pozo
C13-05	Osuna	Sevilla	Pozo
<b>C14-05</b>	Osuna	Sevilla	Pozo
C17-05	Andújar	Jaén	Río Guadalquivir
C22-05	Andújar	Jaén	Río Guadalquivir
C15-05	Arjona	Jaén	Río Guadalquivir
C18-05	Arjonilla	Jaén	Río Guadalquivir
C16-05	Higuera	Jaén	Río Guadalquivir

<sup>a</sup> Los campos que se indican en negrita se seleccionaron también para los muestreos del agua de riego en el año 2004.

<sup>b</sup> Se utilizó para el riego agua subterránea obtenida de un pozo situado en cada campo o agua superficial embalsada procedente del río Guadalquivir en cada una de las localidades indicadas.

### 3. Prospecciones de agua en el año 2005

#### 3.1. Muestras de agua de riego

Se prospectó el agua utilizada para el riego de 21 campos de olivar en los que se confirmó la infección por *V. dahliae* de los árboles afectados. Siete campos estuvieron distribuidos en las localidades de Andújar (2), Arjona (1), Arjonilla (1), Begíjar (1), La Higuera (1) y Marmolejo (1) de la provincia de Jaén, y los otros 14 estuvieron situados en las localidades de Estepa (5), La Roda de Andalucía (1), Marchena (1), Morón de la Frontera (1) y Osuna (6) de la provincia de Sevilla (Cuadro 2). Once de los campos experimentales indicados en Sevilla habían sido incluidos en las prospecciones de agua

del año 2004 (Cuadros 1 y 2). Todos los campos de Sevilla y dos campos de Jaén (C20-05 y C23-05) se abastecieron para el riego con agua subterránea de un pozo situado en cada uno de los campos, en tanto que el resto de los campos en Jaén utilizaron agua superficial embalsada tomada del río Guadalquivir (Cuadro 2). El sistema de riego empleado fue por goteo en todos los campos.

Las muestras de agua se recolectaron de los campos de la provincia de Jaén con una periodicidad de 12 a 19 días entre el 9 de Marzo y el 28 de Abril, y de los pozos de Sevilla cada 15 a 25 días desde el 16 de Febrero al 26 de Abril. De cada campo se recogieron 4 muestras de agua, exceptuando de los campos C15-05 de Jaén y C6-05, C7-

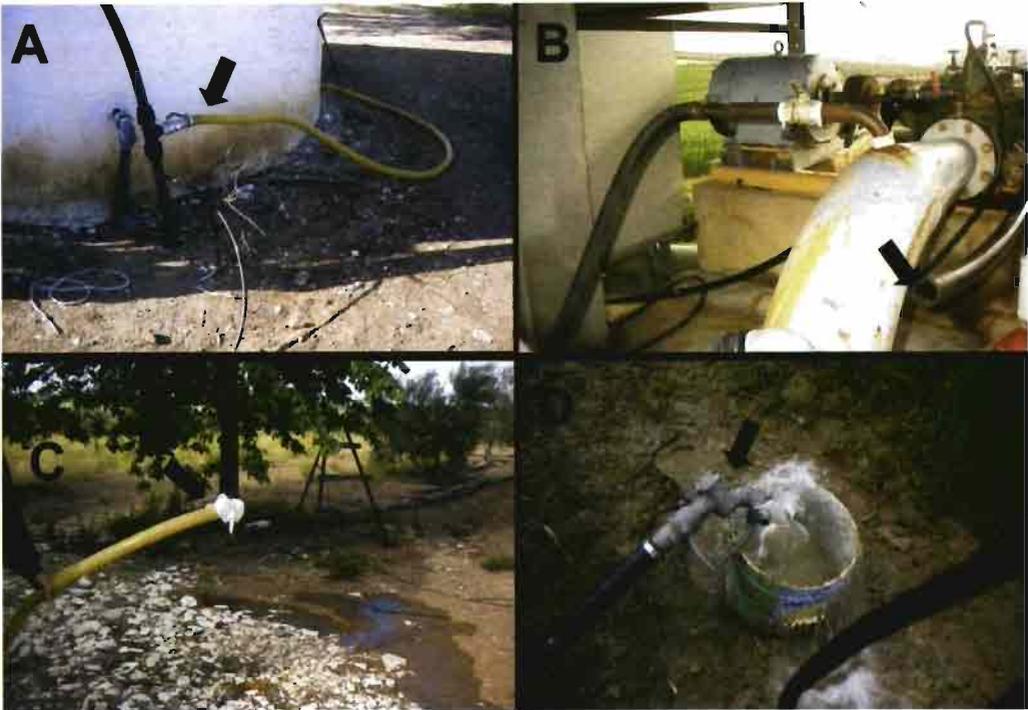


Figura 1. Localización de la toma de muestras de agua en el sistema de riego y filtrado del agua en los campos prospectados. A, B. Cabecera del sistema de riego en olivares que se abastecieron con agua de pozo o con agua superficial embalsada de origen en el río Guadalquivir, respectivamente. C, D. Filtrado del agua de riego en olivares que se abastecieron con agua de pozo o con agua superficial embalsada de origen en el río Guadalquivir, respectivamente.

05 y C12-05 de Sevilla, donde se tomaron 3 muestras. Por lo tanto, se recolectaron un total de 80 muestras de agua, de las que 61 fueron de campos regados con agua de pozo y las otras 19 de campos abastecidos con agua superficial. En cada muestreo, un total de 1000 L de agua se hicieron pasar por un filtro Sefar Nitex de malla de nailon de 20  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (Sefar Headquarter, Suiza) colocado en el extremo de una tubería situada próxima al pozo o a la balsa (Figura 1), antes de que el agua entrara en el entramado de tuberías del sistema de riego del campo. El filtro de nailon y su contenido se introdujeron inmersos en aproximadamente 400 ml de agua estéril en un recipiente de plástico estéril herméticamente cerrado que fue trasladado inmediatamente al laborato-

rio. Un filtro fue usado para cada campo y fecha de muestreo. El filtro dejó pasar el agua y todas las partículas en suspensión menores de 20  $\mu\text{m}$ , por lo que los residuos sobre el filtro sirvieron para detectar y cuantificar la presencia de esclerocios del patógeno, en tanto el agua que pasó a través del filtro se empleó para detectar y cuantificar los micropropágulos de *V. dahliae* presentes en el agua de riego. Para la determinación de micropropágulos, 1 y 10 L del agua filtrada se recolectaron de cada campo en los dos primeros y dos últimos muestreos respectivamente, excepto de 4 campos en Estepa, Marchena, Morón de la Frontera y Osuna, referidos como C2-05, C25-05, C24-05 y C8-05 respectivamente, en los que se recogió 1 L en lugar de 10 L en el tercer muestreo realizado

en razón al elevado número de propágulos cuantificados en aquellos campos en muestreos anteriores. El agua se almacenó en contenedores de plástico estériles herméticamente cerrados para su transporte al laboratorio, donde se conservaron a 4°C en oscuridad durante un máximo de 48 h hasta ser procesadas.

### 3.2. Análisis de las muestras de agua

Los esclerocios y demás residuos retenidos sobre el filtro Sefar Nitex de 20  $\mu\text{m}$  fueron incorporados al agua estéril en el contenedor de plástico, y concentrados en un filtro de malla de nailon Millipore® de 20  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y 47 mm de diámetro con la ayuda de una bomba de vacío. El contenido sobre el filtro se resuspendió en 10 ml de agua estéril mediante sonicado durante 10 min. La suspensión resultante se utilizó para determinar y cuantificar el número de esclerocios de *V. dahliae* en la muestra de agua.

Para la cuantificación de los micropropágulos de *V. dahliae*, las partículas suspendidas en 1 ó 10 L de agua que habían traspasado el filtro Sefar Nitex de 20  $\mu\text{m}$ , se concentraron en un filtro de membrana Millipore® de 1,2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y 47 mm de diámetro, y se resuspendieron en 10 ml de agua estéril como se describió anteriormente.

Las dos suspensiones de 10 ml obtenidas fueron agitadas después de retirar el filtro respectivo, y alícuotas de 0,5 ml de cada una de ellas se distribuyeron homogéneamente sobre la superficie de 20 placas Petri conteniendo medio semiselectivo APSM. Las placas se incubaron y observaron para identificar y cuantificar el número de colonias de *V. dahliae* originadas como se ha descrito para el análisis de muestras de agua recolectadas en el año 2004.

## RESULTADOS

*V. dahliae* fue recuperado del 20-80% de los olivos muestreados en cada campo experimental finalmente seleccionado para las prospecciones del agua de riego en los años

2004 y 2005, con una frecuencia media de infección que varió entre el 5-100% de los trozos de las ramas analizadas. Se confirmó así la presencia de la Verticilosis en dichos campos.

No se detectaron propágulos viables de *V. dahliae* en ninguna de las 120 muestras de agua de riego tomadas en los 23 campos de olivar prospectados en las provincias de Jaén y Sevilla en el periodo comprendido entre el 17 de Marzo y el 1 de Julio de 2004. En el año 2005, por el contrario, el patógeno se aisló del agua de riego del 85,7% de los campos inspeccionados en cada una de las provincias de Jaén (6 de 7 campos) y Sevilla (12 de 14 campos) (Figura 2), incluyendo 9 de los 11 campos que también se muestrearon en 2004, siendo los valores medios estimados en los campos regados con agua infestada de cada provincia de 213,1 (intervalo 0,5-1000,0) y 3579,9 (intervalo 0,7-27006,3) propágulos viables por 1000 L de agua, respectivamente (Cuadros 3 y 4). *V. dahliae* fue recuperado del agua de riego del 87,5% (14 campos) de los 16 campos regados con agua de pozo, 2 de los cuales estuvieron localizados en Jaén y los 12 restantes en Sevilla (Figura 2), con un valor medio de 3070,4 (intervalo 0,7-27006,3) propágulos viables por 1000 L de agua (Cuadros 3 y 4). El patógeno se aisló del 80% (4 campos) de los 5 campos regados con agua superficial embalsada de origen en el río Guadalquivir, todos ellos situados en Jaén, con una media de 312,9 (intervalo 0,5-1000,0) propágulos viables por 1000 L de agua (Cuadro 3). En conjunto, *V. dahliae* fue detectado en el 32,5% (26 muestras) de las 80 muestras analizadas en total en el año 2005, de las cuales 76,9% (20 muestras; 2 en Jaén y 18 en Sevilla) fueron de agua de pozo y el 23,1% restante (6 muestras en Jaén) de agua superficial.

A partir de las muestras de agua de riego infestadas en ambas provincias andaluzas, y con independencia de su origen, se recuperaron propágulos de *V. dahliae* de dos tamaños diferentes, esclerocios  $\geq 20 \mu\text{m}$  y micropropágulos ( $< 20 \mu\text{m}$  y  $\geq 1,2 \mu\text{m}$ ). Los esclerocios se aislaron del 44% de los 18 campos

que utilizaron agua infestada con un valor medio de 1,5 esclerocios/1000 L de agua, mientras que los micropropágulos fueron recuperados del 78% de los campos regados con agua infestada con un promedio de 3158,9 micropropágulos/1000 L de agua. El tipo de propágulo aislado del agua tendió a variar principalmente con el periodo de prospección, y la cantidad de micropropágulos lo hizo con aquél y con el campo, en tanto que la cantidad de esclerocios sólo varió con el campo.

En la provincia de Jaén, el patógeno fue recuperado del agua de riego en todos los periodos de muestreo considerados, pero la detección en un campo determinado no fue continua en el tiempo. Así, *V. dahliae* se aisló del 25 al 50% de las muestras de agua obtenidas de los 6 campos que utilizaron agua de riego infestada, y fue detectado en 2 de dichos campos en el muestreo de invierno llevado a cabo la primera quincena de

Marzo, y en 2, 3 y 1 campo en los muestreos de primavera, realizados en la segunda quincena de Marzo y en la primera y segunda quincena de Abril, con un promedio en cada periodo respectivo de 2, 2500, 36,3 y 1 propágulos viables por 1000 L de agua (Cuadro 3). Las cantidades de micropropágulos estimadas en el agua de riego fueron mucho más elevadas que las de esclerocios (Cuadros 3 y 4). Los esclerocios se aislaron del agua de riego del 33% (2 campos) y 17% (1 campo) de los 6 campos regados con agua infestada en los muestreos efectuados en las primeras quincenas de Marzo y de Abril y en la segunda quincena de Abril, respectivamente, en cantidades de 1-7 esclerocios por 1000 L de agua de riego según el campo, y no fueron detectados en el muestreo realizado en la segunda quincena de Marzo. Por el contrario, los valores máximos de micropropágulos se obtuvieron en la segunda quincena de Marzo, en la que fueron detectados en el

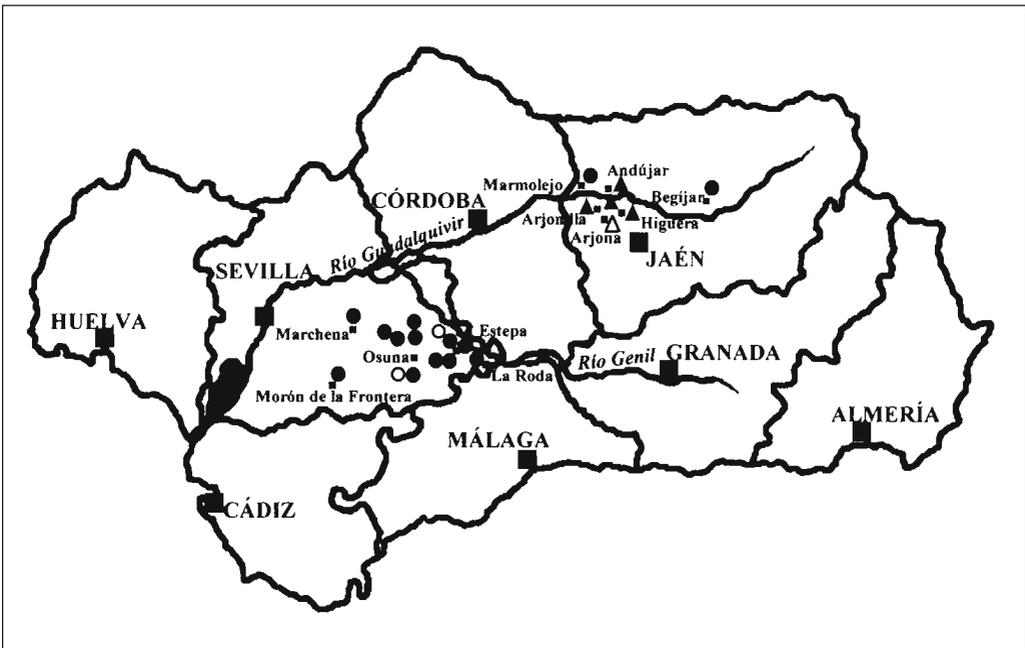


Figura 2. Distribución geográfica de los campos de olivo que utilizaron para regar agua de pozo infestada (círculo relleno) o no infestada (círculo vacío) por *Verticillium dahliae*, o agua embalsada de origen en el río Guadalquivir infestada (triángulo relleno) o no infestada (triángulo vacío) por el patógeno.

Cuadro 3. Número de propágulos de *Verticillium dahliae* por 1000 L de agua utilizada para el riego de campos de olivar localizados en la provincia de Jaén en distintos periodos de muestreo en el año 2005<sup>a</sup>.

Campo	Localidad	1 <sup>a</sup> quincena de Marzo		2 <sup>a</sup> quincena de Marzo		1 <sup>a</sup> quincena de Abril		2 <sup>a</sup> quincena de Abril	
		Esclerocios	Micropropágulos	Esclerocios	Micropropágulos	Esclerocios	Micropropágulos	Esclerocios	Micropropágulos
C17-05	Andújar	0	0	0	1000	0	0	1	0
C22-05	Andújar	2	0	0	0	2	0	0	0
C15-05	Arjona	- <sup>b</sup>	-	0	0	0	0	0	0
C18-05	Arjonilla	2	0	0	0	0	0	0	0
C20-05	Begújar	0	0	0	0	0	100	0	0
C16-05	Higuera	0	0	0	4000	0	0	0	0
C23-05	Marmolejo	0	0	0	0	7	0	0	0

<sup>a</sup> El agua procedente de un pozo en los campos C20-05 y C23-05 y el agua embalsada de origen en el río Guadalquivir en el resto de los campos, fueron muestreadas en cada periodo indicado para detectar y cuantificar los propágulos de *V. dahliae* de diferente tamaño presentes en ellas: esclerocios ( $\geq 20 \mu\text{m}$ ) y micropropágulos ( $< 20 \mu\text{m}$  y  $\geq 1,2 \mu\text{m}$ ). Se analizaron 1000 L de agua de cada campo para la cuantificación de esclerocios en cada muestreo, mientras que para cuantificar los micropropágulos del hongo se analizaron 1 y 10 L de agua en los dos primeros y los dos últimos muestreos respectivamente.

<sup>b</sup> No realizado.

33% de los 6 campos que emplearon agua de riego infestada por *V. dahliae*, en cantidades estimadas de 1000-4000 micropropágulos por 1000 L de agua según el campo; disminuyeron en la primera quincena de Abril a 100 micropropágulos por 1000 L de agua en el 17% de los 6 campos indicados anteriormente; y no se detectaron en el último muestreo realizado (Cuadro 3). De este modo, el agua de riego infestada de los campos en Jaén estuvo contaminada sólo con esclerocios en la primera quincena de Marzo (primer muestreo) y segunda de Abril (cuarto muestreo), únicamente con micropropágulos en la segunda quincena de Marzo (segundo muestreo), y con ambos tipos de propágulos en la primera quincena de Abril (tercer muestreo). No se aislaron esclerocios y micropropágulos a la vez en una misma muestra de agua, aunque los dos tipos de propágulos se detectaron en el agua de riego del mismo campo en diferentes muestras.

Similarmente, en la provincia de Sevilla, *V. dahliae* también fue aislado del agua utilizada para el riego en todos los periodos de muestreo establecidos y su presencia en un campo dado fue discontinua en el tiempo. De este modo, el patógeno se aisló del 25 al

75% de las muestras de agua de riego analizadas de un total de 12 campos que regaron con agua infestada, y fue recuperado de 3 y 9 de dichos campos en los dos muestreos de invierno realizados en la segunda quincena de Febrero y primera quincena de Marzo, respectivamente, y de 4 y 2 campos en los dos muestreos de primavera efectuados en la primera y segunda quincena de Abril, respectivamente, con promedios respectivos en cada periodo de muestreo de 1335,0, 18558,4, 100,5 y 200,0 propágulos viables por 1000 L de agua (Cuadro 4). Los esclerocios estuvieron presentes en el agua de riego del 17% (2 campos) y 8% (1 campo) de los 12 que utilizaron agua contaminada con propágulos del patógeno, en los dos muestreos de invierno y en la primera quincena de Abril, respectivamente, en cantidades que variaron de 1-25 esclerocios por 1000 L de agua según el campo, pero no se detectaron en el último muestreo realizado la segunda quincena de Abril (Cuadro 4). Los micropropágulos se aislaron en todos los periodos de muestreo, pero en un porcentaje de campos y en cantidades que alcanzaron un máximo en el último muestreo de invierno y disminuyeron durante los muestreos de primavera. Así,

Cuadro 4. Número de propágulos de *Verticillium dahliae* por 1000 L de agua utilizada para el riego de campos de olivar en la provincia de Sevilla en distintos periodos de muestreo durante el año 2005<sup>a</sup>.

Campo	Localidad	2ª quincena de Febrero		1ª quincena de Marzo		1ª quincena de Abril		2ª quincena de Abril	
		Esclerocios	Micropropágulos	Esclerocios	Micropropágulos	Esclerocios	Micropropágulos	Esclerocios	Micropropágulos
C1-05	Estepa	0	0	0	0	0	0	0	200
C2-05	Estepa	0	0	0	7000	0	0	0	0
C5-05	Estepa	1	0	0	3000	0	0	0	0
C6-05	Estepa	0	0	- <sup>b</sup>	-	0	0	0	0
C7-05	Estepa	0	0	-	-	2	0	0	0
C4-05	La Roda de Andalucía	0	0	0	2000	0	100	0	0
C25-05	Marchena	0	0	25	108000	0	0	0	0
C24-05	Morón de la Frontera	0	0	0	34000	0	0	0	0
C8-05	Osuna	0	0	0	5000	0	0	0	0
C9-05	Osuna	4	0	1	2000	0	0	0	200
C11-05	Osuna	0	0	0	0	0	100	0	0
C12-05	Osuna	0	0	-	-	0	0	0	0
C13-05	Osuna	0	0	0	2000	0	200	0	0
C14-05	Osuna	0	4000	0	4000	0	0	0	0

<sup>a</sup> El agua procedente de un pozo localizado en cada campo se muestreó en cada periodo indicado para detectar y cuantificar los propágulos de *V. dahliae* de diferente tamaño presentes en ella: esclerocios ( $\geq 20 \mu\text{m}$ ) y micropropágulos ( $< 20 \mu\text{m}$  y  $\geq 1,2 \mu\text{m}$ ). Se analizaron 1000 L de agua de cada campo para la cuantificación de esclerocios en cada muestreo, mientras que para cuantificar los micropropágulos del hongo se analizaron 1 L de agua en los dos primeros muestreos de cada campo y el tercer muestreo de los campos C2-05, C8-05, C24-05 y C25-05; y 10 L de agua en el resto de los muestreos.

<sup>b</sup> No realizado.

el agua de riego del 8, 75, 25 y 17% (1, 9, 3 y 2 campos, respectivamente) de los 12 campos que se abastecieron para el riego con agua infestada, contuvo 4000, 2000-108000, 100-200 y 200 micropropágulos por 1000 L de agua en la segunda quincena de Febrero, primera quincena de Marzo, y primera y segunda quincenas de Abril, respectivamente (Cuadro 4). Consecuentemente, un mayor número de campos utilizaron para regar agua infestada por micropropágulos que por esclerocios en todos los muestreos, excepto en la segunda quincena de Febrero (primer muestreo) en la que el número de campos que se abastecieron para el riego con agua infestada por esclerocios duplicó al número de ellos que utilizaron agua infestada con micropropágulos. Ambos tipos de propágulos de *V. dahliae*, esclerocios y micropropágulos, fueron recuperados a la vez de dos

muestras de agua en la primera quincena de Marzo (segundo muestreo).

## DISCUSIÓN

El conocimiento de los medios de dispersión del inóculo de *V. dahliae* en campos de olivar es de gran importancia a efectos epidemiológicos, y para el manejo y control eficientes de la VO. Los resultados de nuestras investigaciones demuestran que el agua utilizada para el riego de olivares en las provincias de Jaén y Sevilla contiene niveles cuantificables de propágulos de *V. dahliae*, tanto si proviene de una fuente subterránea (pozo) como si es agua superficial embalsada de origen en el río Guadalquivir. Propágulos de *V. dahliae* de diferentes tamaños, esclerocios iguales o superiores a  $20 \mu\text{m}$  y micropropágulos inferiores a  $20 \mu\text{m}$  e iguales o superio-

res a 1,2  $\mu\text{m}$ , fueron aislados de la misma o de distintas muestras de agua infestada. En general, se cuantificaron niveles mucho más elevados de micropropágulos que de esclerocios y la detección promedio de los primeros fue mayor en las muestras de agua recolectadas a finales de invierno que en las de primavera.

Los estudios desarrollados se han realizado en Andalucía, que es la Comunidad Autónoma española donde se concentra el 60% de la superficie nacional de olivar y el 80% de la producción (ANÓNIMO, 2004). Así mismo, se han elegido para efectuar las prospecciones del agua de riego las dos provincias de Andalucía con mayor extensión de olivar en regadío y que se encuentran entre las tres provincias de esta región con mayor superficie dedicada al olivar. El 31,4% de 572.674 ha y el 27,1% de 200.483 ha de olivar en las provincias de Jaén y Sevilla, respectivamente, están cultivadas en regadío, con un total de 234.338 ha que representan el 73,8% de la superficie andaluza de olivar en regadío en el año 2004 (ANÓNIMO, 2006). Adicionalmente, se han elegido zonas de cultivo que nos han permitido explorar los dos tipos de agua comúnmente utilizados para el riego de olivar, esto es, agua subterránea procedente de pozos (24% del agua de riego) y agua superficial (70,5% del agua de riego) procedente del río Guadalquivir que abastece la Cuenca Hidrográfica más importante de Andalucía (PASTOR MUÑOZ-COBO, 2005).

En estas investigaciones se han detectado y cuantificado por separado propágulos de *V. dahliae* de diferente tamaño presentes en el agua de riego: los esclerocios, que son las principales estructuras de supervivencia del hongo en el suelo (WILHELM, 1955); y propágulos de pequeño tamaño, compuestos posiblemente en su mayoría por conidias de corta longevidad en condiciones desfavorables (GALANOPUOLOS y TRIBE, 1974; SCHREIBER y GREEN, 1962; GREEN, 1969), pero que también podrían comprender fragmentos de micelio o de esclerocios. El tamaño de poro (20  $\mu\text{m}$ ) del filtro de malla de nailon utiliza-

do nos debe haber permitido concentrar y cuantificar una proporción extremadamente elevada de los esclerocios de *V. dahliae* presentes en las muestras de agua analizadas, superior incluso a la proporción de las poblaciones del patógeno en el suelo que se estima por el método del tamizado húmedo (HUISMAN y ASHWORTH, 1974), que cuantifica los esclerocios comprendidos entre 125 y 37  $\mu\text{m}$ . De acuerdo con HAWKE y LAZAROVITS (1994), el filtro de 20  $\mu\text{m}$  nos habría permitido además cuantificar la fracción de esclerocios con mayor capacidad germinativa y de supervivencia y, por lo tanto, con mayor potencial para causar infecciones. Análogamente, para retener y cuantificar los micropropágulos de *V. dahliae* de tamaño inferior a 20  $\mu\text{m}$  hemos utilizado un filtro de 1,2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro considerando, de acuerdo con la información disponible, que las dimensiones de las conidias no son inferiores a 1,4  $\mu\text{m}$  (HAWKSWORTH y TALBOYS, 1970; SMITH, 1965).

La aparente falta de consistencia observada en la detección de *V. dahliae* en el agua de riego entre las prospecciones realizadas en 2004 y 2005, y especialmente en los resultados obtenidos en los 11 campos incluidos en ambos años de estudio, podrían justificarse en gran parte por las diferencias en la cantidad de agua analizada por muestra en cada año, que fue de 0,5 y 0,02 L en 2004 y de 1000 y 1-10 L en 2005, para la recuperación de esclerocios y micropropágulos, respectivamente. Ello, unido a los niveles relativamente bajos de las poblaciones de *V. dahliae* presentes en el agua de riego, puestos de manifiesto en el año 2005, debió reducir extremadamente la posibilidad de aislar al patógeno en 2004. Se debe considerar también que, aunque las muestras de agua procedieran del mismo pozo o balsa, el agua fue renovada no solo entre los dos años de prospecciones, sino también entre muestreos realizados en el mismo año, en particular cuando el agua estaba embalsada y, por consiguiente, el agua muestreada pudo encontrarse en estados de infestación diferentes, como se confirma por los resultados obtenidos en

el curso de estas investigaciones.

Las cantidades de esclerocios estimadas en las muestras de agua de riego analizadas en el año 2005 estuvieron en todos los casos, excepto en uno de los muestreos del campo C25-05 (Marchena, Sevilla), próximas al umbral de detección del método analítico utilizado lo que, muy posiblemente, limitó la detección de esclerocios en muchas de las muestras analizadas. En cualquier caso, nuestros resultados parecen indicar que en el primer muestreo de invierno realizado en cada una de las dos provincias prospectadas, el agua de riego infestada contenía predominantemente esclerocios en la mayoría de los campos, mientras que en el siguiente muestreo llevado a cabo a finales de invierno (Sevilla) o principios de primavera (Jaén) hubo un incremento moderado (Jaén) o muy elevado (Sevilla) en el porcentaje de campos con micropropágulos, al que siguió una reducción en dicho porcentaje en los restantes muestreos de primavera. Por el contrario, la presencia y cantidad de esclerocios en el agua de riego no pareció seguir ningún patrón temporal identificable. Los esclerocios podrían haber llegado al agua de riego libres o inmersos en restos de plantas infectadas, arrastrados por el agua de escorrentía o sobrante de riego (EASTON *et al.*, 1969) hasta el río o, a través de los intersticios del suelo, hasta las capas subterráneas de agua, y/o podrían haber sido transportados por el viento junto con las partículas de suelo (EASTON *et al.*, 1969) o adheridos a útiles de riego (gomas, cubos y botas entre otros) hasta el río, los pozos y las balsas. En condiciones nutricionales adecuadas o de temperaturas favorables en el agua, los esclerocios podrían germinar originando micropropágulos (principalmente conidias) de escasa persistencia comparada con la de los esclerocios (GALANOPOULOS y TRIBE, 1974; GREEN, 1969; SCHREIBER y GREEN, 1962).

La presencia de propágulos de *V. dahliae* en el agua utilizada para el riego del 85,7% de los campos de olivar prospectados en Jaén y Sevilla indica que el agua de riego es un vehículo eficiente de dispersión del inóculo

del hongo en estas provincias. Esta dispersión podría ocurrir a cortas y largas distancias, y podría servir para introducir al patógeno en áreas de cultivo o campos libres del mismo, así como para incrementar la densidad de inóculo de *V. dahliae* en suelos previamente infestados. Por consiguiente, el agua de riego infestada por *V. dahliae* probablemente está contribuyendo a aumentar la densidad de inóculo primario del patógeno en el suelo, que da lugar al desarrollo de las epidemias, y puede haber sido uno de los principales factores que han ayudado a incrementar los ataques de Verticilosis observados en los últimos años en Andalucía. La detección de este patógeno en el agua de riego, y especialmente en el agua superficial embalsada procedente del río Guadalquivir, podría tener importantes connotaciones epidemiológicas por la extensa utilización de este agua para el riego de diferentes cultivos en Andalucía y la amplia gama de plantas huéspedes de *V. dahliae* (PEGG y BRADY, 2002). Asimismo, la infestación del agua subterránea también es de gran significación para la sanidad de los cultivos considerando la interrelación entre las fuentes subterráneas y superficiales de aguas.

La relevancia de la presencia de *V. dahliae* en el agua de riego puesta de manifiesto en nuestras investigaciones está supeditada a la capacidad de sus poblaciones en el agua de causar enfermedad en olivo u otros huéspedes. Por ello, es necesario estudiar la patogenicidad y virulencia de dichas poblaciones, que es una línea de trabajo que estamos llevando a cabo en estos momentos, para adoptar decisiones en relación a: 1) aconsejar a los agricultores que se abstengan de utilizar aguas infestadas con *V. dahliae* para el riego no sólo de olivar sino también de otros cultivos susceptibles al patógeno; y, 2) dirigir nuestras investigaciones futuras a la búsqueda de medidas de control convenientes y eficientes para erradicar o reducir la cantidad de inóculo de *V. dahliae* presente en el agua de riego, en el caso de que fuese necesario utilizar este agua. En tanto no se conozcan las variantes patogénicas de *V. dahliae* pre-

senten en el agua de riego, se deben utilizar todas las medidas preventivas posibles para evitar la infestación del agua de riego, tales como: mantener los pozos y las balsas de almacenamiento tapados el máximo tiempo posible para evitar la llegada de partículas de polvo, en particular cuando estén situados en lugares transitados frecuentemente por vehículos o con movimiento de suelo; realizar una limpieza exhaustiva de la balsa con productos desinfectantes tras un periodo de desuso; mantener el agua limpia de restos vegetales; y evitar introducir en el agua todo tipo de utensilios (cubos, gomas, etc., incluidas las botas de los operarios) que contengan suelo o restos de plantas, o en su caso, desinfectarlos antes de usarlos.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido financiada por el proyecto CAOD.03-3. Los autores quieren agradecer a D. Francisco Vico Baena la asistencia técnica en el desarrollo de los trabajos, y a los propietarios de los campos experimentales utilizados en este estudio y a la Comunidad de Regantes Nuestra Señora de los Dolores (Arjona, Jaén), por la colaboración que han prestado desinteresadamente. Durante el desarrollo de dichas investigaciones, la Dra. Dolores Rodríguez Jurado disfrutaba de un contrato INIA-CCAA para realizar sus actividades de investigación en el IFAPA Centro "Alameda del Obispo" (Córdoba), CICE, Junta de Andalucía.

## ABSTRACT

RODRÍGUEZ-JURADO D., J. BEJARANO-ALCÁZAR. 2007. Dispersion of *Verticillium dahliae* in irrigation water used in olive orchards in Andalucía, southern Spain. *Bol. San. Veg. Plagas*, **33**: 547-562.

The increment in severity of *Verticillium* wilt epidemics of olive trees has been associated with the establishment of irrigation in new and traditional olive orchards in Andalucía. Irrigation water can influence *Verticillium* wilt of olive (VO) by means of the dispersal of propagules of *Verticillium dahliae*. Therefore, the objectives of this research work were to determine and quantify the presence of *V. dahliae* in the irrigation water used in olive orchards in Andalucía, and to study the variation in the level of the pathogen populations over time during the irrigation season. Disease surveys were carried out in 33 olive orchards affected by *Verticillium* wilt at the Jaén and Sevilla provinces in 2004 (5 and 18 fields, respectively) and 2005 (7 and 14 fields, respectively), with 11 of the fields being prospected in both years. In each field, 2-8 irrigation water samples of 0.5 L obtained from March to July in 2004 and 3-4 samples of 1000 L of water collected from February to April in 2005 were analysed. *V. dahliae* was isolated only of the water samples analysed in 2005. The pathogen was recovered of irrigation water in 85.7% of the olive orchards surveyed in each province, representing 87.5 and 80% of total of fields irrigated with subterranean water from wells and dammed up superficial water from the Guadalquivir river, respectively. Subterranean and superficial irrigation water in both provinces were infested by propagules of *V. dahliae*, which were differentiated because of their size in sclerotia ( $\geq 20 \mu\text{m}$ ) and micropropagules ( $< 20$  y  $\geq 1.2 \mu\text{m}$ ). The micropropagules were recovered from irrigation water in a higher percentage of fields that used infested water (78%) and in higher average levels (3158.9 micropropagules/1000 L) than sclerotia were (44% y 1.5 sclerotia/1000 L, respectively). Within the olive orchards irrigated with water infested by *V. dahliae*, the incidence of fields with water contaminated by sclerotia varied from 0 to 33% through the irrigation season and did not show any recognizable pattern over time, while the percentage of fields with water infested by micropropagules reached a maximum of 33% in Jaén and of 75% in Sevilla in the second and first fortnight of March, respectively, and decreased progressively through the spring samplings.

**Key words:** *Verticillium* wilt, olive, inoculum source, epidemiology, control.

## REFERENCIAS

- AL-AHMAD, M. A., MOSLI, M. N. 1993. Verticillium wilt of olive in Syria. *Bull. OEPP/EPPPO Bull.*, **23**: 521-529.
- ANÓNIMO. 2004. Anuario de Estadística Agroalimentaria 2004. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- ANÓNIMO. 2006. Anuario Estadístico de Andalucía 2006. Instituto de Estadística de Andalucía.
- ARBOGAST, M., POWELSON, M. L., CAPPAERT, M. R., WATRUD, L. S. 1999. Response of six potato cultivars to amount of applied water and *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, **89**: 782-788.
- ASHWORTH, L. J., JR., ZIMMERMAN, G. 1976. Verticillium wilt of the pistachio nut tree: occurrence in California and control by soil fumigation. *Phytopathology*, **66**: 1449-1451.
- ASHWORTH, L. J., JR., WATERS, J. E., GEORGE, A. G., MCCUTCHEON, O. D. 1972. Assessment of microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* in field soils. *Phytopathology*, **62**: 715-719.
- BEJARANO-ALCÁZAR, J. 2005a. Control de la Verticilosis del olivo mediante la aplicación de enmiendas orgánicas. *Oleo*, **106**: 40-51.
- BEJARANO-ALCÁZAR, J. 2005b. Problemática fitosanitaria en la olivicultura de regadío. En: Cultivo del Olivo con Riego Localizado. Pastor Muñoz-Cobo, M (ed.). Junta de Andalucía y Mundi-Prensa (España). Pp. 663-710.
- BEJARANO-ALCÁZAR, J., BLANCO-LÓPEZ, M. A., MELERO-VARA, J., JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. 1996. Etiology, importance and distribution of Verticillium wilt of cotton in southern Spain. *Plant Dis.*, **80**: 1233-1238.
- BEJARANO-ALCÁZAR, J., PÉREZ-ARTÉS, E., 2002. Importancia de la Verticilosis del agodonero y distribución de patotipos de *Verticillium dahliae* en Andalucía. Resúmenes XI Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, Almería: 219.
- BLANCO-LÓPEZ, M. A., JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M., CABALLERO, J. M. 1984. Symptomatology, incidence and distribution of Verticillium wilt of olive trees in Andalucía. *Phytopathol. Mediterr.*, **23**: 1-8.
- BUTTERFIELD, E. J., DEVAY, J. E. 1977. Reassessment of soil assays for *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, **67**: 1073-1078.
- CABALLERO, J. M., PÉREZ-HERNÁNDEZ, J., BLANCO-LÓPEZ, M. A., JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. 1980. Olive, a new host of *Verticillium dahliae* Kleb. in Spain. Proceeding 5<sup>th</sup> Congress of the Mediterranean Phytopathological Union: 50-52.
- CIRULLI, M. 1981. Attuali cognizioni sulla Verticilliosi dell'olivo. *Informatore Fitopatologico*, **31**: 101-105.
- EASTON, G. D., NAGLE, M. E., BAILEY, D. L. 1969. A method of estimating *Verticillium albo-atrum* propagules in field soil and irrigation waste water. *Phytopathology*, **59**: 1171-1172.
- GALANPOULOS, N., TRIBE, H. T. 1974. Conidial survival in *Verticillium dahliae*. *Transactions of the British Mycological Society*, **63**: 85-91.
- GREEN, R. J., JR. 1960. The survival of *Verticillium albo-atrum* in muck soils. *Phytopathology*, **50**: 637.
- GREEN, R. J., JR. 1969. Survival and inoculum potential of conidia and microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* in soil. *Phytopathology*, **59**: 874-876.
- HARRINGTON, M. A., DOBINSON, K. F. 2000. Influences of cropping practices on *Verticillium dahliae* populations in commercial processing tomato fields in Ontario. *Phytopathology*, **90**: 1011-1017.
- HAWKE, M. A., LAZAROVITS, G. 1994. Production and manipulation of individual microsclerotia of *Verticillium dahliae* for use in studies of survival. *Phytopathology*, **84**: 883-890.
- HAWKSWORTH, D. L., TALBOYS, P. W. 1970. *Verticillium dahliae*. Commonwealth Mycological Institute. Description of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 256.
- HUISMAN, O. C., ASHWORTH, L. J., JR. 1974. Quantitative assessment of *Verticillium albo-atrum* in field soils: procedural and substrate improvements. *Phytopathology*, **64**: 1043-1044.
- HUISMAN, O. C., GRIMES, W. D. 1989. Cultural practices: the effect of planting density and irrigation regimes on Verticillium wilt of cotton. En: Vascular Wilt Diseases of Plants. Basic Studies and Control. Tjamos, E.J., Beckman, C.H. (eds.). NATO ASI Series H: Cell Biology 28. Pp. 537-541.
- JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M., MERCADO-BLANCO, J., OLIVARES-GARCÍA, C., COLLADO-ROMERO, M., BEJARANO-ALCÁZAR, J., RODRÍGUEZ-JURADO, D., GIMÉNEZ-JAIME, A., GARCÍA-JIMÉNEZ, J., ARMENGOL, J. 2006. Genetic and virulence diversity in *Verticillium dahliae* populations infecting artichoke in eastern-central Spain. *Phytopathology*, **96**: 288-298.
- JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M., TJAMOS, E. C., CIRULLI, M. 1998. Olive. En: A Compendium of Verticillium wilts in tree species. Hiemstra, J.A., Harris, D.C. (eds.). Ponsen and Looijen, The Netherlands. Pp. 13-16.
- LEVIN, A. G., LAVÉE, S., TSBOR (LAHKIM), L. 2003. Epidemiology of *Verticillium dahliae* on olive (cv. Picual) and its effect on yield under saline conditions. *Plant Pathol.*, **52**: 212-218.
- LÓPEZ-ESCUADERO, F. J., DEL RÍO C., CABALLERO, J. M., BLANCO-LÓPEZ, M. A. 2004. Evaluation of olive cultivars for resistance to *Verticillium dahliae*. *Eur J. of Plant Pathol.*, **110**: 79-85.
- MERCADO-BLANCO, J., RODRÍGUEZ-JURADO, D., PARRILLA-ARAUJO, S., JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. 2003. Simultaneous detection of the defoliating and nondefoliating *Verticillium dahliae* patotypes in infected olive plants by duplex, nested polymerase chain reaction. *Plant Dis.*, **87**: 1487-1494.
- PASTOR MUÑOZ-COBO, M. 2005. Cultivo del Olivo con Riego Localizado. Junta de Andalucía y Mundi-Prensa. 783 pp.
- PEGG, G. F., BRADY, B. L. 2002. Verticillium wilts. CABI Publishing, Wallingford, UK. 552 pp.
- RODRÍGUEZ, E., GARCÍA-GARRIDO, J. M., OCAMPO, J. A., CAMPOS, M. 2004. Resultados preliminares sobre la Verticilosis del olivo en la provincia de Granada. Resúmenes XII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, Lloret de Mar (Gerona): 209.
- RODRÍGUEZ-JURADO, D. 1993. Interacciones huésped parásito en la Verticilosis del olivo (*Olea europea*

- L.) inducida por *Verticillium dahliae* Kleb. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- RODRÍGUEZ-JURADO, D., BLANCO LÓPEZ, M. A., RAPOP-PORT, H. F., JIMÉNEZ DÍAZ, R. M. 1993. Present status of *Verticillium* wilt of olive in Andalucía (southern Spain). *Bull. OEPP/EPPPO Bull.*, **23**: 513-516.
- RUGGIERI, G. 1948. Ricerche ed esperienze su una tracheovorticilliosi dell'olivo. *Olivicoltura*, **3**: 6-9.
- SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, M. E., RUIZ-DÁVILA, A., PÉREZ DE ALGABA, A., BLANCO-LÓPEZ, M. A., TRAPEROCASAS, A. 1998. Occurrence and etiology of death of young olive trees in southern Spain. *Eur. J. of Plant Pathol.*, **104**: 347-357.
- SCHNATHORST, W. C., SIBBETT, G. S. 1971. The relation of strains of *Verticillium albo-atrum* to severity of *Verticillium* wilt in *Gossypium hirsutum* and *Olea europea* in California. *Plant Dis. Repor.*, **55**: 780-782.
- SCHREIBER, L. R., GREEN, R. J., JR. 1962. Comparative survival of mycelium, conidia and microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* in mineral soil. *Phytopathology*, **52**: 288-289.
- SERRHINI, M. N., ZEROUAL, A. 1995. La Verticilosis del olivo en Marruecos. *Olivae*, **58**: 58-61.
- SMITH, H. C. 1965. The morphology of *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae* and *V. tricorpus*. *N.Z.J. Agric. Res.*, **8**: 450-478.
- SMITH, V. L., ROWE, R. C. 1984. Characteristics and distribution of propagules of *Verticillium dahliae* in Ohio potato field soils and assessment of two assay methods. *Phytopathology*, **74**: 553-556.
- THANASSOULOPOULOS, C. C., BIRIS, D. A., TJAMOS, E. C. 1979. Survey of *Verticillium* wilt of olive trees in Greece. *Plant Dis. Repor.*, **63**: 936-940.
- THANASSOULOPOULOS, C. C., BIRIS, D. A., TJAMOS, E. C. 1980. Dissemination of *Verticillium* propagules in olive orchards by irrigation water. Proceedings 5<sup>th</sup> Congress of The Mediterranean Phytopathological Union, Patras (Grecia): 52-53.
- WILHELM, S. 1955. Longevity of the *Verticillium* wilt fungus in the laboratory and field. *Phytopathology*, **45**: 180-181.
- XIAO, C. L., SUBBARAO, K. V. 2000. Effects of irrigation and *Verticillium dahliae* on cauliflower root and shoot growth dynamics. *Phytopathology*, **90**: 995-1004.

(Recepción: 13 noviembre 2007)

(Aceptación: 24 noviembre 2007)