

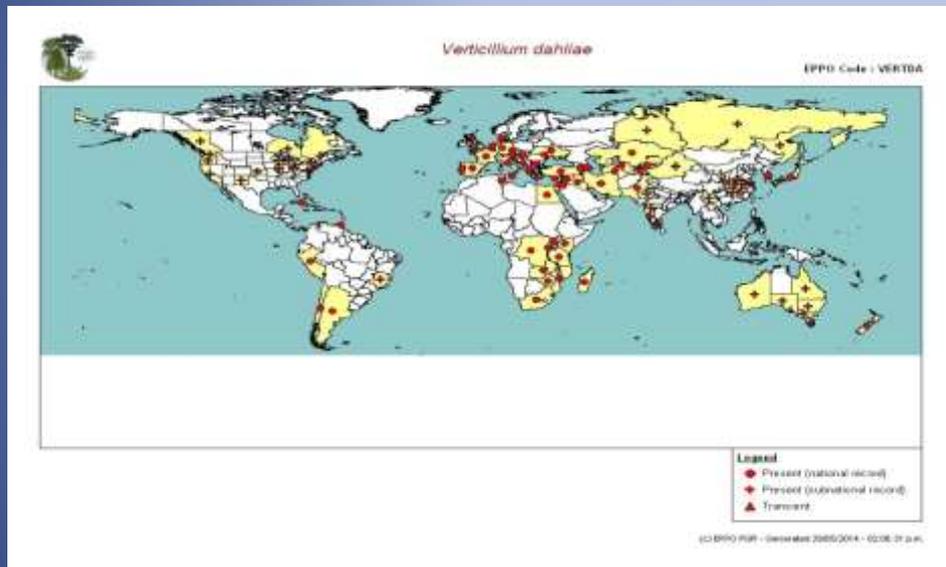


Caracterización del patotipo de
Verticillium dahliae de olivo con
síntomas de Rama Seca

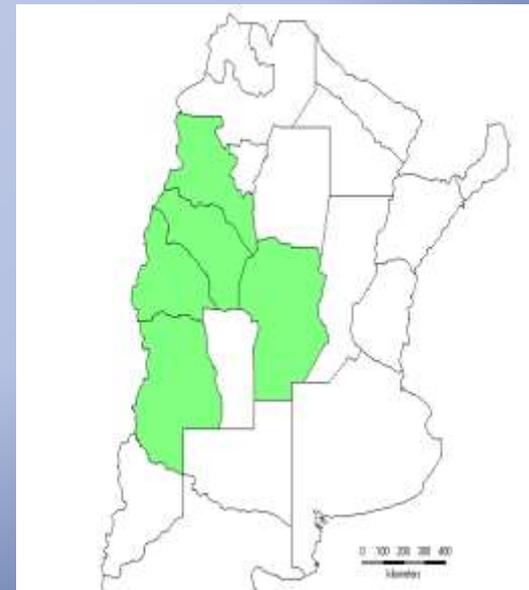
Dra. M. Laura Otero

- ✓ El cultivo del olivo incrementó su importancia, fomentado por la Ley de diferimiento impositivo según ley N° 22.021 provincias: La Rioja, Catamarca, San Juan, Norte de Mendoza y Córdoba.
- ✓ Alcanza actualmente las 102.000 has.
- ✓ Plantaciones tradicionales y modernas (alta densidad, riego por goteo etc.)

- La Verticilosis, “parálisis parcial” o pardeo es una de las enfermedades fúngicas más importantes del olivo, se encuentra difundida en los principales países cultivados

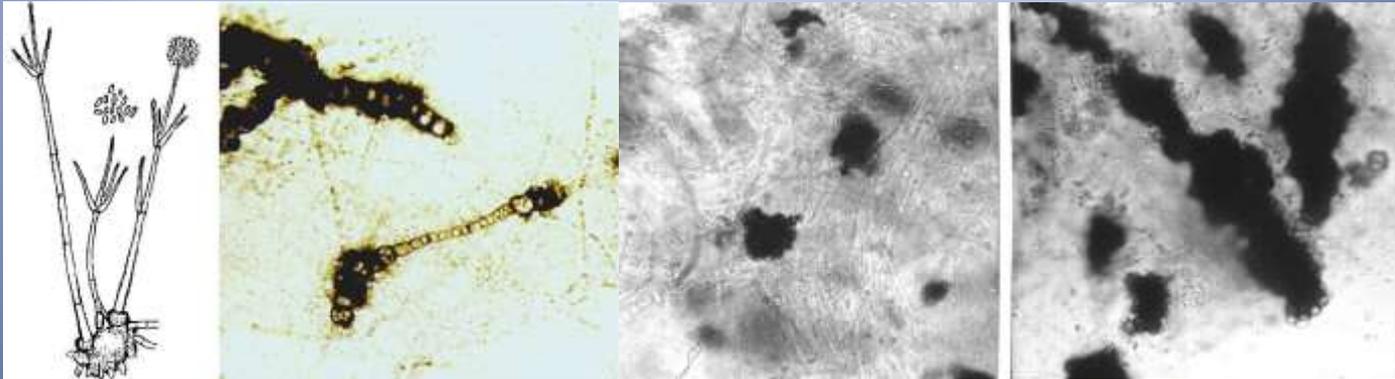


- Fue identificada por primera vez en en el noroeste cordobés (Docampo et al., 1981)
- En Argentina se encuentra en la provincias de Córdoba, La Rioja, Catamarca, Mendoza y San Juan.



Verticilosis del olivo

- ✓ Agente causal: *Verticillium dahliae* kleb
- ✓ Produce conidios hialinos, oblongos, conidióforos dispuestos en verticilos.
- ✓ Formas de resistencia: microesclerocios.



✓ Síntomas: las hojas se tornan castañas, se abarquillan y quedan adheridas a las ramas.

✓ Es un hongo vascular

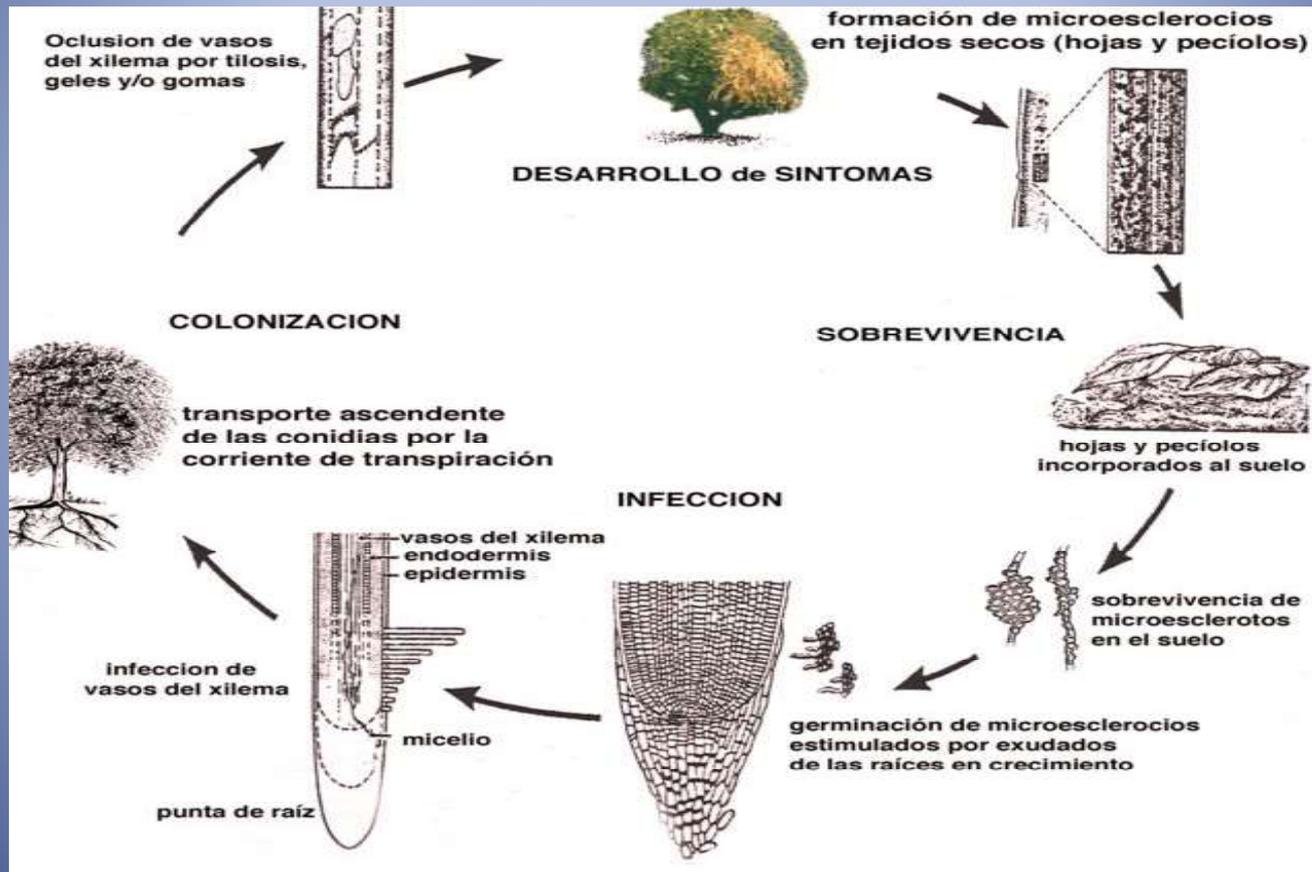


✓ Evolucionan por sectores de la planta, produciendo la necrosis de ramas hasta producirse la muerte del árbol.

✓ Puede manifestarse como síndrome de "decaimiento lento" y apoplejía

✓ Aparece a comienzos de la primavera.

Ciclo de la enfermedad



Formas de dispersión del hongo

MICROESCLEROCIOS



```
graph TD; A([MICROESCLEROCIOS]) --> B[➤ Restos de tejidos infectados (ramas, hojas secas)]; A --> C[➤ Empleo de plantines infectados]; A --> D[➤ Empleo de suelos contaminados]; A --> E[➤ A través del agua de riego]; A --> F[➤ Viento, herramientas de labranza, etc.]
```

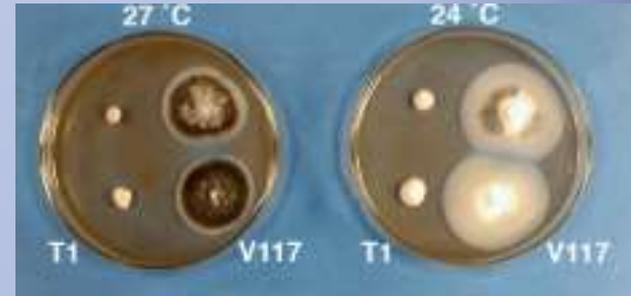
- Restos de tejidos infectados (ramas, hojas secas)
- Empleo de plantines infectados
- Empleo de suelos contaminados
- A través del agua de riego
- Viento, herramientas de labranza, etc.

Factores que afectan la enfermedad

- ✓ Densidad de inóculo del hongo en suelo
- ✓ Virulencia del aislamiento del hongo
- ✓ Susceptibilidad del cultivar
- ✓ Manejo
- ✓ Condiciones climáticas
- ✓ Cultivo antecesor susceptible (algodón etc.)
- ✓ Tipo de suelo etc.

✓ Diferencia razas o patotipos :

- Razas no defoliantes o SS-4: manchas cloróticas, necróticas del algodón. En olivo producen marchitez y necrosis parcial de las ramas.
- Razas defoliantes o T1: provocan la defoliación total del algodón y muerte de los olivos con rapidez.



Determinación de la severidad de los aislamientos

- **Razas defoliantes o T1:** provocan la defoliación total del algodón y muerte de los olivos con rapidez.
- **Razas no defoliantes o SS-4:** manchas cloróticas, necróticas del algodón. En olivo producen marchitez y necrosis parcial de las ramas.

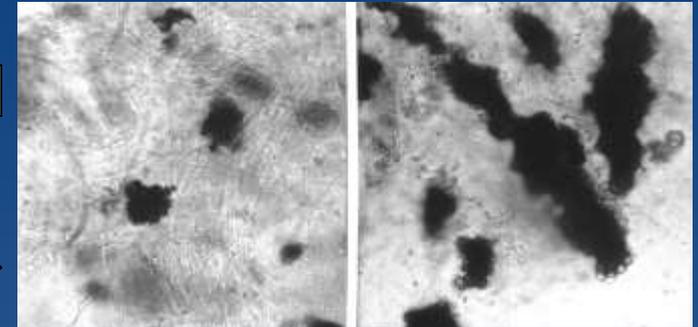
Caracterización de los aislamientos

C
A
R
A
C
T
E
R
I
Z
A
C
I
O
N

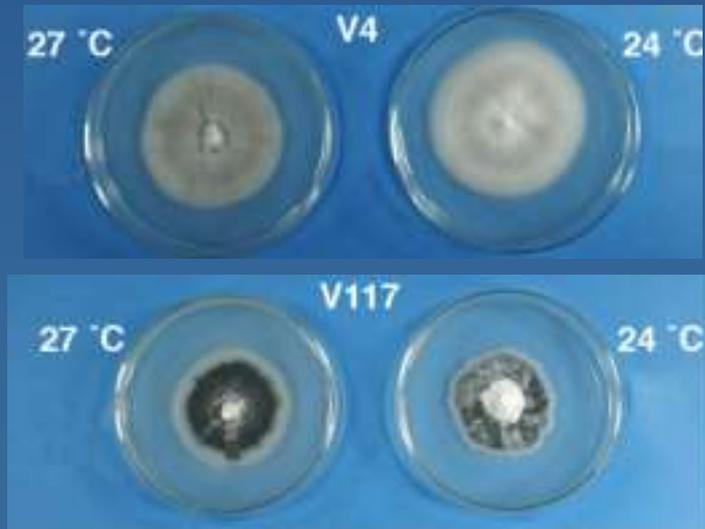
Hospedantes diferenciales



Morfología de los esclerocios



Temperaturas óptimas de crecimiento



Desarrollo en APG-sanguinarina



Diagnóstico de la enfermedad

- ✓ Métodos microbiológicos
- ✓ Métodos moleculares: PCR

Aislamiento

Ramas de 20-30 cm sintomáticas de la enfermedad son desinfectadas.

Se toman pequeñas virutas de madera que se siembran en medios selectivos e incuban

a 25 C y en oscuridad.

La estructura del hongo que se observa son los microesclerocios.

✓ Dificultad: restringido a una época del año principalmente en primavera hasta otoño.



Detección en suelo

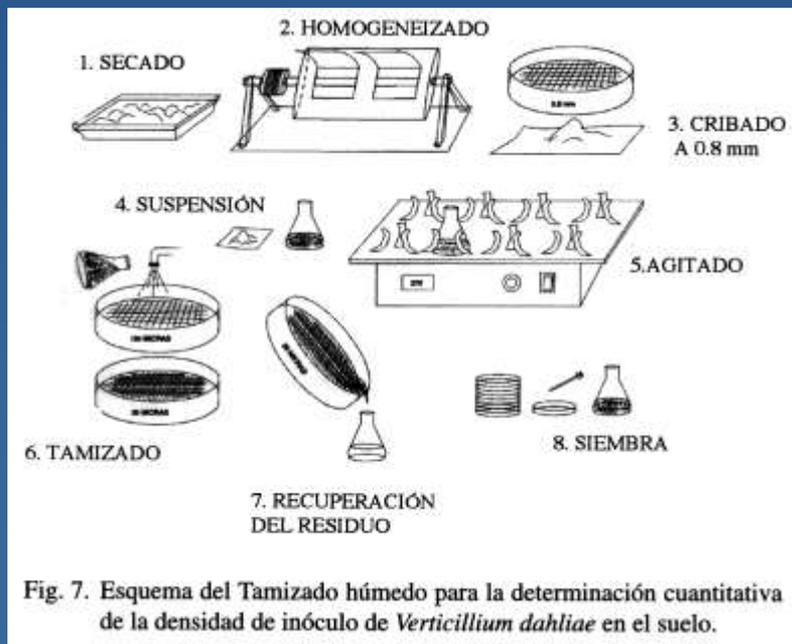
- ✓ A través del método de filtrado húmedo se obtuvieron colonias y se determinó la densidad de inóculo presente en suelo.
- ✓ En suelos de la pcia de La Rioja se determinaron concentraciones de inóculo de **valores de entre 0,4 y 4,8 ppg (propágulos por gramo de suelo) para Capital y 0,4 a 6,4 para Aimogasta.**
- ✓ Resulta de interés a la hora de evaluar la efectividad de métodos de control o para realizar análisis previos a la plantación y poder determinar predicciones de riesgo.
- ✓ Se preveé implementar la técnica de PCR para muestras de suelo.



Aislamientos obtenido desde suelo

Método Filtrado húmedo

- En general para densidades de inóculo bajas.
- Prepara una suspensión de suelo y se filtra mediante zarandas de 125 y 37 μm



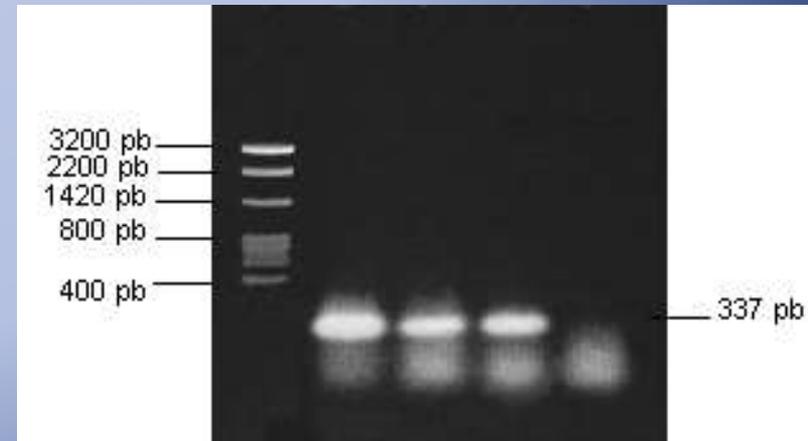
PCR en tejidos de olivo infectados

Extracción del DNA de la planta

Reactivos de la reacción:
Iniciadores ITS1-ITS2,
Buffer, MgCl₂, dNTP's,
Taq DNA polimerasa

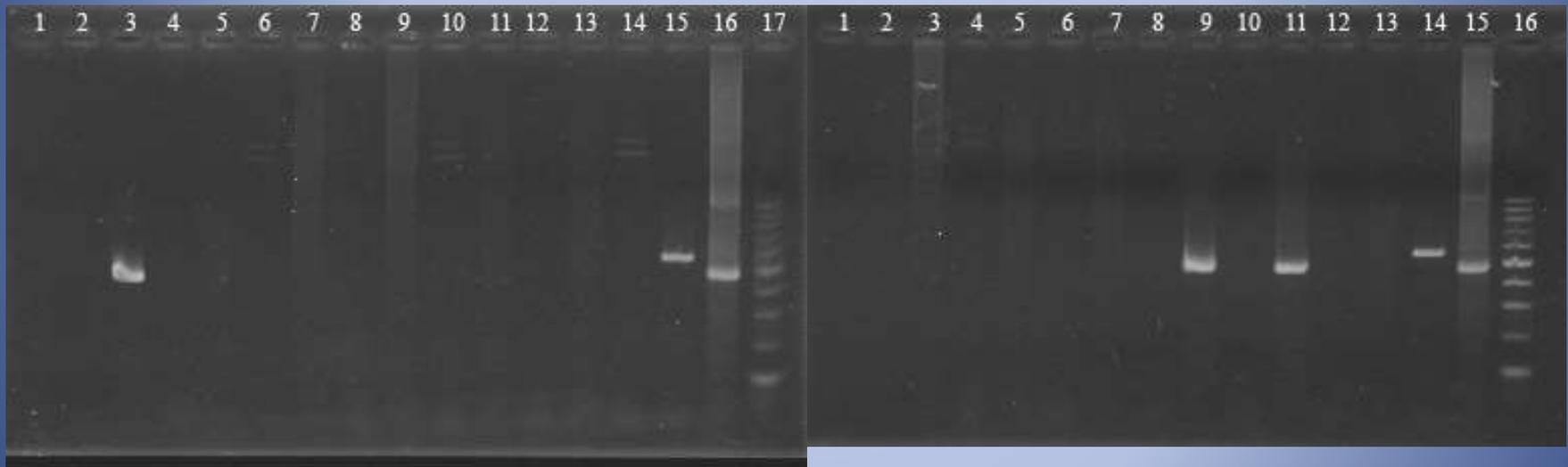


- Desnaturalización 95 °C 1 min.
- Desnaturalización 95 °C 1 min.
- Hibridación 60 °C 1 min.
- Elongación 72 °C 1 min.
- Elongación 72 °C 5 min.



Detección de las cepas del hongo en muestras vegetales mediante PCR anidado

- ✓ Cebadores específicos para razas



- Muestras positivas: muestras 2 , 8, 9 del ensayo en Catinzaco
- Bandas específicas: 548 pb y 462 pb

- Actualmente se cuenta con una colección de aislamientos, los que han sido caracterizados mediante las pruebas de hospedantes diferenciales y pruebas *in vitro* identificándose como “no defoliantes”
- La cepa defoliante o T1 en muestras ha sido detectada recientemente en el país.

Situación a campo



Síndrome de la “rama seca” en La Rioja

➤ No presenta síntomas específicos :

Marchitamiento generalizado en hojas, con o sin amarillento, defoliación que puede conducir a la muerte de la planta.

Agentes asociados:

- ✓ *Fusarium solani*,
- ✓ *F. acuminatum*, *F. equiseti*,
- ✓ *F. moliniforme* . *F. roseum*.
- ✓ *Phytophthora sp.* *Pythium sp.*
- ✓ *Rizoctonia solani*,
- ✓ *Sclerotinia bataticola*,
- ✓ *Verticillium dahliae*.

➤ Se determinaron *Fusarium solani*, *Pythium aphanidermatum*, *P. rostratum* y *P. sylvaticum*



¿Cómo diferenciar Verticilosis de rama seca?

VERTICILOSIS

- Plantas jóvenes la marchitez es generalizada.
- Plantas adultas la marchitez es sectorial
- Aparición del síntoma: a partir de los 2 años de plantación, en individuos aislados
- No hay pudrición de raíces
- Coloración rojiza o “púrpura” de las ramas y coloración castaña en los vasos



RAMA SECA

Marchitez generalizada en toda la copa.

- Daños en el sistema radicular:
- Podredumbres de raíces

✓ *Importancia de un DIAGNÓSTICO ESPECÍFICO*

Sintomatología asociada a la “Rama seca” en olivares tradicionales

✓ Ley de emergencia sanitaria N° 9489



- ✓ Se realizó un muestreo en forma conjunta por SENASA-INTA y se analizaron muestras mediante pruebas serológicas y moleculares
- ✓ Se confirmó la presencia de *Xylella fastidiosa* en muestras de olivo sintomáticos en los dtos de Arauco , Milla Mazán y San Blas (pcia de La Rioja)
- ✓ Transmisión mediante hemípteros (Cicadellidae) alimentadores de xilema (“chicharritas”).
- ✓ Serán necesarias investigaciones para determinar si hay otros hongos asociados

Monitoreos en el Dto. Arauco (La Rioja) Síntomas de marchitez

Semejantes a la verticilosis del olivo



Otros síntomas



Secciones transversales de troncos



En ramas y frutos



En rebrotes

Patógenos involucrados:

- *Verticillium dahliae*
- *Phaeoacremonium* spp.
- *Phaeoconiella clamydospora*
- *Neofusicoccum parvum*
- *Pleurostomophora richardsiae*

✓ Serán necesarias investigaciones para determinar si hay otros hongos asociados

Ing. Agr. Mauro Paccioretti



Selección de genotipos de olivo de comportamiento promisorio frente a *Verticillium dahliae* Kleb. en olivares de la provincia de Córdoba

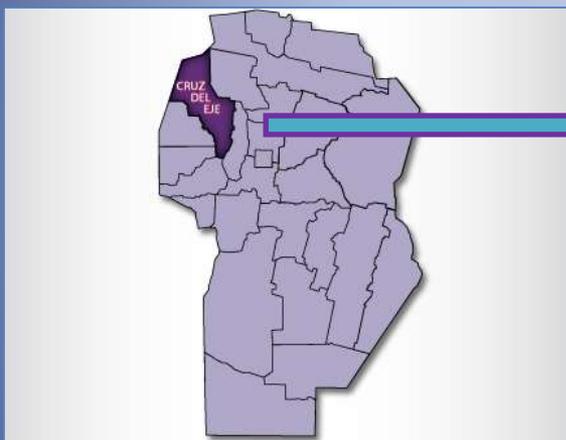
- ✓ **Seleccionar genotipos de olivo de comportamiento promisorio frente a *V. dahliae*.**
- ✓ **Evaluar el comportamiento de genotipos promisorios de olivo frente a inoculaciones artificiales de *V. dahliae*.**
- ✓ **Caracterizar mediante microsatélites genotipos de comportamiento promisorio frente a *V. dahliae*.**

R.Jorge Taborda, L. Torres, V. Gonzalez , M. Paccioretti.



Prospección en huertos de la región noroeste de la provincia de Córdoba y recolección de muestras

Cinco fincas comerciales de olivo próximos a las localidades de Media Naranja, Las Playas, Paso Viejo y Guanaco Muerto, pertenecientes al departamento Cruz del Eje de la provincia de Córdoba.



Manejo tradicional y composición varietal heterogénea. La presencia del hongo fue constatada previamente por Docampo *et al.*, (1981) y se observan plantas con síntomas característicos de la enfermedad.

Prospección en huertos de la región noroeste de la provincia de Córdoba y recolección de muestras (Octubre de 2013)

En huertos con plantas infectadas se individualizaron genotipos promisorios, asintomáticos o con síntomas poco severos, considerados pertenecientes a los cultivares Arauco, Arbequina, Manzanilla, Manzanilla Gigante, Frantoio, Farga y Nevadillo.



Ejemplar promisorio establecimiento Las Playas.



Estacas en proceso de enraizamiento Vivero san Gabriel, La Rioja.



INTA

Material seleccionado

Plantas de dos años de edad obtenidas a partir de estacas semileñosas de genotipos de comportamiento promisorio:

Variedades seleccionadas

- Farga Las Playas
- Farga Romero
- Frantoio 4 Soles
- Manzanilla Gigante

- Oblonga FCA: Tolerante
- Arauco (vivero La Rioja): Susceptible

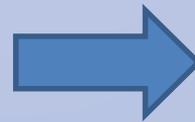


- ✓ Inoculación de los plantines fueron sumergidas en la suspensión de conidios a una concentración de 1×10^7 conidias/ml durante 30 minutos.



Inoculación de plantas

- ✓ Las plantas inoculadas se colocaron en cámara de ambiente controlado (25 ± 4 °C) y se observa la evolución de los síntomas según escala de síntomas de 0 a 4 de acuerdo al porcentaje de follaje afectado durante 10 semanas.



Por qué es una enfermedad de difícil control?

- ✓ **Prolongada supervivencia del hongo en el suelo mediante microesclerocios**
- ✓ **Amplia gama de plantas cultivadas y no cultivadas susceptibles a la infección**
- ✓ **Variabilidad genética y patogénica en la población del patógeno**
- ✓ **Crecimiento del hongo confinado en el xilema durante la fase parasítica**
- ✓ **Medios de dispersión de las estructuras del patógeno**

Estrategias de control

Preventivos

establecimiento en suelos libres del patógeno
Utilización de material de plantación libre
Empleo de cultivares tolerantes

Métodos culturales

Desinfección de herramientas,
no establecer cultivos intercalares,
Control de malezas,
reducción de laboreos,
Control de dosis de riego,
Abonado equilibrado,
Destrucción de restos infectados,
Control de malezas de hoja ancha

Físicos o Químicos

✓ Solarización individual de árboles
✓ Control químico: escala o nula eficacia
Bromuro de metilo,
cloropicrina o metan sodio.

Uso de agentes de **control Biológico**
Enmiendas orgánicas o abonos verdes

MANEJO INTEGRADO DE LA ENFERMEDAD



Manejo integrado de la enfermedad

Medidas preventivas

- ✓ establecimiento en suelos libres del patógeno
- ✓ Utilización de material de plantación libre del patógeno
- ✓ Empleo de cultivares tolerantes o resistentes

Métodos preventivos

- ✓ **Plantar en suelos libres del hongo:** análisis previo en las nuevas plantaciones , cultivos antecesores no susceptibles
- ✓ Empleo de variedades tolerantes
- ✓ Plantas libres del hongo
- ✓ Evitar el contacto con plantas o materiales orgánicos susceptibles de contaminarse
- ✓ Limpiar los tractores herramientas de trabajo
- ✓ Utilizar aguas no contaminadas para riego
- ✓ Control biológico: Micorrizas y hongos antagonistas



Comportamiento de variedades frente a *V. dahliae*

Cultivar	No defoliante	Defoliante
Picual	S	E
Cornicabra	E	E
Hojiblanca	S	S
Lechin de Granada	M	E
Morisca	R	S
Picudo	M	E
Empeltre	R	M
Arberquina	S	E
Manzanilla de Sevilla	R	E

E: extremadamente susceptible; S: susceptible; M: moderadamente susceptible; R: resistente

Prácticas culturales

✓ Eliminar el inóculo en árboles infectados, como restos de poda

✓ **Eliminar malezas susceptibles a verticilosis:** malezas de hoja ancha y malezas de verano
Ej. *Portulaca oleracea* (verdolaga), *Xanthium* sp. (Caílos), *Amarantus* spp (amarantos) ,
Chenopodium ssp. (Quinoa)



Portulaca oleracea



Xanthium sp.



Amarantus spp



Chenopodium ssp.

Medidas tras la plantación

Métodos culturales

- ✓ Desinfección de arados, aperos de labranza
- ✓ No establecer cultivos huéspedes intercalares
- ✓ Destrucción de restos infectados de plantas enfermas
- ✓ Control de malezas de hoja ancha
- ✓ Reducción de las labores
- ✓ Control de la dosis de riego (primavera-verano)
- ✓ Abonado equilibrado, evitar dosis excesivas de nitrogenados.



Métodos biológicos

✓ Aplicación directa de gros. Fúngicos/bacterias **antagonistas**: ej. *Talaromyces flavus*, *Trichoderma*.

✓ **Biofumigación**

Tratamiento con materiales y restos orgánicos frescos: estiércol, mostaza blanca, crucíferas, gramíneas (sorgo y pasto de Sudán) como abonados en verde



Métodos físicos o químicos

- ✓ Solarización individual de árboles
- ✓ Control químico: escala o nula eficacia
Bromuro de metilo,
cloropicrina o metan
sodio.



Efecto de la solarización, materia orgánica y *Trichoderma* sobre la severidad y la densidad de inóculo de *V. dahliae* en el suelo.

✓ Ensayos en Capital y en Arauco
Var. Arauco y Manzanilla

✓ Tratamientos:

- Solarización,

-Solarización + *Trichoderma harzianum* (4×10^7 conidios),

-Solarización + Materia orgánica (32Kg)

✓ Los tratamientos fueron evaluados mediante el progreso de la enfermedad y los valores de Densidad de inóculo (DI)



Otero, ML; Roca, Zapata R.; Ladux J. ; Zanelli M.; Matías, C., Pérez, B.

- ✓ La respuesta al tratamiento varió con las zonas
En el ensayo de El Tala, tratamiento Sol disminuyó DI hasta valores indetectables
En el ensayo Aimogasta , Sol y Sol + Tri mostraron la mayor disminución de DI .
- ✓ La aplicación de Sol + OM no fue efectiva en la reducción de DI .
- ✓ La severidad de síntomas se redujó más notoriamente en la localidad del Tala
- ✓ En Aimogasta , árboles de control mostraron reversión de los síntomas que podrían estar relacionados con el fenómeno de la recuperación natural.
- ✓ El aumento de temperatura en suelos solarizados fue adecuado para la reducción de la densidad de inóculo de *V. dahliae* y malezas
- ✓ La solarización y poda de ramas pueden ser usados para mantener la severidad en bajos niveles
- ✓ Serán necesarios nuevos estudios para conocer las variables que afectan a la eficacia del tratamiento y conocer la severidad de las cepas presentes en el suelo.



**BÚSQUEDA DE VARIEDADES
TOLERANTES**



**CARACTERIZACIÓN DE
CEPAS**



**MANEJO
INTEGRADO DE LA
ENFERMEDAD**



**DISMINUCIÓN DEL
INÓCULO**



**USO DE PLANTINES
SANOS
DE VIVERO**

- Dra. Beatriz Pérez, INTA Ins. IMYZA INTA Castelar
- Ing. Agr. Mónica Roca, SENASA La Rioja
- Ing. Agr. (Dr.) Ricardo Jorge Taborda, Biol. (Mgter.) Laura Torres, Ing. Agr. Valeria Gonzalez (Becaria SECyT), Ing. Agr. Mauro Paccioretti. Lab. Calidad Genética y Sanitaria Fac. Cs. Agropecuarias UNC (Córdoba)
- Ing. Daniel Moriconi, Ing. Agr. Donna Rattalino (Becaria CONICET) Lab. de Alta Complejidad Univ. UNdeC (Chilecito, La Rioja)
- C. González Vera , Ing. Agr. C. Jury , Ing. Agr. V. González Vasso , Ing. Agr. F. Seleme. Cát. Fitopatología, Fac. Cs. Agropecuarias Univ. Catamarca
- Ing. Agr. Fernanda Arias, Ing. Agr. Enrique Oriolani, INTA EEA Luján de Cuyo
- Ing. Agr. S. Jotayan, INTA AER Aimogasta, La Rioja
- Ing. Agr. J. Ladux INTA AER Chilecito, La Rioja
- Ing. Agr. César Matías INTA EEA Zumalao, Catamarca



Gracias por su atención!

