

Carrera de Magister Scientiae en Protección Vegetal

Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales

UNLP



“Revisión de antecedentes, presencia, incidencia, severidad, frecuencia de agentes asociados y mermas de rendimiento para “rama seca” del olivo en la provincia de La Rioja”

Ing. Agr. Mónica E. M. Roca de Esteva

DIRECTORA

Ing. Agr., Ph. D. Beatriz Álida Pérez. INTA IMYZA - Castelar

CO-DIRECTORA

Ing. Agr., Ph. D. María Rosa Simón UNLP

2015

JURADO

Dr. Andrés Nico

Dra. Blanca Canteros

Ing. Agr. MSc. Delia Docampo

Fecha de defensa de Tesis

30 de septiembre de 2015-

DEDICATORIA

A mi esposo, Matías y a mis hijos Rosario, Clara, Santiago, Pedro y Juan.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Laura Otero, por su generosidad, apoyo, estímulo, y acompañamiento en el trabajo codo a codo durante muchos años, siendo su aporte fundamental en el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Beatriz Álida Pérez por su ejemplo de tenacidad, dedicación, profesionalismo, generosidad, capacidad de trabajo y constancia, que en todo momento contagia y moviliza.

A la Dra. María Rosa Simón, por su inapreciable ayuda, profesionalismo, enseñanza, apoyo e invalorable criterio, el cual fue fundamental para encarar y llevar a cabo el proyecto.

A la Dra. Marta L. Zanelli por su desinteresada ayuda, comprensión, enseñanza, afecto entusiasmo y generosidad para transmitir sus conocimientos.

Al Ing. Agr. Juan Carlos Pérez mi jefe y amigo, quien siempre me apoyo, aconsejó y estimuló para realizar trabajos de investigación.

Al Ing. Agr. Sebastián Contini, quien gestionó parte de los recursos aportados por la empresa para realizar la tesis. Por su amistad, cooperación, confianza y acompañamiento permanentes.

A la Ing. Agr. M. Sc. Delia Docampo, por su constante vocación de docencia, profesionalismo, aportes, apoyo y revisión crítica del proyecto.

A Andrés Nico y Blanca Canteros por su tiempo y dedicación para revisar la tesis.

Al Dr. Miguel Ángel Blanco-López, quien siempre me supo dar una respuesta a dudas sobre los trabajos y es un ejemplo de generosidad, calidez y profesionalismo.

A la Dra. Silvina Pastor por su acompañamiento e invaluable aporte con la identificación de especies de *Pythium*.

A los Ings. Agrs. Gustavo Dávila, Guillermo Goñalons, Andrea Calahorra, Enrique Dalton, quienes aportaron información, ayuda y acompañamiento para la ejecución del ensayo.

A los operarios de campo de Sierras de Mazán S. A. quienes siempre me ayudaron para concretar las observaciones a campo, especialmente a Deborah.

A mis compañeros de trabajo Pedro González, Javier Miranday, Juan Alizzi, Rodrigo Ceballos, Adrián Nieto y a la Ing. Agr. María Giménez, quienes me ayudaron con las tomas de muestras y observaciones a campo en distintas etapas del ensayo.

Al SENASA por permitir realizar la Maestría, particularmente al Ing. Agr. Carlos Benzo, e Ings. Agrs. Víctor Ruíz, Carlos Bontcheff y Carlos Lehmacher, por asignar recursos para realizar la cursada y los ensayos.

A la Dra. Cecilia Rousseaux y al Dr. Peter Searles, que siempre me brindaron su cooperación, e información para la tesis.

A la Dra. Vilma Conci, directora del INTA-IPAVE, por facilitar la infraestructura y equipamiento necesarios para los análisis moleculares.

A mis colegas de La Rioja quienes siempre me han brindado su apoyo, amistad y solidaridad en todos los trabajos efectuados. Néstor Banno, Emilio Caimi, Eduardo García, Matías Cincota. Orlando Barros, Jorge Ortiz, José Luis Ladux, Sergio Drazic, Ricardo Márquez, Julián Clusellas, Federico Guchea, Pablo Quiroga, Fabián Terán y aquellos que nos dejaron pero los recordamos, como Daniel Pellegrino.

A mis amigos de la Maestría con quienes logramos amistades entrañables.

Al Ing. Agr. Miguel Costilla, quien fue un ejemplo de vida, generosidad, humildad y practicidad.

Muy especialmente,

A mi mamá, porque aunque hace mucho que no está, me enseñó a creer en Dios y sobrellevar todas las dificultades con entereza y Fe.

A mi hermana Virginia que es mi alma gemela,

A mi abuela Elisa que con su sencillez, humildad y tesón me enseñó la importancia del trabajo y esfuerzo silencioso.

A mi marido, quien siempre me apoyó, me acompañó y animó en todas las decisiones profesionales que tuve que encarar. Y a mis hijos que son mi orgullo.

A mis amigas y amigos de todos los momentos, niñez, secundaria, facultad, actuales, los de la maestría, por brindarme cariño, apoyo, contención y diversión. Cada uno en su momento fue y es importante.

Al resto de mi familia y familia política que siempre está acompañando mis logros y dificultades.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

Roca, M.; Pérez, B.A.; Simón, M.R.; Pastor, S.; Zanelli, M y. Otero, M.L. 2012. First report of a defoliant strain and fruit yield reduction of *Verticillium dahliae* in *Olea europaea* cv. 'Picual' in La Rioja province, Argentina. Revista International Society Horticultural Science (ISHS). 1^a. Ed. San Juan: International Society for Horticultural Science, P-09 (International Symposium on Olive Growing; 7; (25 al 29 de September)

Otero, M.L; **Roca, M.**; Zapata, R.; Ladux, J.L.; Ortiz, J.; Zanelli, M.; Matías, C. y Pérez, B.A. 2014. Effect of solarization, organic matter, and *Trichoderma* on the severity of *Verticillium* wilt in olive trees (*Olea europaea* L.) and soil inoculum density. Acta Horticulturae (ISHS). 1057:121-126.

Oriolani, E.; Otero, L.; Matías, A.; Nieto, A.; Pérez, B.; **Roca, M.** 2008. Enfermedades. En: Manual de reconocimiento de enfermedades y plagas en olivo. Editorial INTA. 79 pp.

PRESENTACIÓN EN CONGRESOS Y JORNADAS

Roca, M.E. Fecha de evaluación y muestreo de *Xylella fastidiosa* en olivo. Jornadas de capacitación sobre *Xylella fastidiosa* en olivo. Crilar Anillaco, 26 y 27 de Agosto de 2014 (oral).

Roca M. E. La “rama seca” y *Xylella fastidiosa* en olivo. Jornada de Sanidad en Olivo, organizada por el CENIT (UNLAR), EEA INTA Chilecito, en la Sede UNLAR Aimogasta, 13 de Junio 2014 (oral).

Roca, M.E.; Tolocka, P.A.; Otero, M.L.; Pérez, J.C. y Haelterman, R.M. 2014. Primera detección de *Xylella fastidiosa* en olivares en los departamentos Arauco y Castro Barros (La Rioja). Libro de resúmenes 3er. Congreso Argentino de Fitopatología Tucumán, Junio 2014- 169 pp.

Roca, M.; Pérez, B.A.; Simón, M.R.; Pastor, S.; Zanelli, M y. Otero, M.L. 2012. First report of a defoliant strain and fruit yield reduction of *Verticillium dahliae* in *Olea europaea* cv. ‘Picual’ in La Rioja province, Argentina. (International Symposium on Olive Growing; 7; (25 al 29 de September) (Oral).

Roca, M.E. Síndrome de “rama seca” de Olivo: agentes causales y manejo. 28° Reunión Ordinaria de la Comisión Federal Fitosanitaria, provincia de Santiago del Estero. 13 y 14 de Septiembre 2012 (oral).

Roca, M.E. Síndrome de la “rama seca”, Charla para productores organizada por la Secretaría de Agricultura de La Rioja. Aminga, provincia de La Rioja, 6 de Septiembre de 2012.

Roca, M.E. ¿Qué es la “rama seca”? Jornada de Sanidad del olivo. INTA-UNLAR sede Aimogasta. Aimogasta, provincia de La Rioja. 8 de Junio de 2011 (oral).

Pérez, B. A.; Oriolani, E. J.; Otero, M. L.; **Roca, E.M.;** Becerra, V.; Brancher, N.; Matias, C. A.; Ladux, J. L.; Arias, F.; Funes, C. 2010. Sanitary status of olive (*Olea europaea*) in Argentina. Congreso Lisboa Portugal 28th IHC Lisboa. 2: 369 (oral Perez).

Pérez, B. A.; **Roca, M. E.;** Oriolani, E. J.; Otero, M. L.; Becerra, V.; Matias, A. C.; Brancher, N.; Ladux, J. L.; Funes, C.; Arias, F. 2010. Premature death disease in olive (*Olea europaea*) in Argentina. Congreso Lisboa Portugal 28th IHC Lisboa. 2: 369 (oral Perez).

Roca, M.E. “La importancia de fecha de evaluación y seguimiento en los problemas sanitarios del olivar“. Reunión de Programa Específico Nacional de Frutales INTA (PENFRU) Mendoza Octubre de 2010 (oral).

PARTICIPACIONES EN PROGRAMAS Y ACTIVIDADES ACADÉMICAS

Organización de Jornadas de capacitación sobre *Xylella fastidiosa* y enfermedades en olivo. Instituciones intervinientes Senasa, Centro Regional Cuyo, Dirección Nacional de Protección Vegetal, INTA, Instituto de Patología Vegetal (IPAVE) e Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (Imyza). Crilar Anillaco-26 y 27 de Agosto de 2014.

Participación en la Formulación de Proyecto Provincial para la erradicación y medidas fitosanitarias de plantas de olivo tradicionales de cv. ‘Arauco’ con Verticilosis, en las localidades de Aimogasta y Villa Mazan, departamento Arauco, provincia de La Rioja. Entidades intervinientes: Secretaría de Agricultura de La Rioja, CFI, INTA, SENASA, Cámaras de productores y Universidades (2013-2014).

Profesora de la Cátedra de Fitopatología, Carrera de Agronomía, Universidad de La Rioja (UNLAR). Actualmente Adjunta a cargo interina, desde 2011.

Participante en el proyecto PNFRU 2184-Módulo OLIVO INTA-SENASA. Sanidad en Olivo, desde Marzo de 2006 al 2011.

Convocada por la Universidad Nacional de La Rioja para presentar un Proyecto de Investigación y Extensión de “rama seca” de olivo (2010 al presente).

Participación en el Programa de Apoyo al Fortalecimiento Institucional del SENASA-Comunidad Europea. Desde el 29 de octubre al 9 de noviembre de 2007. ITALIA: Bologna: Servicio Fitosanitario de la Región de Emilia- (SFRER). Consejo Nacional de Investigaciones - (CNR) Sede Bologna. Perugia: Servicio Fitosanitario de la Región de Umbria - (SFRU) Consejo Nacional de (CNR) de Perugia. Vivero olivícola “Agrícola Faena”. Bari: Universidad de Bari. Consorcio Viverístico de Puglia. ESPAÑA: Córdoba: Universidad de Córdoba (ETSIAM). Junta de Andalucía – Delegación de Agricultura y Pesca. Barcelona: Vivero Agromillora Catalana.

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 EL CULTIVO DE OLIVO EN ARGENTINA: RESEÑA HISTÓRICA, ÁREA DE CULTIVO, CULTIVARES Y PRODUCCIÓN	1
1.2 PRODUCCIÓN DE OLIVO PARA MESA Y ACEITE	4
1.3 “SECA DE OLIVOS JÓVENES” EN ESPAÑA Y “RAMA SECA” EN ARGENTINA.....	6
1.4 AGENTES BIÓTICOS Y ABIÓTICOS ASOCIADOS CON LA “RAMA SECA”.....	11
1.4.1 <i>Sintomatología asociada a Verticillium dahliae Kleb</i>	13
1.4.2 <i>Patogenicidad y diversidad genética y patogénica en las poblaciones de V. dahliae de olivo</i>	14
1.4.3 <i>Ciclo de vida V. dahliae. Infección, colonización y desarrollo del patógeno</i>	15
1.4.4 <i>Epidemiología de la verticilosis</i>	17
1.4.5 <i>Verticilosis del olivo a nivel mundial. Importancia y distribución geográfica</i>	17
1.4.6 <i>Evaluación de daños económicos causados por V. dahliae</i>	18
1.4.7 <i>Factores ambientales y culturales en el desarrollo de verticilosis</i>	19
1.4.8 <i>Diagnóstico de verticilosis</i>	19
1.5 IMPORTANCIA Y ASPECTOS A ESTUDIAR SOBRE LA “RAMA SECA”.....	21
1.6 HIPOTESIS	24
1.7 OBJETIVO GENERAL.....	24
1.8 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
2. MATERIALES Y METODOS	25
2.1 CARACTERÍSTICAS DE LA FINCA ANALIZADA EN CATINZACO, DEPTO. CHILECITO, PROVINCIA DE LA RIOJA	25
2.2 INCIDENCIA EN UNA FINCA EN CATINZACO, 2001-2005.....	26
2.3 INCIDENCIA Y SEVERIDAD EN LOTES 6 Y 9 EN CATINZACO (LA RIOJA), EN 2009	26
2.4 DETERMINACIONES EN CV. ‘PICUAL’ , LOTE 6, EN LA FINCA UBICADA EN CATINZACO, DEPTO. CHILECITO, LA RIOJA	27
2.4.1 <i>Síntomas, incidencia y severidad en ‘Picual’, lote 6, Catinzaco</i>	27
2.4.2 <i>Relación severidad en ‘Picual’ y variables climáticas</i>	28
2.4.3 <i>Relación de rendimiento en fruto y su relación con severidad en ‘Picual’</i>	28

2.5	FRECUENCIA DE MICROORGANISMOS	28
2.5.1	<i>Muestras vegetales y de suelo</i>	28
2.6	DETECCIÓN MOLECULAR DE LA CEPA DEFOLIANTE DE <i>V. DAHLIAE</i>	31
2.7	PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (QPCR)	32
3.	RESULTADOS	35
3.1	INCIDENCIA DE “RAMA SECA EN UNA FINCA EN LA LOCALIDAD CATINZACO; LA RIOJA DURANTE 2001-2005	35
3.2	INCIDENCIA Y SEVERIDAD EN LOTES 6 Y 9 EN LA FINCA, CATINZACO, LA RIOJA, EN 2009	36
3.3	ENSAYOS EN LOTE 6 EN ‘PICUAL’ EN CATINZACO, LA RIOJA	40
3.3.1	<i>Síntomas en ‘Picual’ en Catinzaco, La Rioja</i>	40
3.3.2	<i>Incidencia en ‘Picual’</i>	41
3.3.3	<i>Severidad en ‘Picual’ en Catinzaco</i>	42
3.3.4	<i>Relación entre severidad en ‘Picual’ y variables climáticas</i>	43
3.4	RELACIÓN ENTRE RENDIMIENTO EN FRUTO Y SEVERIDAD EN ‘PICUAL’	45
3.4.1	<i>Relación entre severidad y kg de aceitunas cosechadas</i>	46
3.5	FRECUENCIA DE MICROORGANISMOS	46
3.6	FRECUENCIA DE DETECCIÓN MOLECULAR DE <i>V. DAHLIAE</i> EN OLIVO ‘PICUAL’ CON QPCR Y NPCR	46
3.7	QPCR CON SONDAS TAQMAN	47
4.	DISCUSIÓN	50
5.	CONCLUSIONES	55
6	REFERENCIAS	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Superficie plantada con olivo.	2
Tabla 2. Producción de olivo para mesa y aceite (t).	5
Tabla 3. Incidencia (%) de “rama seca” por cv. y departamento en La Rioja, 1999.	10
Tabla 4. Incidencia (%) de “rama seca” en cvs. de ‘Manzanilla’, en La Rioja, 1999.	10
Tabla 5. Superficie plantada (ha) de olivo en finca Catinzaco, (La Rioja).	25
Tabla 6. Análisis de varianza de los datos de incidencia transformados (logit) de “rama seca” en Catinzaco, La Rioja, 2001-2005.	35
Tabla 7. Incidencia (%) de “rama seca” en cvs. de olivo en Catinzaco, 2001 a 2005.	36
Tabla 8. Análisis de varianza de severidad para cvs., lote 6, en Catinzaco.	36
Tabla 9. Análisis de varianza de severidad para cvs., lote 9, en Catinzaco.	38
Tabla 10. Síntomas observados en ‘Picual’ en la localidad de Catinzaco en marzo 2010 (lote 6).	41
Tabla 11. Análisis de varianza de severidad de “rama seca” sobre ‘Picual’.	42
Tabla 12. Severidad en 110 plantas de ‘Picual’, marzo 2009/abril 2010 en Catinzaco.	43
Tabla 13. Rendimiento promedio de fruto (kg/planta) en ‘Picual’ en 2009 y 2010.	45
Tabla 14. Prueba de medias independientes entre rendimiento de asintomáticas y sintomáticas en 2009 y 2010	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Zonas geográficas y % de superficie implantada de olivo en La Rioja (Andrada, 2002 Secretaría de Agricultura de La Rioja y Censo Nacional Agropecuario, 2002).	3
Figura 2. Mapa político de la provincia de La Rioja.	9
Figura 3. Severidad “rama seca” sector este de la copa, lote 6 Catinzaco. Las barras verticales indican la desviación o el error estándar para cada una de las medias (LSD $P \leq 0.05$).	37
Figura 4. Severidad “rama seca” sector oeste de la copa, lote 6 Catinzaco. Las barras verticales indican la desviación o el error estándar para cada una de las medias (LSD $P \leq 0.05$).	37
Figura 5. Severidad de la “rama seca” en la totalidad de la copa, lote 6 Catinzaco. Las barras verticales indican la desviación o el error estándar para cada una de las medias (LSD $P \leq 0.05$).	37
Figura 6. Severidad “rama seca” sector este de la copa, lote 9. Las barras verticales indican la desviación o el error estándar para cada una de las medias (LSD $P \leq 0.05$).	38
Figura 7. Severidad “rama seca” sector oeste de la copa, lote 9. Las barras verticales indican la desviación o el error estándar para cada una de las medias (LSD $P \leq 0.05$).	39
Figura 8. Severidad “rama seca” promedio de la copa, lote 9. Las barras verticales indican la desviación o el error estándar para cada una de las medias (LSD $P \leq 0.05$).	39
Figura 9. Productos de PCR anidado diferenciando cepa defoliante de <i>V. dahliae</i> .	47
Figura 10. Resultados de PCR cuantitativa para muestras vegetales.	48
Figura 11. Resultados de PCR cuantitativa para muestras vegetales.	49

APÉNDICE TABLAS

Apéndice Tabla 1 Datos meteorológicos aeropuerto de Chilecito, SMN*, 1991-2000. 68

Apéndice Tabla 2. Olivos con “rama seca” en finca de Catinzaco, La Rioja (2001- 2006).

69

APÉNDICE FOTOS

Foto 1. Planta de olivo asintomática.	71
Foto 2. Planta de olivo con “apoplejía”.	72
Foto 3. Planta de olivo con “decaimiento lento”.	73
Foto 4. Planta de olivo con defoliación, cepa defoliante (D) <i>V. dalthiae</i> .	74
Foto 5. Tronco de olivo con “acostillado o chupado”	75
Foto 6. Corte de rama de olivo donde se evidencia a nivel de xilema coloración castaña púrpura.	76
Foto 7. “Rama roja o púrpura” de olivo.	77
Foto 8. Rama de olivo con necrosis apical y frutos momificados y normales	78
Foto 9. Olivo con cancro y exudado en tronco.	79
Foto 10. “Chupones o varetas” con puntas necrosadas, ‘ <i>Picual</i> ’, Catinzaco, La Rioja.	80
Foto 11. Hojas de olivo con coloración verde apagado, “apoplejía”.	81
Foto12: Olivo con rasgado de corteza y “negrilla”.	82
Foto 13. Cancro producido por helada.	83
Foto 14. Olivo con inyecciones y “tronco acostillado”.	84

RESUMEN

“Rama seca” es el principal problema del olivar riojano. En una finca en Catinzaco, provincia de La Rioja se estimó su incidencia entre 2001 y 2005. En 2009 se evaluó severidad en plantaciones de 1999 y 2001. Adicionalmente en 2009 y 2010 se realizó el seguimiento de 130 plantas sintomáticas y asintomáticas cv ‘Picual’(plantación 1999) registrando severidad, efecto de variables ambientales, reducción de rendimiento y etiología. La detección de *Verticillium dahliae* Kleb se efectuó por técnicas tradicionales, qPCR y nPCR. Entre 2001 y 2005, la incidencia aumentó diez veces en el grupo ‘Arbequina’, ‘Barnea’, ‘Kadesh’, ‘Manzanilla’, ‘Nabalí’, ‘Novo’ y ‘Picual’, con los mayores valores para ‘Kadesh’ y ‘Manzanilla’. La plantación 1999, mostró severidad >60% en ‘Mission’ y ‘Sirio’; mientras que en la del 2001, ‘Barnea’ cuadruplicó a ‘Arbequina’ y duplicó a ‘Picual’. ‘Arbequina’ mostró los menores valores de incidencia y severidad. La parcela cv ‘Picual’ de 1999, mostró diferencias de severidad entre plantas asintomáticas y enfermas, entre fechas de evaluación e interacción. Las ecuaciones de regresión entre la severidad y las variables climáticas que mejor predijeron el avance de la enfermedad, estuvieron conformadas por un factor lineal con temperaturas inferiores a 20°C y otro exponencial con temperaturas superiores a 35°C; el primer factor tendió a disminuir la enfermedad y el segundo a estabilizarla. Asimismo la severidad de “rama seca” tendió a incrementarse con el aumento de las precipitaciones. La reducción en rendimiento alcanzó 93% (2009). La regresión de datos de severidad y rendimiento 2009 y 2010, mostró asociación entre las variables analizadas. La técnica nPCR permitió detectar por primera vez a la cepa defoliante de *V. dahliae* en ‘Picual’, mientras que qPCR resultó altamente sensible y específico para *V. dahliae*. Es la primera cita de la detección de la cepa defoliante de *V. dahliae* en olivo en Argentina y la primera evaluación de pérdidas de rendimiento atribuibles a “rama seca”.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El cultivo de olivo en Argentina: reseña histórica, área de cultivo, cultivares y producción

El olivo fue cultivado desde la más remota antigüedad y su área de dispersión se extendía desde Siria hasta Grecia, poblando abundantemente las costas del mar Mediterráneo. En 1520, las evidencias sugieren que se trajeron estacas de Sevilla, España, a Sudamérica, llegando a Argentina, Chile y Perú. En 1670, el rey Carlos III ordenó que todos los árboles de olivo y vid existentes en Argentina fueran talados, debido a la potencial competencia que suponían estos cultivos (Searles *et al.*, 2012). A finales del siglo XIX y comienzos del siglo XX, Argentina, inició el “Fomento Económico del Olivo”, que incluyó todas las provincias con apropiadas condiciones agroclimáticas (Ley Nacional 11.643) (Olivera, 2000). Durante las décadas del ‘70 y el ‘80 la producción disminuyó considerablemente debido a la competencia con los aceites de girasol y maíz.

Hasta 1990 el área plantada con olivo en Argentina era de 30.000 ha con la mayor producción proveniente de las provincias de Mendoza (13.700 ha), Córdoba (5.000 ha) y San Juan (4.800 ha) (MAGPyA, 2004). La mayoría de las explotaciones eran pequeñas, de alrededor de 10 ha, con plantación tradicional a 10 x 10 m y riego por manto. La Ley Nacional de Promoción N° 22.021, que permitió diferir el pago de impuestos nacionales e invertir dicho monto en la explotaciones agrícolas hasta la entrada en producción, motivó la modernización del olivar y su crecimiento a unas 110.000 ha. En la actualidad, más del 90% del total del área cultivada en Argentina está en las provincias que bordean la cordillera de los Andes, en el Centro Noroeste de Argentina: Catamarca, La Rioja, San Juan y Mendoza. También existen otras zonas de pequeñas plantaciones tradicionales en Córdoba, mientras que las provincias de Neuquén y Río Negro están empezando a explorar su potencial de alta calidad de aceite de oliva. Por último quedan la provincia de Buenos Aires, con fincas viejas y pequeñas con modelos mixtos (aceite y aceituna) y algunas nuevas fincas boutique (Searles *et al.*, 2012) y la provincia de Salta con una reducida superficie (400 ha) (Copello, com. pers.). El 70 % se cultiva bajo riego. Catamarca, La Rioja y San Juan lide-

ran la producción, seguidas por Mendoza, Córdoba, Buenos Aires, Río Negro y Neuquén (Tabla 1).

Tabla 1. Superficie plantada con olivo.

Provincia	Previa a diferir (ha)	A diferir¹ (ha)	Total 2004 (ha)	Total 2012 (ha)
Mendoza	13.700	300	14.000	19.000
Córdoba	5.000	470	5.470	5.500
San Juan	4.800	13.800	18.600	20.000
La Rioja	2.900	27.000	29.900	30.000
Catamarca	1.400	30.000	31.400	31.000
Buenos Aires	1.800	0	1.800	1.800
Río Negro y Neuquén		-	-	2.500
Total	29.600	71.570	101.170	110.000

(MAGPyA, 2004; Searles *et al.*, 2012). ¹Ley Nacional de Promoción 22.012.

El aumento en las plantaciones de olivares de los 90's resultó en una importación masiva de olivos (por ej. entre 1991-1998 ingresaron a La Rioja aproximadamente un millón de plantines procedentes de España, Italia, Israel y Estados Unidos (Roca, com. pers.). Los cvs. importadas fueron principalmente 'Aloreña', 'Arbequina', 'Empeltre', 'Manzanilla', y 'Picual' de España; 'Coratina', 'Frantoio' y 'Leccino' de Italia; 'Barnea', 'Nabali' y 'Novo' de Israel y 'Mission' y 'Manzanilla' de Estados Unidos.

Actualmente, los cvs. predominantes son 'Arbequina' como cv. de aceite y 'Manzanilla', como cv. de mesa, reemplazando a la tradicional 'Arauco', que es el único cv. reconocido de Argentina en el Catálogo Mundial de Variedades de Olivo (International Olive Council, 2000). Probablemente fue seleccionada durante la época colonial de estacas enviadas de España y es similar a 'Azapa' en Chile y 'Sevillana' en Perú. Se dice que 'Arauco' significa agua de greda o arcilla, en referencia al agua de vertiente que usaban los aborígenes para regar los olivos en algunas zonas del Noroeste de Argentina. Sin embargo, algunos cvs. introducidos no han tenido éxito y áreas considerables de cultivos de 'Empeltre', 'Frantoio', y 'Leccino' fueron removidas o reinjertados por problemas en la flora-

ción debido a la falta de acumulación de horas de frío en Catamarca y La Rioja (Searles *et al.*, 2012).

El nuevo marco de plantación y la velocidad que la promoción imprimió al desarrollo, obligaron a incrementar la producción de plantas. Se cambió la multiplicación por estacones y semilla con posterior injertación por el estaquillado herbáceo o semileñoso, lo cual disminuyó la cantidad de plantas madres y por lo tanto la diversidad genética. Hasta que los viveros locales fueron capaces de producir plantines en cantidad, se recurrió a la importación para poder cumplir con los plazos que imponía la Ley Nacional de Promoción 22.012, comúnmente llamada ley de diferimiento.

En la provincia de La Rioja, el olivar está distribuido principalmente en tres áreas: zona. 1: Valle de Aimogasta–Salar de Pipanaco (35% de la superficie), zona 2: La Rioja Capital (41% de la superficie) y zona 3: Valle Antinaco –Los Colorados (21% de la superficie) y otra zona: Colonia Ortiz de Ocampo (1.3% de la superficie). (Figura 1).



Figura 1. Zonas geográficas y % de superficie implantada de olivo en La Rioja (Andrada, 2002 Secretaría de Agricultura de La Rioja y Censo Nacional Agropecuario, 2002).

En la década de los '90, con las nuevas plantaciones se produjeron sustanciales cambios tecnológicos en los olivares, tales como: aumento en la densidad de plantación,

que pasó de menos de 100 a 550 plantas por hectárea; generalización de riego presurizado con fertirrigación; sistemas de conducción y poda mecanizada del/los lateral/es y “topping” (corte de la parte superior de la copa), con la intención de adecuar el olivar a la cosecha mecánica, reducir el uso de mano de obra y atenuar la vecería.

1.2 Producción de olivo para mesa y aceite

El Comité Internacional de Aceite de Oliva (COI) indica que en la Argentina, el 65% de la producción de aceitunas se utiliza para la elaboración de aceite y el 35% para aceituna de mesa. Catamarca destina el 80 % de su producción olivarera a la elaboración de aceite, mientras que en La Rioja está dirigida a la industria conservera principalmente. Las cifras de producción son difíciles de analizar porque no existe una metodología que sustente los guarismos y mucho menos una única fuente que los haya generado; ésto explica solo en parte los "saltos" productivos anuales (Moavro, com. pers). En síntesis los datos del Tabla 2 no constituyen estrictamente una "serie". Hecha esta aclaración, los indicados son las cifras que el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos de la Nación (MAG-PyA) informa entre otros organismos internacionales al COI (Tabla2). De dichos datos surge que la elaboración de aceite de oliva entre 1990 y 2007 (8.000 a 27.000 t), se incrementó en un 337% y la producción de aceitunas de mesa (30.000 a 100.000 t) un 333%. La producción de aceite de oliva tuvo su máximo valor en la campaña 2011/12 con 32.000 t; para las aceitunas de mesa fue en la campaña 2009/10 con 250.000 t.

El aumento de producción desde los '90 en adelante se debe al incremento en la superficie implantada, aunque algunos cultivares aún no alcanzan su máximo potencial. Las variaciones interanuales se pueden explicar en parte, por la natural vecería del cultivo (producción alternada) y factores de manejo como cosecha tardía y podas inadecuadas. Pero la caída o cambios de la producción observada entre las campañas 2010/11 a 2012/13, tanto en aceitunas de mesa como en aceite, obedece a una combinación de factores. Por una parte, las contingencias climáticas sufridas en varias zonas productoras argentinas durante la campaña 2012/13, tales como vientos excesivamente cálidos en floración, heladas tardías y granizo y por otro lado, el sostenido incremento de los costos de producción, en especial la mano de obra sin un correlato en los precios, que redujo los incentivos para cosechar la totalidad de la producción obtenida. También la dificultad para conseguir y contratar cosecheros y la falta de financiamiento para realizar cosecha, derivaron en un cambio de la re-

lación usual conserva-aceite, en donde la mayor proporción de la producción se destinaba a la conserva (Andrada, com. pers. Cámara Olivícola Riojana. (COR), 2013).

Tabla 2. Producción de olivo para mesa y aceite (t).

Campañas de producción (t)	Mesa (t)	Aceite (t)	Producción total(t)
1990/91	30.000	8.000	38.000
2003/04	70.000	14.000	84.000
2004/05	60.000	18.000	78.000
2005/06	85.000	23.000	108.000
2006/07	75.000	15.000	90.000
2007/08	100.000	27.000	127.000
2008/09	95.000	23.000	118.000
2009/10	220.000	17.000	237.000
2010/11	90.000	20.000	110.000
2011/12	150.000	32.000	182.000
2013/14¹	55.000	55.000	130.000
Promedio	93.636	22.909	118.364

MAGyP, 2013. 1 Datos estimativos COR (Cámara Olivícola Riojana).

El consumo promedio nacional de aceitunas de conserva y de aceite de oliva es de 15.000 y 5.240 t anuales, respectivamente. La exportación ha aumentado enormemente en los últimos diez años, Argentina se encuentra entre los cinco mayores exportadores de aceituna de mesa en el mundo con 100.000 t/año, lo que implica un ingreso mayor a 100 millones de dólares. Por otra parte, la producción de aceites representa un bajo porcentaje en el mercado mundial de exportación con 70 millones de dólares en 2009 (MAGyP A). La mayoría de las exportaciones son a Brasil y Estados Unidos (Cáceres *et al.*, 2009, Searles *et al.*, 2012).

Además, el sector es una de las principales fuentes de contratación de mano de obra transitoria en las regiones de Cuyo y NOA. Teniendo en cuenta que aproximadamente existen en Argentina 50.000 ha de olivares modernos (intensivos), se requieren 400.000

jornales al año para poda. Al cálculo, además, deben sumarse las contrataciones de técnicos, capataces y personal administrativo para las empresas. Para la cosecha, la demanda real es de aproximadamente 1.350.000 jornales al año, representando 14.440 puestos de trabajo durante los 90 días de la campaña productiva (Cáceres *et al.*, 2009).

1.3 “Seca de olivos jóvenes” en España y “rama seca” en Argentina

En prospecciones realizadas por la sección de Sanidad Vegetal de la Universidad de Córdoba, España (Sánchez Hernández *et al.*, 1998 a, b, c) durante 1994/95 y 1996 se identificó una sintomatología similar a la “rama seca”, a la que denominaron “SOJ” (seca de olivos jóvenes). En dichas prospecciones determinaron que el 33,1% de los casos se debían a verticilosis (23,3%), daños por heladas (7,8%); el resto lo atribuyeron a insectos y manejos inadecuados de la plantación. Entre los hongos de campo destacaron: *Cylindrocarpon destructans*, *Dematophora necatrix*, *Fusarium* spp., *Macrophomina phaseolina*, *Phytophthora* spp., *Pythium irregulare*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *V. dahliae*, destacándose la verticilosis del olivo (VO) por su elevada incidencia. Además, mediante el análisis de plantines de vivero muertos (damping-off) y pudrición del sistema radicular, determinaron que los hongos asociados a estas pudriciones en vivero eran distintos de los aislados de campo y que por lo tanto, el vivero no sería el origen de las pudriciones radiculares. También determinaron la patogenicidad de aislamientos de cada especie fúngica. De todas las especies, cinco mostraron patogenicidad en olivo: *Cylindrocarpon destructans*, *Phytophthora megasperma*, *P. palmivora*, *Pythium irregulare* y *Sclerotium rolfsii*, reproduciendo los síntomas de pudrición radicular y marchitez en plantas inoculadas. *Fusarium acuminatum*, *F. eumartii*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Macrophomina phaseolina* y *Rhizoctonia solani* resultaron débilmente o nada patogénicos. La patogenicidad de *Phytophthora megasperma*, *P. palmivora* y *Pythium irregulare* resultó dependiente del contenido hídrico del suelo, ya que los aislados ensayados sólo causaron necrosis extensas del sistema radicular y muerte de las plantas inoculadas en condiciones de saturación continua del suelo. La elevada frecuencia de aislados de *Phytophthora megasperma* en suelos encharcados y su dependencia patogénica del exceso de agua en el suelo, sugieren que este hongo puede jugar un papel importante en la generalmente aceptada sensibilidad de los olivos jóvenes a la asfixia radicular (Sánchez Hernández *et al.*, 1998 b, c).

Sánchez *et al.* (2009) informaron los avances en pudrición radicular asociada a *Phytophthora*, mencionando que los síntomas aéreos consisten en muerte súbita, desecación y marchitez, con o sin amarillamiento o pérdida de hojas que conduce a la muerte del árbol en un corto período de tiempo. En olivos adultos observaron deterioro progresivo de la copa con amarillez, desecación y caída de hojas, que puede terminar con intensa defoliación o incluso muerte de los árboles, si persisten condiciones para el desarrollo de enfermedad. Tanto en olivos jóvenes como en adultos, los síntomas aéreos se presentan en toda la copa y no en ramas o sectores del árbol, como ocurre en la verticilosis. Además, el deterioro generalizado del sistema radicular del árbol impide la brotación de chupones o varetas en el tronco, algo que es común en verticilosis. Los síntomas consisten en necrosis del tejido cortical de las raicillas absorbentes. El tejido afectado se desprende con facilidad por lo que las raicillas adquieren un aspecto “pelado” o “descascarillado” característico, en ocasiones muy severas, con pérdida casi total de las raicillas, pudiendo observarse lesiones que afectan el cuello y la parte baja del tallo. Los agentes aislados fueron: *Phytophthora megasperma* y *P. inundata* y en vivero *P. palmivora* y *P. cactorum*. Además de *Phytophthora*, con frecuencia se aisló *V. dahliae* a partir de plantas afectadas por “seca”, lo que pone de manifiesto la presencia de los dos patógenos en los mismos campos, e incluso infectando simultáneamente a los mismos individuos. Otras identificaciones fueron: *Phytophthora citricola* y *P. drechsleri*, en California; *P. megasperma*, *P. palmivora* y *P. citricola* en Argentina y *P. megasperma* en Italia (Teviotdale, 1994; Sánchez Hernández *et al.*, 2001; Nigro *et al.*, 2005; Vettriano *et al.*, 2009; Lucero *et al.*, 2005, 2007 y 2012). Lo Giudice *et al.* (2010) demostraron en Sicilia, Italia la infección conjunta entre *P. palmivora* y *V. dahliae*.

Los primeros problemas de “rama seca” en olivo en Argentina se presentaron en los nuevos viveros de estaquillado herbáceo y al inicio de la plantación. Se identificaron hongos produciendo mortandad de plantines en vivero y a campo pertenecientes a los géneros: *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia* y/o nematodos de los géneros: *Meloidogyne* y *Pratylenchus* (Pérez *et al.*, 2001; Roca *et al.*, 2001, 2002).

Cuando los olivares plantados bajo el régimen de la Ley Nacional de Promoción 22.012, tuvieron dos o tres años (1997) hizo su aparición la sintomatología llamada por los productores “rama seca”. En 1998 el sector olivícola reclamó la intervención de la Comisión Provincial de Sanidad Vegetal de La Rioja (CO.PRO.SA.VEG.). Como conse-

cuencia de ello se conformó una comisión técnica, que coordinó las investigaciones y convocó a instituciones que trabajaron en la identificación de los agentes bióticos y abióticos asociados a la “rama seca”. En 1999, se realizó un relevamiento de información local y de antecedentes en plantaciones de olivo jóvenes entre 3 a 5 años en tres departamentos de la Provincia de La Rioja, encontrándose un 90% de prevalencia (% de fincas afectadas) y un 5,3% de incidencia (33.000 sobre 623.664 plantas evaluadas). El detalle por departamento fue: 10,28 % en Chilecito; 6,5% en Arauco y 0,26% en La Rioja-Capital. (Figura 2) La incidencia por cv. y departamento se indica en los Tablas 3 y 4 (Roca *et al.*, 1999; Babbitt *et al.*, 2000).

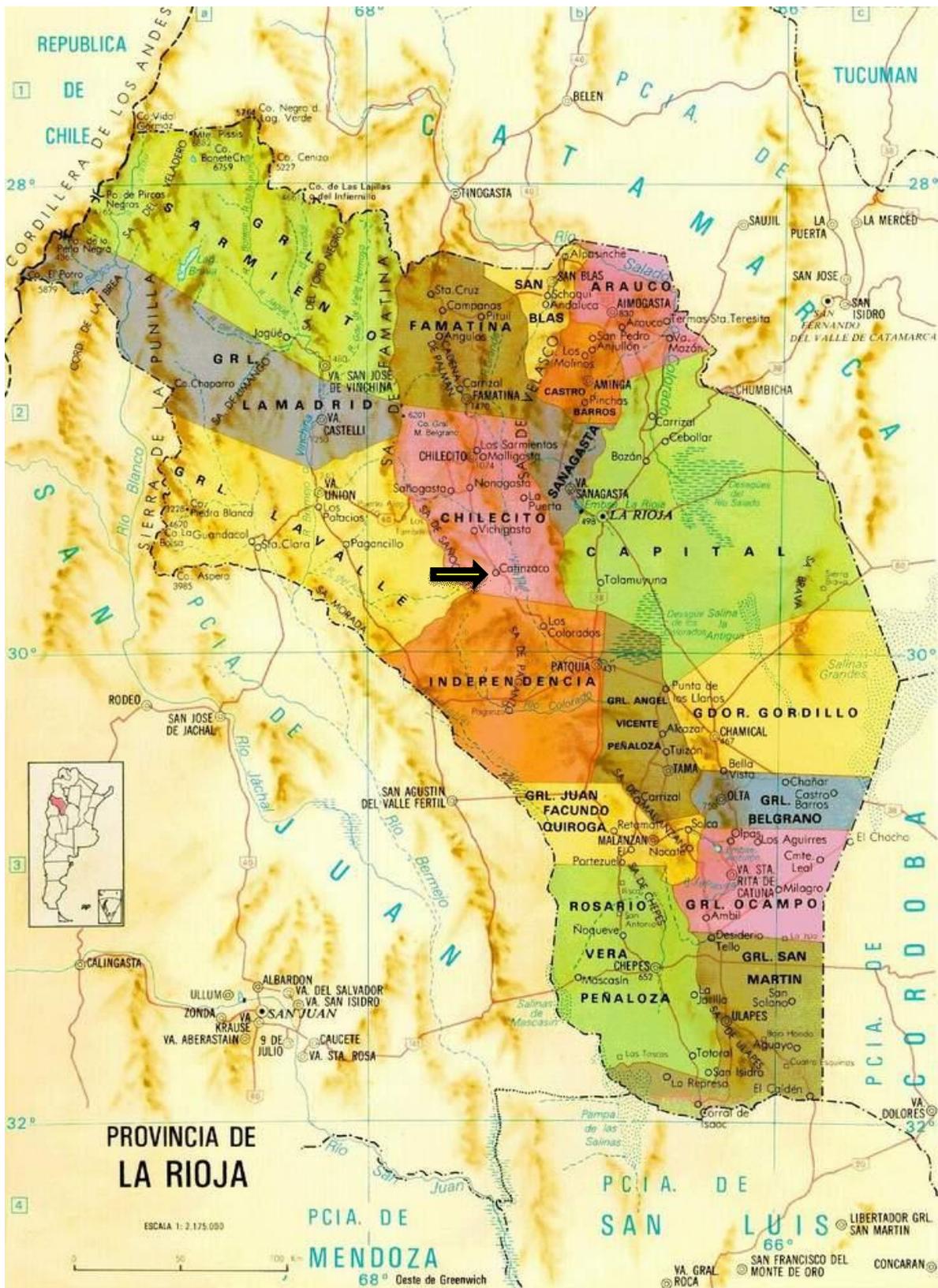


Figura 2. Mapa político de la provincia de La Rioja.

Tabla 3. Incidencia (%) de “rama seca” por cv. y departamento en La Rioja, 1999.

Cultivares	Plantas observadas	Incidencia (%)			Media
		Depto. Arauco	Depto. Chilecito	Depto. Capital	
Manzanilla¹	35.629	9,87	8.29	0.51	6
Arauco	81.935	13,73	3.67	0.03	6
Nabali	9.540	-	8.70	-	9
‘Picual’	132.702	1,14	5.13	0.16	2
Novo	700	-	40.57	-	41
Barnea	4.881	-	5.06	-	5
Arbequina	3.299	-	3.52	-	4
Empeltre	17.146	-	0.23	-	4

(-) sin dato. ¹ incluye todas las denominaciones.

Tabla 4. Incidencia (%) de “rama seca” en cvs. de ‘Manzanilla’, en La Rioja, 1999.

Tipos de ‘Manzanilla’	Incidencia %
Española y californiana	17,4
Fina española	11
Israelí	10,5
Reina española	9,4
Española	8,8
Española Gordal	1,1
Californiana	0,9
Común (Argentina)	0,2

Desde 1999 no se han realizado relevamientos sobre datos de “rama seca” a nivel provincial. En 2007-2008 se realizó una encuesta en 7 distritos del departamento Arauco en plantaciones tradicionales, sobre plantas mayores a 25 años de ‘Arauco’. La incidencia por departamento fue de 0,33 a 9%. El % de plantas muertas y enfermas fue mayor en los distritos de Los Barros (16%) y Arauco (6%). Sobre un total de 124.926 árbo-

les relevados la incidencia fue del 3,1%, y de ésta, el 1.3 % fue mortandad de plantas, principalmente en los distritos de Villa Mazán, Machigasta y Los Barros (Ladux *et al.*, 2014).

1.4 Agentes bióticos y abióticos asociados con la “rama seca”

En diferentes ensayos en la Provincia de La Rioja, se han realizado muestreos de la parte aérea, raíces y suelo en plantas sintomáticas, para tratar de identificar los patógenos involucrados. La sintomatología en la parte aérea de las plantas enfermas abarcaba clorosis, declinación, cambio de coloración (verde apagado), seca de ramas o brotes desde el ápice hacia la base, quedando las hojas de color castaño adheridas y encartuchadas hacia el envés; marchitez y muerte parcial de ramas. También se registraron seca total y posterior mortandad de plantas jóvenes. A nivel radicular se observó pudrición, descortezamiento en raicillas y nodulaciones (tipo rosario) (Oriolani *et al.*, 1999; Docampo *et al.*, 2000 Pérez *et al.*, 2001 a, b; Roca *et al.*, 2001; Babbitt *et al.*, 2000).

Se confirmó la presencia de: *Fusarium spp.*, asociado a pudrición radicular, en un 81,5% sobre raicillas, y en un 86% en suelo. *V. dahliae*, que provoca marchitez de la parte aérea pero no pudrición de raíces, se detectó en el 4,6% de brindillas (El diagnóstico a partir de tejidos infectados puede presentar dificultad según la época del año, lugar y la presencia y crecimiento del hongo en el árbol por el efecto de las temperaturas (muere a más de 35 y menos de 0 a 5°C (Montes *et al.*, 1997; Tossi y Zizzerini, 1998; Trapero y Blanco, 2008).). *Phytophthora spp.*, que produce pudrición y descortezamiento de raíces y raicillas, se detectó en suelo en un 3% de las muestras, (Zanelli, 1999; Babbitt *et al.*, 2000). En brindillas se detectó *Alternaria alternata*, *Pseudoscercospora cladosporioides*, *Phomopsis sp.*, *Drechslera sp.*, etc. (Roca *et al.*, 2001)

La hipótesis de la existencia de una asociación entre *Fusarium* y nematodos (larvas de *Meloidogyne* no quedó demostrada, debido a que *Fusarium* estuvo presente en raíz o suelo en una gran proporción de las muestras, pero sólo en el 50% se encontraron ambos simultáneamente (Costilla, 1999, 2000; Zanelli, 1999, 2000; Roca *et al.*, 2001, 2002).

Costilla (2000) estudiando plantaciones de vid y olivo de las Provincias de La Rioja, Catamarca y San Juan determinó que *Meloidogyne javanica* debe ser considerado el principal nematodo patógeno del olivo, pero no el causal de la “rama seca”, ya que fue encontrado en plantas sintomáticas y asintomáticas. Plantas muy atacadas por nematodos tie-

nen características específicas distintas a las de la “rama seca”: amarillamiento general de la parte aérea, disminución del crecimiento vegetativo, hojas con ápice foliar necrosado (“punta de hoja en flecha”) llegando a la muerte de las plantas. En raíces, los síntomas incluyeron descortezamiento, pudrición y nodulaciones.

Zanelli (2000) no encontró diferencias en las frecuencias de los aislamientos de *Fusarium solani* y *Rhizoctonia* spp. entre plantas sintomáticas y asintomáticas, ni tampoco en el suelo aledaño a plantas sintomáticas y asintomáticas. *V. dahliae* se aisló del 8% de las brindillas, correspondientes a plantas sintomáticas de Arauco y Capital (La Rioja), y 35% en muestras de suelo. Sin embargo otros autores (Biagi *et al.*, 2001, 2002) encontraron una alta frecuencia y patogenicidad de *F. solani* en estacas enraizadas de ‘Arbequina’, ‘Barnea’, ‘Empeltre’, ‘Farga’, ‘Frantoio’, ‘Manzanilla’, ‘Manzanilla israelí’, ‘Nabali’ y ‘Picual’, que sugirieron un rol en la pudrición radicular de plantines de vivero y plantas adultas. Asimismo, existen antecedentes de *F. solani* en olivo asociado a pudrición radicular en Nepal e India (Munjál *et al.*, 1982; Vettraino *et al.*, 2009).

En investigaciones realizadas en la Cátedra de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Cuyo, Lucero *et al.*, 1999 consideraron que los agentes causales del síndrome de la “rama seca” eran *Phytophthora* y *Pythium*. De sus aislados identificaron a *Phytophthora nicotianae*, *P. palmivora* y *P. citricola* (Lucero *et al.*, 2012, 2007; Vettraino *et al.*, 2009;). Su hipótesis es que *V. dahliae* no es el causal de la “rama seca”, basándose en que éste se diferencia fácilmente mediante sus aislados (Lucero *et al.*, 2008). Sin embargo como se ha indicado, el hongo puede inactivarse por factores climáticos, la recuperación natural de la planta enferma, o la imposibilidad de aislarlo del suelo por la baja densidad de inóculo (Montes *et al.*, 1997; Tossi y Zizzerini, 1998; Trapero y Blanco, 2008).

Otero y Pastor (2007), en estudios realizados en la provincia de La Rioja en plantas con “rama seca” aislaron *V. dahliae* 37% y 8 % de *Phytophthora* spp. del total de muestras. De las mismas en 6% de las plantas se detectaron ambos patógenos. También se encontraron: *Fusarium* spp. (24%), *Pythium* spp. (57%) y *Rhizoctonia* spp. (43%).

Dentro de los factores abióticos, la deficiencia de boro inicialmente se interpretó como potencial causal, debido a que sus sintomatologías son similares. Sin embargo se descartó como factor exclusivo, debido a que ensayos posteriores de aplicación de boro no lograron revertir o evitar la aparición del síndrome (Aso, 2000). También se estudiaron

otros factores abióticos (daño por helada, salinidad del agua y suelo, toxicidad por nutrientes o herbicidas y excesos o déficit de nutrientes) pero no se ha podido probar su asociación con el síndrome. El daño por heladas produce rasgado de corteza, canchales, necrosis del sistema vascular, como coloración marrón intensa (Oriolani *et al.*, 2008), pero no siempre esa sintomatología es inmediata; a veces si se produce, tarda unos meses en aparecer. El rasgado de las brindillas y/o ramas puede ocurrir cuando comienza el período de crecimiento, o revertirse por su posterior brotación, o podando las ramas dañadas. Esto no ocurre si la sintomatología es debida por ejemplo a *V. dahliae* (Trapero y Blanco, 2008).

En las evaluaciones realizadas en España y Argentina la verticilosis juega un rol esencial tanto en la “seca de olivos jóvenes”, como la “rama seca” de allí la importancia de analizar algunas de sus características.

1.4.1 Sintomatología asociada a *Verticillium dahliae* Kleb

La verticilosis comprende dos síndromes, denominados defoliante D (altamente virulento y letal) y no-defoliante ND (menos virulento), en el segundo de los cuales pueden diferenciarse dos complejos sintomáticos conocidos como “apoplejía” (o forma aguda de la enfermedad) y “decaimiento lento” (o forma crónica) (Blanco-López *et al.*, 1984; Jiménez-Díaz *et al.*, 1998; Navas Cortes *et al.*, 2008). La “apoplejía” se desarrolla en España entre final de invierno y principio de primavera, e incluye clorosis, enrollado y necrosis de las hojas seguidos de la muerte rápida de brotes y ramas con el patrón sectorial y eventualmente de árbol completo. Las hojas secas pueden desprenderse de la zona central de las ramas afectadas o permanecer adheridas a ellas. Con frecuencia la corteza de los tejidos leñosos afectados adquiere una tonalidad púrpura azulada. El “decaimiento lento”, que se desarrolla en primavera y progresa lentamente hasta comienzo del verano, se caracteriza por necrosis de las inflorescencias, momificado de las flores, coloración verde mate, enrollado y necrosis de las hojas, y defoliación parcial de las dispuestas en las zonas interiores de los brotes una vez necrosadas. Usualmente, los síntomas en las inflorescencias aparecen antes de la clorosis foliar.

El síndrome defoliante se desarrolla desde finales de otoño, hasta inicio del verano y se caracteriza por la caída rápida y extensa de hojas verdes asintomáticas de brotes y ramas, que pueden quedar completamente defoliados y generalmente da lugar a la muerte

de dichos órganos o de la planta completa (Rodríguez-Jurado *et al.*, 1993; Navas-Cortés *et al.*, 2008). Tanto en este síndrome, como en los complejos de “apoplejía” y “decaimiento lento”, los tejidos vasculares interiores de los brotes y ramas afectadas muestran una coloración castaño oscura de valor diagnóstico, y los frutos formados en olivos enfermos se desecan, arrugan y son de menor peso que los de los árboles. La apoplejía se puede confundir con asfixia radical y déficit nutricional, por lo cual no es posible diagnosticarlo sin aislamiento (Blanco *et al.*, 1994, 1995; Trapero y Blanco, 2008).

El agente causal de la verticilosis del olivo (VO) es *V. dahliae*, un hongo de reproducción estrictamente asexual (mitospóricos hifomicetos) evolutivamente relacionado con los Ascomicetos, establecido en la familia Plectosphaerellaceae, clase Sordariomycetes (Spatofora *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Zara *et al.*, 2007). Forma micelio y conidias hialinas (2,5 a 8,0 x 1,4 a 3,2 µm) agrupadas en microgotas mucilaginosas sobre el extremo de fiálicas uninucleadas (16 a 35 x 1,0 a 2,5 µm) dispuestas en verticilos sobre conidióforos no ramificados y microesclerocios negruzcos de tamaño. 15 a 50 µm, hasta 100 µm alargados e irregularmente globosos (Wilhelm, 1955; Smith, 1965).

1.4.2 Patogenicidad y diversidad genética y patogénica en las poblaciones de V. dahliae de olivo

V. dahliae no muestra patogenicidad huésped-específica (Bhat y Subbarao, 1999; Qin *et al.*, 2006), *V. dahliae*, es patogénico en más de 400 especies vegetales, incluyendo cultivos herbáceos, hortícolas, industriales, leguminosos, ornamentales, leñosos, frutales u ornamentales y numerosas dicotiledóneas arvenses (Pegg y Brady, 2002). *V. dahliae* también puede originar infecciones asintomáticas y formar microesclerocios en numerosas plantas mono o dicotiledóneas (Jiménez-Díaz *et al.*, 1998; Pegg y Brady, 2002), muchas de las cuales son comunes en la flora arvense de los olivares, La patogenicidad de los aislados de *V. dahliae* se puede demostrar inoculando plantones de olivo de 3 a 10 meses de edad con conidias de cultivos de 7 días de crecimiento en PDA o en Czapek Dox a 25°C.

El patrón de virulencia D y ND también ocurre en aislados de *V. dahliae* de algodón (*Gossypium hirsutum*), de manera que los aislados D y ND de algodón y olivo muestran virulencia cruzada (Schnathorst y Sibbett, 1971). El patotipo D ha sido diagnosticado en algodón en China, EE.UU., Grecia, Irán, Israel, Perú, Tadjikistan (Dayf *et al.*, 1995;

Portenko y Akimov, 1997), Turquía, la antigua Unión Soviética y en olivo en EE.UU., España, Irán y *Turquía*. En España, dicho patotipo, primeramente diagnosticado en algodón en las Marismas del Guadalquivir (Sevilla), se ha extendido progresivamente en las principales provincias olivareras de Andalucía (Bejarano-Alcázar *et al.*, 1996; Jiménez Díaz *et al.*, 2006, 2008b).

1.4.3 Ciclo de vida *V. dahliae*. Infección, colonización y desarrollo del patógeno

V. dahliae invade la planta mediante hifas formadas por la germinación repetida de los microesclerocios, que es estimulada por exudados radicales en un distancia promedio de 100µm (Huisman, 1982). Probablemente, en olivo la invasión de *V. dahliae* debe tener lugar directamente a través de la epidermis intacta de las zonas de la raíz en procesos de diferenciación y elongación próximas al ápice radical, o de las zonas de inserción de raíces secundarias, pero está claramente favorecida por micro o macro-heridas de diversa naturaleza. Tras la penetración directa de la epidermis radical, el hongo crece intra-e intercelularmente hasta alcanzar el tejido cortical, pero la mayoría de dichas infecciones fracasan en alcanzar el cilindro vascular y establecer infecciones vasculares, que son imprescindibles para la patogénesis (Garber, 1966; Nagtzaam, 1998; Bejarano Alcázar *et al.*, 1999).

El desarrollo de síntomas requiere de la invasión y colonización extensa y sistémica del xilema por el hongo a lo largo del eje de la planta, por medio de conidias trasladadas en los vasos por la corriente transpiratoria y de hifas que crecen longitudinal y transversalmente a través de los poros entre los elementos xilemáticos adyacentes (Rodríguez Jurado *et al.* 1993; Baidez *et al.*, 2007). El crecimiento del patógeno permanece confinado en el xilema durante su fase parasítica, pero esta restricción desaparece con el desarrollo de síntomas severos y la senescencia de la planta, pudiendo entonces crecer y formar microesclerocios en los tejidos extraxilemáticos de raíz y tallo (Jiménez-Díaz *et al.*, 1998). La invasión de los vasos xilemáticos por el patógeno va unida de la formación en aquellos de tílides, junto con el desarrollo de geles de polisacáridos (Rodríguez Jurado *et al.* 1993; Baidez *et al.*, 2007). Además, en los vasos de xilema infectados por el patógeno se depositan complejos fenólicos, que tras su oxidación mediante enzimas polifenoloxidasas, dan lugar a la coloración castaño–oscura del tejido vascular. Esta estructuras provocan las oclusión y reducción del flujo de savia bruta en el mismo, particularmente en el tallo y peciolos folia-

res, que junto con enzimas líticas fúngicas, fitohormonas vegetales y fitotoxinas contribuyen al desarrollo de los síntomas de verticilosis (Beckman, 1981, Mace *et al.*, 1981).

El crecimiento preferente del hongo en los vasos xilemáticos invadidos, y la pronunciada sectorización de los vasos del olivo, con conexión vascular directa entre las raíces y los brotes, hace que los síntomas se puedan presentar distribuidos en ramas aisladas en la copa del árbol y que presumiblemente la extensión de aquellos corresponda al número de raíces de la plantas infectadas (Jiménez Díaz *et al.*, 1998). En condiciones normales los primeros síntomas tienen lugar entre el primero y segundo año después de la plantación, si bien el período es influido por la cantidad y patotipo de *V. dahliae*.

V. dahliae es un hongo ecológicamente simbiote obligado y con nutrición necrótrofa, típico habitante de raíces *sensu* Garret (invasor de suelo), que desarrolla una prolongada fase parasítica circunscripta al xilema de la planta infectada y escasa o nula saprofitica en el suelo, en el cuál sobrevive mediante microesclerocios libres o inmersos en resto vegetales (Pegg y Brady, 2002). Los microesclerocios viven en dormición fungistática microbiana en el suelo durante 14 años (Wilhelm, 1955), hasta su germinación estimulada por exudados radicales de plantas huésped y no huésped. Por el contrario las conidias y micelio del hongo pierden la viabilidad muy rápidamente en el entorno edáfico (Green, 1969). Los microesclerocios de *V. dahliae* se incorporan al suelo tras la descomposición de tejidos infectados, de cultivos o malezas, así como en las heces y estiércol de animales que hayan alimentado de ellos, y las raíces de huéspedes asintomáticos de cubiertas vegetales (Jiménez Díaz, 2010).

Los microesclerocios son dispersados por implementos que facilitan el movimiento de suelo y restos vegetales que los contienen (i.e., hojas caídas de árboles infectados durante el cultivo, restos de poda o producidos durante la recolección, residuos orgánicos de almazaras donde se procesan cosechas de plantaciones afectadas, restos de cultivos herbáceos afectados cercanos a la plantación, etc. (ej.: aperos, maquinaria, vehículos, agua de riego, viento) (Jiménez Díaz *et al.*, 2008a, 1998; Hiemstra, 1998; Easton *et al.*, 1969). Las hojas verdes y asintomáticas caídas durante la estación del cultivo de olivos infectados por el patógeno tipo D pueden desempeñar un papel relevante en la diseminación de *V. dahliae* entre plantaciones y actuar como fuente de inóculo efectiva (Wilhelm y Taylor, 1965; Navas Cortes *et al.*, 2008). *V. dahliae* puede ser introducido en zonas olivareras libres del patógeno mediante el transporte de cosechas y restos de cultivos afectados, en par-

ticular algodón (Wilhelm y Taylor, 1965; Schnathorst y Sibbett, 1971), y sobre todo en el material de plantación, semillas, y el agua de riego infestada por el patógeno.

1.4.4 Epidemiología de la verticilosis

La verticilosis causada es una enfermedad monocíclica, (comprende un solo ciclo de patogénesis por estación de cultivo). El inóculo resultante de él no da lugar a nuevas infecciones y enfermedad durante la misma. En consecuencia, su epidemiología es determinada en gran medida por la densidad de microsclerocios (ms) en el suelo (nº ms/g suelo seco), cuya repercusión es influida a su vez por el efecto combinado de factores como la virulencia del patotipo del hongo, la edad, susceptibilidad, y densidad de plantas y raíces, las relaciones agua/planta, la temperatura del suelo y del aire, los nutrientes del suelo, etc. (DeVay y Pullman, 1984).

En olivares intensivos de regadío, los primeros síntomas suelen aparecer entre los 18 y 24 meses después de plantación de olivo ‘Arbequina’ en suelo infestado por el patotipo D (Navas-Cortés *et al.*, 2008) y de olivo ‘Picual’ en suelo infestado por el ND (Levin *et al.*, 2003a); la enfermedad se desarrolla con carácter estacional en el año de crecimiento del olivo, de manera que la severidad e incidencia de los síntomas aumentan durante finales de otoño-invierno y primavera y disminuyen durante el período estival-otoñal (Navas-Cortés *et al.*, 2008).

1.4.5 Verticilosis del olivo a nivel mundial. Importancia y distribución geográfica

La verticilosis del olivo, es actualmente el problema sanitario más importante del olivar en España y una de las enfermedades más amenazadoras del cultivo en el mundo (Jiménez Díaz *et al.*, 1998). La enfermedad fue descrita por primera vez en Italia 1946 (Ruggieri, 1946), más tarde en California (Snyder *et al.*, 1950), Australia (Morschel, 1961), Grecia (Zachos, 1963), Francia (Vigouroux, 1975), Siria (Al-Ahmad y Mosli, 1993), Marruecos (Serrhini y Zeroual, 1995), Túnez y Turquía (Saydam y Copcu, 1972), España (Caballero *et al.*, 1980), Argentina (Docampo *et al.*, 1981), Jordania (Manluk *et al.*, 1984), Argelia (Bellahcene *et al.*, 2000), Israel (Levin *et al.*, 2003a), Siria (Sanei *et al.*, 2004), Malta (Porta-Puglia y Mifsud, 2005), Montenegro (Latinovic y Vucinic, 2010). En Andalucía, el incremento y expansión de la enfermedad ha coincidido con la expansión del olivar

y las innovaciones tecnológicas en la producción oleícola que caracterizan a la “Nueva olivicultura”.

En Argentina el primer diagnóstico de *V. dahliae* se realizó en el área olivarera de Cruz del Eje (Córdoba) y Sumalao (Catamarca), raza SS-4 de virulencia media. En sucesivos años las plantas se tornaban decadentes e improductivas, especialmente en ‘Manzanilla’. Posteriormente se identificó en otras áreas de La Rioja, San Juan y Mendoza. No había antecedentes de que la cepa T1 o defoliante estuviera presente (Docampo *et al.*, 1981; Otero, 2005), López Escudero y Mercado-Blanco (2011) opinan que tal vez esté presente en todos los países que se cultiva olivo.

1.4.6 Evaluación de daños económicos causados por *V. dahliae*

Los daños económicos causados por *V. dahliae*, y su amplia distribución, hacen que sea la enfermedad más importante del olivo (Wilhelm *et al.*, 1965; Thanassouloupoulos *et al.*, 1979; Cirulli, 1981; Tjamos y Jiménez Díaz, 1998).

López-Escudero y Mercado-Blanco (2011), opinan que es complicada una adecuada evaluación de pérdidas económicas causada por VO en plantaciones de olivo. Los árboles de olivo están sometidos a repetidas infecciones, en la misma o en sucesivas estaciones, desde los propágulos presentes en el suelo. El árbol queda afectado parcialmente, con severidad variable o síntomas de marchitamientos, limitando o deteniendo el crecimiento y la producción. La floración del olivo tiene lugar en ramas de un año, por lo tanto, la producción esperada del árbol para la siguiente estación estará perdida. Sin embargo, los árboles afectados pueden superar la enfermedad y pueden alcanzar rendimientos normales en las siguientes estaciones de crecimiento. Para aumentar la complejidad de la evaluación del impacto de VO, el olivo tiene un largo período juvenil antes de entrar en producción, y durante este tiempo, el árbol tiene altas probabilidades de morir si es atacado por el patógeno. Finalmente, dada la longevidad del olivo, éste puede ser productivo por varias décadas, todo lo dicho plantea dificultades para una evaluación exacta del valor económico, y pérdidas resultantes de la verticilosis.

Se han realizado ensayos parciales de incidencia y resultados de pérdidas de cosecha por VO. Así, en Grecia, Thanassouloupoulos *et al.* (1979) reportaron una incidencia media de 2-3 % de verticilosis (1% de mortalidad), y 1% de pérdidas de cosecha a nivel

nacional; y en ataques en olivares de ‘Picual’ regado con aguas salina tuvieron incidencias del 20 al 50 % y originaron pérdidas del 75 a 89 % de la cosecha (Levin *et al.*, 2003a). En Argentina su presencia se ha detectado en las provincias de Córdoba, La Rioja, Catamarca y Mendoza. Se ha evaluado incidencia y severidad tanto en árboles jóvenes (menos de 15 años) y adultos (más de 25 años), pero no ha evaluado la relación de la enfermedad con el rendimiento.

1.4.7 Factores ambientales y culturales en el desarrollo de verticilosis

El desarrollo de la VO es favorecido por temperaturas del aire y del suelo cercanas al óptimo del crecimiento del patógeno. Observaciones en California indicaron que temperaturas del aire entre 20 y 25°C en primavera, favorecen a las epidemias de VO (Wilhelm y Taylor, 1965). En Andalucía, el desarrollo de síntomas es atenuado o interrumpido tan pronto aumentan las temperaturas a principios del verano. Por el contrario, el riego es probablemente la práctica de cultivo que más influye en el desarrollo de la VO y más significativamente ha contribuido a extender la enfermedad en la moderna olivicultura en Andalucía. Así, varios estudios en Andalucía, Italia, Marruecos y Siria han constatado repetidamente que, tanto en olivares extensivos como de alta densidad de plantación, la incidencia de VO es muy superior en cultivos de regadío comparada con los de secano (Jiménez-Díaz *et al.*, 1998).

1.4.8 Diagnóstico de verticilosis

En muchos casos los síntomas de VO no son suficientemente específicos y el diagnóstico de la enfermedad requiere demostrar la presencia de *V. dahliae* en tejidos afectados mediante aislado en medio de cultivo u otros procedimientos. Para tal fin es recomendable utilizar agar-agua suplementado con aureomicina (30mg/L) e incubar los cultivos a 24 a 27°C durante una semana, así como considerar que la naturaleza y época de muestreo de los tejidos afectados influyen sobre la eficiencia del aislamiento. Las técnicas de aislamiento a partir de tejidos sintomáticos requieren mayor tiempo (7-12 días) que las técnicas moleculares y pueden ser erráticas, ya que depende de numerosos factores, la mayor frecuencia de aislado en cultivo puro se alcanza en primavera y otoño, utilizando brotes o

ramas escasamente lignificados o necrosados (Mercado-Blanco *et al.*, 2001; Levin *et al.* 2003a; López Escudero y Blanco López, 2005).

Los cultivos de *V. dahliae* se pueden identificar por la morfología de sus estructuras reproductivas, así como mediante ensayos mediante PCR simple multiplex utilizando DNA miceliar y los iniciadores DB19/DB22/esp-def1, específico de *V. dahliae* ND y otro de *V. dahliae* D (Mercado Blanco *et al.* , 2003b). Mercado *et al.* (2005) posteriormente desarrollaron un diagnóstico molecular de los patotipos de *V. dahliae*, basado en la amplificación simultánea de marcadores específicos de los patotipos D y ND mediante un protocolo de dúplex-nested-PCR. El procedimiento es efectivo en la detección rápida (62 horas) e inequívoca de los patotipos D y ND de *V. dahliae*, tanto en plantas de vivero inoculadas artificialmente, como en árboles adultos infectados procedentes de plantaciones comerciales; su aplicación a muestras de diverso origen geográfico indicó una alta frecuencia de infecciones por el patotipo D, que concuerda con los informes que alertan a olivicultores sobre la expansión del patotipo más virulento de *V. dahliae* a nuevas áreas de cultivo.

La tecnología de PCR cuantitativa en tiempo real (real-time quantitative PCR, o qPCR), permitió cuantificar al patógeno en tejidos de olivo infectados demostrando que la cantidad de ADN de *V. dahliae* presente en diferentes genotipos de olivo infectados está correlacionada en mayor medida con su grado de susceptibilidad al patógeno que con la virulencia del patotipo. Los resultados demuestran que la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real es una excelente herramienta tanto para monitorear la colonización de los tejidos de olivo por *V. dahliae*, como para evaluar la resistencia o tolerancia de genotipos de olivo a la verticilosis. Su empleo sería una inestimable ayuda en programas de búsqueda de resistencia a esta enfermedad. (Mercado Blanco *et al.*, 2001, 2002, 2003 a, 2003b). La detección temprana, rápida y consistente de la infección en plantas de olivo por los patotipos (D) y (ND) de *V. dahliae* es, entre otros, una acción clave para desarrollar con éxito una estrategia de control integrado de la verticilosis del olivo, cuya aplicación para la certificación de material de plantación como libre del patógeno ayudaría a prevenir la utilización de material de olivo infectado.

Para aumentar la especificidad de la qPCR se usan sondas Taqman que permite medir la producción de productos de PCR mediante un sistema de sondas marcadas mediante dos fluoróforos. Hay que resaltar dos ventajas primordiales frente a las sondas inespecíficas, como el bromuro de etidio o el SYBR GREEN, pues con las sondas Taqman la

fluorescencia que se produce es específica de la amplificación que estamos estudiando, además de permitir que se usen varios fluoróforos en la misma reacción y detectar varios DNA/RNA al mismo tiempo. La desventaja con la que nos encontramos es que hay que diseñar sondas específicas en cada estudio, mientras que con las inespecíficas no se necesitaría diseñar una nueva para cada ensayo lo que, por otro lado, provoca que aumente el número de falsos positivos (disminuye especificidad) (Bilodeau *et al.*, 2012).

1.5 Importancia y aspectos a estudiar sobre la “rama seca”

Las conclusiones generales fueron que en la causalidad de la “rama seca” se encontrarían involucrados distintos microorganismos cuya actividad y expresión pueden estar condicionadas por los factores abióticos, aunque faltaría establecer la importancia relativa de los patógenos detectados. El número de plantas infectadas con *V. dahliae* podría ser mayor debido a que la época de muestreo (otoño) no fue la más indicada para su detección (Docampo, *et al.*, 1981; Roca *et al.*, 2001).

El diagnóstico a partir de tejidos infectados puede presentar dificultad según la época del año, lugar, la presencia y crecimiento del hongo en el árbol por el efecto de las temperaturas (muere a más de 35 y menos de 0 a 5°C (Montes *et al.*, 1997; Tossi y Zazzerini, 1998; Trapero y Blanco, 2008). En olivo se puede dar el fenómeno de recuperación natural (Wilhelm y Taylor, 1965; Thanassouloupoulos *et al.*, 1979; Blanco López y Jiménez Díaz, 1995; Hiemstra, 1998). Esto puede explicarse parcialmente por la inactivación o muerte del hongo en el xilema. La reducción de síntomas aéreos va unida a la dificultad o imposibilidad de recuperar cultivos del hongo de ramas afectadas en medios microbiológicos (Wilhelm y Taylor, 1965; Rodríguez Jurado, 1993; Levin *et al.*, 2003a), y de determinar la presencia de ADN fúngico en el tallo (Mercado Blanco *et al.*, 2001). No se sabe aún cuál es el mecanismo de recuperación, aunque se presume que resulta de la compartimentalización del hongo en el xilema infectado mediante tejidos cicatriciales, o por xilema secundario producido por el cambium vascular, unido a la limitada capacidad de crecimiento radial de *V. dahliae* en el xilema infectado (Rodríguez Jurado, 1993).

Por todo lo mencionado precedente, tanto por la dificultad del diagnóstico microbiológico para diagnosticar *V. dahliae*, como la importancia de la detección diferencial de los patotipos fue el motivo por el cual en el presente trabajo se utilizaron técnicas moleculares para diagnosticar los patotipos presentes en el ensayo.

Otro aspecto a tener en cuenta es que *V. dahliae* puede presentarse en forma asintomática. La infección vascular especialmente a nivel radicular, depende de la virulencia del aislamiento, resistencia del cultivar (cv.) y tiene relación con la severidad de los síntomas en la parte aérea. Si bien puede predecirse el riesgo de enfermedad conociendo la densidad de inóculo en el suelo antes de la plantación, en cultivos leñosos probablemente sólo sería indicativo en los primeros años. Al inóculo inicial hay que añadir el que se genera cada año. En La Rioja, ambos patotipos de *V. dahliae* fueron detectados por PCR en cv. 'Picual'.

En cualquier caso la recuperación está directamente relacionada con la resistencia del cv. e inversamente con la virulencia del hongo, por lo cual la virulencia de la cepa presente debe ser tomada en cuenta para el control de la enfermedad (López-Escudero y Blanco-López, 2005). En otros países la agresividad de la cepa se diagnostica con técnicas moleculares basadas en variantes de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como PCR anidada (nested PCR) que facilitan el diagnóstico e identificación de cepas defoliantes o no defoliantes en forma rápida y precisa (Mercado-Blanco *et al.*, 2003). La información obtenida por PCR es definitiva y por lo tanto, más confiable que la obtenida a través el tamaño y forma de los microesclerocios generados por un aislamiento en medios de cultivo. Posteriormente (Bilodeau *et al.*, 2012) utilizaron una técnica cuantitativa de PCR, qPCR con sondas Taqman, con lo cual se logró aumentar la eficiencia por ser más específico.

La importancia que ha manifestado la rama seca en muchos años, indica la necesidad de intensificar las investigaciones sobre esta patología y realizar una clara diferenciación con factores abióticos que puedan dar la misma sintomatología. Asimismo, los datos de incidencia por zona y cv. no han sido actualizados desde el censo de 1999 y las pérdidas de rendimiento que causa no han sido determinadas, si bien los relevamientos realizados infieren pérdidas en la producción ya que se determinó intensidad de la enfermedad por incidencia y severidad. En este trabajo realizado en una finca de olivo en la zona del Valle Antinaco-Los Colorados, Catinzaco, Departamento Chilecito, provincia de La Rioja uno de los objetivos fue evaluar dichas pérdidas en forma directa registrando la producción de las plantas asintomáticas, sintomáticas y el grado de severidad y estimar las relaciones entre los valores de rendimiento y severidad, durante dos cosechas. Por otra parte de los antecedentes previos resulta notorio que es necesario establecer adecuadamente la relación

entre patógeno aislado y sintomatología observada ya que en la actualidad no está bien definida.

1.6 HIPOTESIS

- ✓ Los agentes bióticos y abióticos asociados al síndrome producen diferentes síntomas.
- ✓ La incidencia y severidad varían con el cv. de olivo.
- ✓ Las condiciones ambientales influyen en el nivel de severidad.
- ✓ La enfermedad reduce el rendimiento en frutos.
- ✓ *V. dahliae* puede ser detectado en plantas con rama seca.

1.7 OBJETIVO GENERAL

Revisar los antecedentes y ampliar el conocimiento sobre la etiología, condiciones favorables para su manifestación, comportamiento varietal e importancia de la enfermedad denominada “rama seca” del olivo en la provincia de La Rioja.

1.8 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Revisar los antecedentes disponibles sobre el tema.
- ✓ Evaluar síntomas, incidencia y severidad de “rama seca” en una finca ubicada en Catinzaco (Depto. Chilecito, La Rioja).
- ✓ Conocer la respuesta varietal frente a la enfermedad.
- ✓ Analizar la relación entre severidad y variables climáticas.
- ✓ Cuantificar la pérdida de rendimiento en fruto según severidad.
- ✓ Identificar los microorganismos asociados a “rama seca”.
- ✓ Discriminar las razas de *V. dahliae* en plantas enfermas.

2.MATERIALES Y METODOS

2.1 Características de la finca analizada en Catinzaco, Depto. Chilecito, provincia de La Rioja

Los registros de campo fueron obtenidos de una finca de olivo ubicada en el Valle Antinaco -Los Colorados, Catinzaco, Departamento Chilecito, provincia de La Rioja (29°4'0" S, 67°23'0"O, 771 msnm). La zona es montañosa, árida, con gran amplitud térmica y escasas precipitaciones estivales (Anexo Tabla 1). La finca disponía de 961 ha de olivo, plantados entre 1995 (lote 1) y 2001 (lote 9), cada lote o etapa de plantación estaba subdividido en sub lotes no mono varietales que incluían algunos de los siguientes cvs. ‘Arbequina’, ‘Barnea’, ‘Manzanilla’, ‘Nabali’, ‘Picual’, entre otras. En los años 1995 y 1996 los olivos se plantaron en un marco de 6 x 6 m (277 plantas/ha) y en los siguientes años (1997 a 2000) en 7 x 5 m (285 plantas/ha). Los cvs. de olivo en cada lote fueron variando según intereses comerciales quedando distribuidos de la siguiente manera: 44% cvs. de mesa (‘Manzanilla’, ‘Nabali’, ‘Santa Catalina’ y ‘Novo’); 30% cvs. aceiteros (‘Barnea’ y ‘Arbequina’) y 25% doble propósito (‘Picual’, ‘Mission’ y ‘Picholine’). En el Tabla 5 se listan los cvs. de olivo, año de plantación (1995 al 2001) con el número de lote o etapa entre paréntesis y área plantada (ha) para Catinzaco. La plantación de 1995 se realizó con material de propagación procedente de Israel, mientras que ‘Arbequina’ se plantó a partir de 1996 con material vegetal de origen local. Excepto para el cv. ‘Santa Catalina’, para el resto se evaluó incidencia y severidad.

Tabla 5. Superficie plantada (ha) de olivo en finca Catinzaco, (La Rioja).

Cultivares.	Año de plantación (lote)							Ha	%
	1995(1)	1996(2)	1997(3)	1997(4)	1998(5)	1999(6)	2001(9)		
‘Picual’	8	12	42	21	32	101	107	323	32
Barnea	2	18	11	12	13	76	67	199	20
Arbequina	-	11	32	18	8	68	50	187	19
Manzanilla	6	44	30	14	40	-	-	134	11
Nabalí	15	-	16	14	17	17	-	79	11

Kadesh	1	-	2	1	-	-	-	4	0,4
Mission	1	-	2	-	2	3	-	8	0,6
Sirio	2	4	3	-	-	3	-	12	1
Novo	-	-	-	-	-	-	7	7	0,6
Picholine	-	-	-	-	-	5	-	5	2
Santa Catalina	-	-	3	-	-	-	-	3	0,3
Total	35	89	141	80	112	273	231	961	

(): Número de loteo etapa de plantación (-): cv. no plantado.

2.2 Incidencia en una finca en Catinzaco, 2001-2005

El porcentaje de plantas enfermas en 2001 a 2005, se estimó en base a los datos de cantidad de plantas afectadas con “rama seca”, tomados en la finca durante dicho período, en los lotes 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 9 y en los cvs. ‘Arbequina’, ‘Barnea’, ‘Kadesh’, ‘Manzanilla’, ‘Nabali’, ‘Novo’ y ‘Picual’. Representando 756 ha con 268.700 olivos, de las 961 ha totales. Cada variedad estuvo representada en 4 a 7 lotes, que se consideraron como repeticiones. El % incidencia se calculó de la siguiente forma:

$$\% \text{ de incidencia} = \frac{\text{Total plantas enfermas} \times 100}{\text{Total de plantas}}$$

Los datos de incidencia fueron transformados por logit para normalizarlos y estabilizar la varianza residual y fueron analizados utilizando un software para análisis estadístico (Genstat edición 12^{va}). La significancia de los datos para cada año (fecha de evaluación), cv. e interacción año x cv. fue obtenida mediante análisis de varianza (ANOVA). Para análisis de los casos significativos ($P < 0.05$) se realizó la prueba de comparación de medias (LSD o diferencia mínima significativa).

2.3 Incidencia y severidad en lotes 6 y 9 en Catinzaco (La Rioja), en 2009

Las estimaciones de porcentajes de plantas enfermas (incidencia) y área de copa afectada en los sectores este y oeste del árbol (severidad) se realizó en lote 6 (plantado en 1999), se evaluaron 77.725 olivos ‘Arbequina’, ‘Barnea’, ‘Mission’, ‘Nabali’, ‘Picual’,

‘Picholine’ y ‘Sirio’) y lote 9 (plantado en 2001), se evaluaron 45.469 olivos ‘Arbequina’, ‘Barnea’ y ‘Picual’). La incidencia se estimó según recuento de plantas con síntomas sobre el total de plantas.

También se evaluó severidad como porcentaje de área afectada. Método: la copa de cada planta se dividió virtualmente en dos sectores: lado este y oeste (interfilas de las plantas). A cada lado le correspondió el 50% de la copa. En cada sector (este u oeste) se analizó la presencia de la enfermedad procediendo de la siguiente manera: mediante una línea imaginaria vertical y otra horizontal, que se cortaban en cruz, fue dividido el sector este u oeste en 4 partes. Se estimó la presencia de ramas, brindillas y hojas secas, si unidos imaginariamente representaban un cuarto del sector se indicó 25 % de severidad. El promedio de las observaciones tomadas en el lado oeste y este fue tomado como porcentaje de la planta afectada. Ej.: lado oeste 30%, lado este 20%, severidad promedio o porcentaje de planta afectada 25%. Los datos de severidad se analizaron estadísticamente por análisis de varianza para datos desbalanceados con número de repeticiones variable.

2.4 Determinaciones en cv. ‘Picual’, lote 6, en la finca ubicada en Catinzaco, depto.

Chilecito, La Rioja

2.4.1 Síntomas, incidencia y severidad en ‘Picual’, lote 6, Catinzaco

El lote 6, plantado en 1999, contenía ‘Arbequina’, ‘Barnea’, ‘Nabali’, ‘Mission’, etc. (Tabla 6).

El cv. ‘Picual’ estuvo entre los más afectados por “rama seca” junto con ‘Barnea’ y ‘Manzanilla’. Esto motivó que se lo eligiera para la evaluación de síntomas y severidad. Además, era el cv. con mayor número de plantas enfermas en el momento del ensayo.

A fines de marzo 2010 en las 110 en las plantas de ‘Picual’ elegidas se registraron los siguientes síntomas: “apoplejía”, “decaimiento lento”, “síndrome de cepa defoliante”, “defoliación marcada”, “rama roja, azulada o púrpura”, “frutos desecados o momificados”, emisión de chupones” y daños producidos por heladas y granizo.

Entre marzo 2009 y marzo 2010, se efectuó un seguimiento mensual de los niveles de severidad en 110 plantas inicialmente sintomáticas y 20 plantas que no presentaban síntomas al inicio de las observaciones. Cada planta fue considerada como unidad ex-

perimental. La severidad, porcentaje de la copa afectada, fue registrada en los sectores este y oeste de la copa. Los datos fueron analizados estadísticamente usando análisis de varian-za.

2.4.2 Relación severidad en ‘Picual’ y variables climáticas

Para analizar la asociación severidad con variables climáticas, se utilizaron los datos de temperaturas mensuales (marzo 2009 a 2010) y precipitaciones de los registros mensuales proporcionados por la finca. Las severidades surgieron de las evaluaciones de los porcentajes de copa afectada para el promedio de las plantas para cada mes. Se consideraron las precipitaciones acumuladas en cada período y las sumatorias de días con temperaturas mínimas inferiores a 20°C [$(20 - (T^{\circ} \text{mín.} < 20^{\circ}\text{C}))$] y días con temperaturas máximas superiores a 35°C [$(T^{\circ} \text{máx.} > 35) - 35$]. La relación entre variables climáticas (temperatura, precipitación) y severidad se analizaron con ecuaciones de regresión lineal y no lineal (cuadráticas, exponenciales e hiperbólicas, etc.).

2.4.3 Relación de rendimiento en fruto y su relación con severidad en ‘Picual’

En las cosechas 2009 y 2010 (lote 6, plantado en 1999), se registraron los kilos de frutos de 110 plantas sintomáticas y 20 plantas asintomáticas cosechadas individualmente. Se compararon las medias de rendimiento entre tipo de planta (sintomáticas y asintomáticas) y entre ambos años por medio de la prueba de medias independientes (prueba t).

La reducción de rendimiento fue calculada según Levin *et al.*, 2013a, usando los datos promedio de rendimiento de fruta para ambos años y tipos de planta. El análisis de regresión se realizó entre severidad promedio de “rama seca” y rendimiento para ambos años.

2.5 Frecuencia de microorganismos

2.5.1 Muestras vegetales y de suelo

Las muestras vegetales fueron colectadas en noviembre 2009, junio y noviembre 2010 y octubre 2011. Para los aislamientos de *Oomycetes*, *Fusarium*, y *V. dahliae* se siguieron los protocolos descritos en la bibliografía para cada caso (Booth, 1971; Tjamos,

1993; Gerlach y Nidemberg, 1982; López Escudero y Blanco López, 2001; Leslie y Summerells, 2006; Otero, 2009). Las muestras vegetales (hojas, brindillas, raíces) y de suelo fueron extraídas en 2009, al azar, de 34 plantas (25 enfermas y 9 asintomáticas) al inicio de primavera (temperatura inferior a 35°C) por ser época propicia para aislado de microorganismos. Se extrajeron 4 sub-muestras del área bajo la copa, siguiendo dos criterios: a) ubicación de los emisores o goteros; y b) ubicación de los síntomas de “rama seca” en el árbol (lateral o generalizado), priorizando el primer criterio. Se seleccionaron las raicillas menores a 5 mm de diámetro, preferentemente con descortezamiento y color pardo-negruzco. Las muestras fueron extraídas con el suelo de la rizosfera. Se mantuvieron en conservadoras a baja temperatura hasta procesamiento en laboratorio.

Identificación de *Fusarium*: las observaciones morfológicas se realizaron en cultivos purificados desarrollados sobre medios agar hojas de clavel (CLA) y agar síntesis neutra (SNA). Los registros de las características de crecimiento y color de los cultivos fueron efectuados sobre APG 2% (Leslie y Summerell, 2006).

Identificación de *Phytophthora* y *Pythium*: se emplearon dos técnicas de aislamiento: a) trampa de hoja de *Rhododendrom*, para determinación en raíces y suelo (Singleton *et al* 1992), b) aislamiento en medio de cultivo semi-selectivo para determinación en raíces. El medio de cultivo empleado fue el medio de Jeffers y Martin modificado (PARP modificado), que consistió en CMA (agar harina de maíz) más antibióticos: (CMA 7g/l, agar bacteriológico 14g/l, ampicilina 250mg/l, Rifampicina 10mg/l, y fungicidas 75%: Pentacloronitrobenzeno 100g/l y Benomil 12mg/l). La modificación del medio Jeffers y Martin original (P5ARP) consistió en el agregado del Benomil y no emplear Pimaricina (por no hallarse en el mercado nacional y habiéndose observado por medio de ensayos preliminares que no afectaba la selectividad del medio) (Jeffers y Martin, 1986; Pastor *et al*, 2004). Preparación del medio CMA se pesaron 40g de polenta en 1 l de agua, se incubaron en baño térmico a 58°C (nunca más de 60°C) durante una hora. Se filtraron con papel de filtro o algodón. Se ajustó a pH a 6,5-7. Se agregaron 12g/l de agar al filtrado. Se auto clavó por 20' a 121°C. Para *Pythium* el medio se prepara con agua corriente y para *Phytophthora* con agua bidestilada. De este modo se obtienen las mejores estructuras para la identificación de las especies.

En ambas técnicas la incubación se realizó a 21°C y con fotoperíodo: 12h luz negra (UV)/12h luz blanca (tubo fluorescente), que constituyen las condiciones necesarias

para el desarrollo de las estructuras específicas de ambos géneros: zoosporangios, oosporas y clamidosporas e hinchamientos hifales. Las observaciones al microscopio para determinar la presencia de dichas estructuras se iniciaron a las 48 h de incubación y se continuaron diariamente hasta los 10 días, ya que los tiempos de desarrollo son diferentes para cada una de estas. Para los estudios morfológicos se utilizó microscopio óptico (MO).

a) trampa de *Rhododendrom* para el aislamiento de *Phytophthora* de suelo y raíces: se lavaron hojas de *Rhododendron* con agua corriente, se cortaron en trocitos de 3mm. Se suspendió suelo fresco sin tamizar (1/5) en agua destilada estéril. Se agregaron los trocitos que queden flotando. Se incubaron 3-5 días en fotoperiodo de 12 horas de luz blanca/ luz negra a 21°C. Se observó la presencia de necrosis en los trocitos de hojas. Se lavaron las hojas necrosadas con agua destilada estéril, se dejaron orear sobre papel absorbente estéril y se sembraron en medio semi-selectivo. Se observó el crecimiento de colonias e identificaron especies.

b) aislamiento en medio de cultivo semi-selectivo para determinación en raíces se seleccionaron raíces con síntomas de descortezado en raíces jóvenes y que se cortaban fácilmente (en olivo se observan las raicillas más claras). Se desinfectaron con hipoclorito al 1% (solución comercial) durante 1'. Se enjuagó con agua destilada estéril y dejó orear sobre papel absorbente estéril. Se trabajó en cámara de flujo. Se cortaron las raicillas en secciones de 5mm, se sembraron en medio Jeffers y Martin modificado procurando que los tejidos queden embebidos en el medio. Se incubaron hasta 7 días a 21-25°C en fotoperiodo de 12 horas de luz blanca/ luz negra. *Phytophthora* tiene un micelio más fino que *Pythium*, de paredes no paralelas, colonia de crecimiento desorganizado, color castaño claro. Se realizar repiques a medio fresco para desarrollar colonias puras e incubarlas bajo las mismas condiciones. Se identificaron especie por medio de preparados temporales y observación en microscopio.

Para aislar *V. dahliae* se recolectaron 10 brindillas o brotes del año (jóvenes), con inicio de síntomas (hojas de tonalidad verde mate, antes de pasar a amarillo o pardo), menores 1.5 cm de diámetro de la zona de bifurcación (horqueta), del borde entre la parte necrosada y no necrosada (Docampo, com. pers.; Otero, 2009). En el caso de plantas muy afectadas se recolectó de los “chupones” o “varetas”.

En laboratorio, el material vegetal se lavó con esponja, desinfectó con hipoclorito de sodio 2% (lavandina comercial 55g/l) por 2' y se lavó bajo chorro de agua corriente por 30' a 1 h. Bajo flujo laminar, las brindillas se descortezaron superficialmente con bisturí, se cortaron trocitos de tejido o escamas incluyendo tejido xilemático y se desinfectaron con hipoclorito de sodio 1% por 20". Los trocitos fueron colocados en placas con agar papa glucosado (APG 2%, pH 7). Al medio de cultivo tibio se agregaron 100 mg /ml del antibiótico estreptomicina. Las placas fueron incubadas a 25°C en oscuridad.

Las muestras de suelo para contabilizar microesclerocios de *V. dahliae* se extrajeron con barreno, descartando los primeros centímetros de suelo. Se tomaron cuatro submuestras de 200 g, a 30 y 60 cm del tronco, equidistantes y en la línea de riego (Otero, 2009). Cada muestra de suelo fue desecada a 22-25°C en estufa durante una semana para eliminar los propágulos sensibles a la desecación. La presencia de microesclerocios de *V. dahliae* fue analizada por el método de filtrado húmedo. El suelo se homogenizó y tamizó en una malla de poro de 0,8 mm. Submuestras de 25 g se resuspendieron en 100 ml de agua estéril y agitaron durante 1 hora a 270 rpm. La suspensión se filtró con tamices de 125 y 37 µm. Los residuos retenidos en el tamiz más pequeño, se re suspendieron en 100 ml de agua destilada y sembraron alícuotas de 1 ml en medio agar pectato sódico modificado o APSM (Tjamos, 1993; López Escudero y Blanco López, 2001; Otero, 2009).

2.6 Detección molecular de la cepa defoliante de *V. dahliae*

Los estudios moleculares fueron realizados en INTA-IPAVE-Córdoba bajo la supervisión de la Dra. Laura Otero. Para la extracción de ADN de brindillas de olivo se utilizó un kit comercial DNeasy Plant Mini kit (Quiagen). Las brindillas se descortezaron cuidadosamente y las escamas de tejido o madera se molieron o maceraron en mortero con nitrógeno líquido para convertirlos en polvo. Paralelamente, se realizó la extracción de ADN de 100 mg de micelio liofilizado, para emplear como control positivo en las reacciones. La pureza y concentración de ADN se determinó en espectrofotómetro y electroforesis en gel de agarosa. Para la caracterización de las cepas del hongo de *V. dahliae* se utilizó la variante PCR anidada (nPCR) se siguió el protocolo de Pérez-Artés *et al.* (2000). En este trabajo se identificaron dos bandas RAPDS asociadas con los patotipos defoliante (D, 1 kb) y no defoliante (ND, 2 kb) producidos con los oligos:

OPH-19: 59-CTGACCAGCC

OPH-20: 59-GGGAGACATC

Estos fragmentos de ADN fueron parcialmente secuenciados y de las secuencias se diseñaron los cebadores D1/D2 (patotipo defoliante) y ND1/ND2 (patotipo no defoliante). Las cepas defoliantes D (D1/D2), se discriminaron empleando cebadores que amplificaron un fragmento de 548pb y para no defoliante usando ND (ND1/ND2) (fragmento de 1410 pb) (Pérez Artes *et al.*, 2000; Mercado Blanco *et al.*, 2002, 2001). En la segunda reacción de PCR anidada se emplearon cebadores internos:

(INTD2f/IND2r: fragmento de 462 pb para cepas defoliantes.

INTND2f/ INTND2r: amplificación fragmento de 824 pb para no defoliantes.

En este protocolo se realizan dos reacciones consecutivas, de manera que la alícuota de los productos de la primera reacción, realizada con el DNA problema y el par de cebadores externos, se utilizó para la segunda, en la que se emplea el par de cebadores internos apropiados y condiciones de reacción más astringentes (Pérez Artes *et al.*, 2000; Mercado-Blanco *et al.*, 2003. 2002, 2001). En este estudio, se utilizó este protocolo anidado pero no dúplex, realizando las reacciones por separado. El ciclado se realizó según Mercado Blanco *et al.* (2003).

2.7 PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

También en el IPAVE con la Dra. Laura Otero se ajustó la técnica de análisis mediante PCR en tiempo real, qPCR con sondas TaqMan. Esta técnica se usó para optimizar el diagnóstico por su sensibilidad y rapidez para detectar *V. dahliae* directamente de muestras vegetales. Esta sonda posee un fluoróforo en su extremo 3' y una molécula en el 5' que es el inhibidor, quencher o desactivador de la fluorescencia; esta sonda marcada hibrida específicamente en la parte central del producto de PCR a obtener. De este modo, cuando se efectúa la PCR (con la sonda más el par de cebadores específicos), la sonda hibrida en el amplicón, pero, debido a la cercanía del fluoróforo al quencher, no se emite fluorescencia; cuando la polimerasa se encuentra con la sonda la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'-3', lo cual provoca la separación del quencher del fluoróforo y, por tanto, la

emisión de fluorescencia está relacionada con la cantidad de amplicón producido. Las sondas Taqman, diseñadas para aumentar la especificidad de qPCR, poseen actividad exonucleasa 5'-3' de la polimerasa Taq y la detección se basa en fluoróforos. (6-carboxyfluorescein, acronym =FAM). La señal fluorescente permite la medición cuantitativa de la acumulación del producto durante la etapa exponencial de PCR aumentando significativamente la especificidad de la detección. Tienen un fluoróforo unido al extremo 5' del oligo y doble quencher inhibidor de la fluorescencia en el extremo 3' (3' Iowa Black + ZENTM= quencher interno ubicado entre dos nucleótidos), pegado a la secuencia de la sonda.

Fluoróforo (FAM)

Doble quencher: 5' FAM / 3' Iowa Black + ZENTM

Tetrachlorofluorescein, acronym (TET).

Quenchers (tetramethylrhodamine, TAMRA).

La mezcla de reacción de PCR estuvo compuesta por: real master mix buffer (Applied Biosystems): oligonucleótidos de amplificación Vdf: 1 μ M, Vdr: 1 μ M; sonda: TaqMan: 0,1 μ M; ADN: 2 μ l; agua: 3 μ l; volumen total: 20 μ l. Las condiciones de ciclado que se utilizaron fueron: 95°C 10' y 55 ciclos de 95°C por 15'', 60°C 45''. Se cambiaron algunos parámetros respecto al protocolo original de Bilodeau *et al.* (2012) (Otero, com. pers.). Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación fueron los citados por Bilodeau *et al.* (2012):

Vdf: CGTTTCCCGTTACTCTTCT

Vdr: GGATTTCGGCCCAGAAACT;

Sonda: Vdhrc: FAM [5' 6-FAM] CACCGCAAGCAGACTCTTGAAAGCCA [3' IB®FQ-ZENTM] (IDT-Integrated DNA Technologies).

Se realizaron algunas modificaciones del protocolo original como la concentración de la sonda que se fijó en 0,1 μ M. La temperatura de hibridación para nuestras condiciones de trabajo se determinó en 60°C. Las pruebas se realizaron con un termociclador Corbett Rotor Gene 6000. Se obtuvieron curvas de calibración para determinar el límite de detección; y con esto definir los rangos del ciclo Ct. (*cycle threshold*). El valor del Ct es

inversamente proporcional a la cantidad de ADN blanco en la muestra analizada, para muestras positivas, dudosas y negativas. La curva de calibración se hizo, mediante diluciones seriadas de ADN del hongo correspondientes a 1.000 pg, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 1.000 fg, 100 fg, 10 fg y 1 fg. Se comprobó que la eficiencia de los oligonucleótidos es de 94% con un R^2 de 0.99799, el límite de linealidad llega hasta 100 fg de ADN templado partiendo de 1ng. El límite de detección se observó en 10 fg empezando a presentar variabilidad en las mediciones. El ADN de las muestras se ajustó a 20 ng.

3.RESULTADOS

3.1 Incidencia de “rama seca en una finca en la localidad Catinzaco; La Rioja durante 2001-2005

La incidencia de “rama seca” en olivo, observada en Catinzaco, La Rioja, en ‘Arbequina’, ‘Barnea’, ‘Kadesh’, ‘Manzanilla’, ‘Nabali’, ‘Novo’ y ‘Picual’ en el período 2001-2005 y en los lotes 1, 2, 3, 4, 5, 6, y 9, mostró diferencias significativas entre cvs. y fechas de evaluación (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis de varianza de los datos de incidencia transformados (logit) de “rama seca” en Catinzaco, La Rioja, 2001-2005.

Fuente de variación	GL	Cuadrados Medios	P [†]
Cultivar	6	14.53	<u><0,001</u>
Fecha de evaluación	4	31.96	<u><0,001</u>
Interacción	24	0.676	=0,132
Residual	101		

[†] Valor de Probabilidad de acuerdo al test de F.

La evolución desde 2001 a 2005 de la incidencia fue de 1,2 a 10,70%. Alcanzando 8.810 plantas enfermas. La enfermedad fue registrada en todos los cvs. de la finca en Catinzaco (Apéndice Tabla 2). En el grupo compuesto por ‘Arbequina’, ‘Barnea’, ‘Kadesh’, ‘Manzanilla’, ‘Nabali’, ‘Novo’ y ‘Picual’, la menor incidencia significativa respecto al resto fue para ‘Arbequina’ y la mayor para ‘Nabali’, quedando el resto con incidencias significativamente similares ($P \leq 0,05$) (Tabla 7).

Tabla 7. Incidencia (%) de “rama seca” en cvs. de olivo en Catinzaco, 2001 a 2005.

Cultivar	2001	2002	2003	2004	2005	Incidencia Promedio cvs.
Nabalí	5,30	5,62	8,51	12,02	12,66	8,82c
Kadesh	0	0	6,61	19,67	19,90	7,39bc
Manzanilla	2,16	4,76	6,50	12,89	12,90	7,84bc
Novo	1,14	2,59	10,52	12,48	12,43	7,83bc
‘Picual’	2,85	3,58	3,84	7,20	7,45	4,99b
Barnea	1,45	1,55	2,43	8,19	8,42	4,41ab
Arbequina	0,09	0,11	0,16	1,12	1,15	0,53a
Promedio fechas evaluación	1,2a	1,94ab	5,51b	10,51c	10,70c	

LSD cv. 4,457

El cv. con menor incidencia en promedio de “rama seca” en la finca en Catinzaco, para el período 2001-2005 fue ‘Arbequina’ seguido por ‘Barnea’ y los de mayor incidencia fueron ‘Nabali’, ‘Manzanilla’, ‘Novo’, ‘Kadesh’ y ‘Picual’.

A partir del 2005 se eliminaron las plantas con “rama seca”.

3.2 Incidencia y severidad en lotes 6 y 9 en la finca, Catinzaco, La Rioja, en 2009

Hubo diferencias significativas de severidad de “rama seca” entre cvs. en ambos sectores de la copa y en el promedio de sectores (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis de varianza de severidad para cvs., lote 6, en Catinzaco.

Fuente de variación	GL	C.M. ¹ Sev. este	P [†]	C.M. ¹ Sev. oeste	P [†]	C.M. ¹ Sev. media	P [†]
Cv.	6	8718,9	<0,001	7186,2	<0,001	7862,9 ()	<0,001
Residual	223	495,9		418,6		407,4	

[†] Valor de Probabilidad de acuerdo al test de F. 1 C.M.= Cuadrados medios.

En los registros obtenidos en 2009 en plantaciones de olivo de 1999 (lote 6): ‘Mission’ presentó la mayor incidencia del lote (2,14%). ‘Sirio’ y ‘Mission’ presentaron una severidad significativamente más alta ($P \leq 0.05$) que la registrada en el resto de las variedades, mientras que ‘Arbequina’ y ‘Picholine’ mostraron una severidad significativa-

mente más baja ($P \leq 0.05$) que el resto de los cultivares tanto para el sector este, oeste de la copa y promedio (Figuras 3, 4 y 5).

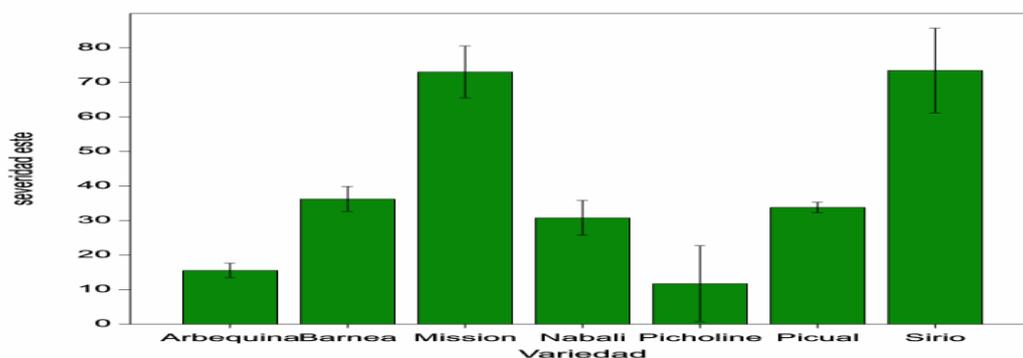


Figura 3. Severidad “rama seca” sector este de la copa, lote 6 Catinzaco. Las barras verticales indican la desviación o el error estándar para cada una de las medias (LSD $P \leq 0.05$).

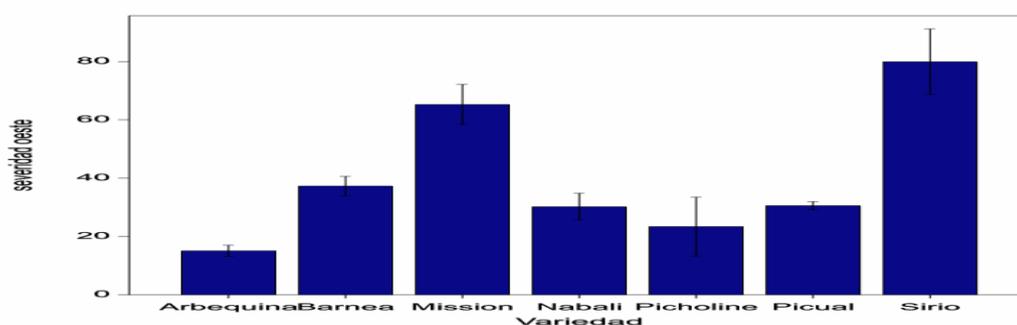


Figura 4. Severidad “rama seca” sector oeste de la copa, lote 6 Catinzaco. Las barras verticales indican la desviación o el error estándar para cada una de las medias (LSD $P \leq 0.05$).

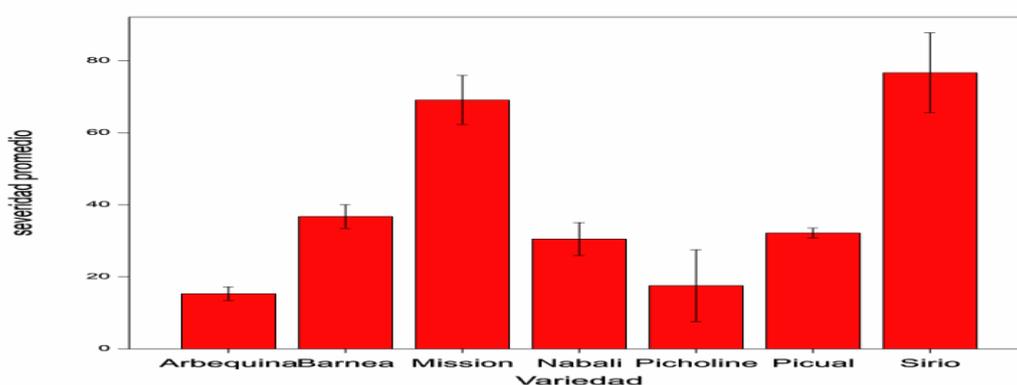


Figura 5. Severidad de la “rama seca” en la totalidad de la copa, lote 6 Catinzaco. Las barras verticales indican la desviación o el error estándar para cada una de las medias (LSD $P \leq 0.05$).

En el lote 9 hubo diferencias significativas de severidad para el sector este, oeste y el promedio, entre cvs. y sectores (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis de varianza de severidad para cvs., lote 9, en Catizaco.

Fuente de variación	GL	C.M. ¹ Sev. este	P [†]	C.M. ¹ Sev. oeste	P [†]	C.M. ¹ Sev. media	P [†]
Cv.	2	8853,6	<0,001	8798,2	<0,001	8810,4 ()	<0,001
Residual	156	508,7		421,7		421,7	

[†] Valor de Probabilidad de acuerdo al test de F.¹ C.M Cuadrado Medio

En los registros de obtenidos en 2009, en plantaciones de olivos del 2001/02 (lote 9), se observó que la incidencia en los cvs. estuvo por debajo del 1,4%. ‘Barnea’ cuadruplicó la severidad de ‘Arbequina’ y duplicó la de ‘Picual’.

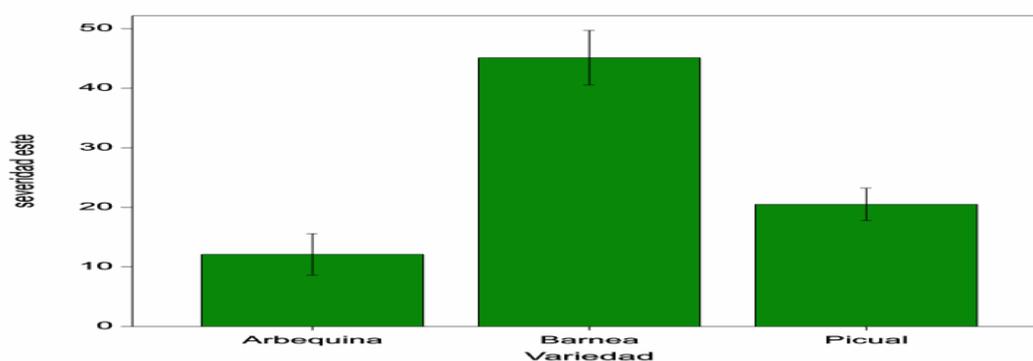


Figura 6. Severidad “rama seca” sector este de la copa, lote 9. Las barras verticales indican la desviación o el error estándar para cada una de las medias (LSD $P \leq 0.05$).

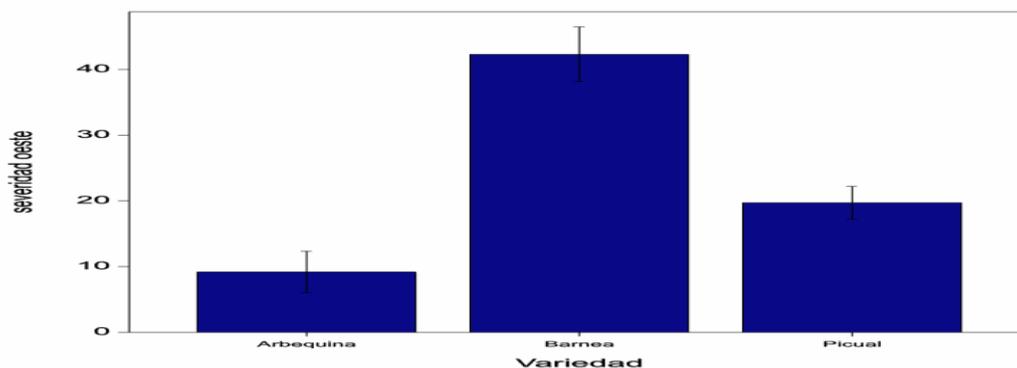


Figura 7. Severidad “rama seca” sector oeste de la copa, lote 9. Las barras verticales indican la desviación o el error estándar para cada una de las medias (LSD $P \leq 0.05$).

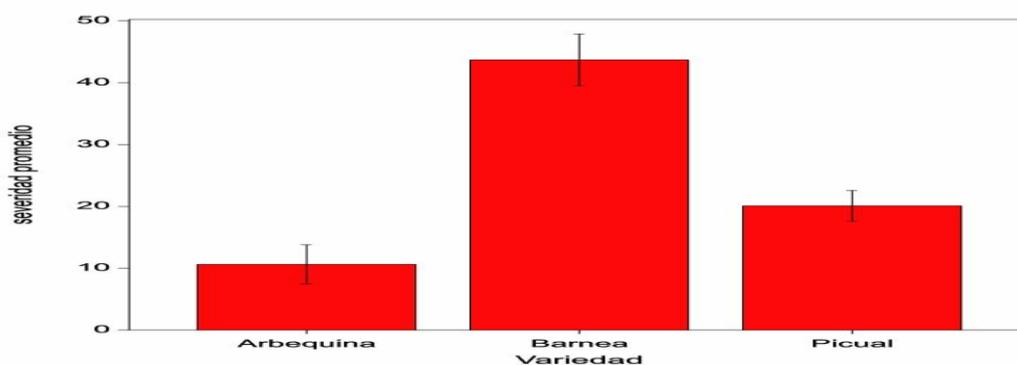


Figura 8. Severidad “rama seca” promedio de la copa, lote 9. Las barras verticales indican la desviación o el error estándar para cada una de las medias (LSD $P \leq 0.05$).

Las Figuras 6, 7 y 8 muestran que hubo diferencias significativas entre las tres variedades, en los dos sectores de la copa y el promedio. En todos los casos ‘Barnea’ presentó una severidad significativamente más alta que las otras dos variedades ($P \leq 0.05$), mientras que ‘Arbequina’ presentó un valor significativamente más bajo ($P \leq 0.05$) que las otras dos variedades para el mismo parámetro.

3.3 Ensayos en lote 6 en ‘Picual’ en Catinzaco, La Rioja

3.3.1 Síntomas en ‘Picual’ en Catinzaco, La Rioja.

Las plantas asintomáticas de ‘Picual’ (lote 6. plantado en 1999) ubicadas en Catinzaco, Chilecito La Rioja no mostraron síntomas de enfermedad entre marzo de 2009 y abril de 2010 (Foto 1). El tipo de síntomas en plantas enfermas se registró al final del ensayo, en abril de 2010 (Tabla 10). Las plantas enfermas presentaron “apoplejía”: necrosis sectorial en las ramas y brotes, clorosis, enrollado y necrosis de las hojas y posterior muerte rápida de brotes y ramas eventualmente el árbol completo (Fotos 2 y 12). El síntoma de “decaimiento lento” (forma crónica de la verticilosis), clorosis y necrosis también fueron observados en los del olivos afectados (Foto 3). El síntoma de defoliación fue observado en plantas afectadas por la cepa defoliante de *V. dahliae* (Foto 4). Se registraron rama púrpura o azuladas en plantas con “decaimiento, apoplejía y/o defoliación” correspondientes al desarrollo de *V. dahliae* (Foto 7), también se observó en corte longitudinal una zona castaña a nivel del xilema, correspondiente al desarrollo de *V. dahliae* (Foto 6). Los frutos formados en olivos enfermos se desecaron, arrugaron y tuvieron menor peso que los sanos y algunos se momificaron (Foto 8). Se produjo también necrosis apical en ramas de “chupones o varetas” (Foto 10); troncos “acostillados o chupados” (Foto 5 y 15); canchros en troncos con o sin exudado (etiología no analizada) (Foto 11); síntomas provocados por heladas y/o granizo: canchros en ramas jóvenes y descortezado en forma concéntrica en ramas más viejas (Foto 13 y 14).

Tabla 10. Síntomas observados en ‘Picual’ en la localidad de Catinzaco en marzo 2010 (lote 6).

Síntomas observados	Nº plantas observadas	% de plantas con síntoma
“Acostillado o chupado de tronco”	95	88
“Rama púrpura azulada o roja”	87	81
“Fruto momificado”	79	73
“Chupón o vareta” con necrosis apical de ramas”	78	72
“Apoplejía”	13	12
Cancro en tronco	65	60
Rama negra y descortezadas	5	5
Síntomas por heladas	76	75

3.3.2 Incidencia en ‘Picual’

En el lote 6, Catinzaco, plantado en 1999 con olivo ‘Picual’ la incidencia de “rama seca” en plantas sintomáticas aumentó seis veces desde 2002 al 2006 (0,53, 0,67, 2,2, 3,38%) mientras que la incidencia en 2009 fue de 1,09% (a partir del 2005-2006 se eliminaron las plantas enfermas).

3.3.3 Severidad en ‘Picual’ en Catizaco

El ANOVA realizado con los datos de severidad en ‘Picual’ plantado en 1999 indicó efecto significativo para los valores de severidad cuando se consideró presencia de síntoma y fechas de evaluación como fuente de variación ($P \leq 0,05$), mientras que el efecto de la interacción fue no significativo ($P \leq 0,05$) (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis de varianza de severidad de “rama seca” sobre ‘Picual’.

Fuente de variación	GL	C.M. ¹ Sev. este	P _⊥	C.M. ¹ Sev. Oeste	P _⊥	C.M. ¹ Sev. media	P _⊥
Presencia de síntoma	1	597,6	<u><0,001</u>	509,0	<u><0,001</u>	554,4	<u><0,001</u>
Fechas de evaluación	12	373,5	0,106	389,3	<u>0,005</u>	367,1	<u>0,047</u>
Interacción	12	373,5	0,106	389,3	<u>0,005</u>	367,1	<u>0,047</u>
Residual	1662	243,8		218,3		207,1	

⊥ Valor de Probabilidad de acuerdo al test de F.¹ Cuadrado Medio.

La severidad promedio de “rama seca” en plantas de olivo sintomáticas (lote 6) fue de 48,5% en marzo de 2009, alcanzó un pico en julio (55,5%) y luego en agosto bajó por efecto de la poda de parte apical (48,1%). En septiembre nuevamente comenzó a aumentar (57%) con un pico máximo en noviembre 2009 (69,4%) a partir del cual se mantuvo y disminuyó en marzo 2010 (57%). Fueron significativas todas las comparaciones de severidades oeste y promedio entre sana y enfermas, entre fechas de evaluación e interacción, mientras para severidad este no fueron significativas entre prospecciones e interacción. Las severidades de sector este siempre fueron mayores a las del oeste (Tabla 12).

Tabla 12. Severidad en 110 plantas de ‘Picual’, marzo 2009/abril 2010 en Catizaco.

Mes	Fecha de evaluación	Sev. Este	Sev. oeste	Sev. promedio
Marzo 2009	0	51,6a	42,0 a	48,5 a
Abril	1	53,4 ab	42,5 ab	50,0 a
Mayo	2	55,3 ab	43,4 abc	51,6 ab
Junio	3	59,7 bcd	45,3 abcd	55,5 abc
Julio	4	49,6 a	42,4 a	48,1 a
Agosto	5	60,3 bcd	46,8 abcdef	57,0 abcd
Septiembre	6	67,5 ef	52,0 defg	65,1 cde
Octubre	7	68,9 ef	53,3 efg	66,0 cde
Noviembre	8	72,5 f	55,4 g	69,4 e
Diciembre	9	69,5 ef	54,4 fg	67,4 de
Enero 2010	10	58,7 abc	49,6 bcdefg	57,8 abcd
Febrero	11	63,9 def	50,4 cdefg	61,1 bcde
Marzo	12	61,1 cdef	48,0 abcdef	57,7 abcd

3.3.4 Relación entre severidad en ‘Picual’ y variables climáticas

Las ecuaciones lineales fueron las que mejor predijeron la relación entre la severidad (promedio, este y oeste) y la sumatoria de temperaturas por debajo de 20°C y las ecuaciones exponenciales (asintóticas) predijeron mejor la relación entre la severidad (promedio, este y oeste) con las temperaturas mayores de 35°C. La intensidad de las precipitaciones no mostró efecto significativo sobre la severidad.

Las ecuaciones de regresión lineal entre la severidad y las temperaturas <20°C que mejor predijeron la asociación fueron:

Variables dependiente: severidad este; variable independiente: sumatoria de temperaturas < 20°C (x).

Severidad este=66,59 (SE2,53)-0,019 (SE 0,00764) x
R²=0,334, P=0,029.

Severidad oeste=52,36 (SE1,48)-0,01487(SE0,00448) x

$R^2=0,477$, P=0,008.

Severidad promedio=63,98 (SE 2,46)-0,02051 (SE0,00743) x

$R^2=0,376$, P=0,020

Asimismo, las siguientes ecuaciones exponenciales predijeron mejor la relación entre severidad (promedio, este y oeste) con la sumatoria de temperaturas $\geq 35^\circ\text{C}$ (x).

Severidad este=67,31(SE 2,54)-12,84 (SE3,63)*0,678 (SE 0.190)^x

$R^2=0,491$; P=0,019

Severidad oeste=53,12 (SE 1,35)-9,62(SE 1,89)*0,731(SE0,116)^x

$R^2=0,685$; P=0,002.

Severidad promedio = 65,00 (SE 2,33)-13,71 (SE3,3)*0,701(SE0,154)^x

$R^2=0,582$; P=0,008

Las ecuaciones lineales múltiples entre severidad y variables climáticas no incrementaron el valor de ajuste, en cambio sí lo hizo la ecuación múltiple integrada por un término lineal para la sumatoria de temperaturas por debajo de 20 y uno exponencial para la sumatoria de temperaturas por arriba de 35.

Dicha ecuación explicó el 10.7% para la severidad este, el 37.7% para la severidad oeste y el 20.4% para el promedio de las severidades

Para todos los casos la enfermedad decreció con temperaturas inferiores a 20°C o superiores a 35°C . Cuando se construyó una ecuación de regresión múltiple, incluyendo una ecuación lineal para la sumatoria de temperaturas $\leq 20^\circ\text{C}$ y una ecuación exponencial para la sumatoria de temperaturas $\geq 35^\circ\text{C}$, se obtuvo mejor predicción de la respuesta de las tres variables de severidad, indicando que luego de un cierto punto, el decrecimiento de la enfermedad se estabiliza con temperaturas superiores a 35°C .

3.4 Relación entre rendimiento en fruto y severidad en 'Picual'

En 2009, el rendimiento promedio de las plantas asintomáticas alcanzó 68,6 kg de frutos/planta (37,7 a 112,8 kg/planta) mientras que en 2010, el promedio se redujo a 40 kg/planta (4 a 80 kg/planta), con diferencias significativas entre ellos. Las sintomáticas presentaron 4,5 kg/planta (0 a 11 kg/planta) y 5,5 kg/planta (1,4 a 11,8 kg/planta). No se comprobaron diferencias significativas entre 2009 y 2010 (Tabla 7).

Las medias de kg en frutas de plantas asintomáticas superan significativamente a la de plantas sintomáticas para ambos años (Tabla 6 y 7).

Las pérdidas de rendimiento fueron de 93,4% y 86,3%, para ambos años.

Tabla 13. Rendimiento promedio de fruto (kg/planta) en 'Picual' en 2009 y 2010.

	Rendimiento plantas asintomáticas		Rendimiento plantas sintomáticas	
	2009	2010	2009	2010
Sumatoria	960,8	561,304	62,996	76,266
Promedio	68,6	40,1	4,5	5,5

Tabla 14. Prueba de medias independientes entre rendimiento de asintomáticas y sintomáticas en 2009 y 2010

Prueba	Varianzas	T	P
Satterthwaite 2009	Distintas	11,08	<u>0,0000</u>
Satterthwaite 2010	Distintas	4,76	<u>0,0004</u>

3.4.1 Relación entre severidad y kg de aceitunas cosechadas

El análisis de regresión entre severidad y rendimiento 2009 y 2010 demostró una asociación significativa entre las variables. Hubo una disminución de 0,509 y 0,393 kg de aceituna por cada porcentaje de severidad para 2009 y 2010, respectivamente.

$$\text{Rendimiento (2009)} = 36,05(\text{SE}=3,22) - 0,5090 \text{ sev. prom. (SE}=0,062) \\ R^2=66,92. P <0,001$$

$$\text{Rendimiento (2010)} = 31,31(\text{SE}=2,24) - 0,3933 \text{ sev. prom. (SE}=0,0393) \\ R^2= 99,93. P <0,001$$

3.5 Frecuencia de microorganismos

En plantas sintomáticas se aislaron *Pythium rostratum* (8%), *Pythium aphanidermatum* (3%), *Pythium sylvaticum* (3%), *Pythium* sp. (12%), *Rhizoctonia* sp. (3%) y *Fusarium solani* (18%). En plantas asintomáticas se aisló *Fusarium solani* (22%).

3.6 . Frecuencia de detección molecular de *V. dahliae* en olivo ‘Picual’ con qPCR y nPCR

La técnica nPCR permitió detectar, por primera vez en el país, la presencia de la cepa defoliante (D) de *V. dahliae* en tres muestras (3/25=12%) de brindillas de olivo ‘Picual’ con síntomas de “rama seca”.

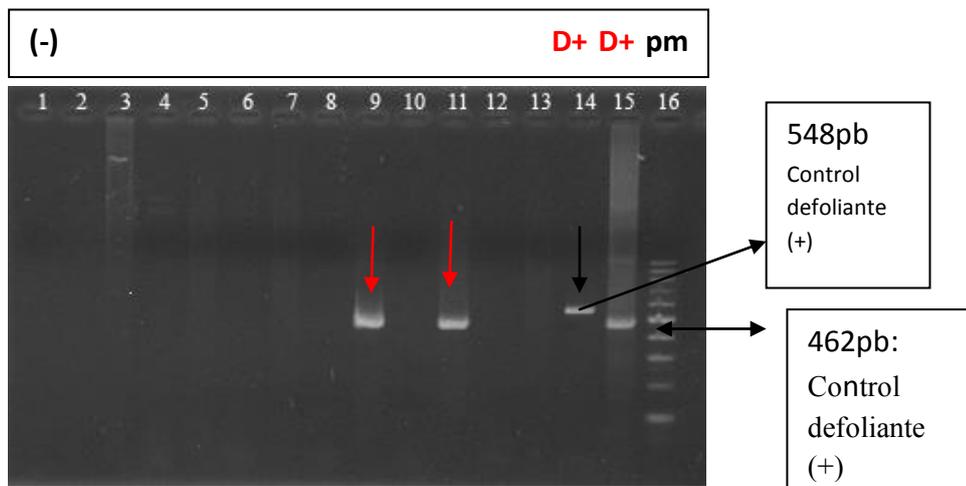


Figura 9. Productos de PCR anidado diferenciando cepa defoliante de *V. dahliae*.

Productos de PCR separados por electroforesis en gel de agarosa luego de las amplificaciones con oligos. Carril 1: control (-), agua, nPCR; Carril 2: asintomática (as), PCR; Carril 3: M1 sintomática, nPCR; Carril 4: M2 sintomática, PCR; Carril 5: sintomática, nPCR; Carril 6: sintomática, PCR; Carril 7: sintomática, nPCR; Carril 8: sintomática, PCR; Carril 9: sintomática, nPCR, defoliante (+), 462pb amplificado; Carril 10: sintomática, PCR; Carril 11: sintomática, nPCR, defoliante (+), 462pb amplificado; Carril 12: sintomática, nPCR; Carril 13: sintomática, PCR; Carril 14: control defoliante (+), 548pb, PCR; Carril 15: control defoliante (+), 462 pb, nPCR; Carril 16: marcadores de peso molecular.

3.7 qPCR con sondas Taqman

El método qPCR sondas Taqman ajustado resultó un método altamente sensible y específico en el diagnóstico de *V. dahliae* de muestras vegetales. Mejoró la eficiencia de detección a 48 % en muestras sintomáticas (12/25=48 %). La eficiencia de la reacción fue del 94%. El índice de calidad de ajuste de la correlación (R^2) entre la medición de la fluorescencia (threshold) y el templado inicial fue muy bueno: 0.99799, (óptimo cercano a 1). (Otero, 2014).

En el gráfico 6 de qPCR Taqman, el Ct para el hongo *V. dahliae* es 25, el resto de las muestras de material vegetal de olivo están entre 34 y 38, resultando todas positivas a *V. dahliae*. El valor del agua (amarillo) y del sano (azul) se mantiene bajo.

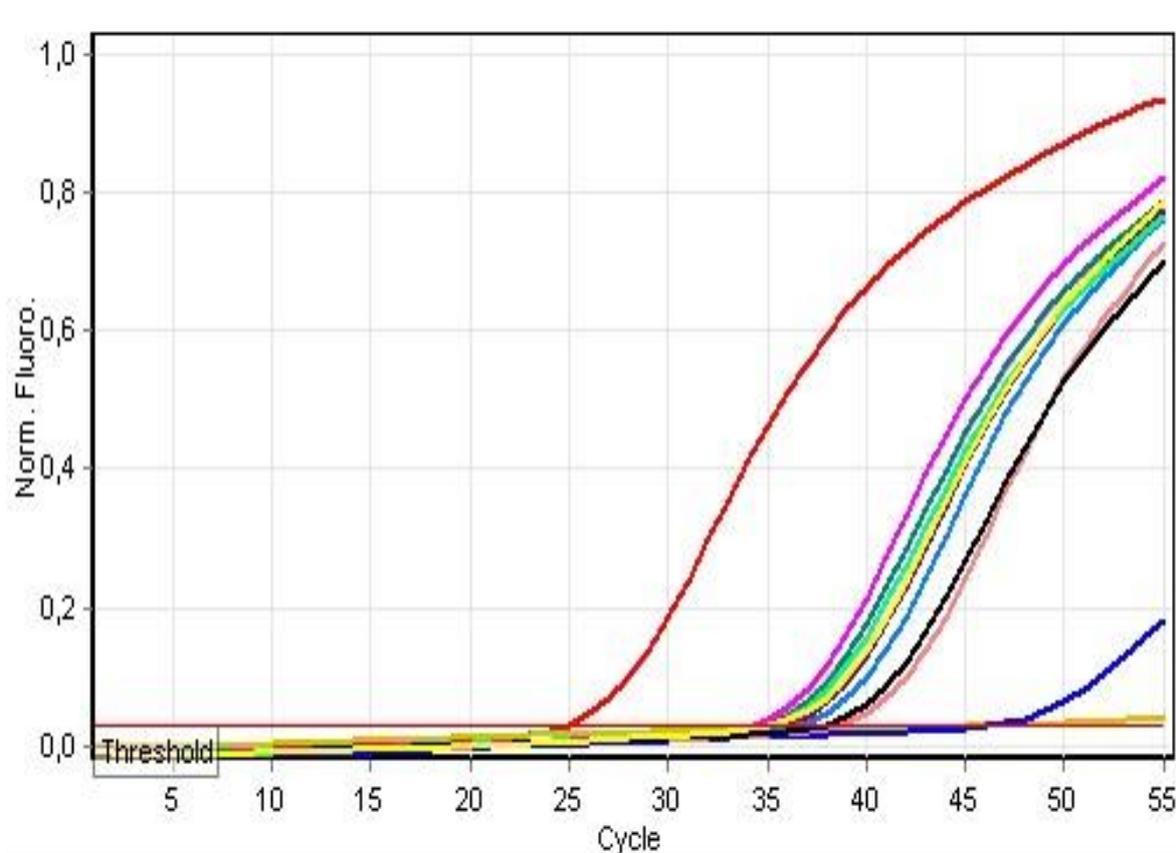


Figura 10. Resultados de PCR cuantitativa para muestras vegetales.

Color línea de fluorescencia	Nombre	Tipo de muestra	Ciclo (Ct)	Resultado
■	10-2 0.5x	Control(+)} <i>V. dahliae</i> .	24,97	
■	agua	Control (-) agua	48,97	
■	sano Arauco	Control (-) planta	46,57	
■	m14 26/1/10	Muestra olivo	36,01	+
■	m13 26/1/10	Muestra olivo	34,82	+
■	m2 20/4/10	Muestra olivo	36,61	+
■	m4 20/4/10	Muestra olivo	35,12	+
■	m5 20/4/10	Muestra olivo	38,53	+
■	m6 20/4/10	Muestra olivo	35,20	+
■	m 6 22/7	Muestra olivo	34,48	+
■	m11 26/1/10	Muestra olivo	37,96	+
■	m8	Muestra olivo	35,31	+

En el gráfico 7 el hongo *V. dahliae* inicia su fluorescencia a Ct 26, las muestras entre Ct de 34 y 39 son positivas para *V. dahliae*, mientras que el resto es negativo o dudosa. El agua no emite fluorescencia.

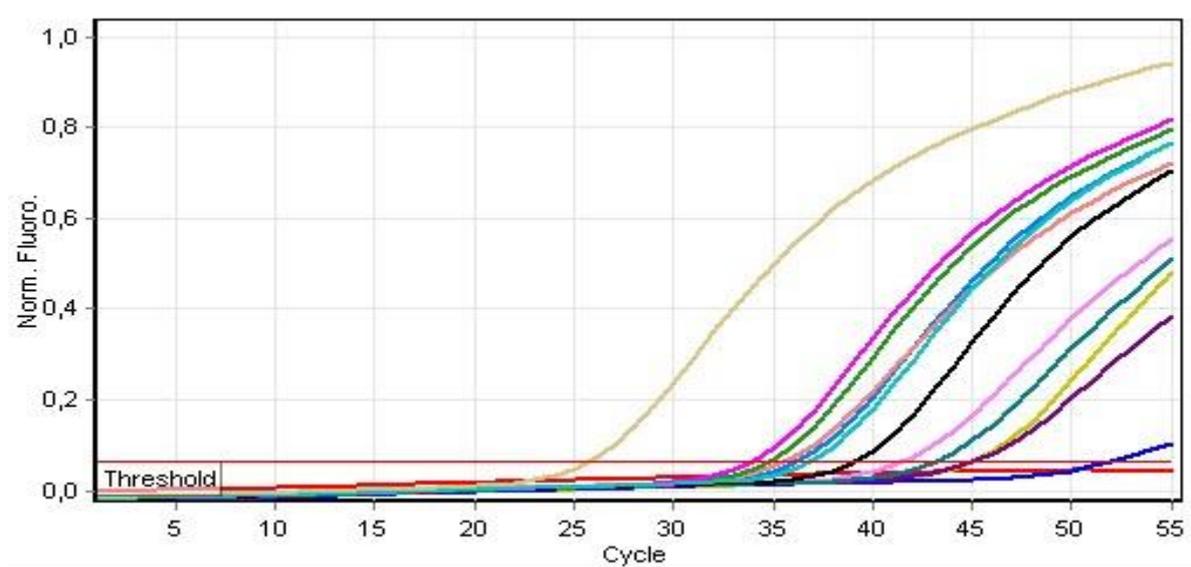


Figura 11. Resultados de PCR cuantitativa para muestras vegetales.

Color línea de fluorescencia	Nombre	Tipo de muestra	Ciclo (Ct)	Resultados
■	Agua	Control (-)agua	>55	
■	Sano	Control(-)planta	45,13	
■	<i>V. d</i> 10 ⁻²	Control (+) <i>V. d</i>	25,78	
■	3T	Muestra olivo	52,07	-
■	4T	Muestra olivo	45,14	-
■	5T	Muestra olivo	41,57	-
■	6T	Muestra olivo	36,27	+
■	7 T	Muestra olivo	43,18	-
■	1 22/7	Muestra olivo	35,63	+
■	2 22/7	Muestra olivo	34,80	+
■	3 22/7	Muestra olivo	33,98	+
■	7 22/7	Muestra olivo	39,20	+
■	14 22/7	Muestra olivo	36,88	+

4. DISCUSIÓN

La “rama seca” así llamada por los productores por el síntoma más típico de seca de ramas, se puede dar por diversos factores bióticos o abióticos y/o por la combinación de éstos. Se caracteriza por la presencia de ramas y brotes secos en distintas partes de la copa, hojas encartuchadas y muertas adheridas a las brindillas, desecación y momificación de inflorescencias y frutos (Oriolani *et al.*, 2008).

En el presente estudio ‘Picual’ presentó “rama seca”, cancro con o sin exudado y “chupado” o “acostillado” del tronco. Este último síntoma, fue descrito por primera vez y se debió posiblemente al taponamiento vascular agravado por el uso de inyecciones intravasculares en el tronco para la aplicación de productos fitosanitarios a los árboles enfermos (Blanco López, com. pers.).

La presencia de “chupones” o “varetas” con necrosis apical y coloración de las ramas púrpura, azulada o rojiza, con o sin presencia de zona castaña en la zona del xilema correspondería a la infección por *V. dahliae*. La infección por *Fusarium* spp. o *Phytophthora* spp., en cambio, no ha sido descrita sobre chupones. Entre los síntomas de “rama seca” se observaron los ocasionados por la cepa no defoliante de *V. dahliae* como “apoplejía” (forma aguda) que también pueden confundirse con los causados por *Phytophthora* spp. u otros *Oomycetes* (*Straminipila*), asfixia radical y/o déficit nutricional. El “decaimiento lento” también puede ser producido por otros microorganismos (Blanco López *et al.*, 1994, 1995; Trapero y Blanco, 2008).

En Catinzaco (La Rioja), las variedades con mayor incidencia de “rama seca” fueron ‘Nabali’, ‘Manzanilla’, ‘Novo’, ‘Kadesh’, ‘Picual’ y ‘Barnea’, mientras que ‘Arbequina’ fue la de menor incidencia. Con referencia a *V. dahliae*, las variedades susceptibles, según registros internacionales, incluyen ‘Manzanilla’, ‘Picholine’ (Wilhelm y Taylor, 1946), ‘Manzanilla’, ‘Mission’ y ‘Picual’ (Wilhelm, 1981; Blanco López *et al.*, 1984; López Escudero *et al.*, 2004). En Israel, ‘Barnea’ está citada como moderadamente susceptible (Levin *et al.*, 2003b). ‘Arbequina’, en cambio, es considerada moderadamente resistente (Martos Moreno *et al.*, 2003, 2006). ‘Picual’ está citada como muy susceptible a ambos patotipos defoliante (López Escudero *et al.*, 2007) y no defoliante de *V. dahliae* (Levin *et al.*, 2003a).

Respecto a la severidad de la “rama seca” este es el primer trabajo en el país que considera varias variedades. Se han realizado previamente otros que consideran principalmente la variedad ‘Arauco’ (Ladux *et al.*, 2014), o que compararon severidad respecto a tratamientos de solarización en ‘Arauco’ y ‘Manzanilla’ (Otero *et al.*, 2014).

Dentro de las variedades con susceptibilidad a “rama seca” hubo variación entre años de plantación debido, posiblemente, a la densidad de inóculo en el momento de plantación, y a la sanidad de las plantas implantadas importadas de diferentes regiones, ya que los lotes cultivados eran de desmonte y se cree que no contaban con inóculo en suelo. Otros factores que, seguramente influyeron fueron: virulencia de los microorganismos, edad de la planta, densidad de plantación, relación agua/planta, temperatura del suelo y del aire, nutrientes del suelo, etc. (DeVay y Pullman, 1984).

En La Rioja, ambos patotipos de *V. dahliae* fueron detectados por PCR en ‘Picual’. En Catizaco, no hubo variedades resistentes a “rama seca” aunque ‘Arbequina’ se mostró menos susceptible. Además en prospecciones anteriores se observó que ‘Frantoio’ y ‘Empeltre’ mostraron menor incidencia (Roca *et al.*, 1999).

Ésta es la primera evaluación de mermas de rendimiento por efecto de “rama seca” efectuada en el país. Se detectaron diferencias significativas entre rendimiento de plantas sintomáticas y sanas. Plantas ‘Picual’ con *V. dahliae* ND, de 3-5 años, regadas con agua salina en Israel, mostraron 20-50% de incidencia y pérdidas entre 75-89% (Levin *et al.*, 2003a). La expresión aguda de la enfermedad y su efecto sobre el rendimiento en ese estudio podría haberse debido al hecho de que el huerto se plantó en suelo infestado y que el riego con agua salina, probablemente, agravó el problema. En Catizaco las pérdidas fueron de 86-93% para ‘Picual’ con “rama seca” sin riego salino en plantas de 10 años.

Otras pérdidas adicionales que deberían ser consideradas son el costo de erradicación de los árboles, el tratamiento del suelo antes del reemplazo de las plantas muertas y el periodo no productivo de las plantas nuevas hasta entrada en producción.

En nuestro caso los patógenos encontrados son hongos de suelo que causan enfermedades monocíclicas, vale decir que comprenden un solo ciclo de patogénesis por estación de cultivo y para las cuales el inóculo resultante del mismo (microesclerocios, oosporas y clamidosporas) dará lugar a nuevas infecciones y enfermedad durante el próximo ciclo de crecimiento del cultivo. Para el caso de *V. dahliae*, que es el que más se ha estudiado, la epidemiología es determinada por la cantidad de inóculo en el suelo cuya repercusión

es influida a su vez por el efecto combinado de factores como la virulencia del patotipo del hongo, la edad, susceptibilidad y densidad de plantas y raíces, etc. (De Vay y Pullman, 1984).

En clima mediterráneo, la severidad por *V. dahliae* es favorecida en primavera por temperaturas entre 20-25°C. Temperaturas de verano mayores a 30°C, en cambio, suprimieron el desarrollo de la enfermedad (Wilhelm y Taylor, 1965; Tossi y Zizzerini, 1998; Levin *et al.*, 2003; Navas Cortés *et al.*, 2008). La enfermedad se desarrolla con carácter estacional en el año de crecimiento del olivo, de manera que la severidad e incidencia de los síntomas aumentan durante finales de otoño-invierno y disminuyen durante el período estival- otoñal (Navas Cortés *et al.* 2008). En nuestro caso se realizó un “topping”, esto es la poda mecánica de la parte superior de las plantas, lo que ocasionó una disminución en la apreciación del % de severidad, debido a que en la mayoría de las plantas el sector afectado es la parte superior. Esto explicaría un pico de caída en la severidad durante el invierno. Luego la otra caída de severidad fue en verano y empezó a aumentar nuevamente en otoño, coincidiendo con la descripción de epidemiología de la verticilosis. En nuestro ensayo en ‘Picual’, la estimación de la severidad a partir de otoño aumentó y disminuyó en verano coincidiendo con el ciclo de infección.

La incidencia en ‘Picual’ aumentó seis veces en 4 años mientras que el aumento de la severidad máxima tuvo un aumento de un 23 % en 9 meses. En algunas zonas se vieron árboles adyacentes muertos o en rodales, pero en general se encontraban aislados. En una plantación en España de ‘Arbequina’ de no laboreo y regada por goteo, la incidencia de infecciones por el patotipo D aumentó casi 7 veces en 4 años. Estos resultados sugieren que la infección de un árbol por *V. dahliae* D influyó sobre la infección de árboles inmediatos adyacentes y dicha influencia fue más intensa entre los árboles que se encontraban más cercanos entre sí, en una hilera, que entre árboles más alejados que se encontraban en hileras adyacentes (Navas-Cortes *et al.*, 2008).

En estudios previos, en los que se incluyó esta finca, se registraron *V. dahliae* en suelo y brindillas (raza no defoliante en muy baja frecuencia), *Fusarium solani* (alta frecuencia), *Rhizoctonia* sp. y *Phytophthora* sp. en raicillas (baja frecuencia) (Babbit *et al.*, 1999; Docampo y Otero, 1999, 2000, 2001; Pérez *et al.* 1999, 2000, 2001; Roca *et al.*, 2001; Otero, 2005; Oriolani *et al.*, 2008). En este trabajo se obtuvieron por aislamiento microbiológico especies de *Pythium*, *Fusarium solani* y *Rhizoctonia*, todas probadas como

patogénicas salvo *Pythium* spp. Éstas habían sido aisladas anteriormente en Argentina (Pastor, 2007; Lucero *et al.*, 2010), pero no se han realizado pruebas de patogenicidad en olivo. En Irán fue citado *Pythium aphanidermun*, provocando muerte de olivos jóvenes en viveros y huertos comerciales (Sanei *et al.*, 2005; Sanei y Razavi, 2012), mientras que *Pythium irregulare* se probó como patogénica en seca de olivo jóvenes “SOJ” en España (Sánchez. *et al.*, 1998 a, b, c).

Para la detección de *V. dahliae*, se utilizó la técnica de PCR anidada por ser más sensible que la PCR común, dado que implica una segunda reacción donde se emplea una alícuota de los productos de la primera como molde y se vuelve a amplificar con oligos que hibridan internamente produciendo un fragmento de menor tamaño que el primero. Por esta técnica fue posible diagnosticar la presencia de *V. dahliae* defoliante (D) no presente en el país hasta este momento.

Estos resultados confirmaron que PCR es más eficiente que el aislamiento microbiológico convencional permitiendo diagnosticar la infección simultánea de los patotipos D y ND en árboles naturalmente infectados (Mercado Blanco *et al.*, 2003b).

Gramaje (2013), realizó la comparación de las técnicas disponibles de qPCR constatando que la técnica de qPCR con sondas TaqMan diseñada por Bilodeau *et al.* (2012) resultó altamente sensible y específica en el diagnóstico de *V. dahliae*, coincidiendo con otros estudios. Las modificaciones realizadas en la concentración de la sonda y el ciclado (temperatura de hibridación y extensión) permitieron obtener valores de eficiencia de la reacción óptimos. La qPCR con sondas Taqman permitió aumentar la eficiencia de la detección de *V. dahliae*, seguramente porque la concentración del hongo al momento de la toma de muestra era muy baja y este método de mayor sensibilidad permitió detectar al hongo.

Según Mercado Blanco *et al.* (2010), la concentración de micelio en los tejidos no estuvo correlacionada con el momento de mayor expresión de síntomas. Esta técnica será de utilidad en la evaluación del comportamiento varietal que requiere el empleo de técnicas de diagnóstico altamente sensibles y específicas.

Esta primera detección de la raza defoliante para nuestro país reviste importancia, debido a la diferencia de virulencia descrita en España para los patotipos D y ND de *V. dahliae* y su significación respecto de la severidad de los ataques en algodón y olivo, ya

que las variedades comerciales que presentaban tolerancia al patotipo ND, son susceptibles al patotipo D.

Más estudios serán necesarios para determinar el comportamiento local de las cepas D y ND, lograr su aislamiento y poder estudiar las características patogénicas sobre diferentes variedades, la diversidad genética de las poblaciones de *V. dahliae* que infectan el olivo en Argentina y su distribución en el resto del país. Así mismo interesa conocer la interacción de este hongo con otros microorganismos de suelo (Tjamos, 1993; López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011; Jiménez Díaz *et al.*, 2012).

También hay que destacar que en esta finca se habían realizado numerosos aislamientos y sólo se había detectado en suelo la presencia de *V. dahliae* (Roca *et al.*, 2000), y en una muestras en brindillas de ‘Manzanilla’ (Otero, 2005), por lo cual su rol en la “rama seca” estaba cuestionado (Roca *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 2001). No se detectó *V. dahliae* en ninguna planta asintomática.

5. CONCLUSIONES

- ✓ La “rama seca” estuvo asociada a factores abióticos (heladas, granizo) y bióticos (*V. dahliae*, *Fusarium solani*, otras especies de (*Fusarium* y *Rhizoctonia*) que pudieron discriminarse.
- ✓ Los factores bióticos no se pueden diferenciar de los abióticos porque tienen sintomatologías comunes.
- ✓ La mayor incidencia de rama seca” fue registrada en germoplasma introducido de Israel y en el primer año de plantación.
- ✓ La mayor severidad se registró en ‘Nabali’, ‘Manzanilla’, ‘Novo’, ‘Kadesh’, ‘Picual’ ‘Barnea’, mientras que ‘Arbequina’ mostró valores bajos.
- ✓ Los cvs. con mayor severidad fueron ‘Sirio’ y ‘Mission’. ‘Picual’, ‘Barnea’ y ‘Nabali’ arrojaron valores medios, mientras que ‘Arbequina’ y ‘Picholine’ mostraron valores bajos.
- ✓ En ‘Picual’, la sumatoria de temperaturas menores a 20°C tendió a reducir la severidad, al igual que las superiores a 35°C.
- ✓ Hubo tendencia al incremento de la enfermedad con el aumento de precipitaciones.
- ✓ La merma de rendimiento de frutos en ‘Picual’ fue superior al 86% y tuvo relación con el grado de severidad.
- ✓ Por técnicas moleculares se diagnosticó *V. dahliae*.
- ✓ Se detectó por primera vez en el país la cepa defoliante de *Verticillium dahliae* D.

6 REFERENCIAS

- Al-Ahmad, M.A. y Mosli, M.N. 1993. Verticillium wilt of olive in Syria. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 23:521–529.
- Aso, P. 2000. Informe de análisis de suelo, agua y foliar para los departamentos de Arauco, Chilecito y Capital de la provincia de La Rioja. Tecnosuelo. Tucumán. pp. 58.
- Bhat, R.G., y Subbarao K.V.1999. Host range specific in *Verticillium dahliae*. Phytopathology, 89:1218-1285.
- Babbitt, S.; Barreto, D.; Barros, O.; Caimi, E.; Contini, S.; Costilla, M.; Corronca, J.; Docampo, D.; Drazic, S.; Gally, M.; García, E.; Gleiser, R.; Guchea, F.; Hudson, R.; Ladux, J.; Ortiz, J.; Otero, M.; Oriolani, E.; Pellegrino, D.; Pérez, B.A.; Roca, M.y Zanelli, M. 2000. Fecha de evaluacion sanitario de olivo en los Dep. Arauco; Chilecito y Capital; La Rioja; en 1999. Simposio Internacional de Olivicultura. ARAUCO 2000. Catamarca. 1316/09. pp.10.
- Báidez, A. G.; Gómez, P.; del Río, J. A. y Ortuño, A. 2007. Dysfunctionality of the xylem in *Olea europaea* L. plants associated with the infection process by *Verticillium dahliae* Kleb. Role of phenolic compounds in plant defense mechanisms. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55:3373-3377.
- Beckman, C. M. H. 1981. Modelling the succession of host-parasite interactions in vascular disease of plants. Pags.15-35 en: Pathobiology of *Verticillium* species. Proc. 3rd International Symposium on Verticillium, Bari, Italy. Phytopathology Mediterranean, 23: 95-221.
- Bejarano Alcázar, J.; Termorshuizen, A. J. y Jiménez Díaz, R. M. 1999. Single root-inoculations on eggplant with microsclerotia of *Verticillium dahliae*. Phytoparasitica, 27:279-289.
- Bejarano Alcázar, J.; Blanco López, M. A.; Melero Vara, J. M. y Jiménez Díaz, R. M. 1996. Etiology, importance, and distribution of Verticillium wilt of cotton in southern Spain. Plant Disease, 80:1233-1238.
- Bellahcene M.; Fortas Z.; Geiger J.P.; Matallah A. y Henni D. 2000. Verticillium wilt in olive in Algeria: geographical distribution and extent of the disease. Olivae, 82:41–43.

- Bilodeau, G. J.; Koike, S. T.; Uribe, P. y Martin, F. N. 2012. Development of an assay for rapid detection and quantification of *Verticillium dahliae* in soil. *Phytopathology*, 102:331-343.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2008).
<http://www.fao.org/corp/statistics/en/>.
- Biagi, M.C. 2002. Hongos asociados al síndrome de la rama seca del olivo *Olea europea* L. Tesis de Grado. Producción Vegetal, Facultad de Agronomía, UBA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. pp.127.
- Biagi, M.; Pérez, B.; Bompadre, J.; Pérgola, M.; Divo de Sesar, M.; Godeas, A. y Vilella, F. 2001. Respuesta de *Olea europaea* var. Manzanilla micorrizada frente a *Fusarium solani*. Resúmenes Sociedad Uruguaya de Horticultura. pp.95.
- Blanco López, M.A. y Jiménez Díaz, R.M. 1995. Una propuesta de lucha integrada contra la verticilosis del olivo. *Fruticultura Profesional*, 70: 52–8 (in Spanish).
- Blanco López M.A.; Jiménez Díaz R.M. y Caballero J.M. 1984. Symptomatology, incidence and distribution of *Verticillium* wilt of olive trees in Andalucía. *Phytopathology Mediterranean*, 23: 1–8.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. CAB International. (eds.) England. pp. 439.
- Caballero J.M.; Pérez Hernández J.; Blanco López M.A. y Jiménez Díaz R.M. 1980. Olive, a new host of *Verticillium dahliae* in Spain. In: Proc. V Congress Phytopathology Mediterranean. Union. Patras, pp. 50.
- Cáceres, R.; Novello R. y Robert M. 2009. Análisis de la cadena de olivo en Argentina. Proyecto específico 2742 del área estratégica de Economía y Sociología: Economía de la cadena Agroalimentaria y Agroindustriales. Eds. INTA, pp. 2-70.
- Costilla, M. 2000. Informe para la Comisión Provincial de Sanidad Vegetal Provincia de La Rioja. Fecha de evaluación de nematodos en “rama seca”. Estación Experimental Obispo Colombes. Tucumán, pp.3.
- Costilla, M. 1999. Informe para la Comisión Provincial de Sanidad Vegetal Provincia de La Rioja. Fecha de evaluación de nematodos en “rama seca”. EE Obispo Colombes. Tucumán. pp.2.
- Cirulli M, 1981. Attuali cognizioni sulla Verticilliosi del olivo. *Informatore Fitopatologico*, 31, 101–5 (in Italian).

- DeVay, J. E. y Pullam, G.S. 1984. Epidemiology and ecology of diseases caused by *Verticillium* species, with emphasis on *Verticillium* wilt of cotton. Page.1-14 en: Pathobiology of *Verticillium* species. Proc. III International Symposium on *Verticillium*, Bari, Italy. *Phytopathology Mediterranean*, 23:95-221.
- Devis, S.; Erten, L.; Sylu, S.; Tok, F. M.; Kurt, S.; Yildiz, M. y Mine Sylu, E. 2077. Vegetative compatibility groups in *Verticillium dahliae* isolates from olive in western Turkey. *European Journal Plant Pathology*, 119:437-447.
- Docampo, D. M.; Pérez, B.; Otero, L.; Roca, M.; Oriolani, E.; Brancher, N. y Navarro, P. 2012. Enfermedades de *Olea europea* L. (olivo). En: Atlas Fitopatológico Argentino. Vol. 4, N°4. 2008, 2009, 2010, 2011, 2012. (eds.): Nome, S. F.; Docampo, D. M.; Conci, L. R. ISSN 1851-8974. Córdoba, Argentina. R
<http://www.fitopatoatlas.org.ar/Inicio.aspx#/Hospedante?Id=638>.
- Docampo, D.; Aso, P.; Costilla, M.; Otero, M.; Pérez, B.A.; Zanelli, M. y Roca, M 2000. Acta fecha de evaluacion La Rioja 2000. pp. 4.
- Docampo, D.M.; Vázquez, A. A. y Laguna, E I.G. 1981. *Verticillium dahliae* Kleb causal de la parálisis parcial del olivo en el área olivera centro oeste Argentina. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 16 (2):197-204.
- Garber, R. H y Houston, B. R. 1966. Penetration and development of *Verticillium albo-atrum* in cotton plants. *Phytopathology*, 56:1121-1126.
- Gerlach, W. y Nirenberg, H. 1982. The Genus *Fusarium*-a Pictorial Atlas. Biologische Bundesanstalt fur Land und Forstwirtschaft. Berlin. pp. 406.
- Gramaje, D.; Pérez, Serrano V.; Montes Borrego, M.; Navas Cortés, J.A., Jiménez Díaz R.M. y Landa, B.B. 2013. A comparison of real-time PCR protocols for the quantitative monitoring of asymptomatic olive infections by *Verticillium dahliae* pathotypes. *Phytopathology*, 103(10):1058-68 [en prensa].
- Green, R. J. 1969. Survival and inoculum potential of conidia and microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* in soil. *Phytopathology* 59:874-876.
- Hiemstra, J.A. 1998. Some general features of *Verticillium* wilt in trees. en Hiemstra, J.A. y Harris, D.C. (eds.). A compendium of *Verticillium* wilt in tree species. Holanda. Pp. 511.
- Huisman, O. C. 1982. Interrelationship of root growth dynamics to epidemiology of root-invading fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 20:303-327.168.

- International Olive Oil Council. 2000. World Catalogue of Olive Varieties. Madrid, Spain. Isaac, I. 1967. Speciation in *Verticillium*. Annual. Review of. Phytopathology, 5:201-222.
- Jiménez Díaz, R. M.; Cirulli M.; Bubici, G.; Jiménez Gasco M.; Antoniou P. y Tjamos, E., 2012. Verticillium wilt a major treat to olive production. Current status and future prospects for its management. Plant Disease, 96: 304-329.
- Jiménez Díaz, R.M. 2010. Verticilosis del Olivo. Pp. 225-249 en Jiménez Díaz, R.M. y Montesinos Seguí, E. (eds.) Enfermedades de las plantas causadas por Hongos y Oomicetos Naturaleza y control integrado. Editorial Phytoma, España en colaboración con la Sociedad Española de Fitopatología.
- Jiménez Díaz, R. M.; Olivares García, C.; Navas Cortés, J.A.; Landa, B.B. y Jiménez Gasco, M.M. 2008. A region wide analysis of genetic diversity in *Verticillium dahliae* infecting olive in Andalusia, southern Spain, Phytopathology, 98(6):S75
- Jiménez Díaz, R. M.; Tjamos, E. C. y Cirulli, M. 1998. Verticillium wilt of major tree hosts: olive. Pp. 13-16 en Hiemstra, J. A. y Harris, D. C. (eds.) A compendium of Verticillium wilt in tree species. Posen y Looijen, Wageningen, the Netherlands. Pp. 511.
- Jeffers. N. S., Martin, J. B. 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. Plant Disease 70: 1038-1043.
- Ladux, J.L., Jotayan, L., Otero, M.L., González Vera, C. y Ortiz, J. 2014. Incidence of *Verticillium dahliae* in traditional olive groves in Arauco department, La Rioja Argentina. Acta Horticulturae. (ISHS) 1057:127-131.
- Latinovic J. y Vucinic Z. 2010. First report of *Verticillium dahliae* on olives in Montenegro. Petria, 20:253.
- Lavee S. 1996. Biology and physiology of the olive. In: World Olive Encyclopedia. Barcelona, Spain: International Olive Council, 59–110.
- Levin, A. G.; Lavee, S. y Tsrer, L. 2003a. Epidemiology of *Verticillium dahliae* on Olive (cv. 'Picual') and its effects on yield under saline conditions. Plant Pathology, 52:212-218.
- Levin, A. G.; Lavee, S., y Tsrer, L. 2003b. Epidemiology and effects of Verticillium wilt on yield of olive trees (cvs. Barnea and Souri) irrigated with saline water in Israel. Phytoparasitica, 31:333-343.

- Leslie, J. y Summerell, B. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing. Iowa. USA. 338 pp.
- Linardelli, C. 2008. Fitosanidad de olivo I. Jornadas interuniversitarias sobre Fitosanidad del olivo. Universidad Nacional de Catamarca 4-5/06/08. 2 pp.
- Lo Giudice V., Raudino, F., Magnano di San Lio, R., Cacciola, S. O. Faedda, R. y Pane A. First Report of a Decline and Wilt of Young Olive Trees Caused by Simultaneous Infections of *Verticillium dahliae* and *Phytophthora palmivora* in Sicily. *Plant Disease* 2010 94:11, 1372-1372.
- López Escudero, F. J. y Mercado-Blanco, J. 2011 Verticillium wilt of olive: a case study to implement and integrated strategy to control a soil-borne pathogen. *Plant Soil*, 344: 1-50.
- López Escudero, F. J.; Mercado Blanco, J.; Roca, J. M.; Valverde Corredor, A. y Blanco López, M. A. 2010. Verticillium wilt of olive in the Guadalquivir Valley (southern Spain): Relation with some agronomical factors and spread of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology Mediterranean*, 49:370-380.
- López Escudero, F. J. y Blanco López, M. A. 2007. Relationship between the inoculum density of *Verticillium dahliae* and the progress of Verticillium wilt of olive. *Plant Disease*, 91:1372-1378.
- López Escudero, F. J. y Blanco-López, M. A. 2005b. Effects of drip irrigation on population of *Verticillium dahliae* in olive orchards. *Journal Phytopathology*, 153:238–239.
- López Escudero, F. J. y Blanco-López, M. A. 2005a. Recovery of young olives trees from *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology*, 110:79-85.
- López Escudero, J.; Martos-Moreno, C. y Blanco-López, M. A. 2003. Análisis y significado epidemiológico de la población de *Verticillium dahliae* en el suelo. Servicio de publicaciones de la Universidad de Córdoba.
- López Escudero, F. J. y Blanco López, M. A. 2001. Epidemiological studies on Verticillium wilt of olive in artificially infested micro plots. VIII International Verticillium Symposium, Córdoba, Spain. November, 5-8. 62 pp.
- Lucero, G.; Pizzuolo, P.; Hapon, M. V.; Franceschini, S; Vettraino A. M. y Vannini A. 2011. Primer reporte de *Phytophthora citrophthora* aislada de olivo en Argentina. II Congreso Argentino de Fitopatología, 1 - 3 /06. 148 pp.

- Lucero, G.; Pizzuolo, P.; Hapon, M. V.; Franceschini S.; Echeverría, S.; Vettraino, A. y Vannini A. 2008. Relación entre *Phytophthora* y *Pythium* en el síndrome de la “rama seca” del olivo. I Jornadas Interuniversitarias sobre Fitosanidad del olivo. Universidad Nacional de Catamarca 4-5/06/08. 2 pp.
- Lucero, G.; Vettraino, A. M.; Pizzuolo, P.; Di Stefano, C. y Vannini, A. 2007. First report of *Phytophthora palmivora* on olive trees in Argentina. *Plant Pathology* 56:728.
- Lucero, G.; Pizzuolo, P.; Linardelli, C.; Tarquini, A.; Echeverría, S.; Otoya Zabala, M. P. y Lucero, H. 2005. *Phytophthora* y *Pythium*, dos especies involucradas en la muerte de ramas de olivo. En: XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología. III Taller Argentino de Fitopatología. Villa Carlos Paz. Córdoba. 19-22/04/05. 436 pp.
- Lucero, H. 1999. Podredumbre del cuello y de raíces del olivo. Sanidad del olivo. Jornadas de actualización. Mendoza. Facultad de Ciencias. Agrarias, UN Cuyo. pp. 38.
- Mace M.E.; Bell A.A. y Beckman C.H. Eds. 1981. Fungal wilt diseases of plants. Academic, New York.
- MAGPyA. 2004. Informe del sector olivarero: subsector productor de aceite de oliva. <http://www.alimentosargentinos.gov.ar/>
- Manluk, O.; Ab-Gharbieh W.I. y Shaw G. 1984. A check list of plant diseases in Jordan. Al-Dastour, Amman.
- Mercado-Blanco, J.; Collado-Romero, M.; Rodríguez-Jurado D y. Jiménez Díaz; R. M. 2005. Aplicación de técnicas moleculares para determinar la incidencia y extensión de la colonización de plantas de olivo por los patotipos de *Verticillium dahliae*. *Olivae: revista oficial del Consejo Oleícola Internacional*, ISSN 0255-996X, N°. 104, pp.36-45.162.
- Mercado Blanco, J.; Collado Romero, M.; Parrilla Araujo, S.; Rodríguez Jurado, D. y Jiménez Díaz, R. M. 2003a. Quantitative monitoring of colonization of olive genotypes by *Verticillium dahliae* pathotypes with real-time polymerase chain reaction. *Physiological Molecular Plant Pathology*, 63:91-105.
- Mercado Blanco, J.; Rodríguez Jurado, D.; Parrilla Araujo, S. y Jiménez Díaz, R. M. 2003b. Simultaneous detection of the defoliating and nondefoliating *Verticillium dahliae* pathotypes in infected olive plants by duplex, nested polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 87:1487-1494.

- Mercado Blanco, J.; Rodríguez Jurado, D.; Pérez Artés, E. y Jiménez Díaz, R. M. 2002. Detection of the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in infected olive plants by nested PCR. *European Journal Plant Pathology*, 108:1-13.
- Mercado Blanco, J.; Rodríguez Jurado, D.; Pérez Artés, E. y Jiménez Díaz, R.M. 2001. Detection of the nondefoliating pathotype of *Verticillium dahliae* pathotype in infected olive plants by nested PCR. *Plant Pathology*, 50:609-619.
- Morera, B.; Páez, J. I.; Vega, J. Ma. y Montes, F. 2005. Comparación de métodos de diagnóstico de *Verticillium dahliae* en olivo: aislamiento en medio de cultivo y PCR. *Boletín Sanidad Vegetal Plagas*, 31:267-275.
- Montes, F.; Páez, J.I.; Vega, J. M y Duhart, M. E. 1997. Épocas de aislamiento de *Verticillium dahliae* Kleb en olivar en la provincia de Sevilla. *Boletín Sanidad. Vegetal Plagas*, 23:439-447.
- Morschel, J.R., 1961. Recorded plant disease in and outside Australia. Part 2- Fruit and Edible Nut crops. Commonwealth Department of Health Division of Plant Quarantine Canberra pp. 113.
- Munjal, R. L.; Kaul, J. L. y Thakur, M. S. 1982. Studies on diseases of olive in himachal pradesh. In: Improvement of Forest Biomass. Symposium Proceedings. Indian Society of Tree Scientists. P. K. Kosla, ed. Sudan. India pp. 437-440.
- Nagtzaam M., Bollen P.M., Termorshuizen A.J. 1998. Efficiency of *Talaromyces flavus* alone or in combination with other antagonist in controlling *Verticillium dahliae* in growthchamber experiments. *Journal Phytopathology*, 146:165–173.
- Navas Cortés, J. A.; Landa, B. B.; Mercado Blanco, J.; Trapero Casas, J.L.; Rodríguez Jurado, D. y Jiménez Díaz, R. M. 2008. Spatiotemporal analysis of spread of *Verticillium dahliae* pathotypes within a high tree density olive orchard in southern Spain. *Phytopathology*, 98:167-180.
- Nicolini J.C. y Traversi 1950. Observaciones sobre una nueva enfermedad del olivo en Argentina. *Informe de la Dirección de Investigaciones Agrícolas*, 32:8–11.
- Nigro, F.; Yaseen, T.; Schena, L.; Ippolito, A. y Cooke D. E. L. 2005. Specific PCR detection of *Phytophthora megasperma* using the intergenic spacer region of the ribosomal DNA. *Journal of Plant Pathology*, 87:300.

- Olivera, G. 2000. Por travesías y oasis: Mercados, producción agraria y actores sociales de La Rioja (Los llanos y Arauco, 1900-60). University Press – National University of Córdoba, Argentina.
- Otero, M.L.; Roca M.; Zapata R.; Ladux J.L.; Ortiz J.; Zanelli M.; Matías C. y Pérez B.A. 2014. Effect of solarization, organic matter, and *Trichoderma* on the severity of partial drying of olive *Olea europaea* L. and *Verticillium dahliae* soil inoculum density. *Acta Horticulturae* (ISHS). 1057:121-126.
- Otero, L. 2009. *Verticillium dahliae* –Verticilosis del olivo. Curso de Posgrado Teórico Práctico Hongos del Suelo. Universidad Católica de Córdoba. Facultad de Ciencias Agrarias. Córdoba 29-31 /07. pp. 6-10.
- Otero, L. 2007. Charla Presentación de resultados de: Aislamientos de *Verticillium dahliae* en plantas de olivo con “rama seca” en La Rioja. Empresa ARBOLES SANOS S.A., La Rioja 8/08/07.
- Otero, M.L. Caracterización biológica, serológica y molecular de *Verticillium dahliae* en olivos de la provincia de La Rioja. 2005. Tesis Doctoral. Facultad Ciencias Exactas, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba.
- Oriolani, E.; Otero, L.; Matías, A.; Nieto, A.; Pérez, B. y Roca, M. 2008. Enfermedades. En: Manual de reconocimiento de enfermedades y plagas en olivo. Ediciones INTA. 79 pp.
- Oriolani, E.; Babbitt, S.; Barreto, D.; Costilla, M.; Docampo, D.; Hudson, R.; Otero, M.; Pérez, B.A.; Roca, M. y Zanelli, M. 1999. Acta fecha de evaluación La Rioja de 1999 pp.4.
- Pastor, S. 2007. Presentación de Aislamiento de *Phytophthora* spp., *Pythium* spp. y *Rhizoctonia* spp. en plantas de olivo en La Rioja. Empresa ARBOLESANOS S. A., La Rioja. 8/08-2007.
- Pastor, S. 2009. *Pythium* spp. Curso de Posgrado Teórico Práctico Hongos del Suelo. Universidad Católica de Córdoba. Facultad de Ciencias Agrarias. Córdoba 29-31 /07. pp. 18-20.
- Pegg, G. F. y Brady, B. L. 2002. *Verticillium* wilts. CABI Publishing, Wallingford.
- Pérez Artes, E.; Mercado Blanco, J.; Ruiz Carrillo, A.R.; Rodríguez Jurado, D. y Jiménez Díaz, R.M. 2005. Detection of the defoliating and nondefoliating pathotypes of

- Verticillium dahliae* in artificial natural soils by nested PCR. *Plant and Soil*, 268:349-356.
- Pérez Artés, E.; García Pedrajas, M. D.; Bejarano Alcázar, J. y Jiménez Díaz, R. M. 2000. Differentiation of cotton-defoliating and nondefoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* by RAPD and specific PCR analyses. *European Journal Plant Pathology*, 106:507-517.
- Pérez, B.A.; Barreto, D.; Docampo, D.; Otero, L.; Costilla, M.; Roca, M. y Babbitt, S. 2001. Current status of the drying syndrome (seca) of olive trees in Argentina. *Phytopathology*, 91 S.71.
- Pérez, B.A.; Blanco-López M. A.; Costilla, M.; Docampo, D.; Otero, M.; Roca, M. y Zanelli, M. 2001. Acta fecha de evaluación La Rioja 2001a. pp.5.
- Porta-Puglia, A. y Mifsud, D. 2005. First report of *Verticillium dahliae* on olive in Malta. *Journal Plant Pathology*, 87:149.
- Portenko, I. G. y Akimov, G. I. 1997. Vegetative compatibility among *Verticillium dahliae* populations of cotton-growing regions of the Middle Asia. Page 93 in: Proc. 7th Int. *Verticillium* Symposium Athens, Greece.
- Qin, Q.M.; Vallad, G.E., Wu, B.M., y Subbarao, K.V. 2006. Phylogenetic analyses of phytopathogenic isolates of *Verticillium* spp. *Phytopathology*, 96: 582-592.
- Roca, M.; Biagi, M.C.; Ortiz, J.; Ladux, J.; Costilla, M.; Zanelli, M.; Barreto, D. y Pérez, B.A. 2002. XI Jornadas Fitosanitarias Argentinas. El complejo *Fusarium Meloidogyne* en olivo. Universidad Nacional de Río Cuarto. Córdoba. 26-28/06 pp. 182.
- Roca, M.; Docampo, D.; Otero, M.; Babbitt, S.; Barreto, D.; Costilla, M.; Gally, M.; Oriolani, E.; Pérez, B.A.; Zanelli, M.; Aso, E.; Aso, P.; Corronca, J.; Gleiser, R.; Ortiz, J.; Ladux, J.; Barros, O.; Caimi, E.; Contini, S.; Drazic, S.; Pellegrino, D.; García, E. y Guchea, F. 2001. La rama seca en olivares de la Provincia de La Rioja. *Revista. Sociedad Argentina de. Horticultura*, 20-58.
- Roca, M. SENASA. 2001. Ingreso de plantas al sistema de Cuarentena Post entrada desde el año 1993 al 2001. Registro de Oficina Local La Rioja. 2. pp.
- Roca, M.; Barros, O.; Caimi, E.; Contini, S.; Drazic, S.; García, E.; Guchea, F. Ladux, J.; Márquez, R.; Ortiz, J. y Pellegrino, D. 1999. Relevamiento de datos sobre la rama seca en la provincia de La Rioja Comisión Técnica CO.PRO.SA.VEG. 20 pp.

- Rodríguez Jurado, D. 1993. Interacciones huésped-parásito en la Verticilosis del olivo (*Olea europaea* L.) inducida por *Verticillium dahliae* Kleb. Tesis doctoral, Universidad de Córdoba. Córdoba. España.
- Ruggieri G. 1946. A new disease of olive. Lo Italia Agrícola, 83:369–72.
- Sánchez, M.; Muñoz, M.; Guerrero, N.; Cuesta, J.; Expósito, D.; Raya, M. y Trapero Casas, A. 2009. La podredumbre radical del olivo y del acebuche. Hoja divulgativa, Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía.
- Sánchez Hernández, M.E.; Muñoz García, M.; Brasier, C.M.; Holt Lodge, H. y Trapero Casas, A. 2001. Identity and pathogenicity of two *Phytophthora* taxa associated with a new root disease of olive trees. Plant Disease, 85:411-416
- Sánchez Hernández, M.; Dávila, A.; Pérez de Algaba, A.; Blanco López, M. y Trapero Casas, A. 1998a. Occurrence and etiology of death of young olive trees in southern Spain. European Journal of Plant Pathology, 104:347-357.
- Sánchez Hernández, M.E.; Pérez de Algaba, A.; Blanco López, M.; Trapero Casas, A. 1998b. La “seca” de olivos jóvenes. Boletín Sanidad Vegetal, 24:551-572.
- Sánchez Hernández, M.E.; Ruíz Dávila, A. y Trapero Casas, A. 1998c. La seca de olivos jóvenes II: identificación y patogenicidad de los hongos asociados con podredumbres radiculares. Boletín Sanidad Vegetal. Plagas, 24:581-602.
- Sanei, S. J. y Razavi1, S. E. 2012. Survey of Olive Fungal Disease in North of Iran. Annual Review & Research in Biology, 2(1): 27-36.
- Sanei, S.J.; Razavil, S.E.; Okhovvat, S.M. y Pahlavani, M.H. 2010. Verticillium wilts. Peik-e Reihan Publication (in Farsi).
- Sanei, S. J.; Okhovvat, S. M.; Hedjaroude, G. A.; Saremi, H. y Java Nikkhah, M. 2004. Olive Verticillium wilt or dieback of olive in Iran. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences. 69:433-442.
- Saydam, C. y Copcu, M. 1972. Verticillium wilt of olives in Turkey. J. Turk. Phytopathology, 1:45-49.
- Schnathorst, W.C. y Sibbett, G.S. 1971. The relations of strains of *Verticillium albo-atrum* to severity of Verticillium wilt in *Gossypium hirsutum* and *Olea europaea* in California. Plant Disease. Reporter, 9:780-782.
- Searles, P.; Rousseaux, M.C.; Ladux, J.; Trentacoste, E.; Arjona, C.; Cólica, J.; Matias, C.; Bueno, L. y Vita Serman, F. 2012. Argentina. Pp.13-23. En El-Kholy, M.; Avan-

- zato, D.; Caballero J.; Chartzoulakis K. y Vita Sherman, F. (eds.). Following Olive Footprints (*Olea europaea* L.) Cultivation and Culture, Folcklore and History, Traditions and Uses.
- Serrhini, M.N. y Zeroual, A. 1995. Verticillium wilt in Morocco. *Olivae*, 58:58–61.
- Smith, H. C. 1965. The morphology of *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae* and *V. tricorpus*. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 8:540-478.
- Snyder, W.C.; Hansen, H.N. y Wilhelm, S. 1950. New host of *Verticillium albo-atrum*. *Plant Disease. Reports* 34:26–27.
- Spatofora, J. W.; Sung, G. H.; Johnson, D.; Hesse, C.; O'Rourke, B.; Serdani, M.; Spotts, R. ; Lutzoni, F. ; Hofstetter, V. ; Miadlikowska, J. ; Reeb, V. ; Gueidan, C. ; Fraker, E., Lumbsch, T., Lucking, R., Schmitt, I., Hosaka, K., Aptroot, A., Roux, C., Miller, A. N. ; Geiser, D. M. ; Hafellner, J. ; Hestmark, G. ; Arnold, A. E. ; Budel, B. ; Rauhut, A. ; Hewitt, D. ; Untereiner, W. A. ; Cole, M. S. ; Scheidegger, C. ; Schultz, M. ; Sipman, H. y Schoch, C. L. 2006. A five-gene phylogeny of Pezizomycotina. *Mycologia*, 98:10181028.]
- Tagarelli, S. 2008. Producción olivícola. Dirección Nacional de Alimentos SAG-PyA. www.alimentosargentinos.gov.ar/03/revistas/r_41/cadenas/Olivos_Pccion_olivicola.htm.
- Talboys, P. W. 1958. Some mechanisms contributing to *Verticillium*-resistance in the hop root. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 41:222-241.
- Trentacoste, E.R. y Puertas, C.M. 2011. Preliminary characterization and morpho-agronomic evaluation of the olive germplasm collection of the Mendoza province (Argentina). *Euphytica*, 177: 99-109.
- Teviotdale, L.B. 1994. Diseases of olives. En: Universidad of California. Olive production manual. Publication 3357:107-109.
- Thanassoulopoulos, C.C.; Biris, D.A. y Tjamos E. C. 1979. Survey of Verticillium wilt in olive trees in Greece. *Plant. Disease. Reporter*, 63:936-940.
- Tjamos, E.C. 1979. Survey of Verticillium wilt of olive trees in Greece. *Plant Disease Reporter*, 63: 936–40.
- Tjamos, E.C. y Jiménez Díaz, R.M. 1998. Management of disease .En: Hiemstra JA, Harris DC (eds.). A compendium of Verticillium wilts in tree species. Ponsen and Looijen, Wageningen, pp 55–57.

- Tjamos E.C. 1993. Prospects and strategies in controlling *Verticillium* wilt of olive. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 23:505–512.
- Tossi, L. y Zizzerini, A. 1998. Investigations on the epidemiology of *Verticillium* wilt in olive in central Italy. *Olivae*, 71:50-55.
- Trapero Casas, A. y Blanco López, M. A. 2008. Enfermedades. Pp. 595-656 en: Barroco, D.; Fernández-Escobar, R. y Rallo, L. (eds.). *El Cultivo de Olivo* 6th.ed. Junta de Andalucía y Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, Spain.
- Vettrano, A.; Shrestha, G.; Vannini, A. 2009a. First Report of *Fusarium solani* causing Wilt of *Olea europaea* in Nepal. *Plant Disease*. 93:200.
- Vettrano, A. M.; Lucero G.; Pizzuolo P.; Franceschini S.; Vannini A. 2009b, First Report of Root rot and twigs wilting of olive trees in Argentina caused by *Phytophthora nicotianae*. *Plant Disease*. 93: 765.
- Vigouroux, A. 1975. *Verticillium dahliae*, agent dun dépérissement del olivier en France. *Annual Phytopathology*, 7:37–44 (in French).
- Wilhelm, S. 1981. Sources and genetics of host resistance in field and fruit crops. En: Mace, M. E.; Bell, A.A. y Beckman, C.H. (eds.). *Fungal wilt Diseases of Plants*. Academic Press, New York, pp. 299-376.
- Wilhelm, S. y Taylor, J. B. 1965. Control of *Verticillium* wilt of olive through natural recovery and resistance. *Phytopathology*, 55:310-316.
- Wilhelm, S. 1955. Longevity of *Verticillium* wilts fungus in the laboratory and field. *Phytopathology*, 45:180-181.
- Wilhelm, S. y Thomas, H.E. 1950. *Verticillium* wilt of bramble fruits with special references to *Rubus ursinus* derivatives. *Phytopathology*, 40:1103-1110.
- Zachos D.G., 1963. La verticilliose del oliver en Grèce. *Annales Institut Phytopathologique Benaki (NS)*, 5: 105–7.
- Zanelli, M. 2000 Análisis estadístico de los muestreos realizados en el año 2000 pp.19. Análisis estadístico de los muestreos realizados en el año 1999 pp.5.
- Zhang, N.; Castlebury, L.A.; Miller, A.N.; Huhndorf, S.M. ; Schoch, C.L. ; Seifert, K.A. ; Rossman, A. Y. ; Rogers, J.D. ; Kohlmeyer, J. ; Volkmann-Kohlmeyer, B. y Sung, G.H. 2006. An overview of the systematics of the Sordariomycetes based on a four-gene phylogeny. *Mycologia*, 98:1076-1087. London 113 pp.

APÉNDICE TABLAS

Apéndice Tabla 1 Datos meteorológicos aeropuerto de Chilecito, SMN*, 1991-2000.

VARIABLES	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	Anual
Temperatura máxima (°C)	32,9	31,1	29,6	25,3	21,2	17,6	17,2	21,4	24,6	28,1	31,1	33,8	26,2
Años considerados	10	8	9	8	9	9	10	10	9	10	9	9	7
Máximo valor medio	34,1	34,2	30,4	29,5	23,1	20,0	20,1	23,1	27,2	29,9	32,6	36,0	27,2
Ocurrencia	1998	1999	1993	1997	1994	1994	1997	1996	1999	1998	1996	1994	1997
Mínimo valor medio	32,1	28,4	27,5	23,0	19,5	14,9	13,7	19,9	22,0	26,3	29,6	32,2	25,3
Ocurrencia	1992	1998	1998	1999	2000	1996	1992	1991	1998	1991	1992	1999	1992
Temperatura mínima (°C)	18,7	16,9	16,3	11,1	7,1	2,5	0,6	3,6	7,3	11,9	15,5	18,4	10,8
Años considerados	10	9	10	9	9	9	10	10	10	10	9	9	8
Máximo valor medio	19,4	18,4	17,5	13,0	9,6	4,1	3,0	5,7	9,4	13,0	17,0	21,3	11,7
Ocurrencia	1993	1999	1993	2000	1994	1992	1997	1997	1997	1994	1996	1994	1994
Mínimo valor medio	16,8	14,7	14,8	9,2	5,2	0,2	-1,0	2,4	4,6	10,5	13,7	16,7	10,3
Ocurrencia	1999	1998	2000	1999	1998	1996	1996	1999	1998	1991	1999	1999	1998
Precipitación (mm)	51,1	35,5	16,4	7,4	4,7	1,7	2,4	2,4	4,4	6,1	7,9	23,7	162,5
Años considerados	10	9	10	9	10	9	10	10	10	10	9	9	8
Máximo valor	85,1	58,2	36,0	22,0	31,1	6,0	11,0	14,0	16,6	23,0	27,3	63,0	187,5
Ocurrencia	1997	1991	1998	2000	1997	2000	2000	1998	1996	2000	2000	1992	1998

*Servicio Meteorológico Nacional

Apéndice Tabla 2. Olivos con “rama seca” en finca de Catinzaco, La Rioja (2001- 2005).

Lote	o Cultivar	2001	2002	2003	2004	2005	Plantas Arrancadas2	Total olivos plantados
Lote 1 (1995)	Nabalí	101	103	381	742	742	1122	2575
	Barnea	33	33	50	174	174	203	411
	‘Picual’	315	372	380	664	664	701	1659
	Manzanilla	107	193	245	462	462	415	682
	Kadesh	20	20	78	146	146	165	259
	Novo	24	39	126	147	147	155	228
	Otras¹	35	54	85	117	117	22	1189
	Total “RS”	635	814	850	2452	2452	2783	
Lote 2 (1996)	Barnea	103	93	93	530	530	46	4807
	‘Picual’	21	21	33	139	139	49	2127
	Manzanilla	36	41	108	125	125	79	8978
	Novo	10	15	23	31	31	56	1970
	Arbequina	19	19	20	174	174	18	2935
	Otras	12	14	18	28	28	40	2394
	Total “RS”	201	203	295	1027	1027	288	
Lote 3 (1997)	Nabalí	0	13	21	21	75	33	2100
	Barnea	0	4	22	35	30	13	3060
	‘Picual’	0	19	69	40	126	44	10212
	Manzanilla	0	11	14	18	28	18	6744
	Kadesh	0		0	1	4	1	672
	Novo	0	1	5	13	14	6	1656
	Arbequina	0	3	9	15	43	5	9076
	Otras	0	11	12	12	34	8	6408
	Total “RS”	0	62	152	155	354	128	
Lote 4 (1997)	Nabalí	0	9	17	17	0	29	2940
	Barnea	0	6	15	24	0	7	4078
	‘Picual’	0	34	41	15	0	29	5435
	Manzanilla	0	2	3	4	0	7	3060

	Novo	0	1	1	3	0	1	1078
	Arbequina	0	1	2	7	0	1	5140
	Otras	0	0	2	2	0	0	960
	Total "RS"	0	53	81	72	0	74	
Lote 5	Nabalí	0	8	11	11	11	2	2825
(1998)	Barnea	0	9	9	9	9	2	3553
	'Picual'	0	30	51	27	16	6	8952
	Manzanilla	0	12	30	24	27	9	10155
	Kadesh	0	0	0	0	0	0	0
	Novo	0	4	10	10	10	4	1718
	Arbequina	0	0	3	3	4	2	2550
	Otras	0	3	12	12	9	0	2349
	Total "RS"	0	66	126	96	86	25	
Lote 6	Nabalí	0	0	0	0	0	0	0
(1999)	Barnea	0	79	256	287	367	361	21738
	'Picual'	0	149	190	580	544	323	28176
	Arbequina	0	12	21	199	179	132	19323
	Otras	0	12	113	113	82	70	5627
	Total "RS"	0	252	580	1179	1172	886	
	Lote 9	Barnea	0	0	0	94	370	260
(2001/02)	'Picual'	0	0	0	155	427	197	18720
	Arbequina	0	0	0	62	71	23	12799
	Otras	0	0	0	26	0	65	9497
	Total "RS"	0	0	0	337	868	545	

¹Otras: 'Sirio', 'Mission', 'Santa Catarina', 'Picholine'

"Plantas arrancadas, plantas que se sacaron por "rama seca"(RS)

APÉNDICE FOTOS



Foto 1. Planta de olivo asintomática.



Foto 2. Planta de olivo con “apoplejía”.



Foto 3. Planta de olivo con “decaimiento lento”.



Foto 4. Planta de olivo con defoliación, cepa defoliante (D) *V. dalhiae*.



Foto 5. Tronco de olivo con “acostillado o chupado”



Foto 6. Corte de rama de olivo donde se evidencia a nivel de xilema coloración castaña púrpura.



Foto 7. “Rama roja o púrpura” de olivo.



Foto 8. Rama de olivo con necrosis apical y frutos momificados y normales



Foto 9. Olivo con cancro y exudado en tronco.



Foto 10. “Chupones o varetas” con puntas necrosadas, *‘Picual’*, Catinzaco, La Rioja.



Foto 11. Hojas de olivo con coloración verde apagado, “apoplejía”.



Foto12: Olivo con rasgado de corteza y “negrilla”.



Foto 13. Cancro producido por helada.



Foto 14. Olivo con inyecciones y “tronco acostillado”.