



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Enfermedades del olivo en la provincia de Jaén: organismos fitopatógenos

Alumno: Jorge Juan López Guerrero

Junio, 2014



UNIVERSIDAD DE JAÉN

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

Grado en Biología

Trabajo Fin de Grado

Enfermedades del olivo en la provincia de Jaén: organismos fitopatógenos



Jorge Juan López Guerrero

En Jaén, a 25 de Junio del 2014

Índice

1.	Introducción.....	6
1.1.	Características del olivo.....	6
1.2.	El fruto del olivo.....	7
1.3.	Requerimientos edafoclimáticos del olivo.....	7
1.4.	Particularidades del cultivo del olivo.....	8
1.5.	Geografía del olivar español.....	9
1.6.	Variedades españolas del olivo.....	10
1.7.	Tipos de cultivo del olivo: Convencional y ecológico.....	12
1.7.1.	Características de la agricultura ecológica.....	12
1.7.2.	Objetivos básicos de la agricultura ecológica.....	13
1.8.	El aceite de oliva.....	14
1.8.1.	Clasificación del aceite de oliva.....	14
2.	Objetivos.....	16
3.	Materiales y métodos.....	17
3.1.	Material vegetal.....	17
3.1.1.	Procedencia del material vegetal utilizado.....	17
3.2.	Material fungible e inventariable.....	17
3.3.	Medios de cultivo.....	18
3.3.1.	Patata-dextrosa-agar (PDA).....	18
3.3.2.	Patata-dextrosa-agar-acidificado.....	19
3.3.3.	V8 (8 vegetales).....	19
3.3.4.	Medio de madera.....	19
3.3.5.	PARPB.....	19
3.4.	Toma y procesado de muestras.....	20
3.4.1.	Muestras de la parte aérea.....	20
3.4.2.	Muestras de raíz y suelo.....	20
3.5.	Aislamiento de nematodos fitopatógenos.....	21
3.6.	Aislamiento de <i>Verticillium dahliae</i>	22
3.6.1.	Observación de <i>Verticillium dahliae</i>	23
3.7.	Aislamiento de <i>Phytophthora</i> spp.....	24
3.7.1.	Observación de <i>Phytophthora</i> spp.....	25
4.	Resultados y discusión.....	26

4.1.	Identificación de los nematodos fitopatógenos aislados....	26
4.2.	Identificación de los hongos fitopatógenos aislados.....	27
4.2.1.	Identificación de <i>Verticillium dahliae</i>	27
4.2.2.	Identificación de <i>Phytophthora</i> spp.....	30
5.	Conclusiones.....	34
6.	Bibliografía.....	35

Resumen

El olivo convive con numerosos seres vivos y solo un número bajo de patógenos supone una importante amenaza. Sin embargo, la utilización de técnicas intensivas en el cultivo está provocando una pérdida de estabilidad en el ecosistema, lo que conlleva un aumento de problemas fitosanitarios, siendo tanto los hongos como los nematodos fitopatógenos un factor de riesgo para el desarrollo de este cultivo. En este trabajo se identificaron nematodos del género *Meloidogyne* y hongos del género *Phytophthora* y *Verticillium dahliae*, como los agentes causantes de una serie de síntomas tales como marchitez, defoliación y podredumbre radical. Se llevaron a cabo las técnicas idóneas para aislar e identificar morfológicamente a los patógenos citados a partir de material vegetal extraído de olivos afectados procedentes del municipio de Peal de Becerro, de la provincia de Jaén.

Abstract

The olive tree coexists with a large number of living beings and only a small percentage of pathogens represents an important threat. However, the use of intensive farming techniques is causing a loss of stability in the ecosystem, leading to increased plant health problems. Both phytopathogenic fungi and nematodes are risk factors for the development of this crop. In this work, the genre of nematodes *Meloidogyne* and the genres of fungi *Verticillium dahliae* and *Phytophthora* are identified as the causative agents of a number of symptoms such as wilting, defoliation and root rot. The best techniques were used to isolate and morphologically identify the named pathogens from plant material. This material was extracted from olive trees affected by those pathogens in the township of Peal de Becerro, in the province of Jaén.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características del olivo

Olea europaea, olivera, olivo o aceituno, es un árbol perennifolio, longevo y originario del mediterráneo oriental, que empezó a cultivarse para aprovechar sus frutos, las aceitunas, y el jugo extraído de ellas, el aceite de oliva. El alto valor de sus producciones facilitó su expansión por toda la zona mediterránea. Como especie botánica, el olivo cultivado (*Olea europea* L.) procede de una variedad silvestre (*Olea chrysophylla* Lam.) que evolucionó a través del acebuche u oleastro (*Olea oleaster* L. u *Olea europea oleaster*), que es un olivo silvestre que se diferencia en poseer un porte arbustivo, de menor tamaño, con hojas de forma oval y con un fruto bastante más pequeño.

La clasificación taxonómica del olivo es la siguiente:

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliophyta*

Orden: *Lamiales*

Familia: *Oleaceae*

Género: *Olea*

Especie: *O. europaea*

Olea europea es un árbol de tamaño mediano, de unos 4 a 8 m de altura, dependiendo de la variedad, con copa ancha y tronco grueso, retorcido y a menudo muy corto. “Presenta una corteza finamente fisurada, de color gris o plateado, hojas opuestas de 2 a 8 cm de largo, con el ápice ligeramente puntiagudo, coriáceas y verdes grises oscuras por el haz. En el envés las hojas son más pálidas y densamente escamosas, con un peciolo muy corto” (Araque, *et al.*, 2002). Las flores son bisexuales o polígamas, con corola blanca que se disponen en inflorescencias compuestas de 10 a 40 flores, según variedad, con un color blanco-verdusco, simples, bracteadas y con cáliz en forma de cúpula.

El olivo florece al final de la primavera (abril-mayo) y sus frutos, se desarrollan durante todo el verano hasta su maduración a comienzos del otoño (septiembre-

octubre). Sigue a continuación el cambio de color (envero), hasta completar su madurez fisiológica en los primeros meses del invierno.

1.2. El fruto del olivo

La aceituna es un fruto succulento de 1 a 3,5 cm de largo, ovoide, verde al principio, que adquiere un color negro-morado en su plena madurez. Se distinguen las siguientes partes: pedúnculo o rabillo, epicarpio o piel, mesocarpio o carne, endocarpio o hueso y embrión o semilla. El fruto va experimentando cambios en su coloración al tiempo que engorda, desde un verde intenso al comienzo de su cuajado, a un verde amarillento según va desarrollándose. Aparecen manchas púrpuras al iniciar el envero, a la que le sigue una tonalidad púrpura azulada y cuando alcanza su madurez plena adquiere una tonalidad negro azulada.

La composición química media es la siguiente:

Agua 50%
Aceite 22%
Azúcares 19,1%
Celulosa 5,8%
Proteínas 1,6%
Cenizas 1,5%.

1.3. Requerimientos edafoclimáticos del olivo

Como árbol mediterráneo, el olivo está muy bien adaptado a condiciones ambientales muy duras, tales como las sequías y las altas temperaturas, y aunque habita en suelos pobres, requiere que estén bien aireados.

Es una especie muy rústica, de fácil cultivo, por lo que se ha instalado en terrenos marginales. “No tolera temperaturas menores de -10°C y no presenta problemas de heladas, con excepción de las variedades muy tempranas, en las que el fruto se ve muy dañado. Presenta escasos requerimientos de horas frío y elevados de calor (entre el brote y la floración transcurren 3-4 meses y de la floración hasta la recolección, 6-7 meses)” (Barranco, 2008). Los agentes meteorológicos más graves son los vientos secos y las temperaturas elevadas durante la floración, de forma que se produce el aborto ovárico generalizado,

resintiéndose seriamente la producción. Respecto a la sequía es muy resistente y el óptimo de precipitaciones se sitúa en torno a los 650 mm bien repartidos. En casos de extrema sequía se induce la producción de flores masculinas.

“Es una árbol ávido de luz, de forma que una deficiencia de ésta reduce la formación de flores o induce que éstas no sean viables, debido a la insuficiencia de asimilados en la zona axilar de las hojas” (Araque, 2002).

El suelo preferente del olivo es el liviano, arenoso y de buen drenaje. El pH más adecuado es el cercano a la neutralidad, siendo tolerante a niveles moderadamente alcalinos.

1.4. Particularidades del cultivo del olivo

-Nutrición

“Normalmente sólo se lleva a cabo el abonado nitrogenado, en forma de urea al 4% y en cantidades de 0.5-1 kg por árbol, que pueden aportarse por vía foliar para homogeneizar el reparto” (Díez, *et al.*, 2001). La respuesta al abonado potásico es tardía y se aportan de 300-400 g/árbol.

-Riego

El 95% del olivar se cultiva en secano, pero los rendimientos aumentan con el riego. Por debajo de los 800 mm de precipitación la irrigación se hace necesaria, siendo el sistema más adecuado el riego localizado por goteo a razón de 800-900 litros por árbol y año.

-Marcos de plantación

Tradicionalmente se han venido utilizando marcos de plantación muy amplios de forma injustificada. “La densidad media de plantación en España es de 72 árboles por hectárea, aunque actualmente se están recomendando valores de 312 árboles por hectárea, llegando hasta 400 en régimen de regadío” (Guzmán, 2005). En secano no deben sobrepasarse los 300 árboles por hectárea. Los marcos de plantación deben de ser rectangulares.

-Mantenimiento del suelo

Las labores repetidas para la eliminación de las malas hierbas originaban graves problemas de erosión y pérdida de del suelo. El no laboreo total, con eliminación de malas hierbas mediante el empleo de herbicidas, permite la obtención de mayores rendimientos y disminuye los costes, pero pueden producir la formación de cárcavas debido a la escorrentía del agua de lluvia. Entre estos dos sistemas se sitúa el laboreo mínimo, en la que se realiza una labor muy superficial, evitando los problemas anteriormente mencionados.

-Poda

Tradicionalmente, la poda se realizaba a 2-3 patas, mientras que actualmente se tiende a un solo tronco en vaso. “La poda de regeneración se realiza de forma bianual, siendo desaconsejables las podas severas” (Pastor, 1996).

1.5. La geografía del olivar español

España es el país del mundo con mayor superficie dedicada al olivar, 2,6 millones de hectáreas, estando entre las variedades más importantes la picual, hojiblanca, arbequina, cornicabra y manzanilla.

“España es el mayor productor de aceite de oliva y de aceituna de mesa del mundo. La producción española representa en torno al 42% de la producción mundial” (Cayuela, et al., 2006). El olivar español está presente en 34 provincias de 13 Comunidades Autónomas.

La superficie total del olivar en el año 2012 (2.584.564 ha), de las cuales el 94,4% son de olivar de almazara y el 3% son olivar de mesa y el 2,6% son de olivar de doble aptitud.

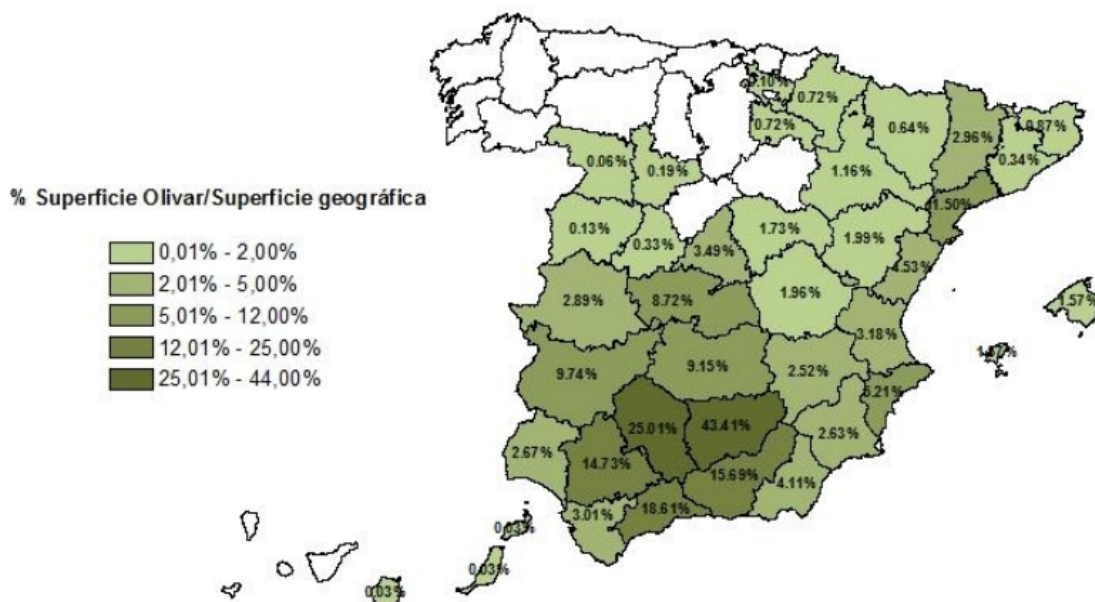


Figura 1. Distribución provincial de la superficie de olivar/superficie geográfica. Año 2012. Fuente: Encuesta sobre Superficies y Rendimientos de Cultivos (ESYRCE 2012)

1.6. Variedades españolas de olivos

En España se cultivan más de 100 variedades de olivo, muchas de ellas autóctonas y con extensión limitada. Las variedades más representativas, tanto para almazara como para aceituna de aderezo, son las siguientes:

- Arbequina: La más representativa de Cataluña, produce aceites frutados, entre verdosos y amarillos, con aromas suaves y dulces, a manzana y a almendra fresca. La planta es de poco vigor, con brotes largos y poco ramificados. La hoja es acanalada y ensanchada por el ápice, mientras que el fruto es pequeño, ovalado.
- Cornicabra: Domina toda la zona central (Toledo, Ciudad Real y Madrid). Sus aceites son de color amarillo verdoso a oro. Aromas frescos y sabor entre dulce,

amargo y algo picante. El árbol es de vigor medio con ramas de mediana longitud y con escasa formación de brotes. La hoja es larga y lanceolada y el fruto es largo y curvo.

- Empeltre: Típica aceituna del Bajo Aragón. Con ella se elaboran aceites de color entre amarillo y oro viejo. Tiene aromas de frutas, sobre todo de manzana y un sabor suave y dulce. Árbol de gran vigor con ramas erguidas y hojas anchas y algo alabeadas. El fruto es asimétrico y alargado.

- Hojiblanca: Variedad dominante en Málaga y Córdoba, con doble aptitud para aceite y para mesa. “Da aceites de color verde intenso, con aromas de frutas maduras y recuerdos de aguacate, presentado un sabor agradable con ligeras puntas de amargos y picor”(Barranco, 2000). El vigor del árbol es de medio a bueno con copa de densidad media. La hoja es alargada y parcialmente acanalada y el fruto es de tamaño grande y oblongo.

- Picual: La gran variedad predominante en Jaén. Su aceite tiene una gran estabilidad y personalidad, fuerza, con un amargor intenso y claros tonos picantes. Árbol de gran vigor, con copas vigorosas y gran desarrollo foliáceo. La hoja es alargada y el fruto elipsoidal.

- Blanqueta: Se cultiva en Alicante y en el sur de Valencia. Produce aceites de tonalidad verde hoja y aromas frutados. El árbol es de poco vigor con ramas cortas, la hoja es corta y lanceolada y el fruto es algo ovalado.

- Cacereña: Llamada también Manzanilla cacereña por su difusión en la provincia de Cáceres. “Es una variedad de doble aptitud y muy apreciada para el aderezo, tanto en verde como en negra, por la calidad de su pulpa”(Barranco, *et al.*, 1984). Es un árbol de escaso vigor, con floración y maduración tempranas. Sus hojas son planas y de longitud media y los frutos tienen forma esférica.

- Verdial de Badajoz: Está presente en las vegas del Guadiana. Produce aceites con aromas a aceituna verde, frutos secos y destaca por su dulzor. El árbol es resistente a la sequía y se emplea como patrón. El fruto es de gran tamaño y es de doble aptitud.

- Lechín de Sevilla: Se distribuye por las provincias de Sevilla y Córdoba, principalmente. Su aceite es relativamente inestable con un aroma medio y equilibrado y un sabor amargo. El árbol es vigoroso con ramas cortas y copa espesa. La hoja es corta y casi plana y el fruto es elipsoidal y algo abombado por el dorso.

- Manzanilla: Se cultiva en la provincia de Sevilla, principalmente en las proximidades de la capital. El árbol es de poco vigor y de copa poco densa. Las hojas son cortas y gruesas y el fruto es ovalado. Se emplea fundamentalmente como aceituna para aderezo.

- Gordal: Tanto su origen como su cultivo están vinculados a la provincia de Sevilla. El árbol es de vigor medio con ramas largas y gruesas. La hoja es alargada y muy recta y el fruto es de gran tamaño.

1.7. Tipos de cultivo del olivo: Convencional y ecológico

La agricultura ecológica se basa en una serie de técnicas de producción agrícola cuya finalidad es aumentar la fertilidad del suelo, haciendo crecer plantas sanas, siendo indispensable que sus raíces profundicen en una tierra con una actividad microbiana intensa.

“La agricultura convencional utiliza una gran cantidad de productos químicos de síntesis y técnicas erróneas de laboreo que destruyen la vida subterránea, debilitando la resistencia natural de las plantas a enfermedades y plagas, provocando más ataques parasitarios que obligan a aumentar la potencia o la cantidad de estas sustancias químicas, dejando un suelo estéril y aguas subterráneas contaminadas” (Ortega, 1958).

1.7.1. Características de la agricultura ecológica

La agricultura orgánica es una forma de producción sostenible que incluye las siguientes características:

-Evita el uso de material de síntesis química, como productos fitosanitarios (insecticidas, acaricidas, fungicidas, herbicidas) o fertilizantes, ya que los nitratos son solubles y contaminan las aguas subterráneas.

-No se emplean semillas modificadas genéticamente ni plantas transgénicas, usando solo variedades de semillas adaptadas a las condiciones locales.

-Existe una planificación a largo plazo del manejo del suelo, que incluye un plan de rotación de cultivos, incorporación de materia orgánica (rastros y estiércoles), “utilización de cultivos de cobertura y abonos verdes, adecuadas prácticas de labranza, conservación de suelos y agua y control biológico de plagas” (Sánchez, *et al.*, 2009)

-Se utilizan recursos propios de la finca, reciclado nutrientes, se diversifica la producción y se conserva el medio ambiente.

1.7.2. Objetivos básicos de la agricultura ecológica

Los objetivos básicos de la agricultura ecológica son los siguientes:

-Producir alimentos de alta calidad nutritiva y en suficiente cantidad.

-Trabajar con los ecosistemas en lugar de querer dominarlos.

-Fomentar los ciclos bióticos dentro del sistema agrícola, como microorganismos, fauna y flora del suelo, plantas y animales.

-Mantener y aumentar a largo plazo la fertilidad de los suelos.

-Mantener la diversidad genética del sistema agrícola y de su entorno, incluyendo planes de protección de hábitat de plantas y animales silvestres.

-Lograr con las prácticas desarrolladas en el proceso un ingreso económico familiar y comunal satisfactorio

“Podríamos definir entonces la agricultura ecológica como el sistema de producción que integra aspectos agronómicos, económicos, ecológicos y sociales, donde se utilizan recursos agrícolas naturales, se mantiene la diversidad vegetal y animal, así como la fertilidad y salud del suelo, promueve la conservación de la biota y se minimiza el impacto ambiental” (Guzmán, *et al.*, 2004).

1.8. El aceite de oliva

Los compuestos químicos del aceite oliva pueden integrarse en dos grupos: Fracción saponificable e insaponificable. La primera está constituida por triglicéridos (ésteres de ácidos grasos y glicerina) y ácidos grasos libres. “Entre los ácidos grasos más abundantes se encuentra el ácido monoinsaturado oleico y en menor proporción los ácidos poliinsaturados linoleico y linolénico. Los ácidos grasos saturados se encuentran en cantidades semejantes o menores a las de otros aceites vegetales” (Ramírez, 2001).

La extracción del aceite de oliva virgen en una almazara se puede hacer mediante dos métodos: presión y centrifugación. El sistema clásico es el de presión, en el que la pasta procedente de la aceituna molida se bate y se reparte en capachos para someterla a presión en las prensas hidráulicas. En una almazara moderna la pasta batida se centrifuga en un decanter, o centrífuga de eje horizontal, para obtener tres fases (aceite, alpechín y orujo) o dos fases, el aceite por un lado y el alpechín y orujo por otro.

1.8.1. Clasificación del aceite de oliva:

Dentro de los aceites de oliva se pueden distinguir:

a) Aceite de oliva virgen: son aquellos aceites obtenidos exclusivamente por procedimientos físicos, y en unas condiciones de temperatura que no impliquen la alteración del aceite. Es un producto natural que conserva el sabor, las aromas y las vitaminas de la fruta. Se clasifica en:

-Extra: Presenta un gran sabor y aroma y posee una acidez (expresada en ácido oleico) no superior a 1 grado. Es el de mayor calidad.

-Fino: Con acidez situada entre 1º y 1,5º. Este aceite, aunque de calidad inferior al anterior, es excelente para el consumo.

-Semifino: Cuya acidez se sitúa entre 1,5º y 3º. Estos aceites no están permitidos envasarlos, salvo autorización expresa.

-Lampante: Con una acidez superior a los 3º. Estos aceites no están autorizados para el consumo directo.

b) Aceite de Oliva Refinado: Es el aceite procedente de la refinación por procedimientos químicos, de aceites de oliva vírgenes de alta acidez. Estos aceites han perdido sus características organolépticas (color, olor y sabor) y sus propiedades naturales.

c) Aceite de Oliva: Mezcla de aceites de Olivas vírgenes distintos al lampante y de oliva refinado, con acidez no superior a 1,5°. (Este es el producto más consumido en España).

d) Aceite de Orujo Crudo: Es el obtenido por medio de disolventes de orujo de oliva, un subproducto de la aceituna.

e) Aceite de Orujo refinado: es el obtenido por refinación de este aceite de orujo crudo y con acidez no superior a 0,5°.

f) Aceite de Orujo de oliva: Mezcla de aceite de orujo refinado y de aceite de oliva vírgenes distintos al lampante, con acidez no superior a 1,5.

2. OBJETIVOS

El olivo, como todas las plantas cultivadas, convive con numerosos seres vivos y puede verse afectado por la acción de organismos de origen muy variado y por diversos agentes abióticos. “El número de enfermedades del olivo conocidas actualmente supera la cifra de 50, incluyendo agentes bióticos y factores abióticos, pero solo un número relativamente bajo de estas enfermedades suele llegar a tener importancia en la práctica, debido a que las características propias del cultivo del olivo han hecho que su ecosistema sea bastante estable al haberse conservado mecanismos naturales de control que han ayudado a controlar las poblaciones de las diferentes especies de patógenos asociadas a la planta”(Pastor, *et al.*, 1998). “Esta estabilidad solo se ve alterada como consecuencia de cambios en las condiciones climatológicas y de una alteración de la biodiversidad natural del ecosistema, originada por el aumento en la utilización de técnicas intensivas, como abonos, riegos, plaguicidas, introducidos con el objetivo de alcanzar la máxima producción posible” (Pastor, *et al.*, 1998). Todo esto provoca pérdidas de estabilidad que incrementan los problemas fitosanitarios del olivo sumado a impacto ambiental.

De este modo, la productividad se está viendo cada vez más mermada debido a un síndrome de desecación y marchitez, produciendo una gran mortalidad en plantaciones de todas las comarcas andaluzas. Esta mortalidad se ha asociado con diversos agentes y factores ambientales entre los que destacan la podredumbre y daños radiculares. Se han llevado a cabo diversos estudios en los que se han tomado muestras de tejidos dañados, tanto de parte aérea como de raíces, donde se aislaron los agentes causantes de estos daños entre los que se encuentran hongos y gusanos nematodos.

Por tanto, el presente trabajo tiene por objeto aislar e identificar patógenos procedentes de plantas de olivo, que llegan al laboratorio de sanidad vegetal con síntomas de enfermedad. Este objetivo general se puede desglosar en los siguientes objetivos concretos.

- Identificación de síntomas de las plantas.
- Selección del método de aislamiento del patógeno
- Identificación del patógeno

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Material vegetal

Se ha llevado a cabo el aislamiento de tejidos a partir de parte aérea y raíces de árboles pertenecientes a la variedad "Picual" de *Olea europea* L.

3.1.1. Procedencia del material vegetal utilizado

Las muestras fueron obtenidas en la provincia de Jaén, en el municipio de Peal de Becerro, en una parcela de 600 ha, con 55.000 olivos y un cultivo de regadío, el cual se regó desde la primavera hasta el otoño, con una frecuencia de dos días a la semana. El cultivo era tipo convencional, con tratamientos fitosanitarios tres veces al año. Presentaba cierta humedad con zonas encharcadas debido a la proximidad a manantiales y al río Guadiana.

3.2. Material fungible e inventariable

Agar

Agitador Magnético

Agua destilada

Alcohol 70%

Bisturí

Campana de flujo laminar

Cubreobjetos

Dextrosa o glucosa

Embudos

Escalpelo

Guantes

Matraces aforados de 500 mL autoclavables

Matraces Erlenmeyer de 250 mL

Mechero de alcohol

Papel de aluminio

Papel de filtro

Papel parafilm®

Patatas

Pinzas de disección

Portaobjetos

pHmetro

Placas de Petri de plástico estériles

Vasos de precipitado de 500 mL

3.3. Medios de cultivo

El aislamiento de patógenos se llevó a cabo en los medios de cultivo que se detallan en este apartado. Los medios de cultivo se esterilizaron en el autoclave a 120°C (1 atm de presión) durante 20 minutos, cuando todos los componentes del medio se habían disuelto. Una vez esterilizados, los medios se distribuyeron en placas de Petri de plástico estériles a razón de 20 ml/placa.

3.3.1. *Patata-dextrosa-Agar (PDA)*

Medio principalmente utilizado para el aislamiento de *V. dahliae* y *Phytophthora*. Su composición es la siguiente:

Patatas	250g
Dextrosa o glucosa	20g
Agar	20g
Agua destilada	1000 ml

El pH se ajustó a 5,6 con una solución de HCl 0,1 N o NaOH 0,1 N

3.3.2. *Patata-dextrosa-agar-acidificado (PDAA)*

Su preparación es igual que el PDA, pero añadiéndole 10 gotas de ácido láctico al 85% cuando el medio no estaba muy caliente (40-45°C). El medio se agitó antes de verterlo en las placas de Petri.

3.3.3. *V8 (8 vegetales)*

Medio utilizado para el aislamiento de *Phytophthora*. (no añadir ni ácido láctico ni estreptomicina)

Jugo de tomates y verduras	200ml
----------------------------	-------

CaCO ₃	2,0g
-------------------	------

Agar	15,0g
------	-------

Aguadestilada	Completar hasta 1l
---------------	--------------------

Esterilizar durante 20 minutos a 120°C en autoclave, dejar enfriar hasta 40°C y añadir en su caso los siguientes compuestos:

Pimaricina	5,0mg
------------	-------

Rifampicina	25,0mg
-------------	--------

Hymexazol	5,0mg
-----------	-------

Benomilo	10,0mg
----------	--------

3.3.4. *Medio de madera*

Medio utilizado para el aislamiento de *V.dahliae*

Virutas de madera	3g
-------------------	----

Agar	15g
------	-----

Estreptomicina sulfato	380mg/10ml
------------------------	------------

3.3.5. *PARPB*

Medio selectivo para el aislamiento de hongos pitiáceos. Su composición es la siguiente:

Corn-Meal-Agar (CMA)	17g
----------------------	-----

Agua desionizada	950 ml
------------------	--------

Piramicina	5mg
Ampicilina sódica	250mg
Rifampicina	10mg
PCNB	100mg
Himexazol	550mg

Los antibióticos se disolvieron en 50 ml de agua estéril y el CMA se añadió a 40-45°C. El medio se conservó en oscuridad para evitar su degradación.

3.4. Toma y procesado de muestras

3.4.1. Muestras de la parte aérea

V. dahliae se aisló a partir de ramas de olivo. Las muestras de tejido se tomaron en la época más adecuada para el aislamiento, que es aquella en la que la temperatura exterior diurna se sitúa en torno a las 20-25°C, abarcando principalmente desde la salida del invierno hasta principios de verano. Las muestras se eligieron en zonas donde apareció la enfermedad de forma salpicada, bien en árboles individuales o en rodales en torno a un foco inicial. Los síntomas observados en los olivos para su adecuada elección fueron los siguientes: Pérdida de brillo de las hojas, marchitez sectorial de las ramas, necrosis de inflorescencias y momificado de flores y frutos en los brotes afectados.

De entre las ramas afectadas, evitando aquellas que estén demasiado secas o dañadas, se cortaron aproximadamente unos 10-12 tallos de 25-30 cm de longitud y de unos 2 cm de grosor. Una vez humedecido el material, se guardó en bolsas de plástico, cerradas y señalizadas según procedencia y árbol, que se mantuvieron a una temperatura de 4°C, con el fin de mantener la humedad, hasta ser procesadas en el laboratorio.

3.4.2. Muestras de raíz y suelo.

Para el aislamiento de *Phytophthora* spp y *Meloidogyne* spp se escogieron muestras procedentes de la raíz y del suelo. Los síntomas observados para la elección de las muestras fueron los siguientes: amarillez, defoliación y marchitez, evitándose los olivos totalmente muertos. Se descalzó el olivo mediante una zanja en la zona que va desde la base del tronco hasta unos 25-30 cm y de una

profundidad a la que aparecieron las primeras raíces finas, evitando incluir raíces completamente secas o gruesas.

Las muestras tomadas tenían un grosor comprendido entre 1 y 5 mm de diámetro y mostraban síntomas de podredumbre tales como coloración oscura, mal olor y desprendimiento de la corteza externa. La cantidad de raíces por muestra incluyó, al menos, 20 raíces afectadas, evitando mezclar raíces procedentes de distintos olivos.

Cada muestra se introdujo en una bolsa de plástico con tierra humedecida, asegurándose de que estuvieran protegidas de la luz y evitando así su desecación. Cada muestra se identificó según su procedencia y árbol y se llevaron al laboratorio de inmediato donde se mantuvieron a 4°C hasta ser procesadas.

3.5 Aislamiento de nematodos fitopatógenos.

Las muestras de raíces se depositaron en un recipiente donde se lavaron con agua para eliminar la tierra adherida que dificulta la observación de los nematodos. Una vez limpias las raíces, se depositaron en un recipiente con agua, donde se observaron la presencia de síntomas característicos, como necrosis, agallas, engrosamientos o presencia de quistes. Las partes más dañadas o necrosadas se eliminaron, se escogieron las raíces más cercanas a la base de tallo, donde hay más probabilidad de encontrar al patógeno y se eliminó con un bisturí la corteza de las raíces más gruesas para facilitar la identificación de las agallas. Mediante un microscopio estereoscópico se localizaron los nematodos, que con la ayuda de un bisturí se colocaron en un portaobjetos con una gota de agua destilada. Se puso un cubreobjetos y se eliminó el exceso de agua con papel absorbente. Se calentó el portaobjetos sobre el mechero para que los nematodos se relajaran y tomaran la posición normal para su identificación bajo el microscopio óptico: Las hembras con el cuerpo curvado ventralmente y los machos con la forma de palo de stick.

Para posteriores preparaciones las raíces se mantuvieron en una cámara húmeda (placa de petri con papel de filtro humedecido en agua estéril y cerrada con parafilm®) a temperatura ambiente.

3.6 Aislamiento de *Verticillium dahliae*

Las muestras de la parte aérea se utilizaron para este aislamiento fueron tallos sin necrosis, cuyas hojas habían manifestado los síntomas de la enfermedad, entre 0,5-1 cm de grosor.

La preparación de la muestra para su análisis se realizó de la siguiente manera: primero se eliminó mediante unas tijeras las hojas y con un estropajo humedecido se limpiaron los tallos, que se etiquetaron y se ataron con una cinta con el número de registro de la muestra. Las muestras se llevaron a un vaso de precipitado, que se mantuvo con un flujo continuo de agua durante una hora mediante un tubo conectado a un grifo y el otro extremo en la base del vaso de precipitado, eliminando así la contaminación que la material pudiese tener.

El material se llevó a la cámara de flujo laminar, donde se procesó, extrayendo con un escalpelo la parte externa del tallo y realizando cortes en forma de cuña mediante un bisturí, con el fin de coger el sistema vascular del tallo. El material antes de cada análisis se esteriliza pasándolo por alcohol al 96% y se flamea en un mechero 3 veces. Se emplean para el aislamiento 2 bisturíes, 2 escalpelos y 2 pinzas, que se utilizan alternativamente, esterilizados en el mechero de alcohol cada vez que se extraían fragmentos del tejido vegetal. Los cortes en forma de cuña de realizaron así debido a que el patógeno se encuentra en el xilema. Una vez troceado el tejido y obtenidas las astillas de los tallos, estas se desinfectaron en lejía al 10% durante 60 segundos y se depositan sobre un trozo de papel de filtro estéril para eliminar el líquido adherido antes de la siembra en medio de cultivo. Las porciones de tejido se colocaron en placas de Petri con medio en posiciones equidistantes, con un número de 7 a 9 porciones por placa. A continuación las placas se sellaron con cinta parafilm® y se rotularon con el número de muestra, la fecha y el tipo de medio. La incubación se llevó a cabo en una estufa a 23,5 °C en condiciones de oscuridad. El desarrollo de la colonia del hongo se observó cada 4-5 días durante 3 semanas.

3.6.1 Observación de Verticillium dahliae

Para la observación del hongo al microscopio óptico se realizaron dos tipos de preparaciones:

a) Con un bisturí se hizo un corte en forma de placa en el agar en el borde de la colonia, donde no hay mucha densidad de micelio, para facilitar la observación. El

material se colocó en un portaobjetos, donde se le añadió una gota de agua destilada y encima se puso un cubreobjetos.

b) Con una aguja enmangada se pasó ligeramente por el micelio sin llevarse una cantidad excesiva de material que pueda dificultar la observación. El micelio se distribuyó en un portaobjetos donde previamente se le echó una gota de agua esterilizada o colorante y se colocó un cubreobjetos evitando que se formaran burbujas.

Los colorantes que se emplearon para teñir las estructuras de *Verticillium* fueron:

a) Erytrosina: Tiñe el citoplasma y proporciona una buena diferenciación entre las células de la pared, el citoplasma y el colorante. Útil para el estudio de la conidiogénesis. Su composición es la siguiente:

-Erytrosina 1 g

-NH₄OH 10% 100 ml

Añadir la Erytrosina a la solución de amoníaco. Almacenar en una botella protegida de la luz.

b) Lactofuchisna: Se utiliza para la observación de características generales de los hongos. Proporciona una buena visión de gúttulas, septos en conidióforos y conidios, estructura de los tipos de paredes de los cuerpos fructíferos. Su composición es la siguiente.

-Fuchsina ácida 0,1 g

-Ácido láctico 100 ml

Disolver la fuchsina ácida en ácido láctico y almacenar en una botella protegida de la luz.

3.7 Aislamiento de *Phytophthora* spp

Para el aislamiento de este patógeno se utilizaron las muestras obtenidas de la parte de la raíz y del suelo, que se mantuvieron a una temperatura óptima para el mantenimiento de la humedad. Se llevó a cabo dos tipos de aislamiento:

a) Trampas vegetales: Debido a la dificultad para el aislamiento de *Phytophthora* spp en medios de cultivo, se utilizaron pétalos de clavel inmaduros que se introdujeron en una placa de Petri con agua estéril y tierra de alrededor de las raíces. La placa de Petri se introdujo en una estufa a 20°C, donde las zoosporas del hongo se desplazaron por el medio hacia los pétalos de clavel, donde germinaron. Los pétalos se siembran en medio de cultivo V8 para favorecer el crecimiento del hongo y su posterior observación. Las placas se incubaron a 20°C.

b) Aislamiento a partir de tejido infectado: Se tomaron las raíces y se lavaron con agua para eliminar toda la tierra que tuviesen. Una vez lavadas, con una cinta se ataron y se etiquetaron. El material se llevó a un vaso de precipitado, con un flujo continuo de agua conectado a un grifo durante dos horas. El tejido a sembrar consiste en raíces absorbentes, finas de 1mm de diámetro aproximadamente, que presentaban la corteza desprendida. En la cámara de flujo laminar, donde se procesó el tejido, mediante un bisturí se trocearon segmentos de las raíces con síntomas, tomando la zona de avance del patógeno, incluyendo en cada porción parte sana y parte dañada. El material antes de cada análisis se esteriliza pasándolo por alcohol al 96% y se flamea en un mechero 3 veces. Se emplean para el aislamiento 2 bisturíes, 2 escalpelos y 2 pinzas, utilizados alternativamente y esterilizados en el mechero de alcohol cada vez que se extraían fragmentos del tejido vegetal. Una vez troceado el tejido, se esteriliza con lejía a distintas concentraciones y tiempos: 5% 1 minuto, 5% 2 minutos, 10% 1 minuto, 10% 2 minutos. Tras la esterilización, el material se depositó sobre un trozo de papel de filtro estéril para eliminar el líquido adherido antes de la siembra en medio de cultivo. El tejido se colocó en el medio de forma que los trocos de raíz sobresalieran un poco del agar, facilitando así el avance del hongo.

3.7.1 Observación de *Phytophthora* spp

Para la observación del hongo al microscopio óptico se realizaron dos tipos de preparaciones:

a) Con un bisturí se hizo un corte en forma de placa en el agar, preferiblemente en zonas donde el hongo no se encuentra con mucha densidad de micelio, para facilitar la observación. El material se colocó en un portaobjetos, donde se le añadió una gota de agua esterilizada y encima se puso un cubreobjetos.

b) Con una aguja enmangada se pasó ligeramente por el micelio sin llevarse una cantidad excesiva de material que pueda dificultar la observación. El micelio se distribuyó en un portaobjetos donde previamente se le echó una gota de agua destilada y se colocó un cubreobjetos evitando que se formaran burbujas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Identificación de los nematodos fitopatógenos aislados

En el aislamiento de nematodos que se llevaron a cabo en raíces de olivo no observamos individuos adultos, aunque si pudimos aislar huevos, tanto en el aislamiento directo como en el de cámara húmeda.



Figura 2. Huevo de *Meloidogyne*. Fuente: Delegación Provincial de la C.A.P de Málaga. Dpto. de Sanidad Vegetal. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía.

Por las características y tipo de huevo creemos que se trataba de *Meloidogyne* spp.

Este género pertenece al orden *Tylenchida* y a la familia *Meloidogynidae*. “Se caracteriza por formar agallas en raíces de unas 2000 especies, tanto arbóreas como herbáceas” (Romero, 1992).



Figura 3. Raíces de olivo infectadas con *Meloidogyne*. Fuente: Laboratorio de producción y sanidad vegetal.

Son nematodos endoparásitos sedentarios, desarrollando su ciclo dentro de la plana hospedadora. “La hembra queda en el interior de la raíz y su crecimiento y alimentación da lugar a la formación de las agallas. Un ciclo completo puede durar un mes en condiciones óptimas, alcanzando en primavera y otoño las poblaciones más altas” (Romero, 1992). “La dispersión por el suelo es muy lenta, siendo favorecida por las prácticas del hombre” (Taylor, 1983).

“Debido a la formación de las agallas en las raíces, en la parte aérea se observa como síntoma secundario retraso en el crecimiento, falta de vigor y decaimiento del árbol. Estos síntomas en campo se observan en rodales” (Doucet, *et al.*, 1997). “En parcelas infectadas con grandes daños se utiliza la solarización, proceso hidrotérmico de desinfestación del suelo mediante el calor solar producido” (Christie, 1986).

4.2 Identificación de los hongos fitopatógenos aislados

“Los hongos representan el grupo más numeroso de microorganismos fitopatógenos, siendo los responsables de las mayores pérdidas agrícolas” (Agrios, 1985). “El hábitat de los hongos es muy amplio, ya que se encuentran en el suelo, agua, en las plantas o animales. Pueden desarrollarse en condiciones climáticas muy variadas, con amplios rangos de temperatura” (Rodríguez, 1983).

4.2.1 Identificación de *Verticillium dahliae* Kleb

“La Verticilosis del Olivo es una de las enfermedades más importantes de este cultivo, diagnosticada por primera vez en Italia en los años 40, lo que refleja una amplia distribución en los países de la cuenca mediterránea. Desde la primera detección en Andalucía en 1975 se ha extendido por todo el área de cultivo y actualmente constituye la enfermedad que en mayor medida preocupa debido a la importancia económica de las pérdidas producidas y a la dificultad de su control” (Jiménez, *et al.*, 1984).

V. dahliae pertenece a la clase Deuteromycetes y es un hongo que puede sobrevivir en el suelo durante varios años debido a que forma microesclerocios. “Estos microesclerocios están formados por células fuertemente compactadas por lo que el hongo puede permanecer en suelos escasamente cultivados o sin cultivos, dependiendo su proliferación de nutrientes y sustancias expulsadas de las raíces de las plantas” (Jiménez, *et al.*, 1984). Los microesclerocios existentes en el suelo

germinan produciendo pequeñas hifas que penetran en las raíces y avanzan hasta el sistema vascular. “La penetración puede ser directa o facilitada por heridas de naturaleza diversa” (Wihlem, 1965). Una vez se encuentra el hongo en el xilema, invade las plantas mediante conidias producidas por el micelio y mediante el movimiento de la savia alcanza zonas superiores.

“La diseminación puede hacerse a través del agua de riego o mediante las herramientas utilizadas., aunque también puede infectar a través de la parte aérea o por la raíces de otra planta hospedante” (López, 2004).

V.dahliae se consiguió aislar en medio PDAA (apartado 3.3.2, página 15) y en medio de madera (apartado 3.3.4, pagina 16). El porcentaje de aislamiento positivo fue ligeramente mayor en medio de madera que en PDAA. En el medio de madera solo se observan los microesclerocios en cultivos viejos (2 meses). “Las plantas de olivo afectadas por *V.dahliae* manifiestan los primeros síntomas a partir de dos años, pudiendo aparecer antes dependiendo de la cantidad y virulencia del patógeno, de las condiciones ambientales y la variedad” (Rodríguez, 1993).

V. dahliae es un patógeno vascular y presenta 2 tipos de síntomas (Jiménez, et al., 1984):

- a) Apoplejía: Este síntoma es de desarrollo rápido, iniciándose por una pérdida del color verde de las hojas desde el invierno hasta principios de primavera y a veces durante el otoño. Se caracteriza por una necrosis rápida de brotes, ramas principales y secundarias desde el extremo hacia la base. En ocasiones termina con la muerte del árbol. Frecuentemente se puede observar una coloración morada, distribuida longitudinalmente en la corteza y una coloración marrón de los tejidos próximos al xilema.
- b) Decaimiento lento: Ocurre durante la primavera después de la apoplejía. Consiste en la necrosis de las inflorescencias, en la que las flores quedan momificadas y las hojas caen generalmente antes de secarse.

Si los olivos no mueren, suelen recuperarse en los años siguientes, habiendo una recuperación natural frente a las infecciones.

Tras la observación al microscopio de las preparaciones se puede observar un micelio hialino, septado, a partir del cual se desarrollan conidióforos con las fiálidas dispuestas en verticilos.

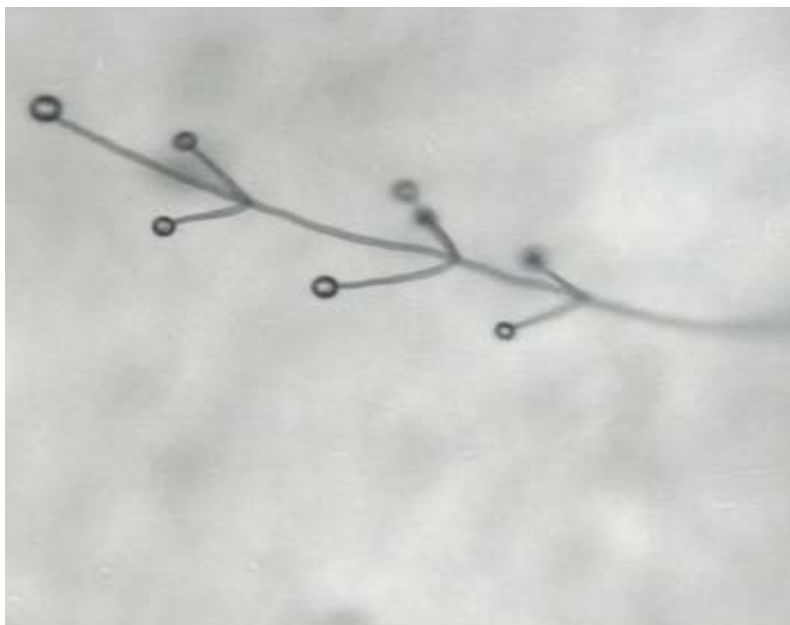


Figura 4. Conidióforo de *V.dahliae*. Fuente: <http://digilander.libero.it/bubicig/funghi/pages/Verticillium%20dahliae%2002.html>.

Tal y como se ha descrito con anterioridad los conidios eran elipsoidales, hialinos, unicelulares, producidos apicalmente, solitarios o unidos en estructuras mucilaginosas formando pequeñas cabezas. En las placas de cultivo observamos la formación de microesclerocios de color oscuro.

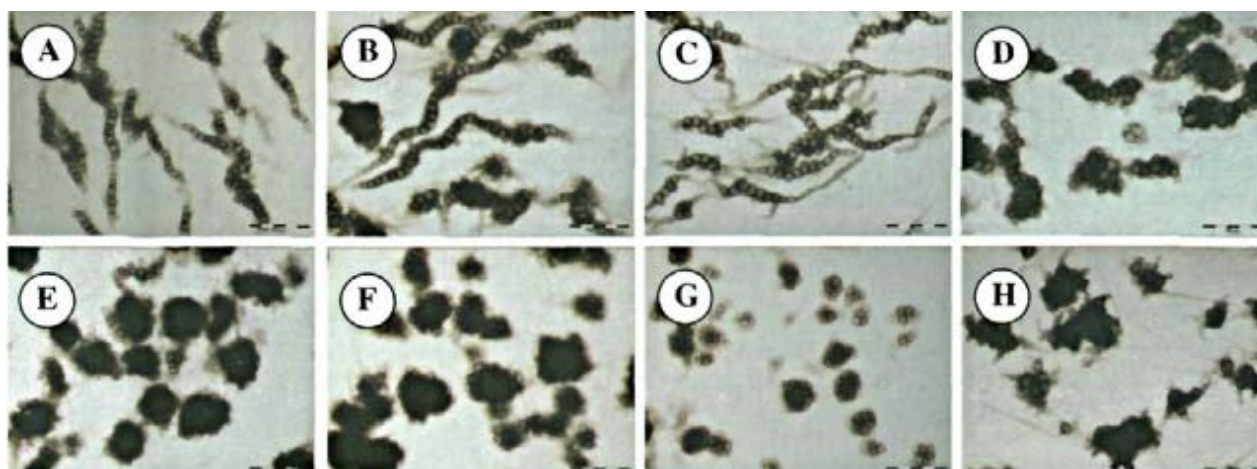


Figura 5. Morfología de microesclerocios alargados de *V.dahliae* (A, B, C), ovalados (D), redondeados (E,F), esféricos (G) y redondeados o esféricos con proyecciones (H). Fuente: Boletín Sanidad Vegetal. Plagas, 29: 613- 626, 2003.

La presencia de microesclerocios nos permite diferenciar *V. dahliae* de *V. albo-atrum*, ya que este último no produce esclerocios.

El género *Verticillium* es capaz de atacar a más de 200 especies vegetales, entre las que se incluyen plantas ornamentales, árboles frutales y forestales, malezas, hortalizas y cultivos extensivos.

“Existen dos patotipos de *V.dahliae*, diferenciándose por su capacidad de producir la enfermedad. Estos aislados son conocidos como defoliante y no defoliante. El patotipo defoliante es más virulento que el no defoliante, ocasionando la muerte poco después de la inoculación” (Markakis, *et al.*, 2004). El aislado no defoliante produce síntomas moderados y hay una recuperación de la enfermedad.

Para el control de *V.dahliae* se utilizan métodos preventivos, como la utilización de plantas libres de patógenos y suelos no infestados. Para erradicar el patógeno en el suelo se utiliza la solarización, debido a la sensibilidad de los microesclerocios a temperaturas moderadamente elevadas en condiciones de humedad.

4.2.2 Identificación de *Phytophthora* spp

Phytophthora pertenece a la clase *Oomycetes*. Es un patógeno de amplia distribución en Andalucía. “Causa podredumbre, especialmente grave en olivos jóvenes y en épocas con abundantes precipitaciones que traen consigo un encharcamiento prolongado del suelo” (Sánchez, *et al.*, 2001).

“En Andalucía, durante los años 1996-98, se dio una elevada mortalidad debido a un periodo lluvioso en el que el 65% de los olivares jóvenes fueron afectados por la enfermedad. Los olivos adultos son menos afectados por estas podredumbres pero si se dan condiciones favorables puede dar lugar a la muerte de algunos olivos” (Expósito, 1999).

El patógeno habita en el suelo en forma de oosporas, estructuras de supervivencia, que germinan produciendo esporangios cuando se dan condiciones favorables, como encharcamiento del suelo y temperaturas entre 10 y 35°C. “Los esporangios liberan zoosporas que avanzan por el agua atraídos químicamente por los exudados de las raíces, donde establecen la infección, proliferando rápidamente el patógeno” (Erwin, *et al.*, 1983). “El factor que más influye en la severidad de la

infección es la duración del encharcamiento del suelo, produciendo la asfixia radical debido a las condiciones de anoxia” (Erwin, *et al.*, 1983).

“Existe tanto reproducción sexual como asexual. En la sexual se produce la unión de células gaméticas (anteridio y oogonio), formando las oosporas, estructuras de supervivencia que dan lugar a esporangios” (Zentmer, *et al.*, 1980). Las estructuras de la reproducción asexual consisten en clamidosporas, esporangios y zoosporas. “Las clamidosporas son esféricas y presentan una pared celular gruesa, que actúa como una estructura de supervivencia” (Trapero, 1996). “Los esporangios, en condiciones de clima cálido germinan e infectan nuevos tejidos y en condiciones de clima frío y húmedo dan lugar a zoosporas, las cuales presentan flagelos para desplazarse por el agua” (Trapero, 1996).

Los aislamientos llevados a cabo en el laboratorio a partir de raíces de olivo dieron negativo en los medios PARPB y V8. Uno de los principales problemas del aislamiento de este hongo es la contaminación con *Phytium*, un hongo que suele confundirse con *Phytophthora* debido a la ausencia de tabiques y a las oosporas. “La principal diferencia entre estos dos hongos es que en *Phytophthora* la formación de zoosporas ocurre dentro del esporangio mientras que en *Pythium* el protoplasma indiferenciado sale del esporangio dentro de una vesícula en la que más tarde se diferenciará en zoosporas”(Timmer, *et al.*, 2000).

Se pueden observar dos tipos de síntomas:

a) Los síntomas aéreos, que consisten en una desecación y marchitez generalizada que afecta a toda la planta, produciendo la muerte del árbol en pocas semanas. Este síntoma es conocido como “muerte súbita”. “Si las condiciones favorables de la enfermedad persisten se puede observar un deterioro progresivo de la copa, con amarillez, desecación y caída de las hojas” (Sánchez, *et al.*, 2001).



Figura 6. Síntomas de amarillez y defoliación en olivo. Fuente: "La podredumbre radical del olivo y del acebuche". Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía.

b) "Los síntomas radicales, que consisten en la necrosis de las raíces, afectando principalmente al tejido cortical de las raíces absorbentes, donde aparece un reblandecimiento en las primeras fases del desarrollo de la enfermedad, adquiriendo una coloración oscura." (Sánchez, *et al.*, 2001). Conforme avanza la podredumbre, la necrosis es total, tomando las raíces un aspecto descascarillado.

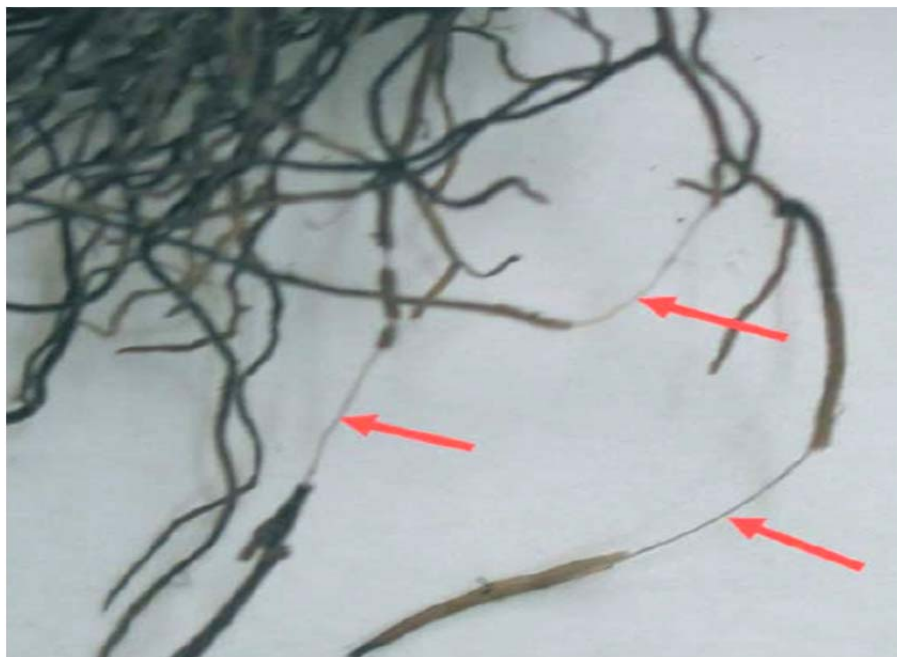


Figura 7. Podredumbre de raicillas de olivo. Síndrome de raíz descascarillada. Fuente: "La podredumbre radical del olivo y del acebuche". Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía.

En las preparaciones se puede observar un micelio hialino, cenocítico, aunque pueden aparecer septos en cultivos viejos. La morfología de la colonia generalmente

es de tipo radiado, estrellado y con los bordes redondeados o sinuosos, pero puede variar en función del medio utilizado y de la cepa de la especie. Otra característica consiste en “los hinchamientos hifales, que consisten en vesículas y protuberancias en el micelio” (Erwin, *et al.*, 1983). “Para la clasificación de la especie, una característica muy importante a tener en cuenta son los esporangios y el tipo de papila que tienen” (Sánchez, *et al.*, 2001).

“Existen muchas especies de *Phytophthora*, pero entre las más abundantes en Andalucía se encuentran *P. megasperma* y *P. inundata*, siendo las dos especies parecidas morfológicamente y ecológicamente parecidas” (Sánchez, *et al.*, 2001). “Una característica que distingue a las dos especies es su diferente temperatura óptima de crecimiento. Mientras *P. megasperma* tiene un óptimo de 21°C, *P. inundata* tiene un óptimo de 30°C, pudiendo ambas especies convivir ya que muestran un bajo nivel de competencia” (Expósito, 1999).

Las medidas preventivas para el control de este hongo son el drenaje del suelo, la micorrización, la fertilización fosfórica y evitar el encharcamiento prolongado del suelo.

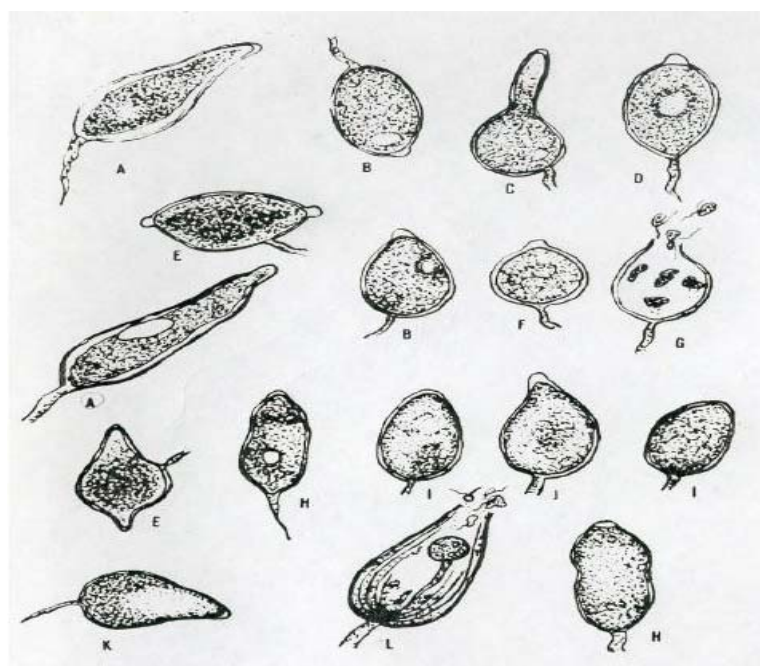


Figura 8. Diferentes tipos de esporangios de las especies de género *Phytophthora*. Irregular papilado (A), Limoniforme (B), Piriforme (C), Trasovado (D), Irregular con dos papilas (E), Globoso (F), Descargando las zoosporas (G), Elíptico (H), Ovalado sin papilas (I), Ovalado con papilas (J), Cuerpo esférico y ápice agudo (K), Múltiple (L). Fuente: “*Phytophthora*: Características, diagnóstico y daños que provoca en algunos cultivos tropicales. Medidas de control. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical.”

5. CONCLUSIONES

Primera- Tras el análisis de raíces de olivo con agallas observamos la presencia de huevos de *Meloidogyne*.

Segunda- El aislamiento de *V.dahliae* a partir de ramas de olivo se realizó con éxito tanto en medio PDAA como en medio de madera.

Tercera- En el medio de madera la producción de microesclerocios tuvo lugar en los cultivos viejos.

Cuarta- De las raíces de olivo que presentaban síntomas de necrosis no se aisló *Phytophthora*.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G.N. (1985) Fitopatología. 2º ed. Ed. Limusa, México. 756pp.
- Alonso, A.M. (2003) Análisis de la sostenibilidad agraria: el caso del olivar en la comarca de Los Pedroches (Córdoba). Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- Araque Jiménez, E.; Gallego Simón, V.J. y Sánchez Martínez, J.D. (2002) El olivar regado en la provincia de Jaén. Investigaciones geográficas. Nº 28. Págs. 5-32.
- Araque Jiménez, E. (2010) El olivar en la provincia de Jaén: evolución reciente y situación actual. En Araque, E.; Cuesta, M. J. y García, P.: Actas del Congreso de la Asociación Española de Ciencia Regional. Jaén. Asociación Andaluza de Ciencia Regional. Págs. 271-297.
- Barranco, D. y Rallo, L. (1984) Las variedades de olivo cultivadas en Andalucía. M.º de Agricultura-Junta de Andalucía, Madrid.
- Barranco D., Fernández-Escobar R. y Rallo L., (2008) El cultivo del olivo, sexta edición, Ediciones Mundi-Prensa Madrid, 846p
- Barranco, D. Fernández-Escobar y R. Rallo, L. (1996) El cultivo del olivo. Junta de Andalucía. Conserjería de Agricultura y Pesca. Mundi-Prensa.
- Barranco D. (2000) Catálogo mundial de variedades de olivo. Consejo Oleícola Internacional. Madrid.
- Cayuela, J. A.; García, J. M. y Gutiérrez, F. (2006) Influencia de la producción integrada del olivar sobre la calidad del aceite de oliva. Grasas y aceites. Vol. 57. Nº 4. Págs. 422-428.
- Christie, J. (1986) Nematodos de los vegetales: su ecología y control. México: Limusa, 275 p.
- Díez, E.; Ariza, M. y Martínez, F. (2001) El olivar y las medidas agroambientales. Expoliva 2001. Foro del olivar y medio ambiente.
- Doucet, M. E.; Ponce De Leon, E.L. y Poloni, N. (1997) Alteraciones histológicas inducidas por *Meloidogyne incognita* en raíces de olivo en Catamarca, Argentina. Nematol. medit. 25: 275–277.
- Erwin, D.C, and Riberiro, O.K. (1996) *Phytophthora* diseases world-wide. St paul, Minnesota, USA: APS Press.
- Erwin, D.C., Bartnicki-García, S., and Tsao, P.H (1983) *Phytophthora*: Its biology, taxonomy, ecology and pathology. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.

- Expósito Segovia, D. (1999) Evaluación de la resistencia de cultivares de olivo a la podredumbre radical causada por *Phytophthora megasperma*. Trabajo Profesional Fin de Carrera, ETSIAM, Universidad de Córdoba. 144 pp.
- Guzmán, G.I., Alonso, A.M. y Sánchez, J. (2004) Manual de Olivicultura Ecológica. Ed: ISEC-Universidad de Córdoba. pp. 27-138.
- Guzmán Álvarez, J. R. (2005): Territorio y medio ambiente en el olivar andaluz. Sevilla. Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía.
- Jiménez Díaz, R.M., Blanco López, M.A. y Caballero J.M (1984). La Verticilosis del olivo en Andalucía: Agente, sintomatología y distribución. Comunicaciones Agrarias, SERIE: Protección Vegetal, 32 pp.
- López-Escudero, F. J., Del Río, C., Caballero, J. M., and Blanco-López, M. A. (2004). Evaluation of olive cultivars for resistance to *Verticillium dahliae*. European Journal of Plant Pathology 110, 79-85.
- Markakis, E. A., Tjamos, S. E., Antoniou, P. P., Roussos, P. A., Paplomatas, E. J., and Tjamos, E. C. (2010) Phenolic responses of resistant and susceptible olive cultivars induced by defoliating and non defoliating *Verticillium dahliae* pathotypes. Plant Disease 94, 1156-1162.
- Ortega Nieto, J. M. (1958) Intensificación y mejora de la producción del olivo en España. Boletín del Instituto de Estudios Giennenses. Nº 18. Págs. 83-106.
- Pastor Muñoz-Cobo, M. y Humanes Guillén, J. (1996) La poda del olivo. Moderna olivicultura. Editorial Agrícola España, s.a.
- Pastor, M., Humanes, J., Vega, V., y Castro, A. (1998). Diseño y manejo de plantaciones de olivar. Consejería de Agricultura y Pesca.
- Rodríguez Jurado, D. (1993) Interacciones huésped-parásito en la marchitez del olivo (*Olea europea* L.) inducida por *Verticillium dahliae* Kleb. Tesis Doctoral, Depto. Agronomía, Universidad de Córdoba, 324 pp.
- Ramírez Santa Pau M. (2001) Variabilidad de la producción en olivo (*Olea europaea* L.) relación entre la alternancia, floración, vigor y productividad. Tesis doctoral, Departamento de agronomía, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de montes Universidad de Córdoba.
- Romero M.D., (1992) Los nematodos formadores de quistes y nódulos. Su interés económico y control. El Campo: 70-77.
- Sánchez Hernández M.E, Muñoz García M, Brasier C.M 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 Martínez, J. D. y Gallego Simón, V. J. (2009) La olivicultura ecológica en Sierra Mágina. Una aproximación inicial. El Olivar: paisaje, patrimonio y desarrollo sostenible. Jaén. Grupo de Desarrollo Rural de Sierra Mágina. Págs.141-161.
- Taylor L. y Sasser J.N. (1983) Biología, Identificación y Control de los Nematodos de nódulo de la raíz (*Meloidogyne*). P.I.M. 111 pp.
- Timmer, L.W., y Tuset, J.J. (2000) Enfermedades producidas por hongos. En: Enfermedades de los cítricos, Duran-Vila, N., y Moreno, P., eds. Monografía de la Sociedad Española de Fitopatología. No 2, pp. 27-44.
- Trapero, A. (1996) Los hongos fitopatógenos. En: Patología Vegetal (Vol II), Llácer, G., López, M.M., Trapero, A., y Bello, A., eds. Sociedad Española de Fitopatología, pp. 773-765.
- Wilhelm, S., and Taylor, J. B. (1965) Control of *Verticillium* wilt of olive through natural recovery and resistance. *Phytopathology* 55, 310-316.
- Zentmyer, G.A. y Erwin, D.C. (1970) Development and reproduction of *Phytophthora*, *Phytopathology* (60): 1120-1127.