

La «seca» de olivos jóvenes II: Identificación y patogenicidad de los hongos asociados con podredumbres radiculares

M. E. SÁNCHEZ HERNÁNDEZ, A. RUIZ DÁVILA y A. TRAPERO CASAS

En este trabajo se han identificado los aislados fúngicos asociados a las podredumbres radiculares de olivo, el factor más importante incluido bajo la denominación genérica de «seca» de olivos jóvenes en Andalucía, así como los aislados asociados a la muerte de plántulas («damping-off») en viveros de olivo. La patogenicidad de aislados seleccionados de cada especie fúngica se evaluó en plantones y estaquillas enraizadas de olivo del cultivar «Picual», en condiciones parcialmente controladas. De todas las especies ensayadas, cinco mostraron claramente su patogenicidad en olivo: *Cylindrocarpon destructans*, *Phytophthora megasperma*, *P. palmivora*, *Pythium irregulare* y *Sclerotium rolfsii*, reproduciendo los síntomas de podredumbre radicular y marchitez foliar en las plantas inoculadas. Otras especies asociadas a podredumbres radiculares en campo y vivero (*Fusarium acuminatum*, *F. eumartii*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Macrophomina phaseolina* y *Rhizoctonia solani*) resultaron débilmente o nada patogénicas. 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 aislamiento de *Phytophthora megasperma* en suelos encharcados (parte I) 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 «asfisia radicular».

M. E. SÁNCHEZ HERNÁNDEZ, A. RUIZ DÁVILA y A. TRAPERO CASAS: Departamento de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080-Córdoba.

Palabras clave: *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium acuminatum*, *Fusarium eumartii*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Olea europaea*, *Phytophthora megasperma*, *Phytophthora palmivora*, *Pythium irregulare*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*.

INTRODUCCIÓN

La «seca» del olivo, una desecación de ramas y marchitez generalizada que está afectando a olivares jóvenes de toda Andalucía, y que puede llevar a la muerte de los árboles afectados (parte I), ha sido asociada a diferentes agentes bióticos y abióticos, e incluso a la actividad de insectos o roedores (parte I). De entre la diversidad de factores asociados detectados en campo, destaca el elevado porcentaje de olivos jóvenes afectados en los que se observa la podredumbre

de su sistema radicular. De las muestras de olivos enfermos recibidas por la Sección de Sanidad Vegetal de Córdoba entre los años 1989 y 1995, se comprobó que en el 30,6% de los casos los olivos presentaban necrosis radiculares. En estos casos se pudieron aislar de los tejidos enfermos hongos causantes de podredumbres radiculares en olivo, como *Armillaria* sp. y *Dematophora necatrix* (DE ANDRÉS, 1991), así como otros hongos que, no habiendo sido descritos en España específicamente en olivo, podrían resultar también patógenos, como especies de *Fusa-*

rium, *Cylindrocarpon*, *Rhizoctonia* y *Sclerotium* (parte I). Con esta información preliminar, desde el año 1994 se han realizado prospecciones en Córdoba, Jaén y Sevilla en olivares afectados de muerte de plántulas, con especial atención a aquellos casos en los que aparecen podredumbres radiculares. En el primer grupo de prospecciones, realizado durante un período de sequía severa en 1994-95, se encontró que únicamente en un 10% de los casos la «seca» estaba asociada a la aparición de podredumbres radiculares. Sin embargo, en las prospecciones de 1996 se registraron abundantes precipitaciones que llegaron a producir un prolongado encharcamiento del suelo en buena parte del olivar andaluz. En estas condiciones, el porcentaje de olivares jóvenes afectado de muerte de plántulas asociada a podredumbres radiculares ascendió al 65% de los campos estudiados, aislándose hongos radiculares, especialmente *Phytophthora megasperma*, asociados a las raíces afectadas (parte I).

En el presente trabajo se ha llevado a cabo la identificación y la determinación de la patogenicidad de los hongos asociados a estas podredumbres radiculares del olivo, correlacionando su naturaleza y frecuencia de aparición con las características climáticas, edáficas y agronómicas específicas en cada caso. Además, también se ha estudiado la patogenicidad de los hongos radiculares asociados a la muerte de plántulas de olivo en vivero (damping-off), con objeto de determinar si, como se ha señalado para la Verticilosis del olivo (BLANCO LÓPEZ *et al.*, 1984), alguno de los hongos presente en condiciones de campo pudiera tener su origen en el material de propagación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los aislados fúngicos obtenidos a partir de raíces de olivos afectados de «seca», tanto en las prospecciones de campo como en vivero, se agruparon en función de

la morfología que presentaron sus colonias en cultivo puro y de cada uno de estos grupos se eligieron varios aislados para proceder a su identificación específica. Una vez identificadas, para determinar su patogenicidad en olivo, se eligieron aquellas especies consistentemente aisladas de las raíces podridas y que no habían sido descritas con anterioridad en España como patógenas del olivo. Además, también se seleccionaron aislados de aquellas especies que, aun sin consistencia, resultaron muy frecuentemente aisladas tanto en campo como en vivero. El origen y frecuencia de aislamiento de las especies fúngicas seleccionadas se muestra en el cuadro 1.

Identificación de los aislados fúngicos

Los aislados fúngicos seleccionados se transfirieron a un medio de mantenimiento hasta su posterior identificación por medio de la observación macro y microscópica de sus colonias, así como de sus estructuras vegetativas y reproductivas producidas en diferentes medios de cultivo. Como medio general de mantenimiento se utilizó PDA 2% (patata-dextrosa-agar), que se sustituyó por CMA (harina de maíz-agar) (DHINGRA y SINCLAIR, 1985) para los aislados de hongos pitiáceos. Las observaciones microscópicas se realizaron bien directamente sobre la placa de Petri utilizando un microscopio invertido, o bien en montajes teñidos con fuchsina ácida en lactofenol, empleando un microscopio convencional. Para la observación al microscopio de conidióforos y células conidiógenas producidas por especies de *Fusarium* y *Cylindrocarpon*, se realizaron microcultivos en portas sobre medio PDA (DHINGRA y SINCLAIR, 1985) y para aquellos aislados que formaban microconidias con dificultad, se utilizó el medio de hoja de clavel (carnation leaf agar, CLA) para favorecer su formación (NELSON *et al.*, 1983).

En el caso de aislados de los géneros *Pythium* y *Phytophthora*, se utilizaron los me-

Cuadro 1.—Origen e identificación de los aislados fúngicos utilizados en los ensayos de patogenicidad

Especie	Frecuencia de aislamiento en campo (%) (a)	Aislado	Origen	Fecha de aislamiento
<i>Cylindrocarpon destructans</i>	—	CD1	Vivero (Córdoba)	Ago. 1995
	83,0	CD2	Olivar (N.Carteya)	May. 1995
	6,0	CD3	Olivar (Lucena)	Jun. 1996
		CD4	Olivar (Lucena)	Jun. 1996
<i>Fusarium oxysporum</i>	83,0	FO1	Olivar (Lucena)	Feb. 1995
		FO2	Olivar (Montilla)	Jun. 1995
<i>Fusarium solani</i>	66,0	FS1	Olivar (Montilla)	Jun. 1995
		FS2	Vivero (Córdoba)	Ago. 1995
<i>Fusarium eumartii</i>	—	FE1	Invernadero (Córdoba)	Abr. 1996
<i>Fusarium acuminatum</i>	—	FA1	Vivero (Córdoba)	Jul. 1996
		FA2	Vivero (Córdoba)	Jul. 1996
<i>Macrophomina phaseolina</i>	33,0	MP1	Olivar (Cabra)	May. 1995
		MP2	Olivar (Lucena)	May. 1995
<i>Phytophthora megasperma</i>	94,0	PM1	Olivar (Córdoba)	Mar. 1996
		PM2	Olivar (La Carlota)	May. 1996
<i>Phytophthora palmivora</i>	—	PP1	Vivero (Córdoba)	Jul. 1996
<i>Pythium irregulare</i>	—	PI1	Invernadero (Córdoba)	Jun. 1996
<i>Rhizoctonia solani</i>	33,0	RS1	Olivar (Castro del Río)	Feb. 1995
		RS2	Invernadero (Córdoba)	Abr. 1996
<i>Sclerotium rolfsii</i>	0,8	SR1	Olivar (Fuentepalmera)	Mar. 1995

(a) Porcentaje de campos con aislamiento positivo respecto al total de campos afectados por podredumbre radicular (114 muestras recibidas por la Sección de Sanidad Vegetal de Córdoba 1989-95, 6 6 y 49 campos en las prospecciones de 1994-95 y 1996, respectivamente) (Ver Parte I).

dios CA (extracto de zanahoria-agar) y CMA (DHINGRA y SINCLAIR, 1985) para inducir la formación de estructuras sexuales. Los aislados se cultivaron sobre estos medios a 20 °C en oscuridad durante 10 días. Para inducir la formación de estructuras asexuales se sembraron en placas con CA y se incubaron durante 2 semanas en oscuridad a 20 °C. Posteriormente, se extrajeron discos de agar de 2 cm de diámetro de las placas y se colocaron en placas de Petri estériles en las que se añadieron 50 ml de solución sali-

na de Schmitthenner (RIBEIRO, 1978). Estas placas se incubaron a 20 °C en oscuridad o bajo luz y con o sin agitación continua a 60 r.p.m., durante 5 días, transcurridos los cuales se observaron al microscopio. Además, en el caso del género *Phytophthora*, los aislados se cultivaron en medio líquido de extracto de zanahoria y las colonias obtenidas se lavaron al chorro de agua y se dispusieron en placas estériles a las que se añadió agua de charca, extracto de suelo o la solución salina de Schmitthenner (DHINGRA y

SINCLAIR, 1985). Estas placas se incubaron a 15 y 20 °C bajo luz/oscuridad y se observaron al microscopio al cabo de 48 h.

Para inducir la formación de estructuras asexuales de las especies del género *Pythium* también se tomaron discos de agar de placas de CMA en las que crecía el hongo y se colocaron en placas de Petri estériles a las que se añadieron 15 ml de solución salina de Schmitthenner. Sobre estos discos se colocaron trozos de hojas de césped, que previamente habían sido hervidos 10 minutos en agua desionizada (PLAATS-NITERINK, 1981) y se incubaron las placas en oscuridad a 20 °C durante 15 días. Transcurrido este tiempo sufrieron un choque térmico para inducir la formación de zoosporas, que consistió en la exposición durante 12 h a una temperatura de 4 °C. Posteriormente, se renovó la solución salina y se incubaron las placas a 20 °C durante 5 h, tras lo cual se realizaron las observaciones microscópicas.

En todos los casos las observaciones y mediciones de estructuras microscópicas se realizaron sobre 25 estructuras por placa, medio de cultivo y aislado. Para cada género fúngico las referencias bibliográficas utilizadas para la identificación de especies fueron las siguientes: *Cylindrocarpon* (BOOTH, 1966), *Fusarium* (BOOTH, 1971, 1977; TOUSSOUN y NELSON, 1976), *Macrophomina* (DHINGRA y SINCLAIR, 1978; HOLLIDAY y PUNITHALINGAN, 1970), *Phytophthora* (WATERHOUSE, 1963; STAMPS *et al.*, 1990; ERWIN y RIBEIRO, 1996), *Pythium* (WATERHOUSE, 1967; PLAATS-NITERINK, 1981), *Rhizoctonia* (SNEH *et al.*, 1991; CARLING y SUMNER, 1992) y *Sclerotium* (MORDUE, 1974; PUNJA y RAHE, 1992).

Ensayos de patogenicidad

Inóculo

Todos los inóculos se prepararon a partir de cultivos puros de cada uno de los aisla-

dos seleccionados. Como medio de mantenimiento y crecimiento se utilizó CMA 2% para los aislados de hongos pitiáceos (especies de *Phytophthora* y *Pythium*) y PDA 2% para el resto de aislados (DHINGRA y SINCLAIR, 1985). Para cada uno de los aislados ensayados el inóculo se preparó con una batidora, mezclando a la velocidad máxima durante 3 min. 600 ml de agua estéril y el contenido de 6 placas de Petri de 9 cm de diámetro en las que el cultivo correspondiente había crecido durante 10-15 días en las condiciones adecuadas para la formación de abundantes estructuras infectivas. Estas condiciones fueron: 20-22 °C en la oscuridad para las especies de *Phytophthora* y *Pythium*, y 20-22 °C, 5-7 días en oscuridad y el resto del tiempo bajo un régimen de 14 h de luz diarias para las especies de *Fusarium* y *Cylindrocarpon*. Las especies de *Rhizoctonia*, *Macrophomina* y *Sclerotium* se incubaron en estas mismas condiciones pero a una temperatura de 29-31 °C (AYCOCK, 1966; DHINGRA y SINCLAIR, 1978, 1985).

Material vegetal

En los cuatro experimentos realizados se utilizaron plantas del cultivar 'Picual' procedentes de un vivero de la zona y propagadas por enraizamiento de estaquillas semileñosas bajo nebulización (CABALLERO y DEL RÍO, 1994). En un primer experimento, de carácter preliminar, se emplearon plantones de 1 año, mientras que en los tres experimentos restantes se utilizaron estaquillas de 4-6 meses.

Inoculación

En el primer experimento (Exp. 1) se utilizaron plantones que, tras ser inoculados mediante un riego con 50 ml de la suspensión de inóculo por plantón, se dispusieron

junto con los testigos sin inocular en condiciones de invernadero (10-30 °C, 25-95% HR) aplicando un riego semanal con agua de grifo. El número de plántones por inóculo ensayado fue de 10, más 10 plántones testigo no inoculados.

En los tres experimentos restantes se utilizaron estaquillas de 4-6 meses. En estos casos la inoculación se realizó como sigue: las plantas se sacaron de los envases en los que crecían en el vivero y se lavaron cuidadosamente las raíces al chorro de agua. Una vez limpias, se sumergieron durante 5 min en la suspensión de inóculo correspondiente. Posteriormente, se trasplantaron a macetas de plástico de 12 cm de diámetro por 9 cm de altura, previamente desinfectadas con lejía comercial al 20% y que contenían 600 ml de suelo esterilizado (arena: limo: turba, 1: 1: 1) más 50 ml de inóculo. Se inocularon 12 plantas por aislado fúngico ensayado, más otras 12 plantas testigo sin inocular.

En el experimento 2 (Exp. 2) las estaquillas fueron colocadas en invernadero (10-30 °C, 40-95% HR) con un riego semanal. El experimento 3 (Exp. 3) se llevó a cabo en cámaras de cultivo con condiciones de luz, temperatura y humedad parcialmente controladas, tratando de reproducir al máximo las condiciones óptimas para la infección y desarrollo de la enfermedad descritas para cada una de las especies fúngicas ensayadas (AYCOCK, 1966; DHINGRA y SINCLAIR, 1978; 1985). Para las plantas inoculadas con aislados de los géneros *Cylindrocarpon* y *Fusarium*, las condiciones fueron 18-22 °C, 50-86% HR y 14 h de luz diarias, regando una vez por semana. Para las que se inocularon con aislados de *Macrophomina*, *Rhizoctonia* y *Sclerotium*, la temperatura se ajustó a 25-30 °C y el riego a una vez cada dos semanas.

En el cuarto experimento (Exp. 4) se evaluaron los aislados de *Pythium* y *Phytophthora*. En este caso los ensayos de patogenicidad se realizaron, tanto en condiciones de invernadero como en cámara de crecimiento, bajo dos condiciones hídricas del suelo diferentes: en suelo regado una vez por se-

mana, como ya se ha descrito, y en suelo continuamente saturado de agua. En este último caso, las macetas con las plantas testigo y las inoculadas se colocaron por separado dentro de bandejas de plástico que se rellenaron con agua. El nivel de agua en las bandejas se mantuvo entre 4 y 6 cm por debajo de la superficie del suelo añadiendo agua periódicamente.

Evaluación de los resultados y análisis estadísticos

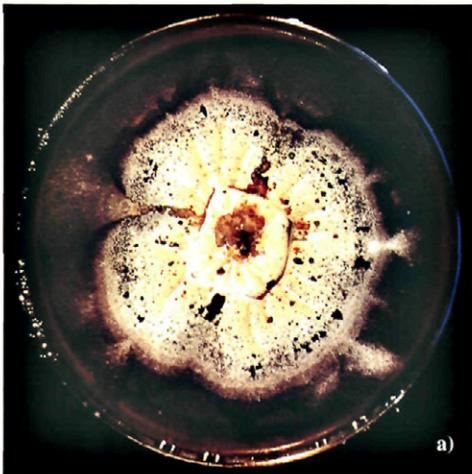
Para todos los experimentos, la severidad de los síntomas aéreos fue evaluada periódicamente en cada una de las plantas con una escala de 0 a 4, según el porcentaje de amarillez, flaccidez o necrosis foliar que presentara (0 = 0%, 1 = 1-33%, 2 = 34-66%, 3 = 67-100%, 4 = planta muerta). Al final de cada experimento se evaluó también la podredumbre radicular usando la misma escala de 0 a 4. A estos datos de severidad de síntomas aéreos y radiculares se les aplicó el análisis de la varianza y los valores medios fueron comparados con las medias de los testigos no inoculados mediante el test de Dunnett (STEEL y TORRIE, 1985). En el Exp. 4 se aplicó además el test LSD (mínima diferencia significativa), ya que permitía un análisis más detallado de los datos. Además, se tomaron muestras de raíz, tanto de las plantas testigo como de las inoculadas en cada experimento, y se sembraron en los medios PDA, PARP (harina de maíz-agar-pimaricina-ampicilina-rifampicina-PCNB) y PARPH (PARP-himexazol) (JEFFERS y MARTIN, 1986) para tratar de reaislar la especie fúngica inoculada, así como otros hongos que pudieran encontrarse invadiendo los tejidos radiculares. El tratamiento de estas muestras de raíz y las condiciones de incubación de las placas fueron las descritas para las muestras de campo en la parte I. Los métodos empleados para la identificación específica de los hongos reaislados fueron descritos en el apartado anterior.

RESULTADOS

Identificación de los aislados

Cylindrocarpon

Las observaciones realizadas de este grupo de aislados coinciden con las descripciones de *Cylindrocarpon destructans* (Zinssmeiter) Scholten (BOOTH, 1966), estado anamorfo de *Nectria radicola* Gerlach, a falta de confirmar la formación de clamidosporas, que en nuestros aislados no se produjo. Todos los aislados formaron colonias de color pardo amarillento en superficie y marrón oscuro en el reverso de la placa (Fig. 1a). Microconidias ovales o elipsoides, con una septa o aseptadas, y de dimensiones aproximadas de $7,5 \times 4 \mu\text{m}$, formadas en fiálidas laterales o terminales. Macroconidias cilíndricas con los bordes redondeados, con 1-3 septas (3 septas la mayoría) y dimensiones entre $25\text{-}38 \times 5 \mu\text{m}$, formadas en fiálidas similares a las anteriores (Figura 1b, 1c).



Fusarium

Atendiendo a características morfológicas, los aislados de este género se clasificaron en 4 grupos:

- *Grupo FO*. Estos aislados formaron colonias con micelio aéreo abundante, algodonoso y denso, de color blanco en oscuridad y rosa salmón bajo luz. Microconidias abundantes, generalmente aseptadas, normalmente elipsoides, de tamaño variable entre $4\text{-}12 \times 1,5\text{-}4 \mu\text{m}$, producidas en fiálidas cortas situadas en conidióforos simples. Las macroconidias fueron regularmente fusiformes, con 3-5 septas y dimensiones comprendidas entre $20\text{-}50 \times 2\text{-}4 \mu\text{m}$, siendo producidas en fiálidas similares a las de las microconidias, que a veces se agrupaban formando esporo-

Fig. 1.—*Cylindrocarpon destructans*: a) colonia en medio PDA mostrando la coloración amarillenta característica de la formación de esporodocios, b) conidias y fiálidas (objetivo 40x), c) detalle de las macroconidias (objetivo 100x).

doquios. Las clamidosporas fueron más frecuentemente terminales, solitarias y algunas veces en cadenas, de forma esférica o limoniforme y diámetro variable entre 5-16 μm . Por todas estas características, los aislados de este grupo se identificaron como *Fusarium oxysporum* Schlenk. Fr. (BOOTH, 1971; TOUSSOUN y NELSON, 1976).

– *Grupo FS*. Los aislados de este grupo formaron colonias con micelio aéreo poco denso, de color blanco grisáceo tanto en oscuridad como bajo luz. Microconidias ovales-elipsoidales, generalmente aseptadas (algunas con una septa), de tamaño aproximado $10 \times 2,5 \mu\text{m}$ y formadas en fiálidas largas, cilíndricas, rectas y situadas en conidióforos escasamente ramificados (Fig. 2b). Macroconidias abundantes, fusiformes, con 1-4 septas (más frecuentemente 3), de tamaño variable entre $22-38 \times 5 \mu\text{m}$ y formadas en fiálidas cortas similares a las de *F. oxysporum* (Fig. 2b). En los cultivos viejos se formaron abundantes esporodoquios que daban a la colonia una coloración amarillenta. Clamidosporas abundantes en cultivos viejos, formadas terminal o intercaladamente, simples o en parejas, de forma esférica u

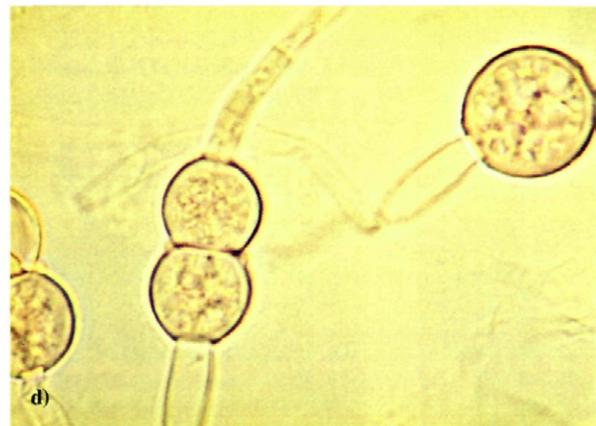
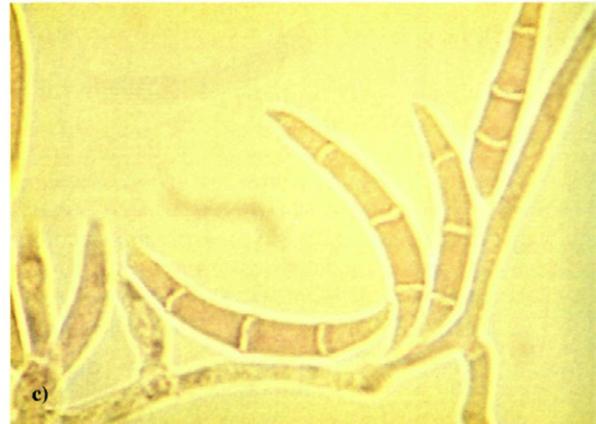
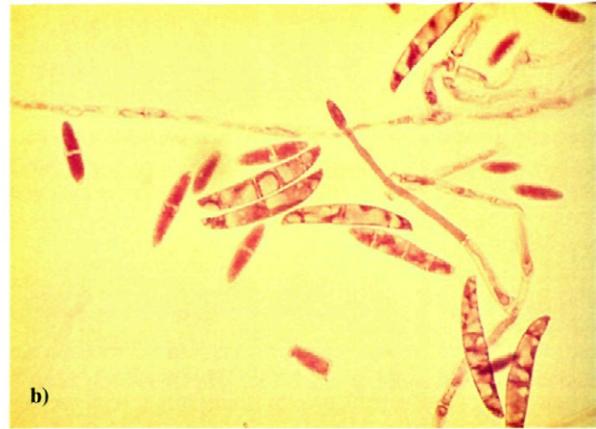
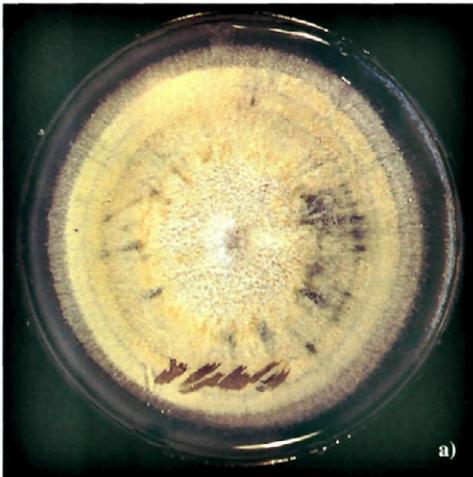


Fig. 2.—*Fusarium* spp: a) colonia de *F. eumartii* en medio PDA mostrando coloraciones amarillentas y verdosas características de la formación de esporodoquios, b) macroconidias, microconidias y fiálidas de *F. solani* (objetivo 40x), c) macroconidias y fiálidas de *F. acuminatum* (objetivo 100x), d) *F. acuminatum*: clamidosporas simples o en cadena, terminales e intercalares (objetivo 100x).

oval, con diámetro medio de 10 μm . Los aislados de este grupo se identificaron como *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. (BOOTH, 1971; TOUSSOUN y NELSON, 1976).

– *Grupo FE*. Estos aislados fueron identificados como *Fusarium eumartii* Carpenter, aunque en los dos sistemas taxonómicos seguidos no se incluye como especie, sino como forma especial de *F. solani*. Las características taxonómicas que separan a esta especie de *F. solani* son el tamaño y la septación de las macroconidias (DOMSCH *et al.*, 1980; GERLACH y NIREMBERG, 1982). Este grupo formó predominantemente macroconidias de 5 septas, de dimensiones 30-70 \times 2.5-5 μm . El resto de las características fueron similares a las de *F. solani*, además, la producción de esporodoquios hizo que las colonias adquiriesen una coloración verdosa característica (Fig. 2a).

– *Grupo FA*. Los aislados de este grupo se identificaron como *Fusarium acuminatum* Ellis & Everhart (BOOTH, 1971; TOUSSOUN y NELSON, 1976). Formaron colonias de color blanco rosado en oscuridad y salmón oscuro bajo luz. En el reverso de la placa de Petri la coloración era marrón rojiza. No se observó en ningún caso la formación de microconidias. Las macroconidias eran fusiformes, con las células terminales

elongadas, 3-5 septas y de dimensiones 17-38 \times 2,5-5 μm , formándose en filíidas cortas (Fig. 2c). Las clamidosporas fueron abundantes, formadas en pares o simples, terminales o intercalares, esféricas u ovoideas, y de 12-15 μm de diámetro (Fig. 2d).

Macrophomina

Las características observadas en los cultivos de este grupo de aislados se correspondieron con las descripciones del hongo celomiceto *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich, cuyo estado esclerocial es *Sclerotium bataticola* Taub. (= *Rhizoctonia bataticola* (Taub.) Butler). El estado esclerocial fue el más frecuentemente observado en los aislados de esta especie. El crecimiento

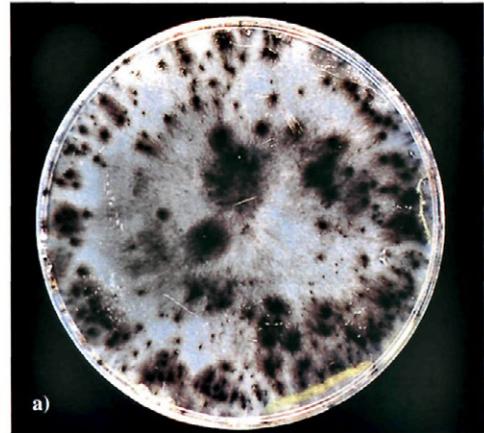
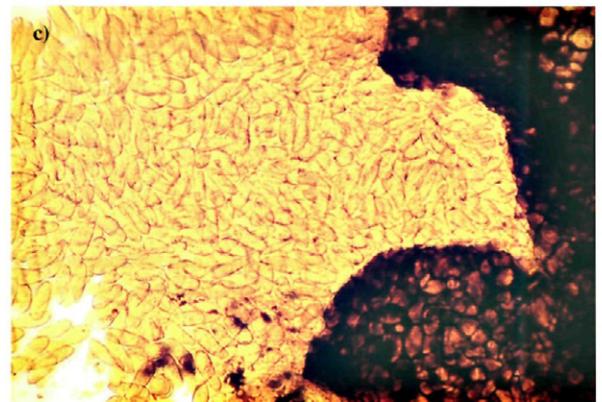


Fig. 3.—*Macrophomina phaseolina*: a) colonia con abundantes esclerocios en medio PDA, b) hifas y esclerocios (objetivo 40x), c) conidias y pared del picnidio (objetivo 40x).



en cultivo de los aislamientos obtenidos fue superior a temperaturas próximas a 30 °C que a temperaturas inferiores, produciéndose colonias con micelio aéreo arborescente y suelto, de color marrón a negro y formando abundantes esclerocios (Figura 3a). Las hifas, hialinas al principio, adquirieron después una coloración marrón o gris oscuro. Los esclerocios fueron de color marrón al principio y negros una vez maduros, esféricos u ovales, y a menudo irregulares (Figura 3b). Los picnidios fueron de color marrón oscuro a negro, globosos, y en su interior se formaron conidias hialinas, no septadas, de paredes delgadas y de forma elipsoidal y oval (Fig. 3c), con medidas aproximadas 24 × 8 µm que concordaron con la relación 3: 1 (longitud: anchura), característica de este género (DHINGRA y SINCLAIR, 1978).

Phytophthora

– *Grupo PM*. Los aislados de este grupo fueron identificados como *Phytophthora megasperma* Drechsler (ERWIN y RIBEIRO, 1996). Formaron en medio CMA colonias con micelio hialino y arborescente, adherido al sustrato, y en medio CA colonias blanquecinas de aspecto petaloide, con abundante producción de estructuras sexuales (Fig. 4a). Los oogonios fueron esféricos, de pared no totalmente lisa, con diámetros variables entre 25 y 48 µm ($\bar{x} = 40,3 \pm 3,4$), con los que

contactaron anteridios predominantemente paraginos (65%) (Fig. 4b), aunque también se observaron anfiginos (35%) (Fig. 4c). Estos oogonios dieron lugar a oosporas apleróticas, con diámetros variables entre 20 y 46 µm ($\bar{x} = 35,9 \pm 3,2$), con paredes de grosor variable entre 2,5 y 10 µm ($\bar{x} = 6,3 \pm 1,3$) (Fig. 4b, c). En algunos aislados no se observaron estructuras sexuales.

Los aislados de *P. megasperma* produjeron esporangios a 15 °C en colonias sumergidas en extracto de suelo, solución salina o agua de charca, formándose con más dificultad en las mismas condiciones a 20 °C. Los esporangios se observaron a partir de las 48 h de someter las colonias a las condiciones descritas y fueron no papilados, persistentes, con forma desde ovoide hasta piriforme y dimensiones variables entre 25 y 100 µm de longitud ($\bar{x} = 46,4 \pm 14,7$) y entre 10 y 43 µm de anchura ($\bar{x} = 26,6 \pm 6,9$) (Fig. 4d). Los esporangióforos presentaron proliferación interna y ramificación simpodial. Se observó la formación de zoosporas dentro de los esporangios que salían al medio líquido o germinaban en su interior, dando lugar a hifas. También se observaron engrosamientos hifales (Fig. 4e).

– *Grupo PP*. Los aislados de este grupo formaron en CMA colonias con micelio hialino y adherido al sustrato, y en CA colonias blanquecinas con micelio aéreo algodonoso de localización difusa. No se observó la formación de estructuras sexuales en los me-

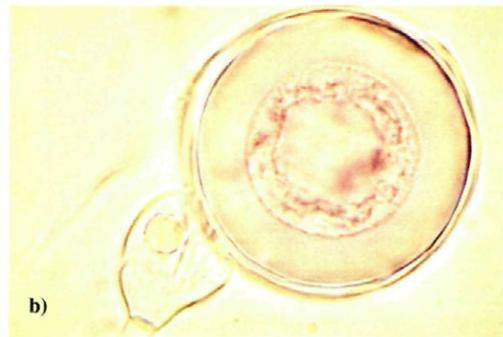


Fig. 4.—*Phytophthora megasperma*: a) colonia de aspecto petaloide en medio CA, b) oospora aplerótica con anteridio paragino (objetivo 100x),

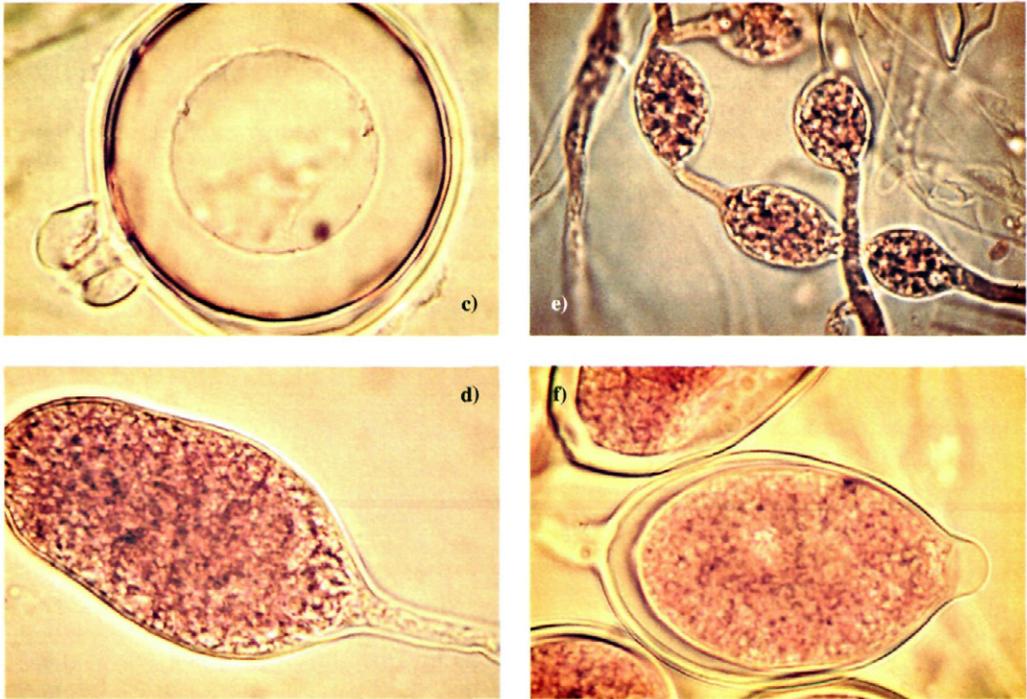


Fig. 4.—*Phytophthora megasperma*: c) oospora aplerótica con anteridio anfigino (objetivo 100x), d) esporangio no papilado (objetivo 100x), e) engrosamientos hifales (objetivo 100x).
Phytophthora palmivora: f) esporangio papilado (objetivo 100x).

dios de cultivo *in vitro*, pero sí de abundantes esporangios papilados, con pedicelo corto, dehiscentes y con proliferación simpodial (Fig. 4f). La longitud de los esporangios varió entre 32 y 58 μm ($\bar{x} = 50,3 \pm 4,6$), y su anchura entre 17 y 33 μm ($\bar{x} = 26 \pm 2,6$). A falta de confirmar si, como parece, este aislado es heterotálico, el resto de sus características coinciden con la descripción de *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler (ERWIN y RIBEIRO, 1996).

Pythium

Los aislados de este grupo fueron identificados como *Pythium irregulare* Buisman (PLAATS-NITERINK, 1981). Formaron colonias de crecimiento rápido y micelio adherido al sustrato y después aéreo y difuso en los medios CMA y CA. Las estructuras se-

xuales se formaron con facilidad en el medio CMA. Los oogonios tenían un diámetro variable entre 17 y 38 μm ($\bar{x} = 21,4 \pm 4,5$), presentando en la pared proyecciones o irregularidades que distorsionaban su forma esférica (Fig. 5a). Las oosporas formadas fueron apleróticas, con diámetro variable entre 12 y 20 μm ($\bar{x} = 16,0 \pm 1,5$), y con pared de grosor inferior a los 2,5 μm (Fig. 5a). Los anteridios se observaron con dificultad, resultando monoclinos o diclinos, predominantemente monoclinos y con pedicelo largo. Los esporangios, formados sobre todo en cultivos a los que se añadieron hojas de césped y solución salina, fueron intercalares, de forma esférica o elipsoidal, longitud entre 20 y 25 μm y anchura entre 12 y 20 μm (Fig. 5b). Los tubos de expulsión fueron difíciles de observar, no siendo posible la observación de las vesículas en las que se diferenciaron las zoosporas.

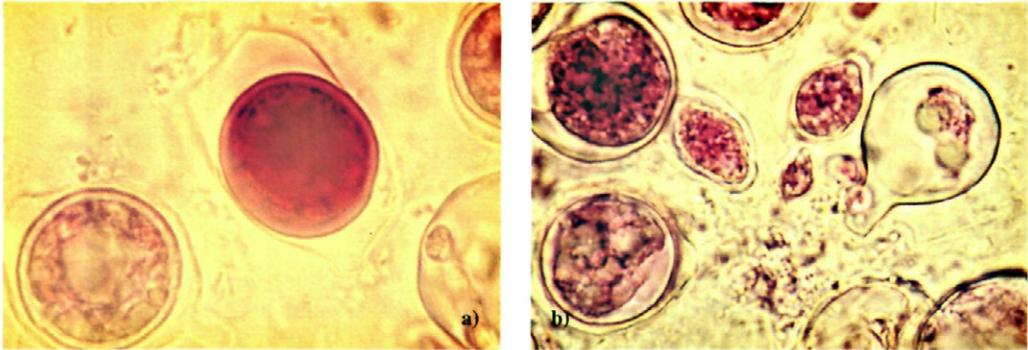


Fig. 5.—*Pythium irregulare*: a) oosporas marcadamente apleróticas con la pared del oogonio deformada y con proyecciones (objetivo 100x), b) oosporas, esporangios y zoosporas. Obsérvese un esporangio vacío con el tubo de descarga (objetivo 100x).

Rhizoctonia

Las características observadas en los cultivos de este grupo de aislados se corresponden con las descripciones de *Rhizoctonia solani* Kühn, fase esclerocial de *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk (SNEH *et al.*, 1991). Los aislados de esta especie dieron lugar a colonias con micelio aéreo arborescente, de color blanquecino a pardo, sin producción de conidias (Fig. 6a). Las hifas presentaban la ramificación característica en ángulo recto, con una constricción en el punto de origen de la ramificación y una septa cerca de este punto (Fig. 6b). Los esclerocios fueron de textura uniforme y tejido no diferenciado, generalmente irregulares.

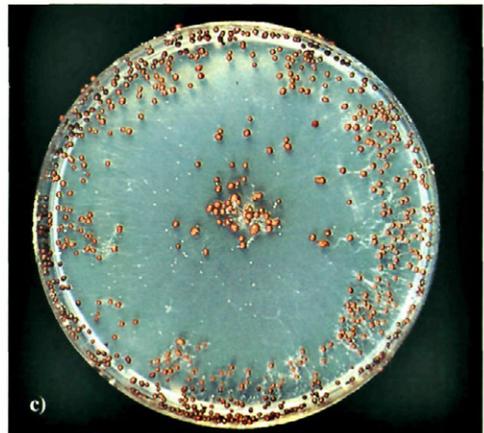
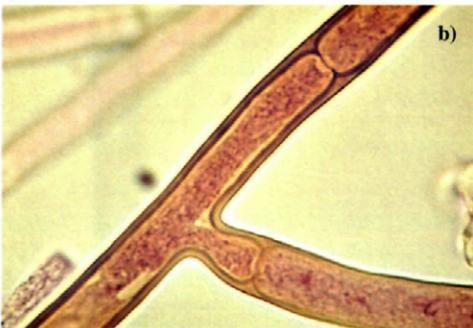


Fig. 6.—*Rhizoctonia solani*: a) colonia en medio PDA, donde se aprecia el comienzo de la formación de esclerocios, b) ramificación de la hifa, septación y constricción en la base de la ramificación características (objetivo 100x). *Sclerotium rolfsii*: c) colonia en medio PDA y esclerocios característicos.

Sclerotium

Las observaciones de este aislado coinciden con las descripciones de *Sclerotium rolfsii* Sacc. (MORDUE, 1974; PUNJA y RAHE, 1992), estado esclerocial de *Athelia rolfsii* (Curzi) Tu & Kimbrough. El crecimiento en PDA del aislado dio lugar a colonias con micelio blanco, inicialmente adherido al sustrato y después aéreo, en el que se formaron abundantes esclerocios de color pardo, esféricos, de 1 a 2 mm de diámetro (Fig. 6c) y con diferenciación celular de sus tejidos en cubierta externa, corteza y médula.

Ensayos de patogenicidad

El cuadro 1 muestra la identificación y origen de los aislados seleccionados de cada una de las especies fúngicas para realizar los ensayos de patogenicidad.

Experimento 1

Los resultados de este experimento preliminar realizado con plántones de olivo en invernadero se resumen en la Figura 7. En casi todos los casos se reprodujeron los síntomas de desecación y marchitez de la parte aérea y necrosis radicular en un número elevado de plantas (Fig. 8a, b). Asimismo, un número elevado de plántones testigo (6 de 10) mostraron también síntomas similares. A pesar de que la severidad media de los síntomas aéreos y radiculares fue menor en las plantas testigo, los valores medios no difirieron significativamente de los de las plantas inoculadas debido a la alta varianza de los datos. En cuanto a la recuperación del agente inoculado del tejido radicular, sólo se alcanzaron valores elevados para las plantas inoculadas con aislados de *F. oxysporum*, *F. solani* y *C. destructans*. De las raíces necróticas de los plántones testigo se pudieron aislar *C. destructans*, *F. oxysporum* y *F. solani*, aunque en baja proporción.

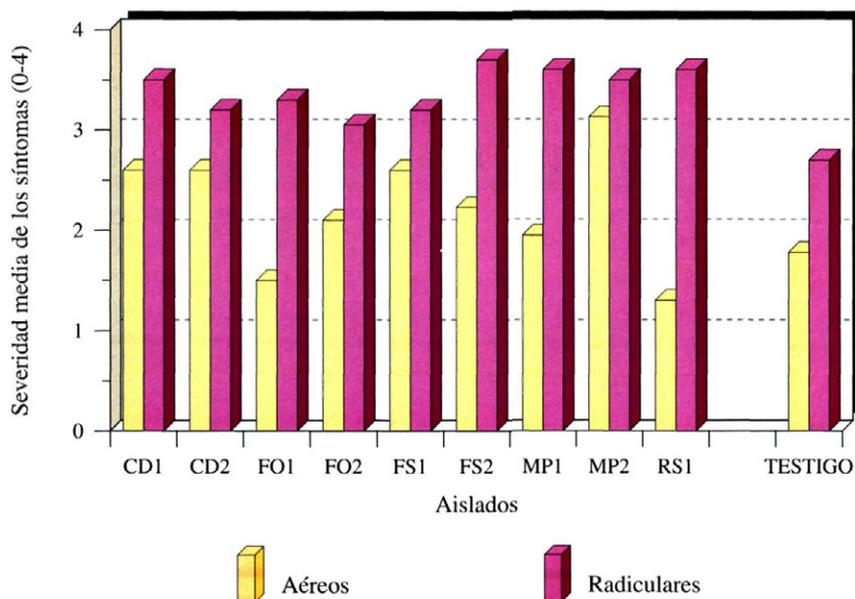


Fig. 7.—Patogenicidad de los aislados fúngicos en plántones del cultivar de olivo «Picual» en invernadero*.

* Los plántones de 1 año de edad crecieron en suelo infestado con aislados de *Cylindrocarpon destructans* (CD1, CD2), *Fusarium oxysporum* (FO1, FO2), *F. solani* (FS1, FS2), *Macrophomina phaseolina* (MP1, MP2) y *Rhizoctonia solani* (RS1).



Fig. 8.—Patogenicidad de hongos radiculares en plantones y estaquillas del cultivar «Picual»: **a)** testigo no inoculado (izquierda) y plantones con distinto grado de severidad de síntomas aéreos, **b)** síntomas radiculares: raíz necrosada con pérdida de tejido cortical en los ápices, **c)** vista general del Exp. 2, **d)** planta testigo (izquierda) y estaquillas inoculadas con *Sclerotium rolfsii*, en los que se aprecia la marchitez de la parte aérea, **e)** síntomas en el cuello y punto de inserción de las raicillas en estaquillas inoculadas con *S. rolfsii*, en los que se observa el micelio blanco del hongo

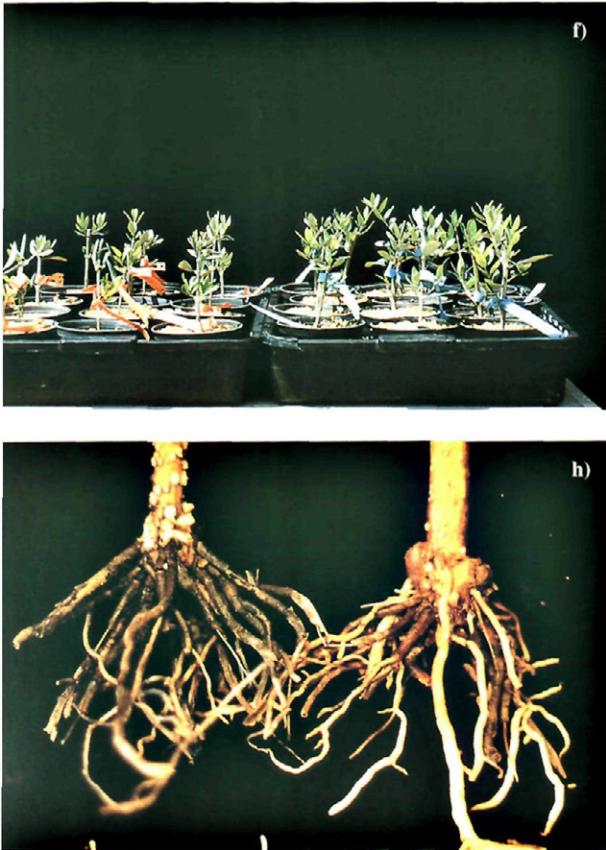


Fig. 8.—Patogenicidad de hongos radiculares en plantones y estaquillas del cultivar «Picual»: f) plantas testigo (izquierda) y estaquillas inoculadas con *Phytophthora megasperma* sometidas a saturación continua de agua en el suelo. Nótese la marchitez de la parte aérea, g) estaquilla testigo (izquierda) e inoculada con *P. megasperma*. Síntomas aéreos: desecación y flaccidez foliar, h) raíz de una planta testigo (izquierda) y de una estaquilla inoculada con *P. megasperma*, ambas sometidas a saturación continua de agua en el suelo. Obsérvese el comienzo de la emisión de raicillas en la base de la estaquilla sintomática (derecha).

Experimento 2

La Figura 9 muestra los resultados del test de patogenicidad sobre estaquillas de olivo en condiciones de invernadero (Exp. 2) (Fig. 8c). Las plantas testigo sufrieron cierto grado de necrosis radicular y mostraron síntomas aéreos aunque de escasa importancia. De las demás plantas, sólo aquellas inoculadas con los aislados SR1 y FO1 mostraron una incidencia y severidad de síntomas significativamente mayores que las de las plantas testigo. El aislado de *S. rolfsii* (SR1) produjo una marchitez generalizada (Fig. 8d) y la necrosis extensa de la base de las estaquillas inoculadas que afectaba al cuello y a los puntos de inserción de las raicillas (Fig. 8e), mientras que el aislado de *F. oxysporum*

FO1, dio lugar a la necrosis de las raicillas. *S. rolfsii* fue reaislado al 100% en el tejido del cuello de la raíz, y *F. oxysporum* se reaisló en un 83% de las raicillas necrosadas. Las estaquillas inoculadas con el resto de los aislados que se ensayaron sólo mostraron cierto grado de necrosis radicular y baja incidencia de síntomas aéreos, no difiriendo significativamente de los valores medios de severidad de síntomas que presentaban las estaquillas testigo. No obstante, hay que resaltar el elevado porcentaje de reaislamiento (100%) de *F. solani* y *R. solani* a partir de las raicillas de las plantas inoculadas con los aislados FS y RS respectivamente. En las estaquillas testigo, estas dos especies fueron también aisladas de las raíces necrosadas, aunque sin consistencia.

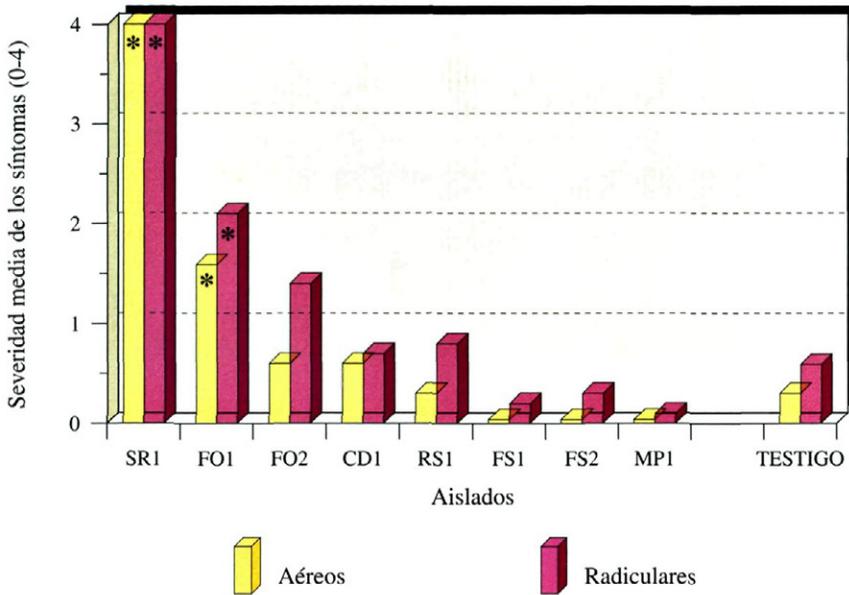


Fig. 9.—Patogenicidad de los aislados fúngicos en estaquillas del cultivar de olivo «Picual» en invernadero*.

* Las estaquillas de 4-6 meses de edad crecieron en suelo estéril infestado con aislados de *Sclerotium rolfsii* (SR1), *Fusarium oxysporum* (FO1, FO2), *Cylindrocarpon destructans* (CD1), *Rhizoctonia solani* (RS1), *F. solani* (FS1, FS2) y *Macrophomina phaseolina* (MP1). Los asteriscos indican los valores medios que difieren significativamente del testigo según el test de Dunnett ($P = 0,05$).

Experimento 3

El tercer experimento de patogenicidad se llevó a cabo en condiciones parcialmente controladas, más favorables para el desarrollo de las infecciones. Los resultados del Exp. 3 (Fig. 10) corroboran los obtenidos en condiciones de invernadero y, además, pusieron de manifiesto la patogenicidad en estaquillas de olivo de los aislados de *C. destructans* (CD3 y CD4), obtenidos en las prospecciones de 1996. Las plantas inoculadas con los aislados CD3 y CD4 mostraron una podredumbre radicular severa, que afectaba sobre todo a las raicillas. Tanto para estos dos aislados como para el aislado SR1, los valores medios de severidad de síntomas aéreos y radiculares resultaron significativamente elevados con respecto a los de las plantas testigo, siendo también muy elevado el nivel de reaislamiento de las especies ino-

culadas (100%). Para el aislado SR1, además de la necrosis extensa de la base de las estaquillas, ya observada en el Exp. 2, fue posible observar el micelio blanco del hongo creciendo alrededor del cuello de las plantas inoculadas. Al igual que en el Exp. 2, *F. solani* fue reaislado al 100% de las raicillas de las plantas inoculadas con el aislado FS1, a pesar de que las estaquillas mostraron un nivel muy bajo de necrosis radicular sin expresión de síntomas aéreos. También se registraron altos niveles de reaislamiento en plantas inoculadas con *F. acuminatum* (75% para las inoculadas con el aislado FA1 y 100% para las inoculadas con FA2), *M. phaseolina* (100% para las plantas inoculadas con ambos aislados, MP1 y MP2) y *R. solani* (66% para las plantas inoculadas con el aislado RS1 y 100% para las inoculadas con el aislado RS2). Las plantas testigo no presentaron síntomas aéreos, pero

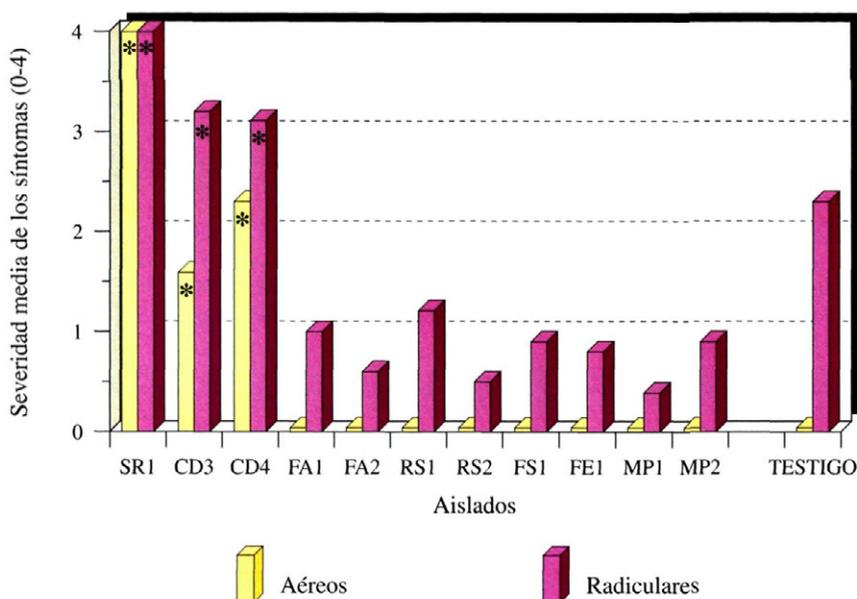


Fig. 10.—Patogenicidad de los aislados fúngicos en estaquillas del cultivar de olivo «Picual» en cámara de crecimiento*.

* Las estaquillas de 4-6 meses de edad crecieron en suelo estéril infestado con aislados de *Sclerotium rolfsii* (SR1), *Cylindrocarpon destructans* (CD3, CD4), *Fusarium acuminatum* (FA1, FA2), *Rhizoctonia solani* (RS1, RS2), *F. solani* (FS1), *F. eumartii* (FE1) y *Macrophomina phaseolina* (MP1, MP2). Los asteriscos indican los valores medios que difieren significativamente del testigo según el test de Dunnet ($P = 0,05$).

se observó un cierto grado de podredumbre radicular. A partir de las raicillas necrosadas se pudo aislar *C. destructans* y, en menor grado, *F. solani* y *P. palmivora*, aunque ninguna de estas especies se obtuvo con consistencia.

Experimento 4

Los resultados de las pruebas de patogenicidad con los aislados de hongos pitiáceos bajo condiciones de invernadero se muestran en la Figura 11. En condiciones de un riego semanal, se registró una muy baja incidencia de síntomas aéreos, tanto en plantas inoculadas como en testigos. Sin embargo, en condiciones de encharcamiento continuo del suelo, todas las plantas, incluidas las testigo sin inocular, mostraron síntomas aéreos (Fig. 8f, 11A). La severidad media de

estos síntomas fueron significativamente mayores para las plantas inoculadas con los aislados PM1 y PM2, en comparación con la severidad media de las plantas testigo (Fig. 8g), ya se trate de las plantas testigo sometidas a encharcamiento del suelo (C1) o no (C2). El análisis estadístico también mostró que no había diferencias significativas entre ambos grupos de plantas testigo (C1 y C2) en cuanto a la severidad media de síntomas aéreos. Con respecto a la podredumbre radicular (Fig. 11B), los valores de severidad de síntomas en condiciones de encharcamiento fueron significativamente mayores en las plantas inoculadas con todos y cada uno de los aislados ensayados, en comparación con sus correspondientes plantas testigo (C1) (Fig. 8h). Bajo condiciones de un riego semanal, la severidad de síntomas radiculares fue también mayor que la severidad media mostrada por los correspondien-

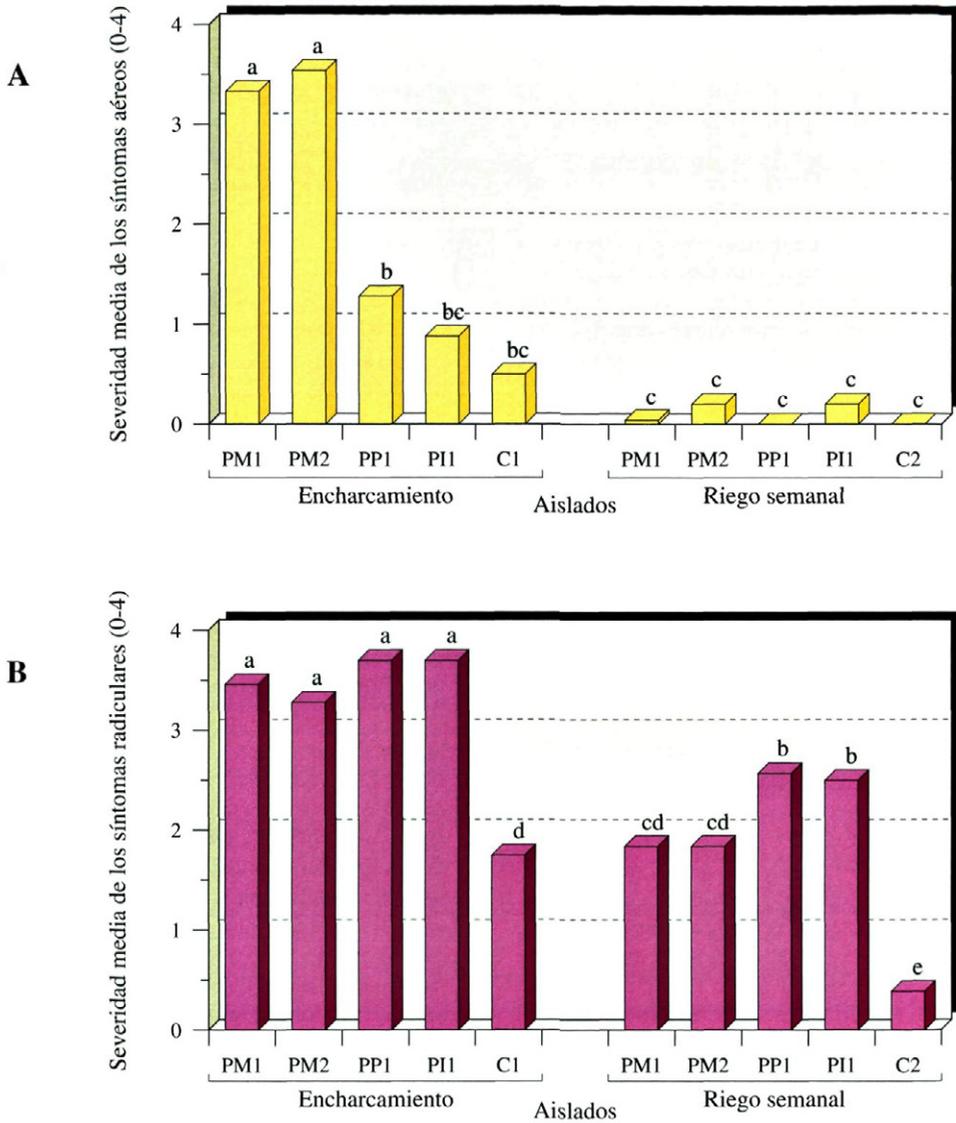


Fig. 11.—Patogenicidad de los aislados de hongos pitiáceos en estaquillas del cultivar de olivo «Picual» en invernadero. Las plantas crecieron en suelo estéril (C1, C2) o en suelo infestado con dos aislados de *Phytophthora megasperma* (PM1, PM2), un aislado de *P. palmivora* (PP1) o un aislado de *Pythium irregulare* (PI1). Barras con letras difieren significativamente según el test LSD protegido de Fisher (P = 0,05).

tes testigos (C2). Por otra parte, la severidad de síntomas radiculares fue significativamente mayor para las plantas testigo sometidas a encharcamiento (C1) en comparación con los valores de severidad de los testigos

sin encharcar (C2). No se observaron diferencias de patogenicidad entre los dos aislados de *P. megasperma* evaluados. Los porcentajes de reaislamiento de las especies inoculadas a partir de las raíces necrosadas

fueron muy altos en todos los casos para las plantas mantenidas en condiciones de encharcamiento del suelo. No se recuperó ninguna de las especies ensayadas a partir de las raíces de las plantas testigo, tanto en el tratamiento C1 como en el C2. Ocasionalmente, se recuperó *R. solani* y *F. solani* de las raíces de las estaquillas C2, y únicamente *F. solani* de las raicillas de las plantas C1.

Este experimento también se realizó en condiciones de cámara de cultivo. En este caso, todos los aislados ensayados, incluso PI1, causaron la muerte de las plantas sometidas a condiciones de encharcamiento, al cabo de 2 semanas tras la inoculación. Las plantas testigo encharcadas permanecieron libres de síntomas aéreos, mostrando no obstante, cierto grado de podredumbre radicular que resultó significativamente menor que la mostrada por las plantas inoculadas. En este corto período de tiempo no se observaron síntomas aéreos en las plantas que se regaron una vez por semana, ya fueran testigos o plantas inoculadas. En cambio, sí se observaron síntomas radiculares, pero su severidad no difirió significativamente de los que presentaron las plantas testigo.

DISCUSIÓN

Todas las especies fúngicas que se ensayaron en las pruebas de patogenicidad son hongos de suelo descritos como patógenos radiculares en diferentes huéspedes. Frecuentemente, estos hongos han sido asociados con podredumbres radiculares en olivo (BOULILA *et al.*, 1995; CICCARONE, 1976; WILHELM *et al.*, 1962). Si exceptuamos a *P. irregulare* y a la especie provisionalmente identificada como *P. palmivora*, el resto de las especies que resultaron patógenas en nuestros experimentos ya habían sido previamente aisladas de olivo. Así, GEORGOPOULOS y THANASOULOPOULOS (AYCOCK, 1966) mencionaron a *S. rolfsii* en Grecia como patógeno de olivo y KOUYEAS y CHITZANIDIS (1968) hicieron lo mismo con *P. megasperma*. En Italia, ZAZZERINI y

MARTE (1976) demostraron la patogenicidad de *C. destructans* en olivo. Por otra parte, varias especies de *Phytophthora*, incluyendo *P. citricola* y *P. drechsleri*, han sido asociadas con podredumbres radiculares del olivo en California (TEVIOTDALE, 1994). *Pythium ultimum* y otras especies no identificadas de *Pythium* y *Phytophthora* también se han aislado de raíces podridas de olivo (FARR *et al.*, 1989; WILHELM *et al.*, 1962).

Nuestras pruebas de patogenicidad demuestran que varios aislados de cinco especies fúngicas (*C. destructans*, *P. megasperma*, *P. palmivora*, *P. irregulare* y *S. rolfsii*) son claramente patógenas de olivo y reproducen los síntomas de podredumbre radicular y marchitez foliar en estaquillas del cultivar Picual. Además, la patogenicidad de *P. megasperma*, *P. palmivora* y *P. irregulare* viene determinada por el contenido hídrico del suelo, ya que los aislados ensayados sólo causaron una podredumbre extensa de la raíz y la muerte de la planta afectada cuando el suelo se encontraba continuamente saturado de agua. En condiciones de riego normales para el olivo, sólo *S. rolfsii* y dos aislados de campo de *C. destructans* causaron claramente una podredumbre severa que dió lugar a la expresión de los típicos síntomas aéreos. También los aislados de *P. megasperma* causaron cierto grado de necrosis radicular en condiciones de un riego semanal, pero sin llegar a desarrollar síntomas aéreos. Por el contrario, los aislados de vivero de *Pythium* y *Phytophthora* sí causaron una podredumbre radicular significativa en estas condiciones, aunque tampoco dieran lugar a la aparición de síntomas aéreos. Es importante señalar que el aislado de vivero de *C. destructans* resultó débilmente patógeno, y que esta situación fue similar para el resto de aislados no pitiáceos ensayados procedentes de vivero. Dado que *P. palmivora* y *P. irregulare* nunca han sido aislados en muestras de campo, se puede concluir que los patógenos radiculares que afectan a los plantones de olivo en campo no parecen tener su origen en el vivero, al menos en el

caso de los viveros localizados en la zona de estudio. La muerte de plantones en viveros de olivo (damping-off) parece deberse a la confluencia de dos factores: por un lado la presencia de patógenos radiculares y por otro, a la existencia de riegos excesivos y/o condiciones de drenaje deficientes.

Como el material vegetal empleado en las pruebas de patogenicidad provenía de un vivero comercial, ésta pudo ser la razón por la cual no fue posible trabajar con plantas totalmente libres de patógenos. Este hecho pudo determinar la falta de resultados positivos en el Exp. 1, en el que no se esterilizó el suelo, así como la aparición de cierto grado de necrosis radicular en las plantas testigo del resto de experimentos, a pesar de realizarse en suelo estéril y lavando cuidadosamente las raíces antes de la inoculación. Esto, a su vez, pudo interferir con las evaluaciones, ya que los hongos presentes en las raíces de las plantas utilizadas pertenecían a la misma especie que alguno de los aislados ensayados, como es el caso de *C. destructans*, *F. solani* o *F. oxysporum*.

La importancia real en condiciones de campo o vivero de los hongos asociados con podredumbres radiculares de olivo, tanto los que han resultado patógenos como los no patogénicos, es difícil de precisar, ya que frecuentemente se aislaron varias especies del mismo campo o árbol y, dadas sus características patogénicas, podrían actuar como patógenos secundarios en situaciones de estrés. Dos excepciones son *S. rolfsii* y *P. megasperma*. El primero sólo se obtuvo en

un campo (cuadro 1). En cambio, *P. megasperma* se aisló muy consistentemente de campos con problemas de encharcamiento, lo que se corresponde con los resultados de nuestras inoculaciones y sugiere que este patógeno puede jugar un papel importante en la generalmente aceptada sensibilidad del olivo a la «asfixia radicular». Este hecho podría tener una especial relevancia, ya que el cultivar «Picual» se ha considerado tradicionalmente muy sensible al exceso de agua en el suelo y, por sus características agronómicas, está siendo utilizado de forma generalizada en las nuevas plantaciones de olivar en Andalucía, incluso en zonas de drenaje deficiente.

Por ello, se hace necesario continuar el trabajo experimental tanto en condiciones controladas como en condiciones de campo, con objeto de caracterizar las poblaciones de *P. megasperma*, su patogenicidad sobre distintos cultivares de olivo y su dependencia del contenido hídrico del suelo. Estos trabajos son fundamentales para establecer estrategias futuras en el control de esta enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren expresar su agradecimiento a F. Luque y M. Navas por su excelente apoyo técnico. Este trabajo de investigación ha sido financiado por el Proyecto AGF93-0342 de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología.

ABSTRACT

SÁNCHEZ HERNÁNDEZ, M. E.; RUIZ DÁVILA, A. y TRAPERO CASAS, A., 1998: La «seca» de olivos jóvenes II: Identificación y patogenicidad de los hongos asociados con podredumbres radiculares. *Bol. San. Veg. Plagas*, 24(3): 581-602.

This work deals with the identification of fungal isolates associated with root rot, the major factor included in the «drying and death syndrome» («seca») of young olive trees in Andalucía, southern Spain. Fungi associated with damping-off in olive tree nurseries were also identified. Several isolates from every fungal species were tested for pathogenicity in nursery plants and rooted cuttings of olive cultivar 'Picual'. Pathogenicity tests demonstrated that five fungal species –*Cylindrocarpon destructans*, *Phytophthora megasperma*, *P. palmivora*, *Pythium irregulare* and *Sclerotium rolfsii*– were clearly pathogenic to olive trees and reproduced symptoms of root rot and foliar wilting. Other fungal species associated with root rot of olive trees in the field or in the nurseries, including *Fusarium acuminatum*, *F. eumartii*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani*, were weakly or not pathogenic. Pathogenicity of *Phytophthora megasperma*, *P. palmivora* and *Pythium irregulare* depended on soil water content, since isolates tested only caused extensive root rot and sudden plant death when the soil was continuously waterlogged. The high frequency of *P. megasperma* (part I) and its dependence for pathogenicity on soil water content suggest that this pathogen may play an important role in the well known sensitivity of young olive trees to «root asphyxiation».

Key words: *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium acuminatum*, *Fusarium eumartii*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Olea europaea*, *Phytophthora megasperma*, *Phytophthora palmivora*, *Pythium irregulare*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*.

REFERENCIAS

- ANDRÉS, F. DE, 1991: Enfermedades y plagas del olivo. Riquelme y Vargas Ed. Jaén.
- AYCOCK, R., 1966: *Stem rot and other diseases caused by Sclerotium rolfsii*. North Carolina Agricultural Experiment Station. Tech. Bull. 174.
- 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. *Phytopath. Medit.* 23: 1-8.
- BOOTH, C., 1966: *The genus Cylindrocarpon*. CMI. Kew, Surrey.
- BOOTH, C., 1971: *The genus Fusarium*. The Eastern Press Limited. London.
- BOOTH, C., 1977: *Fusarium: Laboratory guide to the identification of the major species*. CMI. Kew, Surrey.
- BOULILA, M.; MAHJOUR, M. y CHAIEB, M., 1995: Synthèse de quatre années de recherches sur le dépérissement de l'olivier en Tunisie. *Olea* 23: 112.
- CABALLERO, J. M. y DEL RÍO, C., 1994: *Propagación del olivo por enraizamiento de estaquillas semileñosas bajo nebulización*. Comunicación I+D Agroalimentaria, 7/94. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía.
- CARLING, D. E. y SUMNER, D. R., 1992: *Rhizoctonia*. In: *Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi*. APS press. St. Paul, MN.
- CICCARONE, A., 1976: Uno sguardo alla patologia dell'Olivio nei Paesi mediterranei. *Options Méditerranéennes* 24: 71-79.
- DHINGRA, O. D. y SINCLAIR, J. B., 1978: *Biology and pathology of Macrophomina phaseolina*. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.
- DHINGRA, O. D. y SINCLAIR, J. B., 1985: *Basic plant pathology methods*. CRC press. Boca Raton, Florida.
- DOMSCH, K. H.; GAMS, W. y ANDERSON, T. H., 1980: *Compendium of soil fungi*. Vol. 1. Academic Press. London.
- ERWIN, D. C. y RIBEIRO, O. K., 1996: *Phytophthora diseases worldwide*. APS Press. St. Paul, MN.
- FARR, D. C.; BILLS, G. F.; CHAMURIS, G. P. y ROSSMAN, A. Y., 1989: *Fungi on plants and plant products in the United States*. APS Press, St. Paul, MN.
- GERLACH, W. y NIREMBERG, H., 1982: *The genus Fusarium-a pictorial atlas*. Biologische Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft. Berlin.
- HOLLIDAY, P. y PUNITHALINGAN, E., 1970: *Macrophomina phaseolina*. *CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria* 275. Kew, Surrey.
- JEFFERS, N. S. y MARTIN, S. B., 1986: Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Dis.* 70: 1.038-1.043.
- KOUYEAS, H. y CHITZANIDIS, A., 1968: Notes on Greek species of *Phytophthora*. *Ann. Ins. Phytopathol. Benaki* 8: 175-192.
- MORDUE, J. E. M., 1974: *Corticium rolfsii*. *CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria* 410.
- NELSON, P. E., TOUSSOUN, T. A. y MARASAS, W. F. O., 1983: *Fusarium species: An illustrated manual*

- for identification*. The Pennsylvania State University Press. London.
- PLAATS-NITERINK, A. J. VAN DER, 1981: Monograph of the genus *Pythium*. *Studies in Mycology* 21: 242 pp.
- PUNJA, Z. K. y RAHE, J. E., 1992: *Sclerotium*. In: *Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi*. APS Press. St. Paul, MN.
- RIBEIRO, O. K., 1978: *A source book of the genus Phytophthora*. J. Cramer, Vaduz.
- SNEH, B.; BURPEE, L. y OGOSHI, A., 1991: *Identification of Rhizoctonia species*. APS press. St. Paul, MN.
- STAMPS, D. T.; WATERHOUSE, G. M.; NEWHOOK, F. J. y HALL, G. S., 1990: *Revised tabular key to the species of Phytophthora*. CAB International. Kew, Surrey.
- STEEL, R. G. D. y TORRIE, J. H., 1985: *Bioestadística: Principios y procedimientos*. McGraw-Hill. Bogotá.
- TEVIOTDALE, L. B., 1994: Diseases of olive. En: *Olive production manual*. University of California, Publication 3357: 107-109.
- TOUSSOUN, T. A. y NELSON, P. E., 1976: *A pictorial guide to the identification of Fusarium species*. The Pennsylvania State Univ. Press. University Park.
- WATERHOUSE, G. M., 1963: *Key to the species of Phytophthora De Bary*. CMI Mycological Papers 92. Kew, Surrey.
- WATERHOUSE, G. M., 1967: *Key to Pythium Pringshein*. CMI Mycological Papers 109. Kew, Surrey.
- WILHELM, S.; KAISER, W. J.; GEORGOPOULOS, S. G. y OPITZ, K. W., 1962: Verticillium wilt of olives in California. *Phytopathology* 52: 32.

(Recepción: 24 marzo 1998)

(Aceptación: 20 julio 1998)

