

POTENCIAL DE LA  
**DESINFESTACIÓN QUÍMICA**  
DEL AGUA DE RIEGO Y/O SUELO PARA  
EL CONTROL DE LA **VERTICILOSIS DEL OLIVO**



**Tesis Doctoral**  
**Francisco Jesús Gómez Gálvez**  
**Córdoba , 2018**

TITULO: *Potencial de la desinfestación química del agua de riego y/o suelo para el control de la Verticilosis del olivo*

AUTOR: *Francisco Jesús Gómez Gálvez*

---

© Edita: UCOPress. 2019  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>  
[ucopress@uco.es](mailto:ucopress@uco.es)

---



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

*Programa de doctorado en Ingeniería Agraria, Alimentaria,  
Forestal y del Desarrollo Rural Sostenible*

## **Tesis Doctoral**

Potencial de la desinfestación química del agua de riego y/o suelo para el control de la Verticilosis del olivo

*Potential of chemical disinfestation of irrigation water and/or soil for controlling Verticillium wilt of olive*

### **Autor**

Francisco Jesús Gómez Gálvez

### **Directora**

Dolores Rodríguez Jurado

Área de Protección Vegetal Sostenible



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera  
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL

Noviembre 2018





**TÍTULO DE LA TESIS:** Potencial de la desinfestación química del agua de riego y/o suelo para el control de la Verticilosis del olivo

**DOCTORANDO/A:** Francisco Jesús Gómez Gálvez

### **INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS**

El trabajo titulado “Potencial de la desinfestación química del agua de riego y/o suelo para el control de la Verticilosis del olivo”, realizado por Francisco Jesús Gómez Gálvez, se considera finalizado y reúne los requisitos necesarios para su exposición y defensa como Tesis Doctoral. Las investigaciones se han realizado en el Área de Protección Vegetal Sostenible del Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) en su Centro “Alameda del Obispo” de Córdoba. Durante las mismas, el doctorando ha contribuido con varias aportaciones de interés científico-técnico en referencia al control de la Verticilosis del olivo mediante tratamientos desinfestantes aplicados en el agua de riego. Se ha demostrado que existen desinfestantes de agua que inyectados al sistema de riego por goteo previenen o reducen la incorporación al suelo de conidias y esclerocios de *Verticillium dahliae* (agente causal) en diferentes estaciones del año. La reducción en la incorporación al suelo resulta en niveles reducidos de infección y de Verticilosis en olivo. Se ha constatado también que, en condiciones de inóculo en el suelo y cultivar de olivo propicias para el desarrollo de enfermedad, determinadas estrategias de riego por goteo con agua tratada reducen los niveles de *V. dahliae* en el suelo, reducen la Verticilosis, favorecen la recuperación de los síntomas, no muestran fitotoxicidad en olivo, y mejoran el crecimiento y la producción del olivo.

Los resultados obtenidos han sido objeto de tres artículos científicos en revistas incluidas en el primer cuartil de la relación de revistas de la especialidad Agronomía referidas en el Journal Citation Reports y de un artículo en fase final de elaboración para ser enviado a una revista científica de iguales características. Los resultados se han reflejado también en contribuciones de carácter divulgativo, y aportaciones a congresos tanto nacionales como internacionales.

El doctorando ha complementado su formación con una estancia de tres meses en el USDA-ARS San Joaquin Valley Agricultural Sciences Center bajo la tutela del profesor Dr. Christopher Wallis. Durante la estancia ha ampliado su conocimiento en técnicas de cromatografía aplicadas a la disciplina de Fitopatología.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Firma de la directora

Fdo.: Dolores Rodríguez Jurado

Córdoba, 31 de octubre de 2018



**TÍTULO DE LA TESIS:** Potencial de la desinfestación química del agua de riego y/o suelo para el control de la Verticilosis del olivo

**DOCTORANDO:** Francisco Jesús Gómez Gálvez

**INFORME RAZONADO DEL TUTOR**

D. Enrique Vargas Osuna, como tutor de la Tesis Doctoral titulada “Potencial de la desinfestación química del agua de riego y/o suelo para el control de la Verticilosis del olivo” por el doctorando Francisco Jesús Gómez Gálvez, ratifica el informe favorable dado por la directora de la Tesis D. <sup>a</sup> Dolores Rodríguez Jurado para su exposición y defensa.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Firma del tutor de la Universidad de Córdoba

Fdo.: Enrique Vargas Osuna

Córdoba, 05 de noviembre de 2018

## Tesis por compendio de artículos

Esta tesis cumple el requisito establecido por la Universidad de Córdoba para su presentación como compendio de artículos, consistente en un mínimo de tres artículos publicados o aceptados en revistas incluidas en los tres primeros cuartiles de la relación de revistas del ámbito de la especialidad y referenciadas en la última relación publicada por el Journal Citations Report (SCI):

1. **Gómez-Gálvez FJ**, Vargas-Osuna E, Rodríguez-Jurado D, 2018. Suppressive and preventive activity of chemical disinfectants against sclerotia of *Verticillium dahliae* in water. *Crop Protection* **108**, 12–22. DOI: 10.1016/j.cropro.2018.02.011  
Datos de 2018 (JCR): índice de impacto 1.834, posición 20/83 y 1<sup>er</sup> cuartil en el área temática de Agronomy.
2. **Gómez-Gálvez FJ**, Rodríguez-Jurado D, 2018. Potential efficacy of soil-applied disinfectant treatments against *Verticillium* wilt of olive. *Crop Protection* **106**, 190–200. DOI: 10.1016/j.cropro.2018.01.002  
Datos de 2018 (JCR): índice de impacto 1.834, posición 20/83 y 1<sup>er</sup> cuartil en el área temática de Agronomy.
3. **Gómez-Gálvez FJ**, Hidalgo-Moya JC, Vega-Macías V, Hidalgo-Moya JJ, Rodríguez-Jurado D, 2018. Reduced introduction of *Verticillium dahliae* through irrigation systems and accumulation in soil by injection of peroxygen-based disinfectants. *Plant Pathology*. Article in press, DOI: 10.1111/ppa.12917  
Datos de 2018 (JCR): índice de impacto 2.425, posición 16/83 y 1<sup>er</sup> cuartil en el área temática de Agronomy.

El doctorando



Fdo: Francisco Jesús Gómez Gálvez

## Financiación

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la ayuda otorgada al doctorando por el subprograma del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) de Formación de Personal Investigador (FPI-INIA) del Ministerio de Economía y Competitividad de España. Resolución de 1 de octubre de 2012 (BOE 259; 75749-75757, 27-10-2012).

Los trabajos experimentales realizados en la Tesis Doctoral han sido financiados por el proyecto de investigación del INIA “Control de la Verticilosis del olivo mediante el manejo del riego y la reducción de *Verticillium dahliae* en el agua y en el suelo” (RTA2011-00019-00-00) y por tres proyectos de investigación del Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA): “Control integrado de la Verticilosis del olivo con estrategias sostenibles y respetuosas con el medioambiente” (PEI.PEI2011.1), “Transforma Olivar y Aceite 2013-2015” (PP.TRA.TRA201300.5), y “Transferencia de Tecnología y Cooperación en Olivar y Aceite de Oliva” (PP.TRA.TRA201600.2), todos ellos cofinanciados con fondos FEDER de la Unión Europea.



**UNIÓN EUROPEA**  
Fondo Europeo de Desarrollo Regional



**INIA**  
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera  
**CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL**

**Andalucía**  
se mueve con Europa



## Agradecimientos

No ha sido hasta la escritura de este apartado que he comenzado a vislumbrar el final del desafío que supone la realización de una tesis doctoral. Han sido años de aprendizaje intenso, no solo en el campo científico, sino también en el personal.

En primer lugar, debo agradecer al INIA, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, y al IFAPA, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera de Andalucía, por concederme el apoyo económico y los medios necesarios para desarrollar y culminar este trabajo con éxito.

En segundo lugar, me gustaría agradecer a todas aquellas personas que de una u otra manera han contribuido a que esta tesis doctoral sea una realidad.

A Dolores Rodríguez Jurado, directora de mi tesis y formadora ejemplar a lo largo de estos años. Gracias por depositar tu confianza en mí y por tu dedicación constante.

A mi tutor académico de la Universidad de Córdoba, Dr. Enrique Vargas Osuna, por su disponibilidad y ayuda en todo momento.

A mi amigo Dr. Antonio Santos, testarudo compañero, ariete motivador.

A Victorino, Juan Carlos, Javier, Marcos y Antonio Prieto, por su colaboración, apoyo técnico, y transferencia de conocimientos en olivicultura. Y, por qué no decirlo, por sacarme las castañas del fuego en algún que otro momento.

A todo el personal del centro IFAPA “Alameda del Obispo” de Córdoba, por su excelente acogida y profesionalidad.

A Cristobalina, Alfonsi y Conchi, y al resto de personas que han estado codo con codo conmigo en las diferentes etapas de ejecución experimental.

A Javi, Miguel, y Rubén, por esos buenos momentos en el despacho presidencial y por ese par de ferias. Y a Rocío y Vero, por servirme de referencia en algunos aspectos (aunque ellas quizás no lo sepan).

Gracias también al extraordinario grupo de compañeros que me han acompañado en este último año. Ali, Eli, Carine, Juan Cano, Faten, Inma, Mamen, Mari, Pepe, Raúl, vuestro cariño ha sido el impulso necesario para afrontar el último *sprint*. Mención especial al cariño de la Dra. Angjelina Belaj, mi *fortune-giver*.

Al grupo “Lucha encarnizada”, en particular a Juanma Lora y Juan Miguel Ramírez. Espero que nuestra amistad perdure y que sigamos batiendo marcas en las carreras populares.

I would also like to thank Dr. Christopher Wallis for the rewarding support and the wise scientific advices provided during my stay in California. Likewise, I am deeply grateful for the warm hospitality extended by Nancy, Noemi, Parminder, Pete, and above all Julie and her family. You are all responsible for one of the most amazing experiences of my life.

A Jesús Jorrín, por sus buenos consejos académicos entre cafés de máquina y por encender la chispa investigadora.

A mis amigos del pueblo, por no abandonarme durante mi transformación a *viejoven*.

A mi familia en general por la motivación incesante y el apoyo incondicional a lo largo de todos estos años, y a mi padre en particular por su ingenio a la hora de fusionar carpintería y fitopatología.

A Nuria Elcinto, por estar siempre ahí, incluso cuando el que no estaba era yo. Porque has sido clave en todos y cada uno de estos últimos 6 años. Por tu ayuda con las placas. Por tu ayuda con los riegos. Por tu ayuda con los datos. Por tu compañía en el sofá hasta altas horas de la noche. Esta tesis es tanto mía como tuya.

A Pedro, olivarero de corazón que de manera inconsciente inculcó en mi un cariño especial hacia este cultivo.

# ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>i</b>
<b>Resumen</b>	<b>iii</b>
<b>Summary</b>	<b>vi</b>
<b>Capítulo 1. Introducción general y objetivos</b>	<b>1</b>
<b>1.1 El cultivo del olivo en Andalucía</b>	<b>2</b>
<b>1.2 La Verticilosis del olivo</b>	<b>4</b>
<b>1.3 Naturaleza del agente causal, <i>Verticillium dahliae</i></b>	<b>6</b>
<b>1.4 Factores que favorecen la Verticilosis del olivo. El caso particular de Andalucía</b>	<b>9</b>
1.4.1 Disposición de plantaciones en suelos infestados por <i>V. dahliae</i>	10
1.4.2 Dispersión del patotipo defoliante de <i>V. dahliae</i>	11
1.4.3 Utilización de material vegetal susceptible	12
1.4.4 Implantación del riego en el olivar	12
1.4.4.1 Efecto del régimen de humedad en el suelo	13
1.4.4.2 Efecto del riego como agente de dispersión de <i>V. dahliae</i>	14
<b>1.5 Actuaciones frente a la Verticilosis del olivo. Manejo integrado de la enfermedad</b>	<b>17</b>
1.5.1 Medidas a adoptar antes de la plantación	17
1.5.1.1 Medidas de exclusión y resistencia	17
1.5.1.2 Medidas de erradicación y protección	19
1.5.2 Medidas a adoptar después de la plantación	21
1.5.2.1 Medidas de exclusión y erradicación.	21
1.5.2.2 Medidas de escape	22
1.5.3 Medidas a adoptar escasamente investigadas: exclusión y erradicación de <i>V. dahliae</i> en el agua de riego	23
<b>1.6 Objetivos de la Tesis doctoral</b>	<b>25</b>
<b>Capítulo 2. <i>Suppressive and preventive activity of chemical disinfectants against sclerotia of Verticillium dahliae in water</i></b>	<b>28</b>
<b>2.1 Abstract</b>	<b>29</b>
<b>Capítulo 3. <i>Potential efficacy of soil-applied disinfectant treatments against Verticillium wilt of olive</i></b>	<b>30</b>
<b>3.1 Abstract</b>	<b>31</b>
<b>Capítulo 4. <i>Reduced introduction of Verticillium dahliae through irrigation systems and accumulation in soil by injection of peroxygen-based disinfectants</i></b>	<b>32</b>
<b>4.1 Abstract</b>	<b>33</b>

<b>Capítulo 5. Drip-irrigating with disinfected water reduces <i>Verticillium dahliae</i> in the soil and <i>Verticillium</i> wilt of olive</b>	<b>34</b>
<b>5.1 Abstract</b>	<b>35</b>
<b>5.2 Introduction</b>	<b>36</b>
<b>5.3 Materials and methods</b>	<b>38</b>
5.3.1 <i>V. dahliae</i> isolate and inoculum preparation	38
5.3.2 Plant material	39
5.3.3 Application strategies	39
5.3.4 Experiment layout	39
5.3.5 Disease assessment	41
5.3.6 Estimation of <i>V. dahliae</i> inoculum level in soil	42
5.3.7 Growth measurements	43
5.3.8 Data analysis	44
<b>5.4 Results</b>	<b>45</b>
5.4.1 Registered irrigation data	45
5.4.2 Disease progression	45
5.4.3 Inoculum density in artificially infested soil	48
5.4.4 Olive tree growth and production	50
<b>5.4.5 Discussion</b>	<b>54</b>
<b>Acknowledgements</b>	<b>59</b>
<b>Capítulo 6. Conclusiones</b>	<b>60</b>
<b>Referencias</b>	<b>64</b>
<b>Anejo: Otras contribuciones científicas</b>	<b>76</b>

## Resumen

La contaminación de las aguas de riego por *Verticillium dahliae* supone un riesgo para la sanidad de cultivos susceptibles al patógeno en Andalucía. La dispersión de conidias y esclerocios del patotipo defoliante del hongo a través de este medio, ha contribuido a la extensión y el desarrollo de las epidemias de Verticilosis del olivo (VO) en esta región. La aplicación de desinfectantes químicos al agua de riego puede suprimir la infestación por conidias de *V. dahliae*, y podría constituir una medida de exclusión dentro del manejo integrado de la VO si se probara también su eficacia frente a esclerocios, estructuras de supervivencia del hongo. Además, dado que el destino final del agua tratada sería la zona de influencia del sistema radicular, esta práctica podría contribuir a erradicar al hongo en el suelo y/o reducir la enfermedad en olivares infestados.

El primer objetivo de esta tesis consistió en evaluar *in vitro* la eficacia de la desinfestación química para prevenir y erradicar infestaciones del agua por esclerocios de *V. dahliae*. Tres productos de diferente composición (OX-VIRIN®, OX-AGUA AL25® y Deccoklor®) fueron evaluados en función de la concentración, el aislamiento de *V. dahliae* y el tiempo de acción. El efecto de los productos OX-VIRIN® (OV) y OX-AGUA AL25® (OA), ambos conteniendo peróxido de hidrógeno en su formulación, varió con la concentración y tiempo de acción. La eficacia supresiva en los días posteriores al tratamiento del agua infestada (5-30 días) fue de 87,8-100% para las tres concentraciones más altas de OV (3,2-51,2 mL L<sup>-1</sup>) y de 99,6-100% para las dos más altas de OA (0,4175 y 1,2525 mL L<sup>-1</sup>). Estas concentraciones de OV mostraron mayor eficacia preventiva que las de OA frente a infestaciones realizadas 30 días después del tratamiento químico del agua (97-100% vs. 68,9-100%). El producto clorado Deccoklor® no fue eficaz.

La eficacia potencial de los desinfectantes OV y OA para reducir al hongo en el suelo y la VO se evaluó en plantas jóvenes bajo ambiente controlado en varios experimentos. El efecto fitotóxico de las aplicaciones de los desinfectantes al suelo se exploró también sobre la planta. Cultivares de olivo susceptibles Picual y Arbequina fueron crecidos en suelo infestado con *V. dahliae* y sometidos a

diferentes tratamientos desinfectantes con agua tratada a  $3,2 \text{ mL L}^{-1}$  de OV o a  $0,4175 \text{ mL L}^{-1}$  de OA, concentraciones mínimas recomendables para la desinfección de agua según los resultados del primer objetivo. Las aplicaciones semanal y mensual de OV y la quincenal de OA redujeron sólidamente la densidad de inóculo total y de esclerocios del hongo en el suelo en hasta un 21,3-29,6% y 65,6-91,2%, respectivamente, dependiendo del tratamiento. Estas mismas aplicaciones redujeron la enfermedad entre un 0-40,2% y 3-61,4%, según el parámetro evaluado, en los cultivares Picual y Arbequina, respectivamente. Los tratamientos evaluados no afectaron negativamente al crecimiento de los plantones ni se identificó indicio alguno de fitotoxicidad en ambos cultivares.

Los sistemas de riego del olivar andaluz permiten el tratamiento del agua embalsada, pero también en la red de distribución mediante bombas de inyección. La tercera parte de la tesis abordó la eficacia de inyectar desinfectantes en el sistema de riego para reducir la incorporación y acumulación de *V. dahliae* en el suelo en función de la concentración de los productos (OV y OA;  $3,2-51,2 \text{ mL L}^{-1}$  y  $1,25-11,27 \text{ mL L}^{-1}$ , respectivamente), el tipo de propágulo del hongo presente en el agua (conidias o esclerocios), y las condiciones ambientales (primavera u otoño). La inyección de OV y OA previno o redujo en más de un 95% la acumulación de conidias y esclerocios en el suelo en ambas estaciones según la concentración aplicada. La enfermedad no fue observada y la infección fue prevenida o marcadamente reducida en plantones de olivo crecidos en el suelo regado con agua infestada y tratada.

El último objetivo de la tesis fue evaluar la eficacia de la inyección de los desinfectantes en la red de riego para reducir la densidad de inóculo del hongo en el suelo y la VO bajo condiciones de ambiente natural en un experimento de larga duración. Se combinó el cultivar Picual, un aislado defoliante altamente virulento de *V. dahliae*, y diferentes estrategias de aplicación de OV ( $3,2 \text{ mL L}^{-1}$ ) y OA ( $3,76 \text{ mL L}^{-1}$ ) durante dos periodos comprendiendo desde final de invierno a final de verano. La desinfección redujo la densidad de inóculo total en el suelo (51,2% de media) y la incidencia de enfermedad e infección (20,0% y 18,4% de media, respectivamente). La aplicación quincenal de OA fue la estrategia que arrojó mejores resultados en términos de reducción de inóculo total (75%) y

esclerocios (85,4%) en el suelo, y reducción de síntomas (53%) e infección (70,8%) en olivo. La desinfestación, especialmente bajo la estrategia anterior, atenuó el impacto negativo de la infección sobre el crecimiento y la producción al promover la recuperación de la enfermedad.

Los desinfectantes testados no solo reducen los esclerocios en el agua sino también al hongo en suelo infestado y la VO a ciertas concentraciones. Su uso se postula como una práctica complementaria dentro del manejo integrado de la VO en Andalucía, en olivares y viveros que usen agua infestada por el patógeno y en aquellos en los que el hongo ya esté establecido en el suelo. Los fabricantes de formulados deberían considerar el desarrollo de productos conteniendo peróxido de hidrógeno para aplicar al agua.

## Summary

The infestation of irrigation waters by *Verticillium dahliae* poses a risk for the health of susceptible crops in Andalusia. Spread of conidia and sclerotia of the pathogen via irrigation water has contributed to enlarge the extension and epidemic development of the Verticillium wilt of olive (VWO) throughout this region. The application of chemical disinfectants into the irrigation water has proved to be useful suppressing infestations by *V. dahliae* conidia. To ascertain the effect against sclerotia -more persistent structures of the fungus- is required before recommending this practice as an exclusion measure within the integrated management of the VWO. Furthermore, the fate of this treated water would be the rhizosphere, so this measure could contribute to eradicate the fungus in the soil and/or reduce the disease in infested olive orchards.

The first goal of the present thesis was to evaluate the *in vitro* efficacy of chemical disinfection in preventing and eradicating water infestations by *V. dahliae* sclerotia. Three products differing in composition (OX-VIRIN®, OX-AGUA AL25®, and Deccoklor®) were tested according to the concentration, *V. dahliae* isolate and time of action. The effect of disinfectants OX-VIRIN® (OV) and OX-AGUA AL25® (OA), both including hydrogen peroxide in their formulation, varied with the concentration and time. Suppressive efficacy ranged between 87.8-100% for the three highest concentrations of OV (3.2-51.2 mL L<sup>-1</sup>) and 99.6-100% for the two highest of OA (0.4175 y 1.2525 mL L<sup>-1</sup>) at 5-30 days after the treatment of infested water. These OV concentrations showed higher preventive efficacy than OA concentrations against infestations carried out 30 days after the chemical treatment of the water (97-100% vs. 68,9-100%). The chlorinated product Deccoklor® was ineffective.

The potential efficacy of OV and OA in reducing the fungus in the soil and the VWO in young olive plants was evaluated in several experiments conducted under growth chamber conditions. The soil-applied disinfectant treatments were also assessed for phytotoxicity on olive plants. Susceptible olive cultivars were grown in *V. dahliae*-infested soil and subjected to different disinfectant treatments with OV- or OA-treated water. The lowest concentrations recommended for disinfecting *V. dahliae*-containing water according to results from the previous



objective were used ( $3.2 \text{ mL L}^{-1}$  or  $0.4175 \text{ mL L}^{-1}$ , respectively). The weekly and monthly treatments with OV and the biweekly treatment with OA decreased solidly the total inoculum density in the soil up to 21.3-29.6% and sclerotia density up to 65.6-91.2%, depending on the treatment. These same disinfectant treatments reduced the disease by 0-40.2% and 3-61.4%, depending on the parameter evaluated, on Picual and Arbequina cultivar, respectively. The tested treatments did not negatively affect the plant growth and phytotoxicity was not observed on any cultivar.

Irrigation systems of Andalusian olive orchards allow for the treatment of ponded irrigation water, but also within the distribution network by means of metering pumps. The third part of the thesis addressed the efficacy of injecting disinfectants in the irrigation system in reducing the incorporation and accumulation of *V. dahliae* in the soil according to the product concentration (OV and OA;  $3.2\text{-}51.2 \text{ mL L}^{-1}$  and  $1.25\text{-}11.27 \text{ mL L}^{-1}$ , respectively), the type of propagule infesting the water (conidia or sclerotia), and the environmental conditions (spring or fall). The injection of OV and OA prevented or reduced above 95% the accumulation of conidia and sclerotia in both seasons, depending on the concentration applied. The disease was not observed, and the infection prevented or markedly reduced in olive plants raised in soil irrigated with infested and treated water.

The last objective of the thesis was to assess the efficacy of injecting the disinfectants within the irrigation system for reducing the *V. dahliae* inoculum density in soil and the VWO in a long-term experiment conducted under natural environmental conditions. The assessment was carried out combining the Picual cultivar, a highly virulent defoliating pathotype of *V. dahliae*, and different application strategies with OV ( $3.2 \text{ mL L}^{-1}$ )- and OA ( $3.76 \text{ mL L}^{-1}$ )-treated water for two periods comprising from late winter to late summer. Disinfestation reduced the total inoculum density in soil (by 51.2%, on average) and the disease and infection incidence (by 20.0 and 18.4%, respectively, on average). OA applied twice a month in alternate weeks was the strategy that stood out among the rest by reducing the total inoculum and sclerotia density in soil by 75 and 85.4%, respectively, and symptomatology and infection extent by 53 and 70.8%, respectively, with respect to control. Soil disinfestation, especially following the

mentioned OA-strategy, promoted a significantly greater tree recovery from the disease and relieved the reduction in tree growth and production that occurred in infested soils.

The disinfectants tested in this work not only reduce water infestations by sclerotia, but also the fungus in soil and the VWO when applied at certain concentrations. Their use could be conceived as a complementary practice within the integrated management of the disease in Andalusian orchards or nurseries using *V. dahliae*-containing water and in those in which the pathogen is already established in the soil. The development of water disinfectants incorporating hydrogen peroxide in their formulation should be encouraged by manufacturers.



# Capítulo 1

## Introducción general y objetivos

## 1.1 El cultivo del olivo en Andalucía

El sector del olivar es estratégico en Andalucía por ser elemento generador de riqueza, empleo, cohesión social y ordenación territorial. El olivar es el agrosistema más representativo de Andalucía, con algo más de 1,6 millones de hectáreas, lo que supone cerca del 45% de la superficie de tierras de cultivo (ESYRCE, 2017). Su cultivo se extiende por todas las provincias de la comunidad autónoma, y constituye la principal actividad económica en más de 300 municipios, sobre todo en Jaén, el sur de Córdoba, el noroeste de Granada, el norte de Málaga y el sudeste de Sevilla (eje del olivar andaluz). La importancia del olivar en Andalucía es tal que cuenta con un marco normativo propio que asegura el mantenimiento y la mejora de su cultivo, el desarrollo sostenible de sus territorios y el fomento de la calidad y promoción de sus productos (Ley 5/2011, de 6 de octubre, del olivar de Andalucía; <http://www.juntadeandalucia.es/boja/2011/205/d1.pdf>).

La región andaluza ejerce un liderazgo mundial en producción de aceituna y aceite. En los últimos años el sector olivarero ha producido en torno al 18% de la aceituna de mesa y 41% del aceite de oliva del mundo (datos 2010-2017; MAPA, 2018; COI, 2018). Alcanzar dicha posición de vanguardia no habría sido posible sin los planes de Reestructuración y Reconversión del Olivar que se promulgaron en España durante los años 70 y 80. Se apostó por la investigación con la creación del Centro de Mejora y Demostración de la Técnica Oleícola (CEMEDETO) en Córdoba que, junto a la universidad, marcó las directrices de la denominada Moderna Olivicultura. Se impulsó un nuevo olivar con una mayor densidad de plantación ( $>200$  árboles  $ha^{-1}$ ) y adaptado a la mecanización con árboles a un solo pie (Navarro *et al.*, 2017). También se difundió la técnica de multiplicación por enraizamiento de estaquillas semileñosas bajo nebulización. El sector viverista pasó de ofrecer un grupo heterogéneo de variedades a concentrar su producción en variedades más productivas, de elevado rendimiento graso y precoz entrada en producción (Caballero *et al.*, 2017). Se estima que más del 90% de las plantaciones jóvenes se han establecido y se están estableciendo con las variedades 'Picual', 'Arbequina' y 'Hojiblanca' (Barranco, 2017). Según el censo de variedades más reciente en Andalucía, 'Picual' es la variedad más extendida con cerca de 860.000 hectáreas cultivadas,

lo que representa aproximadamente el 60% de la superficie de olivar en Andalucía (CAPDER, 2015a). Por otro lado, es de destacar la introducción y expansión de la variedad de origen catalán 'Arbequina' en todas las zonas oleícolas andaluzas por su buena aptitud al olivar de alta densidad (600-2000 árboles ha<sup>-1</sup>). Atendiendo al aumento considerable de este tipo de olivares, se podría esperar que el número de árboles 'Arbequina' plantados pueda estar ya próximo al de 'Picual' (V. Vega-Macías, comunicación personal).

La implantación del riego fue otro elemento clave del aumento de productividad del olivar. En la década de los 90, la subida del precio del aceite, la intensa sequía que azotó a las zonas productoras y la difusión de las técnicas de riego localizado sirvieron de caldo de cultivo para la puesta en riego del olivar en Andalucía (Orgaz *et al.*, 2017). El olivar regado pasó de ocupar cerca de 88000 hectáreas a alcanzar algo más de 338000 en un periodo de 20 años (Sánchez-Martínez *et al.*, 2011). La tendencia se ha mantenido ascendente y en la actualidad el 38,1% de la superficie de olivar andaluz se encuentra en regadío, ocupando cerca de 609000 hectáreas (ESYRCE, 2017). El incremento del número de olivares regados en una región con clima semiárido como Andalucía ha conducido a un conflicto de intereses por el uso del agua con respecto a otros cultivos y otros usos distintos al riego. La limitada disponibilidad de agua y el coste de bombeo de agua subterránea obligan a un uso racional de la misma mediante el almacenamiento del agua en balsas, estrategias de riego deficitario y sistemas de riego localizado (Pastor, 2005). Así, el riego localizado por goteo es el sistema más implantado en el olivar andaluz, empleándose en un 95,5% de las plantaciones regadas (CAPDER, 2015b).

Una instalación típica de riego por goteo incluye i) estación de bombeo, ii) balsa de almacenamiento y/o regulación, iii) elementos de prefiltrado, iv) cabezal de riego (filtros, equipos de fertirrigación, elementos de control), v) red de distribución (tuberías principales, secundarias y portagoteros), vi) goteros, y vii) elementos de control, regulación y seguridad (Serrano *et al.*, 2005). Las balsas de almacenamiento están muy extendidas en las explotaciones que utilizan tanto aguas de origen superficial como subterránea ya que permiten acumular en invierno las dotaciones necesarias para su empleo en verano, en los momentos de máxima sensibilidad al déficit hídrico, y facilitan las programaciones del riego

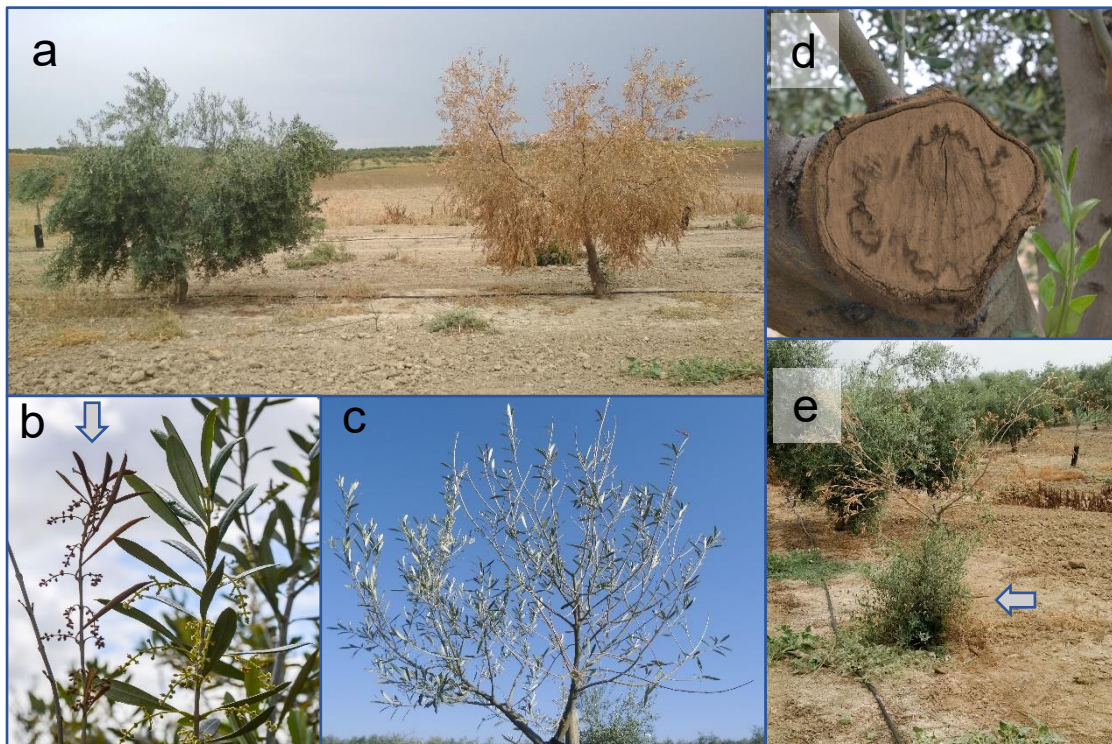
(frecuencia y dosis). El principal inconveniente es que requieren un mantenimiento, normalmente a base de tratamientos alguicidas o bactericidas, durante el periodo de almacenamiento para evitar una contaminación biológica que produzca obturación de goteros (Serrano *et al.*, 2005). La obturación de goteros también se previene con un sistema de filtrado en el cabezal de riego. Éste puede estar compuesto por distintos tipos de filtros según el origen del agua de riego. Por ejemplo, los filtros de arena son especialmente recomendables para aquellas aguas que tengan problemas de algas debido a su exposición a la luz (embalses o conducciones al aire libre), mientras que los hidrociclones lo son para aguas de pozo cargadas de partículas de arena y limo (Fernández-Gómez *et al.*, 2010). Tras el sistema de filtrado, el cabezal de riego suele contar con un equipo de fertirriego, imprescindible cuando se riega de forma localizada (Serrano *et al.*, 2005). La solución fertilizante se prepara o almacena en tanques de fertilización y es incorporada a la red por medio de bombas inyectoras fabricadas en material resistente a la corrosión. Con la fertirrigación puede surgir de nuevo el problema de la obturación, en este caso obturación por precipitados químicos, y por tanto la necesidad de realizar un mantenimiento, en este caso mediante inyección de soluciones ácidas que eliminen las obstrucciones en los goteros (Pastor *et al.*, 2005). Una ventaja añadida de la instalación de un equipo fertirrigador es que permite la incorporación al agua de riego de componentes fitosanitarios (quimigación) como herbicidas o nematocidas.

## 1.2 La Verticilosis del olivo

La Verticilosis del olivo (VO), causada por el hongo *Verticillium dahliae* Kleb., es considerada la enfermedad de origen fúngico más amenazadora del cultivo a nivel mundial (Jiménez-Díaz *et al.*, 2012). Al igual que ocurre en otras Verticilosis, la reproducción de la enfermedad es consecuencia de la colonización vascular del xilema por parte del patógeno que ocasiona obstrucción vascular y desequilibrio en el consumo hídrico de la planta (Pegg & Brady, 2002).

La VO se diagnosticó por primera vez en Sicilia en 1946 (Ruggieri, 1946), y desde entonces se ha detectado en casi todas las zonas olivareras del mundo, causando importantes pérdidas a agricultores, viveristas e industria del olivo en

general (López-Escudero & Mercado-Blanco, 2011). En Andalucía constituye el principal problema fitosanitario del cultivo desde que empezara a ser tenida en consideración a finales del siglo pasado (Caballero *et al.*, 1980; Blanco-López *et al.*, 1984). Las primeras inspecciones de olivos afectados identificaron dos complejos de síntomas característicos de la enfermedad: apoplejía y decaimiento lento (Blanco-López, 1984; Figura 1.1). La apoplejía ocurre principalmente a finales de invierno o principios de primavera y se caracteriza por una marchitez repentina de brotes, y ramas, con abarquillamiento de hojas que, por lo general, quedan adheridas a las ramas, y que puede desencadenar en la muerte del árbol. El decaimiento lento tiene lugar más tarde, durante la floración en primavera y principios de verano, y se distingue por el momificado de inflorescencias y la defoliación parcial de hojas marchitas en tallos afectados. Se ha descrito después otro síndrome en olivos jóvenes en Andalucía, caracterizado por la defoliación parcial o total de hojas verdes asintomáticas desde principios de otoño a principios de primavera, que comúnmente termina con la muerte del árbol (Navas-Cortés *et al.*, 2008; Figura 1.1). En la actualidad es además habitual que el decaimiento lento ocasione muerte de árboles en parcelas con alta incidencia de enfermedad (Rodríguez Jurado, comunicación personal).



**Figura 1.1** Sintomatología de la Verticilosis del olivo. **a:** árbol sin síntomas (izquierda) y árbol afectado por marchitez general o síndrome de apoplejía; **b:** momificado de inflorescencias (síndrome de decaimiento lento); **c:** defoliación (síndrome de defoliación); **d:** coloración vascular; **e:** recuperación natural de síntomas.

La cantidad de síntomas (severidad) de Verticilosis en olivo depende de la cualidad y cantidad de inóculo de *V. dahliae* presente en el suelo, la variedad del olivo, la edad de éste, y las condiciones ambientales (Blanco-López *et al.*, 1984; Navas-Cortés *et al.*, 2008). En olivo y otras especies leñosas la severidad de los síntomas (porcentaje de copa afectado) puede disminuir paulatinamente hasta una remisión completa, lo que se denomina recuperación natural de los síntomas. La recuperación natural de los síntomas se caracteriza por la emisión de nuevos brotes vegetativos, que generalmente se desarrollan en la base del tronco o bajo ramas afectadas (Figura 1.1). Este fenómeno natural es atribuido a una respuesta de escape del olivo por medio de cambios anatómicos y fisiológicos (López-Escudero & Blanco-López, 2005a; López-Escudero & Mercado-Blanco, 2011; Jiménez-Díaz *et al.*, 2012; Bubici & Cirulli, 2014; Santos-Rufo *et al.*, 2017b).

### 1.3 Naturaleza del agente causal, *Verticillium dahliae*

*Verticillium dahliae* Kleb. es un hongo hemibiotrofo de fase sexual desconocida incluido en la división *Ascomycota*, clase *Sordariomycetes* y familia *Plectosphaerellaceae*. Microscópicamente se caracteriza por formar esclerocios melanizados negro-mate de forma variable y tamaño comprendido generalmente entre 25 y 100  $\mu\text{m}$ , y conidias hialinas de  $6 \pm 1,5 \times 3 \pm 0,5 \mu\text{m}$  (largo por ancho). Las conidias se forman acumuladas en la punta de fiálidas dispuestas de manera verticilada a lo largo de conidióforos de 105-690  $\mu\text{m}$  de longitud (Inderbitzin *et al.*, 2011). Los esclerocios constituyen las estructuras de supervivencia del hongo en el suelo y son responsables del inicio de las epidemias (Schnathorst, 1981).



Varias características inherentes a la ecología y biología del hongo hacen que las Verticilosis sean enfermedades que preocupen al agricultor por ser difíciles de controlar:

i) El amplio rango de huéspedes susceptibles a ser infectados y la amplia distribución a nivel mundial del hongo (entre latitudes 60°N y 50°S; Pegg, 1984). *V. dahliae* causa enfermedades vasculares en multitud de especies herbáceas y leñosas de interés agronómico y ornamental, así como en especies forestales (Hiemstra & Harris 1998; Pegg & Brady 2002). Por sus implicaciones epidemiológicas sobre la cantidad de inóculo del hongo en el suelo, es importante destacar el gran número de especies de flora arvense, dicotiledóneas y monocotiledóneas, que pueden ser colonizadas por *V. dahliae* con o sin expresión de síntomas (Benson & Ashworth, 1976; Thanassoulopoulos *et al.* 1981; Pegg & Brady, 2002; Yildiz *et al.* 2009). Aislados del patógeno obtenidos de cultivos de algodón, tomate, pimiento y berenjena, o de malas hierbas como la bardana común (*Xanthium canadense*) o el tomatillo (*Physalis ixocarpa*), han mostrado capacidad infectiva en olivo (Pegg & Brady, 2002).

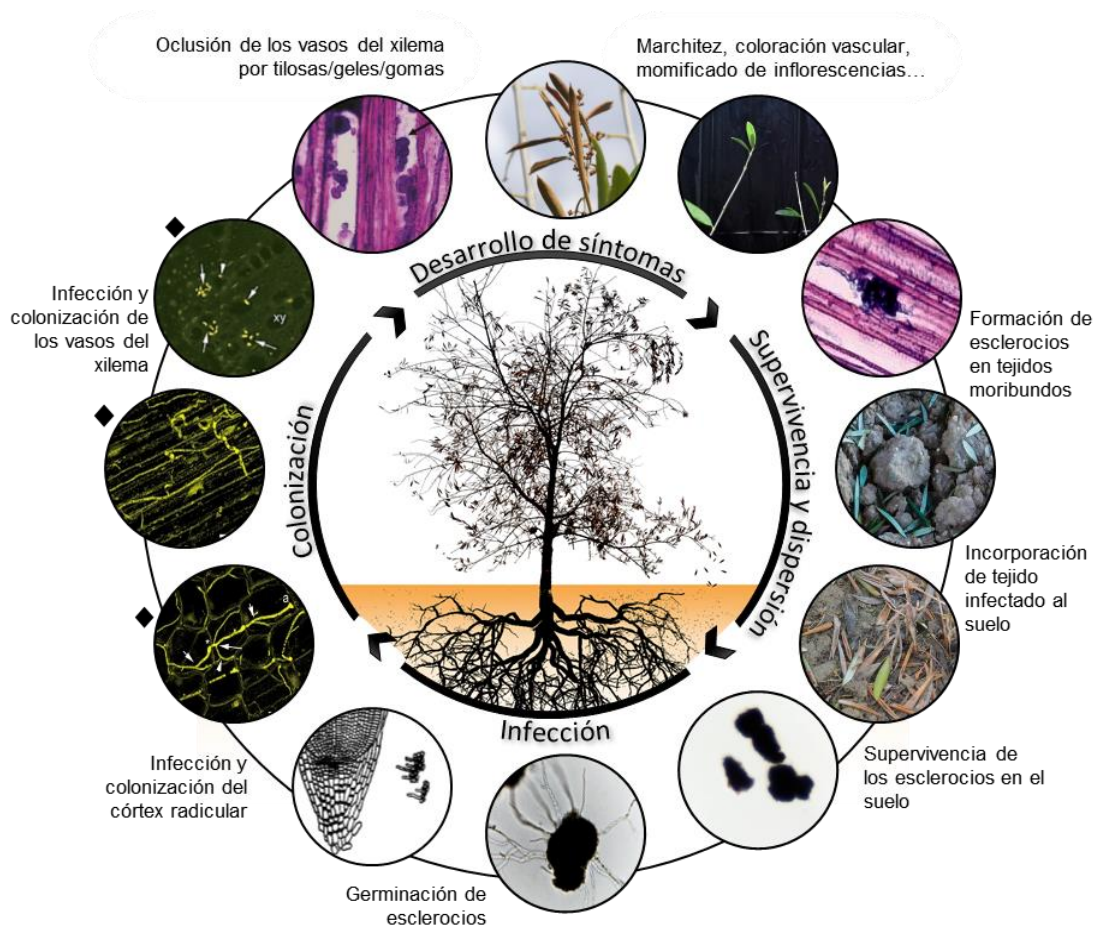
ii) La variabilidad de virulencia en las poblaciones de *V. dahliae*. En el caso particular del olivo, los aislados de *V. dahliae* presentan la misma virulencia diferencial observada previamente en algodónero (Schnathorst & Sibbett, 1971; Rodríguez-Jurado *et al.*, 1993). Así, los aislados del patógeno se han caracterizado como patotipo defoliante (D), altamente virulento, y no defoliante (ND), de virulencia moderada, según originen o no la caída generalizada de hojas verdes asintomáticas de ramos infectados, respectivamente (Rodríguez-Jurado *et al.*, 1993; Navas-Cortés *et al.*, 2008). La mayor virulencia en olivo de los aislados defoliantes frente a los no defoliantes ha quedado constada en varios estudios, observándose significativamente una mayor incidencia y severidad de síntomas (Rodríguez-Jurado *et al.*, 1993), porcentaje de vasos xilemáticos ocluidos (Rodríguez-Jurado, 1993), y ADN del hongo en raíz o tallo (Mercado-Blanco *et al.*, 2003; Markakis *et al.*, 2009). Las infecciones originadas por el patotipo D pueden resultar letales para el árbol, mientras que los olivos infectados por el patotipo ND en general superan la enfermedad con el tiempo de manera natural (Blanco López *et al.*, 1984). En cualquier caso, la recuperación natural de los síntomas no es exclusiva de las infecciones por el patotipo ND y

un árbol recuperado puede mostrar síntomas de nuevo en años posteriores (Blanco-López *et al.*, 1990).

iii) La capacidad de sobrevivir prolongadamente en el suelo. *V. dahliae* está considerado un hongo invasor de suelo, caracterizado por una fase parasítica extensa en el tejido vascular del huésped y una fase saprofita declinante después de la muerte de éste (Powelson & Rowe, 1993; Figura 1.2). Las condiciones desfavorables de inanición en la fase no parasítica promueven la formación de esclerocios en los tejidos moribundos. En olivo, los esclerocios se forman extensamente en ramas, hojas, peciolo, inflorescencias, e incluso semillas de árboles afectados por la enfermedad (Rodríguez-Jurado *et al.*, 2002; Karajeh, 2006; Bejarano-Alcázar *et al.*, 2008; Jiménez-Díaz *et al.*, 2008; Trapero *et al.*, 2011). Una vez incorporados al suelo pueden permanecer viables hasta 15 años soportando condiciones adversas (Wilhem, 1955; Schnathorst, 1981). La fungistasis del suelo puede ser vencida bien al incrementarse la disponibilidad de nutrientes o al reducirse la competencia por ellos (Lockwood, 1977; Pegg & Brady, 2002). Los exudados radiculares, tanto de plantas huéspedes como de no-huéspedes, son considerados la principal fuente que estimula la germinación de los esclerocios de *V. dahliae* (Talboys, 1984; Mol & van Riesen, 1995; Pegg & Brady, 2002). Por otro lado, la humectación o la aireación del suelo pueden favorecer la germinación en ausencia de exudados al favorecer una mayor liberación de nutrientes o una disminución de agentes competidores en el suelo, respectivamente (Menzies & Griebel, 1967; Farley *et al.*, 1971; Green, 1980).

iv) La ubicación del patógeno en el xilema. Tras la germinación, se forman hifas infectivas que penetran en las raíces, crecen hasta alcanzar los vasos xilemáticos, y forman micelio y conidias que colonizan la parte aérea de la planta ayudándose del transporte ofrecido por la transpiración natural de la misma (Pegg & Brady, 2002). En el caso del olivo, la aparición de los primeros síntomas es precedida de una colonización rápida y contundente de los vasos xilemáticos en sentido longitudinal, la cual puede extenderse en sentido transversal posteriormente (Rodríguez-Jurado, 1993; Baidez *et al.*, 2007; Prieto *et al.*, 2009). El desarrollo de síntomas en olivo es atribuido principalmente a la oclusión de los vasos xilemáticos, la cual es producida por las propias estructuras del hongo, pero sobre todo por los compuestos (tilosas, gomas, compuestos

polisacáridos...) que la propia planta produce para confinar e impedir el avance del patógeno (Rodríguez-Jurado, 1993; Baídez *et al.*, 2007; Prieto *et al.*, 2009; Jiménez-Díaz *et al.*, 2012). También contribuye al desarrollo de síntomas la “guerra bioquímica” que se libra entre patógeno y planta con la producción de enzimas líticas, especies reactivas de oxígeno, fitohormonas y compuestos fenólicos (Jiménez-Ruiz *et al.*, 2017; Markakis *et al.*, 2010; Gharbi *et al.*, 2016).



**Figura 1.2** Ciclo de la biología de *Verticillium dahliae* en olivo. ♦ Fuente de foto: Prieto *et al.*, 2009.

## 1.4 Factores que favorecen la Verticilosis del olivo. El caso particular de Andalucía

La VO fue diagnosticada por vez primera en Andalucía en 1979, en olivares experimentales de Córdoba (Caballero *et al.*, 1980), aunque existen descripciones previas de síntomas que pudieran corresponder a esta enfermedad (Benlloch, 1943). Las primeras inspecciones sistemáticas efectuadas entre los años 1980 y 1983 constataron que el 38,5% de 122

plantaciones de menos de 15 años padecía ya esta enfermedad, con una incidencia que en ocasiones llegaba a ser del 90% de árboles afectados (Blanco-López *et al.*, 1984). A pesar de estos datos, la Verticilosis no se percibía como un problema de relevancia para el sector oleícola andaluz, consideración que cambió radicalmente a principios de la década de 1990, cuando comenzó a producirse la muerte de árboles jóvenes en plantaciones nuevas. Desde entonces, la Verticilosis se ha extendido en Andalucía, de manera que en 2007 se estimó que afectada al 71% de los olivares de las tres principales provincias olivareras, con una incidencia media de 20% de olivos afectados (López-Escudero *et al.*, 2010). En la actualidad la enfermedad ha sido detectada ya en las ocho provincias andaluzas con una prevalencia media del 34,4% de olivares enfermos atendiendo a valores de la Red de Alerta Fitosanitaria de la Junta de Andalucía obtenidos de 3800 olivares durante el periodo 2006-2014 (Jiménez-Díaz, 2018).

Al comparar cronológicamente el aumento en la distribución de la VO con la expansión y tecnificación de la olivicultura andaluza (referida en el punto 1.1 de este mismo capítulo) se aprecia como ambos hechos se han producido concomitantemente, lo que apunta a una influencia directa del manejo del olivar sobre la actual incidencia de la VO y/o prevalencia de los patotipos de *V. dahliae*.

#### **1.4.1 Disposición de plantaciones en suelos infestados por *V. dahliae***

El establecimiento de nuevas plantaciones de olivar en suelos infestados por *V. dahliae* parece haber sido un factor de peso en el aumento de gravedad de la VO en Andalucía. El auge que experimentó el olivar a partir de la década de los 70 llevó a establecer plantaciones en terrenos históricamente cultivados con huésped de *V. dahliae* como alcachofa, alfalfa, algodón, berenjena, girasol, pimiento, remolacha o tomate (López-Escudero *et al.*, 2010). El cultivo repetido de variedades susceptibles de estos huéspedes contribuye eficientemente al establecimiento e incremento de poblaciones del patógeno en el suelo (Bejarano-Alcázar *et al.*, 1996; Pegg & Brady, 2002). López-Escudero *et al.* (2010) encontraron una incidencia de VO significativamente mayor en terrenos dedicados tradicionalmente a cultivos susceptibles de ser infectados por el hongo (21,5%) que en aquellos dedicados a cultivos no susceptibles (11,9%).

#### 1.4.2 Dispersión del patotipo defoliante de *V. dahliae*

El cultivo generalizado de algodón a lo largo del Valle del Guadalquivir parece haber contribuido a la introducción, establecimiento y dispersión del patotipo D a lo largo de toda la cuenca (Bejarano-Alcázar *et al.*, 1996; Bejarano-Alcázar & Pérez-Artés, 2002; Milgroom, 2016). La primera identificación del patotipo D en Andalucía ocurrió en el cultivo del algodón en las marismas de Sevilla en 1984 (Bejarano-Alcázar *et al.*, 1996). Una década más tarde se detectó por primera vez infectando olivo en una finca comercial a 150 km de la zona de las marismas de Sevilla (López-Escudero & Blanco-López, 2001). En la actualidad, el patotipo D se ha identificado en alrededor de 350 olivares inspeccionados en 123 municipios de las ocho provincias andaluzas, y constituye el patotipo predominante en las provincias de Córdoba, Jaén y Sevilla (Jiménez-Díaz, 2018). Entre los factores que han favorecido la dispersión del patotipo D a larga y corta distancia en Andalucía, el uso de agua de riego infestada (ver más abajo) y la distribución de material vegetal para plantación infectado parecen haber jugado un papel clave. Inspecciones realizadas por la Dirección General de la Producción Agraria de la Junta de Andalucía detectaron plantones infectados por *V. dahliae* en más de 100 viveros de un total de algo más de 700 prospectados (Caballero & Del Río, 2017).

El predominio del patotipo D respecto al ND tiene importantes implicaciones epidemiológicas y para el manejo de la VO. En primer lugar, hay que considerar el umbral de inóculo de cada patotipo necesario para causar enfermedad en olivo. López-Escudero & Blanco-López (2007) observaron que 3,3 y 10 propágulos del patotipo D por gramo de suelo fueron suficientes para causar una incidencia de enfermedad del 47,2 y 63,8%, respectivamente, en plantones 'Picual' tras 30 meses del trasplante a suelo artificialmente infestado. Por el contrario, 10 propágulos del patotipo ND por gramo de suelo resultaron insuficientes para causar enfermedad en plantones del mismo cultivar y tras el mismo periodo de tiempo (Jiménez-Díaz *et al.*, 2012). Aun así, en condiciones de campo se ha indicado que una densidad de inóculo de tan solo 1 propágulo  $g^{-1}$  del patotipo ND puede originar una incidencia de enfermedad del 10% en olivos 'Picual' (Roca *et al.*, 2015). En segundo lugar, debe contemplarse la mayor virulencia de los aislados D. Las infecciones por el patotipo D originan epidemias

más rápidas y de mayor incidencia de enfermedad que las ocasionadas por el ND, con un incremento en el tamaño de los focos iniciales que no se observa para el patotipo ND. La mayor caída de hojas infectadas en árboles afectados por el patotipo D se ha señalado como factor que favorece el incremento en incidencia y agregación de árboles enfermos comparadas con las epidemias causadas por el patotipo ND (Navas-Cortés *et al.*, 2008). Además, el rango de temperatura del suelo óptimo para causar infección en cultivares de olivo susceptibles es más amplio en aislados D (16-24°C) que en ND (16-20°C) (Calderón *et al.*, 2014).

#### **1.4.3 Utilización de material vegetal susceptible**

Además de la virulencia y la densidad de inóculo de *V. dahliae* presente en el suelo, el grado de susceptibilidad del cultivar es un factor que también determina la severidad de la enfermedad en olivo. La mayoría de las variedades con más difusión en Andalucía (por ejemplo, 'Arbequina', 'Hojiblanca', 'Manzanilla de Sevilla', 'Picual') son susceptibles al patotipo D de *V. dahliae*. A pesar de que se conocen variedades con ciertos niveles de resistencia al desarrollo de síntomas por este patotipo (por ejemplo, 'Empeltre', 'Frantoio' o 'Changlot Real'), éstas no reúnen las características agronómicas demandadas por los productores y la industria olivarera (López-Escudero *et al.*, 2004; Arias-Calderón *et al.*, 2015; Trapero *et al.*, 2015).

#### **1.4.4 Implantación del riego en el olivar**

El aumento en la distribución e importancia de la VO en Andalucía se ha relacionado con la puesta en riego del olivar (Blanco-López *et al.*, 1984; López-Escudero *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2008; Jiménez-Díaz *et al.*, 2011). Esta relación también se ha observado en otras regiones olivareras de países de la Cuenca Mediterránea (Al-Ahmad & Mosli, 1993; Serrhini & Zeroual, 1995; Dervis *et al.*, 2010; Baroudy *et al.*, 2018). El riego puede afectar a la VO por el efecto del régimen de humedad sobre la densidad del hongo en el suelo, el propio árbol, y/o la interacción entre ellos (López-Escudero & Blanco-López, 2005b; Pérez-Rodríguez *et al.*, 2015a, 2016a; Santos-Rufo *et al.*, 2017a, 2017b), pero también por el efecto directo que el agua a través del sistema de riego tienen al actuar como vía de dispersión e introducción de propágulos de *V. dahliae* al suelo

(Rodríguez-Jurado & Bejarano-Alcázar, 2007; Moraño-Moreno *et al.*, 2008; Rodríguez-Jurado *et al.*, 2008; García-Cabello *et al.*, 2012).

#### 1.4.4.1 Efecto del régimen de humedad en el suelo

Según varios estudios clásicos realizados en diferentes huéspedes y condiciones, el grado de humectación del suelo puede influir sobre la supervivencia, germinación y multiplicación de *V. dahliae* en el suelo (Menzies, 1962; Farley *et al.*, 1971; Ben-Yephet & Pinkas, 1977; Mozumder *et al.*, 1970; Ioannou *et al.*, 1977), así como en el tipo de propágulo del hongo formado en el mismo (Evans *et al.*, 1966; Brinkerhoff, 1969; Willetts, 1971). Algunos autores han señalado al descenso de temperatura que se produce en el suelo tras el riego como factor propicio para la supervivencia y capacidad infectiva del patógeno (Karaca *et al.*, 1971). En un estudio llevado a cabo en tres olivares de la provincia de Córdoba, López Escudero & Blanco López (2005b) observaron que, tras cuatro meses en régimen de riego por goteo (2 goteros árbol<sup>-1</sup>, 8L h<sup>-1</sup>, 7h día<sup>-1</sup>), la densidad de inóculo de *V. dahliae* en el suelo próximo a los goteros se podía ver incrementada hasta un 400% con respecto a la detectada en suelo alejado de ellos. Santos-Rufo *et al.* (2017a) observaron una mayor densidad de esclerocios (>333,3%) en suelos mantenidos a un rango de humedad bajo (65% capacidad de campo) que en aquellos mantenidos a un rango de humedad alto (capacidad de campo) en un experimento de 19 meses realizado con suelo artificialmente infestado y en condiciones al aire libre. En ese mismo trabajo, la viabilidad de otras estructuras de *V. dahliae* menos persistentes en el suelo (conidias y micelio) se vio más afectada por la frecuencia de riego (mayor reducción con riegos diarios) y no tanto por la cantidad de agua aplicada.

El riego favorece además un mayor crecimiento de raíces finas en los estratos de suelo en los que el patógeno está más presente, aumentando por tanto la probabilidad de contacto entre las estructuras infectivas de *V. dahliae* y el sistema radicular del huésped (Fernández *et al.*, 1991; Xiao & Subbarao, 2000). También hay que considerar que el agua en el suelo afecta a la transpiración de la planta y, por tanto, al movimiento de micelio y conidias de *V. dahliae* en el xilema y/o a la capacidad del huésped para resistir la colonización sistémica (Pennypacker *et al.*, 1991; Arbogast *et al.*, 1999). En una investigación realizada por Pérez-Rodríguez *et al.* (2015a) se estudió la influencia de varias

frecuencias de riego (Diaria, Semanal, Quincenal y Deficitaria) en el inicio y desarrollo de la enfermedad sobre tres cultivares de olivo con diferente nivel de resistencia a VO ('Picual' < 'Arbequina' < 'Frantoio') dispuestos en microparcels con suelo naturalmente infestado. Observaron que el comienzo de la epidemia no difirió entre tratamientos para los cultivares 'Picual' y 'Arbequina', aunque a largo plazo (dos años tras la plantación) el riego diario favoreció un mayor desarrollo de la VO en los plantones 'Picual'. Sin embargo, estos mismos autores encontraron resultados diferentes cuando trasladaron el estudio a condiciones de campo en dos olivares naturalmente infestados. En este caso, la evolución de la enfermedad fue siempre significativamente mayor en árboles sometidos a riego que a secano, pero no se observaron diferencias entre las frecuencias de riego evaluadas (diaria o quincenal) (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2016a). Santos-Rufo *et al.* (2017a, 2017b) estudiaron la triple interacción entre régimen de riego (3 frecuencias y 2 dosis estudiadas), morfofisiología del olivo, y Verticilosis en olivos jóvenes 'Picual' crecidos durante 3 años en macetas conteniendo suelo infestado artificialmente con *V. dahliae* o suelo libre de patógeno. Entre las frecuencias de riego estudiadas (diaria, semanal y combinada), la aplicación diaria de agua fue la que promovió un mayor crecimiento (longitud de brotes, área foliar y biomasa) y un menor estrés hídrico de la planta, coincidiendo con una menor incidencia de enfermedad y de infección en olivos dispuestos en suelo infestado. Igualmente, el riego a dosis alta (manteniendo el suelo a capacidad de campo) condujo a un menor crecimiento de brotes y un menor desarrollo de biomasa radicular con respecto al riego a dosis baja (65% capacidad de campo), lo que coincidió con una mayor infección en olivos expuestos al hongo (Santos-Rufo *et al.*, 2017b).

#### 1.4.4.2 Efecto del riego como agente de dispersión de *V. dahliae*

El escenario puede volverse aún más complejo si se considera un segundo agravante: la utilización de agua de riego infestada por *V. dahliae*. Se tiene constancia desde hace años que el riego por escorrentía puede favorecer la dispersión de *V. dahliae* en parcelas infestadas de cultivos susceptibles (Easton *et al.*, 1969; Thanassoulopoulos *et al.*, 1980). Trabajos más recientes en Andalucía y el Líbano han demostrado que las aguas recogidas de ríos, arroyos y embalses naturales, así como de balsas, canales y pozos de riego, puede



albergar y dispersar eficientemente diferentes propágulos de *V. dahliae* en áreas con un tradicional cultivo de huéspedes del patógeno (Rodríguez-Jurado & Bejarano-Alcázar, 2007; García-Cabello *et al.*, 2012; Baroudy *et al.*, 2018).

En Andalucía, se realizó un seguimiento temporal (2004-2005) del agua de riego de 33 campos de olivo afectados por la Verticilosis distribuidos por las provincias de Jaén y Sevilla, y regados con agua subterránea (de pozo) o superficial embalsada de origen en el río Guadalquivir. En las muestras de agua tomadas desde marzo hasta julio del 2004 no se detectó a *V. dahliae*, debido posiblemente al pequeño volumen de agua analizada a la salida de los goteros (120 muestras de 0,5 L de agua). Por el contrario, el análisis de 80 muestras de 1.000 L de agua recolectadas en la cabecera de riego desde febrero hasta abril del 2005 puso de manifiesto la presencia de propágulos del hongo en el agua del 85,7% de los campos inspeccionados en cada provincia, siendo aislado tanto de agua de pozo como de agua embalsada. Se cuantificaron en el agua de riego dos tipos de estructuras atendiendo a su tamaño: esclerocios ( $\geq 20 \mu\text{m}$ ) y micropropágulos (mayoritariamente conidias y micelio;  $\geq 1,2 \mu\text{m}$  y  $<20 \mu\text{m}$ ), donde las segundas fueron mucho más abundantes que las primeras (3160 vs  $1,5 \text{ m}^{-3}$  de agua, respectivamente) y sus cantidades fluctuaron más con el tiempo (Rodríguez-Jurado & Bejarano-Alcázar, 2007).

En trabajos posteriores, Moraño-Moreno *et al.* (2008) exploraron el nivel de infestación de las aguas en diferentes campañas de riego. Las aguas de riego de un total de 37 campos de olivo, afectados por la Verticilosis, distribuidos por las provincias de Córdoba, Jaén y Sevilla, fueron muestreadas durante los años 2006 y 2007. Los campos se abastecían de agua procedente de pozos o de aguas superficiales embalsadas o canalizadas a partir de diferentes ríos. Los resultados mostraron que *V. dahliae* estaba presente en el agua de riego del 86-93% de los campos según el año de prospección y la provincia considerada. La variabilidad de infestaciones de agua entre campos en cada año y entre años en cada campo, no permitió discernir patrón repetible alguno. Es de destacar que la utilización de agua infestada por el hongo se dio en el 100% de los campos que regaron con agua procedente de recursos subterráneos (Moraño-Moreno *et al.*, 2008).

Más recientemente, García-Cabello *et al.* (2012) investigaron la presencia y dispersión de esclerocios de *V. dahliae* a través de las instalaciones de riego de una comunidad de regantes (Genil-Cabra) que abastece a casi 5000 ha de cultivos huéspedes del patógeno en la provincia de Córdoba. Se comprobó que el hongo sobrevive y es dispersado eficazmente desde la estación de bombeo hasta la salida del gotero a pie de finca, donde pudieron detectarse hasta 3,75 esclerocios m<sup>-3</sup> de agua dispensada. Esta comprobación podría explicar, en parte, la notable influencia que tiene la dosis de riego sobre la VO en los campos de olivo de dicha comunidad. Pérez-Rodríguez *et al.* (2015b), vieron como parcelas con un alto consumo (2400-1800 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>) presentaban valores significativamente más altos de incidencia de enfermedad (21,4%) que aquellas con una dosis reducida (1400-500 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>; 13,3% de incidencia).

La infestación del agua de riego supone una preocupación extra si se tiene en cuenta la mayor presencia del patotipo D frente al ND en las aguas de varias campañas de riego en Andalucía. Rodríguez-Jurado *et al.* (2008) encontraron una proporción significativamente mayor de aislados D (81%) que ND (12%) en aguas de riego de olivo y algodón en las provincias de Córdoba, Jaén y Sevilla. Moraño-Moreno *et al.* (2011) caracterizaron sobre olivo ('Picual') la virulencia de 150 aislados de *V. dahliae* tomados de aguas de riego subterráneas y superficiales de olivares andaluces. En dicho trabajo se observó una virulencia gradual que pudo ordenarse, de mayor a menor, en 6 grupos: DO1 > DO2 > DO3 (patotipo D) > NDO1 > NDO2 > NDO3 (patotipo ND). Los grupos de virulencia intermedia identificados para los patotipos D y ND se correspondieron con los dos grupos previamente conocidos (o grupos a los que pertenecen los aislados que fueron utilizados de referencia) y fueron en conjunto los más frecuentes en las aguas de riego de olivar. El grupo de aislados de mayor virulencia (DO1) fue detectado únicamente en aguas de riego subterráneas en Córdoba y Sevilla, mientras que las aguas superficiales albergaron mayormente aislados del patotipo D de referencia (DO2) (Moraño-Moreno *et al.*, 2011).

Como se ha mencionado anteriormente, la dispersión a través del agua de riego podría explicar la predominancia del patotipo D entre los aislados de *V. dahliae* que infectan olivo en Andalucía. Muchas de las balsas y pozos utilizados para el riego de olivar se emplean también para otros cultivos huéspedes del

patógeno. Por todo ello, la implementación de medidas dirigidas al control (integrado) del hongo en el agua de riego parece cobrar especial relevancia para el manejo eficiente de la Verticilosis en Andalucía.

## **1.5 Actuaciones frente a la Verticilosis del olivo. Manejo integrado de la enfermedad**

La naturaleza de *V. dahliae* (ver apartado 1.3), los diversos medios de dispersión, la prolongada exposición del olivo al inóculo del patógeno en el suelo y la limitada eficacia individual de los métodos disponibles contra la enfermedad justifica la necesidad de integrar todas las medidas de actuación posibles. El manejo integrado de la enfermedad combina intervenciones antes y después de la plantación que prevengan la introducción y dispersión del patógeno (exclusión), reduzcan los niveles de inóculo en el suelo (erradicación), o reduzcan la eficacia infectiva de éste (escape = protección + resistencia) (Bejarano-Alcázar, 2005; López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011; Jiménez-Díaz *et al.*, 2012).

### **1.5.1 Medidas a adoptar antes de la plantación**

#### *1.5.1.1 Medidas de exclusión y resistencia*

La utilización de suelo libre de patógeno y la elección de material vegetal no infectado son algunas de las medidas claves para limitar la extensión de la enfermedad.

La utilización de suelo y/o sustrato infestado por *V. dahliae* en viveros de olivo, así como la plantación de olivos jóvenes en terrenos infestados por el hongo es un factor de riesgo para la pérdida de plantones y la ocurrencia de graves epidemias en los años siguientes a la plantación. Para una elección adecuada del lugar de plantación se debe contar con información precisa sobre el estado fitosanitario del suelo. Es desaconsejable establecer la plantación en campos cercanos a cultivos susceptibles a *V. dahliae*, particularmente algodónero, así como totalmente desaconsejable hacerlo en campos en los que éstos se hayan cultivado históricamente (Jiménez-Díaz *et al.*, 2012; Hiemstra,

2015). En cualquier caso, la exploración cuantitativa (densidad de inóculo) y cualitativa (virulencia de las poblaciones presentes) del grado de infestación del suelo por *V. dahliae* es importante para evaluar el riesgo de enfermedad en los primeros años tras la plantación. López-Escudero & Blanco-López (2007), en su estudio relacionando nivel de inóculo de patotipo D y desarrollo de enfermedad, observaron que densidades de 0,4-1 propágulo g<sup>-1</sup> podían ocasionar una incidencia media de enfermedad del 11% en plantones 'Picual'. Estos autores concluyeron que en suelos infestados por el patotipo D es desaconsejable la plantación de cultivares susceptibles (López-Escudero & Blanco-López, 2007). En el caso del patotipo ND, siguiendo lo observado en algunas fincas comerciales de olivar (Roca *et al.*, 2015), y tomando el criterio establecido en viveros de especies leñosas susceptibles a la Verticilosis en Holanda y Alemania, podría aceptarse la densidad de 1-2 esclerocios por gramo de suelo como umbral de riesgo (Hiemstra, 2015).

La elección de la variedad es de suma importancia a la hora de realizar la plantación. Además de los factores climáticos, edáficos y agronómicos, la resistencia o susceptibilidad del cultivar determinará en gran medida la producción y los costes del cultivo. La utilización de cultivares o portainjertos resistentes a la VO debe ser punta de lanza en la lucha integrada contra la enfermedad por ser una medida relativamente efectiva, económicamente viable y respetuosa con el medioambiente (López-Escudero & Mercado-Blanco, 2011; Jiménez-Díaz *et al.*, 2012). Hasta ahora, la resistencia a la VO ha sido evaluada en un importante número de cultivares de interés económico, destacando como aquellos de mayor resistencia los españoles 'Empeltre' y 'Changlot Real', el americano 'Allegra', el italiano 'Frantoio', o el griego 'Kalamon' (Trapero-Casas *et al.*, 2017, y sus referencias). Además, desde el 2008 la resistencia a la VO se incluye como carácter de interés en el Programa de Mejora del Olivo llevado a cabo en Córdoba desde 1991. Ello está permitiendo la evaluación de numerosos genotipos fruto de cruzamientos entre variedades, acebuches y otras especies del género *Olea* con el objeto de seleccionar futuras variedades resistentes a esta enfermedad (Trapero, 2014; Arias-Calderón, 2015). La resistencia está siendo estudiada también mediante el uso de portainjertos provenientes de variedades cultivadas resistentes (Valverde-Caballero *et al.*, 2016) o de material

silvestre resistente, estando los de este último ya comercializados (Jiménez-Díaz, 2018).

Independientemente del cultivar elegido, la utilización de material de plantación libre del patógeno deber ser una medida imperante a la hora de establecer la explotación. En el caso del olivo, los requisitos para la producción de material de multiplicación y plantas de vivero certificadas incluyen la utilización de sustrato libre de *V. dahliae* y el cercioramiento por diagnóstico visual (Conformitas Agraria Communitatis) del uso de plantas madre libres de síntomas de Verticilosis (RD 1678/1999 de 29 de octubre). No obstante, la presencia de infecciones asintomáticas puede escapar a esta metodología. Por ello se están desarrollando protocolos o kits de diagnóstico que permiten la identificación precoz de la enfermedad mediante detección inmunológica de una proteína de olivo señalizadora de la infección por *V. dahliae* (Leyva-Pérez et al., 2015).

#### 1.5.1.2 Medidas de erradicación y protección

Reducir la densidad de inóculo en el suelo o proteger a la planta de la infección en sus primeras etapas de crecimiento son actuaciones que incidirán positivamente sobre el cultivo si éste se pretende disponer en suelo infestado. Atendiendo al nivel de *V. dahliae* estimado en el suelo y a la rentabilidad esperada del cultivo, se puede optar por la desinfestación del suelo por medio de métodos culturales, biológicos, físicos, o químicos.

Algunas prácticas culturales pasan por retrasar la plantación y sembrar durante varios años especies no susceptibles al patógeno como las gramíneas maíz, trigo, y cebada, o las liliáceas ajo y cebolla. De esta manera se pretende impedir el incremento de las poblaciones de *V. dahliae* en el suelo a la vez que se puede estar favoreciendo a las poblaciones microbianas antagonistas existentes en el suelo. Por otro lado, la siembra, picado y enterrado en verde (biofumigación) de ciertas especies de crucíferas cultivadas y silvestres han mostrado un potencial alto para reducir al patógeno en el suelo (Bejarano-Alcázar et al., 2008; Jurado-Bello et al., 2013).

La técnica de cubrir el suelo, previamente humedecido, con láminas de polietileno durante el verano (solarización) ha resultado eficaz para reducir

poblaciones de *V. dahliae* en diferentes cultivos herbáceos antes de la siembra (Pegg & Brady, 2002). En el caso del olivar, el alto coste de la solarización impide que sea usada a gran escala en pre-plantación, y restringe su uso a tratamientos puntuales, individuales o parciales (López-Escudero & Mercado-Blanco, 2011; Jiménez-Díaz *et al.*, 2012).

Tradicionalmente, la utilización de fumigantes químicos (cloropicrina, bromuro de metilo, metam-sodio, dazomet, formalina, entre otros) ha permitido la desinfestación eficaz del suelo antes de la siembra de cultivos herbáceos. Sin embargo, su uso generalizado y/o adaptación a cultivos leñosos está limitada la prohibición o rechazo en determinados países, el alto coste de la aplicación, y la ineficacia para erradicar al hongo en capas profundas del suelo (Pegg & Brady, 2002).

En las dos últimas décadas ha habido un interés creciente en el control biológico de la VO mediante la utilización de microorganismos beneficiosos y antagonistas. Entre las bacterias estudiadas, la cepa HRO-C48 de *Serratia plymuthica* (Müller *et al.*, 2008) o la K165 de *Paenibacillus alvei* (Markakis *et al.*, 2016) han mostrado un efecto prometedor frente a la enfermedad debido a la rápida y prolongada colonización de la rizosfera del olivo que impide o dificulta las infecciones por *V. dahliae*. La cepa endófito PICF7 de *Pseudomonas fluorescens* también es efectiva frente a la VO causada por el patotipo D bajo condiciones controladas y semicontroladas (Mercado-Blanco *et al.*, 2004; Prieto *et al.*, 2009). Entre los hongos estudiados, el género *Trichoderma* es el que ha adquirido mayor importancia dentro del control biológico de la VO. De hecho, el único bioformulado que está actualmente comercializado como agente de biocontrol para uso en plantas de vivero es una mezcla de dos especies, *T. asperellum* y *T. gamsii* (Jiménez Díaz *et al.*, 2009). Por último, estudios recientes han identificado varios aislados y mezclas de microorganismos con carácter antagonista frente a *V. dahliae*. Entre ellos, un aislado no patogénico de *Fusarium oxysporum* (FO12) logró prevenir la aparición de la enfermedad en casi el 100% de los casos. Este aislado redujo también la VO cuando fue aplicado en pulverización sobre la parte aérea del olivo, por lo que además del efecto directo sobre el patógeno habría que atribuirle un efecto de resistencia inducida en el huésped (Varo *et al.*, 2016b).

## 1.5.2 Medidas a adoptar después de la plantación

### 1.5.2.1 Medidas de exclusión y erradicación.

Muchas de las malas hierbas que crecen de manera espontánea en el olivar son huéspedes de *V. dahliae*, por lo que evitar su proliferación dificultará la supervivencia, multiplicación y dispersión del patógeno (Thanassouloupoulos, 1981; Frederick *et al.*, 2017). El laboreo convencional es un sistema de manejo de suelo que controla eficazmente las plantas adventicias, pero favorece la erosión y dispersión del patógeno al desplazar partículas de suelo infestado. Las especies *Brassica carinata* y *Sinapis alba*, crucíferas de interés agronómico por su utilidad como cubiertas vegetales en olivar, han resultado eficaces para reducir al hongo en el suelo y la enfermedad en olivo tras ser añadidas como enmiendas en verde al suelo en condiciones de campo (Jurado Bello *et al.*, 2013). Otras enmiendas orgánicas como el compost de orujo de vid y sustancias naturales como el aceite esencial de tomillo (*Thymus* sp.) han mostrado potencial para reducir parcialmente la enfermedad (Varo-Suarez, 2017).

La poda y eliminación de brotes y ramas sintomáticas (mediante la quema y nunca mediante picado) es una práctica más que recomendable para evitar la dispersión del hongo intra e inter-olivar. La eliminación de hojas defoliadas debería también contemplarse principalmente en el caso de epidemias causadas por el patotipo D ya que también constituyen una fuente importante de inóculo (Navas-Cortés *et al.*, 2008).

La técnica de la solarización puede ser muy efectiva a la hora de controlar focos bien definidos de inóculo (erradicación), así como para favorecer la recuperación de árboles con sintomatología ligera en plantaciones ya establecidas y el desarrollo de antagonistas en el suelo (Tjamos *et al.*, 1991; López-Escudero & Blanco-López, 2001).

La aplicación de medidas de control químico, como los fungicidas sistémicos, para eliminar o reducir al hongo en la planta ha reportado resultados favorables en muchos cultivos herbáceos, pero su uso en cultivos leñosos es de poca utilidad (Pegg & Brady, 2002, y sus referencias). En el caso del olivo, la

aplicación al pie del árbol, la aplicación foliar o la inyección en el tronco de diferentes fungicidas ha resultado ineficaz para controlar la enfermedad en condiciones de campo (López-Escudero & Mercado-Blanco, 2011; Jiménez-Díaz *et al.*, 2012, y sus referencias).

#### 1.5.2.2 Medidas de escape

El estado nutritivo de la planta, en particular un exceso de nitrógeno o una deficiencia en potasio, es un factor que puede influir en la susceptibilidad a la Verticilosis en muchos cultivos (Pegg & Brady, 2002). En el caso de olivar, se ha visto que la fertirrigación con abonos hidrosolubles a base de  $\text{NO}_3\text{Ca}$  o N-P-K 15-15-15% pueden incrementar el desarrollo de VO en el cultivar 'Picual' comparado con la ausencia de abonado (Pérez-Rodríguez, 2016b). Por el contrario, Abu-Qamar & Al-Raddad (2001) observaron una menor severidad de síntomas y menor porcentaje de infección en olivos 'Nabali' fertilizados a base de NPK 15:15:15 ( $150 \text{ g árbol}^{-1}$ ) que en olivos no fertilizados. Estos autores concluyeron que la fertilización puede favorecer a un mayor fortalecimiento del olivo y a una mayor resistencia frente a infecciones radiculares del patógeno.

El manejo del riego puede también influir en el desarrollo de la VO al afectar el nivel de inóculo de *V. dahliae* en el suelo al tiempo que modifica el crecimiento y la fisiología en el árbol (ver apartado 1.4.4.1). Cubrir las necesidades del cultivo a partir de pequeñas cantidades de agua aplicadas con alta frecuencia en combinación con cultivares resistentes parece ser la mejor estrategia para favorecer el escape a las infecciones vasculares y minimizar el desarrollo de la enfermedad (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2015b, 2016a; Santos-Rufo *et al.*, 2017a, 2017b).

La resistencia del cultivar también puede ser considerada como medida disponible una vez establecida la plantación. La sustitución de árboles muertos o afectados por cultivares con cierto grado de resistencia a la VO permitirá reducir la eficacia del inóculo para causar enfermedad, así como el aporte de inóculo al suelo y su incremento en el mismo.



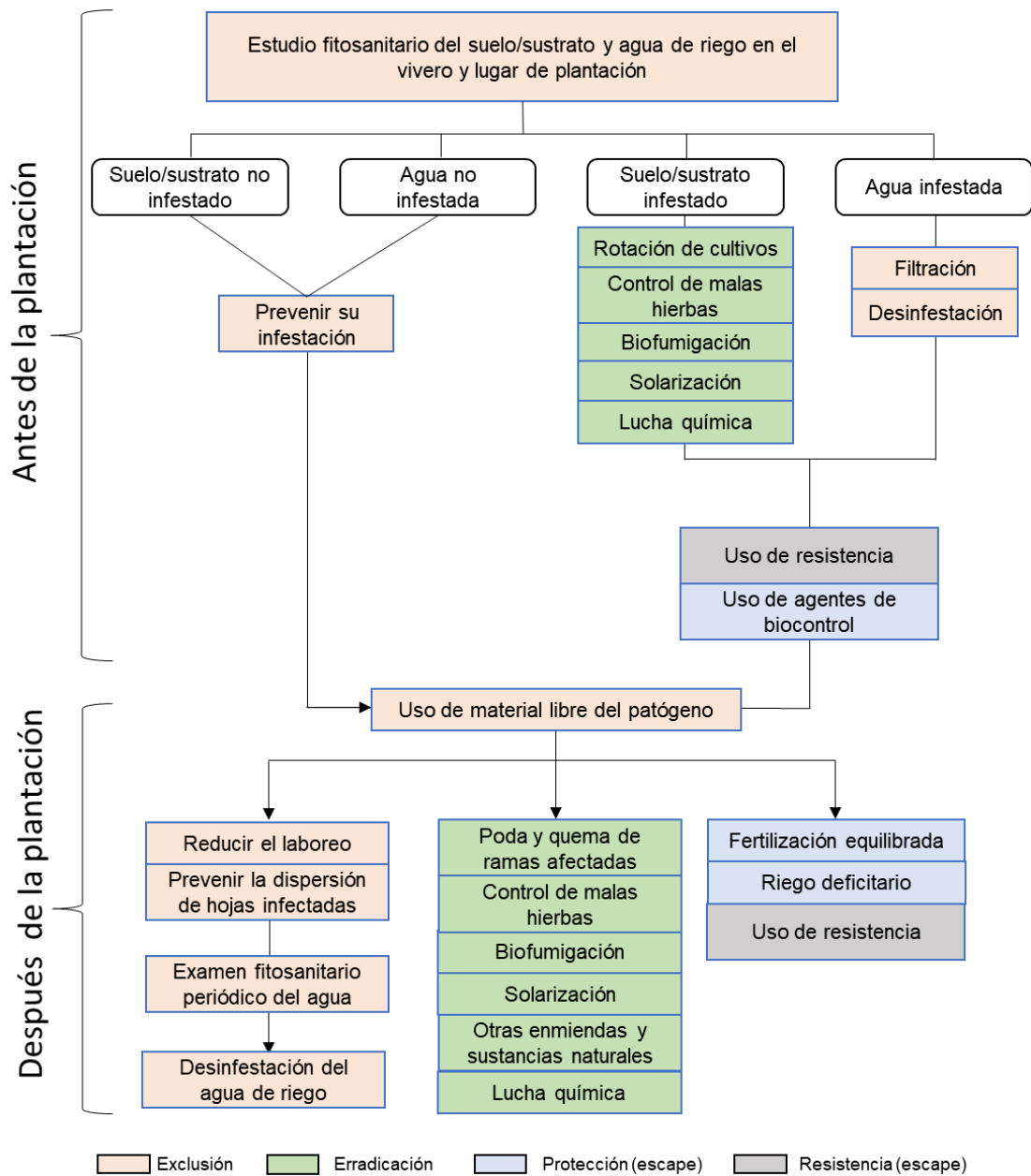
### **1.5.3 Medidas a adoptar escasamente investigadas: exclusión y erradicación de *V. dahliae* en el agua de riego**

Como se ha comentado anteriormente, las aguas de riego de olivar y otros cultivos huéspedes de *V. dahliae* pueden estar infestadas por aislados del patógeno de distinta virulencia en olivo (ver apartado 1.4.4.2).

La primera medida que ha de adoptarse, siguiendo la misma recomendación que para el suelo, sería examinar el grado cuantitativo y cualitativo de infestación del agua disponible para el riego tanto a nivel de vivero como en la propia explotación. La fluctuación en el tiempo de la presencia y cantidad de propágulos requiere un seguimiento adecuado (Rodríguez-Jurado & Bejarano-Alcázar, 2007). En circunstancias en las que el seguimiento indicado no fuese posible, las medidas de control dirigidas al agua deberían concentrarse en los meses favorables para el desarrollo de enfermedad.

Una vez se tiene constancia de la presencia del patógeno en las fuentes de agua disponibles, lo más recomendable sería prescindir del riego, o reducirlo, en la medida de lo posible. De lo contrario, las actuaciones deben ir dirigidas a prevenir, suprimir o reducir los niveles de inóculo en el sistema de riego. Varios métodos de desinfestación han sido evaluados para erradicar a *V. dahliae* en el agua de sistemas de cultivo intensivo con circuito de riego cerrado. El tratamiento del agua con calor, ozonización, o radiación ultravioleta fue efectivo para reducir el aporte de conidias y micelio del hongo, pero su efecto fue irregular frente a esclerocios (Ehret *et al.*, 2001, y sus referencias). En un mismo sistema cerrado de cultivo, Martínez *et al.* (2009) evidenciaron que los filtros de arena no impiden la dispersión de esclerocios del patógeno. Este tipo de filtros de arena son ampliamente utilizados en el riego localizado del olivar en Andalucía e igualmente se ha observado que son insuficientes para prevenir la incorporación de esclerocios de *V. dahliae* al suelo del olivar (hasta 3,75 esclerocios m<sup>-3</sup> de agua dispensada por el gotero; García-Cabello *et al.*, 2012). Por último, en un estudio reciente, se ha observado que los filtros de malla, también utilizados en el olivar andaluz, retienen los propágulos de *V. dahliae* con mayor eficacia que los de arena, pero tampoco impiden la llegada de esclerocios al suelo del cultivo (Baroudy *et al.*, 2018).

La ineficacia de las barreras físicas a la hora de prevenir la llegada de *V. dahliae* al cultivo motiva la exploración de otras medidas para el manejo del patógeno en el agua de riego. El tratamiento químico del agua de riego mediante desinfectantes tradicionales (p.e. aquellos a base de cloro, bromo o yodo), o con productos alternativos de bajo impacto medioambiental (p.e. aquellos a base de peróxido de hidrógeno, ozono, ácido peracético, surfactantes, etc.) es un método ampliamente explorado para otros patógenos (Hong & Moorman, 2005; Stewart-Wade, 2011). Los agricultores en Andalucía están familiarizados con el tratamiento químico del agua para fines tales como el mantenimiento de balsas y/o líneas de goteros o la propia fertirrigación del cultivo. Aprovechando este escenario, el Área de Protección Sostenible de Cultivos del IFAPA (Córdoba) se comprometió hace unos años a explorar la desinfestación química del agua de riego como medida adicional dentro del manejo integrado de la VO.



**Figura 1.3** Estrategia de lucha integrada contra la Verticilosis del olivo (Adaptado de López-Escudero & Mercado-Blanco, 2011, y Hiemstra *et al.*, 2015).

## 1.6 Objetivos de la Tesis doctoral

Santos-Rufo *et al.* (2016) constataron el potencial de varios desinfectantes basados en agentes oxidantes y no oxidantes en reducir las conidias de *V. dahliae* en agua embalsada. El efecto de la aplicación de los desinfectantes sobre las estructuras de supervivencia del hongo presentes también en las aguas de riego, y las diferentes opciones de aplicabilidad de los desinfectantes al agua (tratamiento en la balsa de riego o inyección en la red de

riego) no fueron consideradas en el trabajo citado. Además, dado que el destino final del agua tratada será el suelo y el olivo, es oportuno explorar el efecto que ésta pueda tener sobre la densidad de inóculo de *V. dahliae* en el suelo, sobre el desarrollo de la enfermedad, y sobre el propio olivo.

Por todo ello, se plantearon cuatro objetivos principales para cuya consecución se abordaron una serie de objetivos específicos:

1. Evaluar la eficacia potencial de la desinfestación química frente a infestaciones del agua por esclerocios de aislados de *Verticillium dahliae* con distinto nivel de virulencia en olivo (capítulo 2).

1.1. Valorar *in vitro* la eficacia supresiva frente a esclerocios de *V. dahliae* en agua de desinfectantes eficaces en reducir las infestaciones del agua por conidias (el agua infestada se trató).

1.2. Valorar *in vitro* la eficacia preventiva frente a esclerocios de *V. dahliae* del tratamiento de agua con los desinfectantes y las concentraciones de mayor potencial supresivo (el agua se trató y subsecuentemente se infestó).

2. Evaluar el efecto de la aplicación al suelo de tratamientos que desinfectan el agua sobre la Verticilosis del olivo en condiciones de ambiente controlado (capítulo 3).

2.1. Evaluar el potencial de varios tratamientos desinfectantes para reducir la densidad de inóculo de diferentes aislados de *V. dahliae* en el suelo y el desarrollo de Verticilosis en cultivares de olivo de distinto nivel de susceptibilidad a la enfermedad.

2.2. Determinar el efecto de varios tratamientos desinfectantes sobre el crecimiento, e identificar indicios de fitotoxicidad en diferentes cultivares de olivo.

3. Determinar la eficacia de la inyección de desinfectantes en el sistema de riego para prevenir la introducción de *V. dahliae* y/o su acumulación en el suelo (capítulo 4).

- 3.1. Valorar el efecto de los desinfectantes inyectados en el sistema de riego por goteo sobre el nivel de inóculo de *V. dahliae* en agua y en suelo en distintas estaciones.
  - 3.2. Determinar la patogenicidad sobre olivo del inóculo tratado incorporado al suelo en los experimentos del objetivo anterior en condiciones de ambiente controlado.
4. Determinar el efecto de la aplicación de desinfectantes a través del riego sobre la Verticilosis del olivo en condiciones de ambiente natural (capítulo 5).
- 4.1. Valorar distintas estrategias de riego por goteo con concentraciones seleccionadas de desinfectantes por su eficacia para reducir los niveles de inóculo de *V. dahliae* en el suelo.
  - 4.2. Determinar la eficacia de las estrategias de riego anteriores para reducir el desarrollo de la Verticilosis en el cultivar de olivo más extendido en Andalucía.
  - 4.3. Determinar el impacto de las estrategias de riego con desinfectantes valoradas en los objetivos anteriores en el crecimiento y la producción del olivo.



## Capítulo

## 2

### Suppressive and preventive activity of chemical disinfectants against sclerotia of *Verticillium dahliae* in water

**Authored by** Francisco J Gómez-Gálvez<sup>a</sup>, Enrique Vargas-Osuna<sup>b</sup>, and Dolores Rodríguez-Jurado<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Plant Pathology, Area of Sustainable Crop Protection, Andalusian Institute of Agricultural Research and Training (IFAPA), Centro 'Alameda del Obispo', Apartado 3092, 14080 Córdoba, Spain

<sup>b</sup>Department of Agricultural and Forestry Sciences and Resources, University of Cordoba, Spain

**Published in** Crop Protection 108 (2018) 12-22

## 2.1 Abstract

Disinfectants have been widely assessed against conidia, zoospores and mycelial growth of fungal plant pathogens in water, however, studies against sclerotia or melanized structures are limited. The disinfectants OX-VIRIN®, OX-AGUA AL25® and Deccoklor® reduce *Verticillium dahliae* conidia in water, but their potential efficacy in reducing sclerotia of the pathogen in water remains unknown. In this study, sclerotia of six *V. dahliae* isolates differing in virulence were exposed *in vitro* to a range of concentrations of the mentioned disinfectants for 30 days to evaluate the suppressive efficacy. In addition, concentrations with higher suppressive effect were tested for their preventive efficacy by means of assays where treated water was subsequently infested. Concentration and monitoring time (1 min, and 5, 15 and 30 days post-chemical treatment; dpc) were the critical factors for the efficacy of the chemicals, whereas variations depending on isolates virulence were negligible. The three highest concentrations of OX-VIRIN® (3.2-51.2 mL L<sup>-1</sup>) and the two highest concentrations of OX-AGUA AL25® (0.4175 and 1.2525 mL L<sup>-1</sup>) showed an average suppressive efficacy ranging from 87.8-100 % and 99.2-100 % at the last three sampling times, respectively. Deccoklor® was ineffective at the evaluated concentrations. The three highest concentrations of OX-VIRIN® and the highest concentration of OX-AGUA AL25® maintained a preventive efficacy above 97 and 95 %, respectively, at all sampling times. For OX-AGUA AL25® at 0.4175 mL L<sup>-1</sup>, the preventive efficacy fluctuated over sampling time, but it was of at least 68.9 % at 30 dpc in repeated experiments.



## Capítulo **3**

### **Potential efficacy of soil-applied disinfectant treatments against *Verticillium* wilt of olive**

**Authored by** Francisco J Gómez-Gálvez, and Dolores Rodríguez-Jurado

Laboratory of Plant Pathology, Area of Sustainable Crop Protection, Andalusian Institute of Agricultural Research and Training (IFAPA), Centro 'Alameda del Obispo', Apartado 3092, 14080 Córdoba, Spain

**Published in** Crop Protection 106 (2018) 190-200



### 3.1 Abstract

Disinfestation of irrigation water has re-emerged the interest in including disinfectant treatments within the integrated management of *Verticillium* wilt of olive to reduce the pathogen spread and introduction through irrigation facilities. OX-VIRIN® (OV) and OX-AGUA AL25® (OA) are two disinfectants based on oxidizing and non-oxidizing agents, respectively, that have shown a potential efficacy reducing water infestations by *V. dahliae* under certain guidelines. This investigation was designed to evaluate now their effects on *V. dahliae* in the soil, the olive plant and the plant-pathogen interaction under growth chamber conditions. Seven disinfectant treatments were applied through watering to *V. dahliae*-infested soils sustaining 'Picual' or 'Arbequina' olives. The OV-w (weekly), OV-m (monthly) or OA-b (biweekly) treatments reported a significant deleterious effect in the total inoculum density in soil and reduced or tended to decrease the sclerotia survival of all *V. dahliae* isolates (three isolates used) in presence of both cultivars in all the experiments (two experiments per cultivar were carried out). 'Picual' olives exhibited a greater disease incidence than 'Arbequina' ones. The incidence of diseased plants was lower in olives subjected to disinfectant treatments in comparison with those under untreated control, with a maximum reduction of 21.1 % and 43.4 % in 'Picual' and 'Arbequina', respectively. OV-w or OA-b treatments applied to 'Picual' and OV-w treatment to 'Arbequina' decreased partially but solidly (all experiments per cultivar) the disease intensity index. Furthermore, values from the area under the disease progress curve were significantly reduced by OV-m and OA-b treatment in both 'Picual' experiments, depending on the isolate. The olive growth parameters were not significantly affected by the disinfectants and an absence of phytotoxicity was reported. Results from this work demonstrate that disinfection treatments reducing the fungus in water can also potentially reduce the fungus in soil and, partially, the *Verticillium* wilt in olive.



## Capítulo **4**

### Reduced introduction of *Verticillium dahliae* through irrigation systems and accumulation in soil by injection of peroxygen-based disinfectants

**Authored by** Francisco J Gómez-Gálvez<sup>a</sup>, Juan C Hidalgo-Moya<sup>b</sup>, Javier J Hidalgo-Moya<sup>b</sup>, Victorino Vega-Macías<sup>b</sup>, and Dolores Rodríguez-Jurado<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Plant Pathology, Area of Sustainable Crop Protection; and <sup>b</sup>Area of Agrifood Engineering and Technology, Andalusian Institute of Agricultural Research and Training (IFAPA), Centro 'Alameda del Obispo', Apartado 3092, 14080 Córdoba, Spain

Plant Pathology (2018). **In press**: [doi.org/10.1111/ppa.12917](https://doi.org/10.1111/ppa.12917)

## 4.1 Abstract

Controlling *Verticillium dahliae* through irrigation systems should be an important measure within integrated management of verticillium wilt of olive in Spain. Pathogen content of water infested by *V. dahliae* conidia and sclerotia can be diminished following *in vitro* treatments with the disinfectants OX-VIRIN® and OX-AGUA AL25®. Three concentrations per disinfectant were assessed for their effectiveness under operational conditions of modern irrigated olive orchards. Sterilized potted soil was drip-irrigated with conidia- or sclerotia-containing water that was pumped from a storage tank and disinfected (or not, control) within the pipelines via metering pumps. The trial was carried out in autumn and spring for each type of propagule infesting the water. The inoculum dispensed through drippers and the total inoculum density accumulated in soil were estimated. Furthermore, the treated residual inoculum in soil was assessed for pathogenicity on olive plants. Conidial incorporation in soil was prevented by most disinfectant treatments in spring; while for sclerotia, prevention was observed only at the highest OX-VIRIN® (51.2 mL L<sup>-1</sup>; in both seasons) and OX-AGUA AL25® (11.27 mL L<sup>-1</sup>; in autumn) concentration. The remaining disinfectant treatments reduced conidia and sclerotia accumulation in soil by over 99% and 95%, respectively. Season particularly impacted the efficacy of lower concentrations. Expression of symptoms was not observed in olive plants grown in previously treated soils. The infectivity of the residual inoculum present in some treated soils was prevented, markedly reduced or limited to the roots. These results provide a novel, interesting and feasible approach in the management of the disease.



## Capítulo

## 5

### **Drip-irrigating with disinfected water reduces *Verticillium dahliae* in the soil and *Verticillium* wilt of olive**

**Authored by** Francisco J Gómez-Gálvez<sup>a</sup>, Victorino Vega-Macías<sup>b</sup>, Juan C Hidalgo-Moya<sup>b</sup>, Javier J Hidalgo-Moya<sup>b</sup>, and Dolores Rodríguez-Jurado<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Plant Pathology, Area of Sustainable Crop Protection; and <sup>b</sup>Area of Agrifood Engineering and Technology, Andalusian Institute of Agricultural Research and Training (IFAPA), Centro 'Alameda del Obispo', Apartado 3092, 14080 Córdoba, Spain

**In preparation for being submitted to Plant Pathology**

## 5.1 Abstract

The application of disinfectants through drip-irrigation could be a feasible practice against *Verticillium* wilt of olive (*Verticillium dahliae* Kleb.). OX-VIRIN® (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + PAA) and OX-AGUA AL25® (QACs + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) are two disinfectants that showed efficacy against *V. dahliae* in irrigation water and a disease-reducing potential in young olive plants. In this work, various application strategies incorporating OX-VIRIN® (once a month, or twice a month in alternate or successive weeks) or OX-AGUA AL25® (once a month, or twice a month in alternate weeks) were assessed post-planting for their effect on *V. dahliae* in soil, *Verticillium* wilt in olive tree, and olive yield, in a two-year pot-experiment under natural environmental conditions. Disinfectants were injected (or not, control+) via metering-pumps into a drip-irrigation system that irrigated olive trees disposed in *V. dahliae*-infested soil (or non-infested, control-). All disinfectant applications significantly reduced the total inoculum density in soil recorded throughout the experiment. The sclerotia density was also significantly reduced by 73.6-86.8%, depending on the treatment. The disease and infection incidence were always lower in treatments subjected to disinfestation. OX-AGUA AL25® applied twice a month in alternate weeks was the treatment that most reduced the symptomatology (by 53.0%) and infection extent (by 70.8%) with respect to control. Soil disinfestation promoted a significantly greater tree recovery from the disease and relieved the reduction in tree growth and production that occurred in infested soils.

## 5.2 Introduction

Verticillium wilt is a vascular disease that causes serious concern to farmers, producers and industries linked to the olive tree crop (*Olea europaea* L.). The occurrence of Verticillium wilt of olive (VWO) has been reported in almost all olive-growing regions of the world, causing losses by death of complete trees or reduction in fruit yield (Jiménez-Díaz *et al.*, 2012). The difficulty in controlling the disease lies in the characteristics of the causal agent, *Verticillium dahliae* Kleb., that include i) parasitic phase within the xylem vessels, ii) formation of melanized, resting structures (sclerotia), iii) broad host range, and iv) virulence variability among populations (López-Escudero & Mercado-Blanco, 2011). Currently, there are not fully effective, singly-applied methods for the management of VWO, so the best strategy relies on the integrated implementation of uncomplete resistant cultivars and biological, physical, and cultural approaches (López-Escudero & Mercado-Blanco, 2011; Jiménez-Díaz *et al.*, 2012).

A well-conceived strategy for the integrated control of VWO must include preventive measures and pre- and post-planting palliative actions. Although the most efficient measures are those applicable before planting, especially the use of resistant cultivars, post-planting measures are increasingly demanded in areas where the VWO is already widely extended (López-Escudero & Mercado-Blanco, 2011). Such is the case of Andalusia, in southern Spain, where the mean disease prevalence was estimated at 34.4 % according to data collected in 3800 olive orchards during the period 2006-2014 (Jimenez-Diaz, 2018). In this region the highly-virulent defoliating (D) pathotype of the fungus prevails and cohabits with D-susceptible olive cultivars, and it has been observed that the disease incidence and occurrence of the D pathotype is significantly higher in irrigated than dry-land orchards (Blanco-López *et al.*, 1984; Rodríguez *et al.*, 2008; López-Escudero *et al.*, 2010; Jiménez-Díaz *et al.*, 2011). Farmers of this region, especially in areas with serious disease outbreaks, are advised to follow actions that prevent the pathogen dispersion within and between exploitations, reduce the pathogen in soil, and minimize the negative impact on the olive tree. Thus, the removal and disposal (never by chopping) of affected tissues, irrigation with *V. dahliae*-free

waters, biofumigation, solarization and use of resistant cultivars, are some of the recommended practices (López-Escudero & Mercado-Blanco, 2011; Jiménez-Díaz *et al.*, 2012). However, these measures are not always implemented because of the increase in production costs or the bias toward native cultivars that, although susceptible, are more agronomically desirable.

One of the factors behind the positive correlation between irrigation and VWO is the dispersal of *V. dahliae* throughout irrigation water. Surface and subterranean water sources for irrigation have proved to be an efficient means for the spread of *V. dahliae* propagules in Andalusia and elsewhere (Rodríguez-Jurado & Bejarano-Alcázar, 2007; García-Cabello *et al.*, 2012; Baroudy *et al.*, 2018). Drip-irrigation represents the most widely used system (95.5%) in Andalusian olive orchards, with new implantations every year (CAPDER, 2015b). This irrigation method allows important water savings in comparison with sprinkler, furrow or flooding irrigation, but requires a higher level of maintenance to avoid drippers clogging (Pastor *et al.*, 2005). Various products based on activated peroxide or quaternary ammonium compounds are commercially available for preventing and reducing biofilm formation in ponded water as well as for cleaning the drip-irrigation pipelines in Spain (De Liñán-Carral & De Liñán-Vicente, 2018). Disinfectants based on these formulations have been assessed for their efficacy in reducing water infestations by *V. dahliae*. OX-VIRIN®, disinfectant based on hydrogen peroxide in combination with peracetic and acetic acid, and OX-AGUA AL25®, algicide composed of hydrogen peroxide and cationic surfactants, have reported effectiveness against the pathogen in water, both under laboratory and natural conditions, and both in still and running water (Santos-Rufo & Rodríguez-Jurado, 2016; Gómez-Gálvez *et al.*, 2018a; Gómez-Gálvez *et al.*, 2018b). Treating irrigation water with this kind of sanitizers could be included as pre-planting or post-planting exclusion action in nurseries or plots using *V. dahliae*-containing water.

Besides the efficacy to reduce the pathogen in water, additional effects once the disinfected water reaches the soil and the olive plant should be considered. To this aim, previous studies conducted with young olive plants under controlled conditions assessed the effect of applying OX-VIRIN®- or OX-AGUA AL25®-treated water on the *V. dahliae* inoculum in soil, the VWO development,

and the occurrence of phytotoxicity. Both products showed potential to reduce the fungus in soil and, partially, the disease development when applied under certain guidelines. Furthermore, the disinfectants were proved to not cause phytotoxicity on olive cultivars ‘Picual’ or ‘Arbequina’ (Gómez-Gálvez & Rodríguez-Jurado, 2018).

Once the previous researches with OX-VIRIN® and OX-AGUA AL25® have provided some aspects aiding in the selection of dosage levels and application strategies, a further research evaluating the effect of the disinfectants in actual use scenarios was pending. In this present work, several treatments applying OX-VIRIN® or OX-AGUA AL25® at different intervals through drip-irrigation were evaluated for their effect on the inoculum density of *V. dahliae* in soil and the VWO development in olive trees, as well as for their impact on the olive tree growth and production, in a two-year experiment conducted under natural environmental conditions of Cordoba, Andalusia.

## **5.3 Materials and methods**

### **5.3.1 *V. dahliae* isolate and inoculum preparation**

The monoconidial VO161-D isolate, provided by the Area of Sustainable Crop Protection of the IFAPA “Alameda del Obispo” Centre (Cordoba, Spain), was used in this study. This isolate was collected from irrigation water and characterized as highly virulent on olive plants in previous studies (Moraño-Moreno *et al.*, 2011).

Agar plugs of stored fungal cultures (plum-extract agar submerged in liquid paraffin at 4°C in darkness) were refreshed on chlortetracycline-amended (30 mg L<sup>-1</sup>) water agar for a week and further subcultured on potato-dextrose agar (PDA, 250 g of potato, 20 g of agar and 20 g of glucose per litre of distilled water) for 14 days, always at 24 ± 1 °C in darkness. Colonized PDA-plugs (0.5 mm in diameter) were transferred thereafter to 1L-flasks containing 450 g of sterilized cornmeal-sand substrate (CSS; cornmeal, sifted sand, and distilled water at 1:9:2, w/w). The infested CSS was incubated at 24±1°C in darkness for 40 days, shaking the flask every 4-5 days to get a redistributed growth.



### **5.3.2 Plant material**

Plant material consisted of one-year-old 'Picual' olive trees. 'Picual' cultivar was chosen on the basis of its wide diffusion in Andalusia and its high susceptibility to D pathotype of *V. dahliae* (López-Escudero *et al.*, 2004; Trapero *et al.*, 2013). Plants were propagated from pathogen-free mature olive trees in active vegetative growth and were not subjected to mycorrhization at the nursery. Olive trees with similar shape and length were selected to be included in the experiment.

### **5.3.3 Application strategies**

Disinfectants OX-VIRIN® and OX-AGUA AL25® (OX-CTA, Spain; hereinafter abbreviated as OV and OA, respectively) were applied at 3.2 and 3.762 mL L<sup>-1</sup>, respectively, following different application strategies: OV applied once a month (OV1), OV applied twice a month in alternate weeks (OV2), OV applied twice a month in successive weeks (OV3), OA applied once a month (OA1), and OA applied twice a month in alternate weeks (OA2). Untreated watering was included as control (C) treatment. Both disinfectants, dosages and application guidelines were chosen according to results obtained in previous assessments under laboratory, growth chamber and natural conditions (Santos-Rufo & Rodríguez-Jurado, 2016; Gómez-Gálvez & Rodríguez-Jurado, 2018; Gómez-Gálvez *et al.*, 2018a; Gómez-Gálvez *et al.*, 2018b).

### **5.3.4 Experiment layout**

A pot trial combining Picual cultivar and VO161-D isolate was conducted under natural environmental conditions for 17 months, comprising two spring-to-fall periods. The experiment was located at the IFAPA 'Alameda del Obispo' Centre in Cordoba (37°51'36" N, 04°48'05" W), Andalusia region, Spain. This location has a continental Mediterranean climate with a mean annual temperature of 18.2 °C, a minimum mean temperature of 11.4 °C during winter, and a maximum mean temperature of 25.1 °C during summer. The mean total annual precipitation is 605 mm with over 95% of it occurring from September to May (AEMET, 2018).

The potting soil preparation, soil infestation, and plant transplant were conducted following the procedure described by Santos-Rufo *et al.* (2017a). Soil consisted of a 2 + 1 (by volume) mix of loam and peat supplemented with basal nutrients and dry heated at 80 °C for 72 h before use. 40 L plastic pots (37.5 cm high and 40 cm in diameter) were used in this experiment. Each pot was filled, except for a central planting hole delimited by a plastic cylinder, with 33.5 kg of inoculum-free soil that was immediately brought to 14% moisture (by weight). This is the amount of available water required in the soil to ensure that olive trees are not affected by water stress symptoms according to previous studies (Santos-Rufo *et al.*, 2017a). At the time of transplanting, one olive tree per pot had their roots washed and transplanted into the planting hole with a homogeneous mixture of potting soil and colonized CSS (6.5 kg; 20:1, w/w). Olive trees transplanted in a mixture of potting soil and pathogen-free CSS were included as control. For the first irrigation, each planting hole was watered to 14% with chemically treated or untreated water depending on the treatment and the plastic cylinder was removed from the center of the pot. Subsequent irrigations were carried out weekly with a variable amount of water determined from weight differences in pots respecting first records at the beginning of the trial. For this, one pot per treatment was permanently maintained on a scale Gram K-AI series (50 g readability, Gram Precision S.L.).

Irrigation system consisted of six polypropylene tubes that supplied water to 24 pots per chemical treatment (12+12; infested + non-infested soil); with three 1.3 L h<sup>-1</sup> compensating emitters equidistantly placed per pot. Each tube was connected to a valve that supplied water from the general network and equipped with a metering pump (Invicta Classic, Baeza S.A.) that injected the disinfectant product within the pipeline when scheduled. Both the valves and metering pumps were controlled by a programmer (Agronic 2000; Sistemas Electronics Progres S.A.); the desired amount of irrigation water was matched by setting the time of valve opening and pump operating. Metering pumps were always programmed to operate few minutes after valve opening. Untreated water was checked for the presence of *V. dahliae* at 3-month intervals during the trial (Rodríguez-Jurado & Bejarano-Alcázar, 2007). Trees were fertirrigated weekly (at different days from assessed disinfestation) with 300-350 mL per pot of Hoagland's nutrient solution.

The appropriate phytosanitary treatments were performed in accordance with local practices.

Soil temperature was recorded hourly by means of temperature probes (Em50 Data Logger®, Decagon Devices, Inc., USA, accuracy  $\pm 1$  °C, resolution 0.1 °C) inserted into one pot per treatment at depths of 15 to 30 cm. Air temperature and rain data were obtained from the meteorological station of the IFAPA 'Alameda del Obispo' Centre, located a few kilometres afar from the experimental site.

The experimental design was a 2 x 6 factorial combination of treatments arranged in a split-plot completely randomized design with four replications per treatment. Each replication consisted of three pots (one tree per pot). The main plot was fungal soil infestation (infested and non-infested soil), and the sub-plot was the application strategy.

### **5.3.5 Disease assessment**

Olive trees were visually inspected for Verticillium wilt symptoms weekly for 17 months after planting. Symptom severity was calculated according to external symptoms (chlorosis, wilting, necrosis or defoliation) using a 0 to 4 scale: 0 = healthy plant; 1 = up to 33% of aerial part affected; 2 = up to 66%; 3 = up to 100%; 4 = plant dead. The disease intensity index (DII, 0–100 %) was determined as  $DII = \sum (S_i \times N_i) / 4N_t \times 100$ , where  $S_i$  is the symptom severity in an individual plant,  $N_i$  is the number of trees with  $S_i$  symptom severity, and  $N_t$  is the total number of trees for each replication. The area under disease progress curve of DII plotted over time (weeks) relative to maximum possible area (SAUDPC, 0–100 %) was calculated following Campbell & Madden (1990). Other parameters considered were the disease-free period (DFP, number of days between transplant and the onset of first symptoms), the final disease incidence (DI, percentage of trees with external symptoms after 17 months) and the final disease intensity index (DII after 17 months). Additionally, the phenomenon of recovery from the disease was addressed according to the incidence of recovered trees (recovery incidence, RI) and the percentage of recovery with respect the maximum DII reached (degree of recovery; DR).

Plant infection was addressed by checking the presence of *V. dahliae* in leaves, twigs, shoots and/or roots, depending on the disease progress. When first symptoms appeared, infection was confirmed by re-isolation of *V. dahliae* from freshly-fallen leaves or affected twigs (10 cm long). When symptom severity was close to plant dead, the presence of the fungus was checked again in the aerial part (twigs and shoots). At the end of the experiment, all living trees (symptomatic and asymptomatic ones grown in infested soil) were surveyed for *V. dahliae* infection in root systems and aerial parts: for each plant, 8 roots and 6 shoots were sampled. Re-isolation was always conducted following Rodríguez-Jurado (1993). Briefly, leaves (including petioles), twigs, shoots and roots were thoroughly washed, cut into 5 mm-long pieces (6 pieces per leaf, 18 pieces per root, twig or shoot; properly spaced to cover the total length), surface-disinfected with sodium hypochlorite, rinsed with sterile distilled water, and plated onto chlortetracycline-amended water agar (twigs and shoots were debarked before cutting). Thereafter, plates were incubated at  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  in darkness for 14 days and *V. dahliae* identified by microscopic observations of conidiophores and microsclerotia on the medium. The infection incidence (II; percentage of infected trees) and colonization index (CI; percentage of plated pieces yielding *V. dahliae* colonies respecting the total number of plated pieces) were calculated.

### **5.3.6 Estimation of *V. dahliae* inoculum level in soil**

The total inoculum density (ID) of *V. dahliae*, consisting of sclerotia and other less persistent fungal structures (Santos-Rufo *et al.*, 2017a), was monitored monthly in treatments with infested soil during the irrigation period, comprising six sampling times in the first year (from late-April to mid-September) and seven samplings in the second year (from late-March to mid-September). Additionally, air-dried soil sclerotia density ( $S_dD$ ) of *V. dahliae* was estimated at the beginning and at the end of each irrigation period. Sampling was conducted in four pots per treatment (one pot per replication), collecting always from the same pots randomly chosen at the beginning of the experiment. Three 15 g wet soil samples (equally spaced from each other and the trunk) were collected to a depth of 5 to 15 cm from each pot. Samples were hand-crumbled, thoroughly mixed, and stored at  $4^\circ\text{C}$  until processed.

For ID quantification, technique of wet soil dilution plating onto semiselective medium for *V. dahliae* (Modified Sodium Polypectate Agar; MSPA) was used: 10g-subsample of wet soil was subjected to serial 5-fold dilutions in agar solution (1 L distilled water and 1 g agar) and aliquots of 1 mL were spread onto MSPA plates (four replicated plates per replication). Colony forming units were always expressed per g of dry soil (CFU g<sup>-1</sup> dry); the dry soil weight was calculated in each sample by drying a 20g-subsample to a constant weight at 105°C and then weighing it.

Determination of S<sub>d</sub>D was conducted by impaction plating of pulverized dry soil onto MSPA medium using the modified Andersen sampler technique (Butterfield & DeVay, 1977): another 5-g subsample of wet soil was air-dried for 28 days and two aliquots distributed onto 10 MSPA plates. Aliquots accounted for 5-15 mg of dry soil at the beginning of the first irrigation period, 50-150 mg at the end of this period and the beginning of the second one, and 500-1000 mg at the end of the second irrigation period (1-3, 10-30 or 100-200 mg per plate, respectively). Both for the ID and S<sub>d</sub>D quantification, *V. dahliae* colonies were counted under a stereoscopic microscope after incubating the plates at 22 ± 2°C in the dark for 14 days.

### **5.3.7 Growth measurements**

Tree growth was estimated according to the increases in canopy area and biomass (fresh weight). The canopy area was measured at the beginning and at the end of both irrigation periods and a growth rate was calculated as the difference between consecutive measurements, divided by the number of days between them (three rates calculated). One olive tree per replication was randomly chosen at the beginning of the experiment and three pictures were taken at each measurement time using a portable platform. This platform allowed to make the shots from three regularly spaced, fixed points and set a white background behind the tree. Pictures were scaled in the image processing software ImageJ® (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) according to a topographic milestone set next to the tree. A filter was then applied to pixel in black all the canopy area using the software Inspector 22. By knowing the scaled dimensions of the picture and the percentage of black pixels in it, the

canopy area was obtained in square centimetres. The final area was calculated as the mean of the three areas corresponding to the three pictures. For canopy biomass, 50 leftover trees, regular in shape and length to those included in the experiment, were weighed at the beginning of the experiment and the average weight considered as initial value. The weight increase of each plant was calculated at the end of the experiment. Additionally, all the olive fruits yielded in each olive tree were collected at the end of the experiment and their oil content estimated by nuclear magnetic resonance.

### **5.3.8 Data analysis**

Data from all measured parameters were subjected to standard analysis of variance (ANOVA). Prior to analysis, data were screened for normality and homogeneity of variances, and subjected to angular or logarithmic transformation when necessary. In cases where ANOVA requirements were not fulfilled, the nonparametric Kruskal–Wallis test was used. When the ANOVA or the Kruskal–Wallis showed significant differences ( $P < 0.05$ ) among treatments, mean values were compared using the Fisher's least significant difference (LSD) or the Dunn's tests at  $\alpha = 0.05$ , respectively.

The progress of ID over time (weeks) was tested for fitting a non-linear model. For each replication, a regression equation was calculated using the inoculum data from their respective MSPA plates. For each function, the area under the inoculum progress curve (AUIPC) was estimated by integration, i.e.,  $A = \int_0^{74} f(x)dx$ . Values of area were then compared among treatments.

When analysing disease and inoculum parameters, only *V. dahliae*-infested treatments were considered, with application strategy and replication arranged in a factorial design. When analysing growth parameters, soil infestation was included as effect, resulting in a split-plot design with soil infestation as main-plot factor and application strategy as sub-plot factor with replications. All analyses were performed using Statistix 9 (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA).

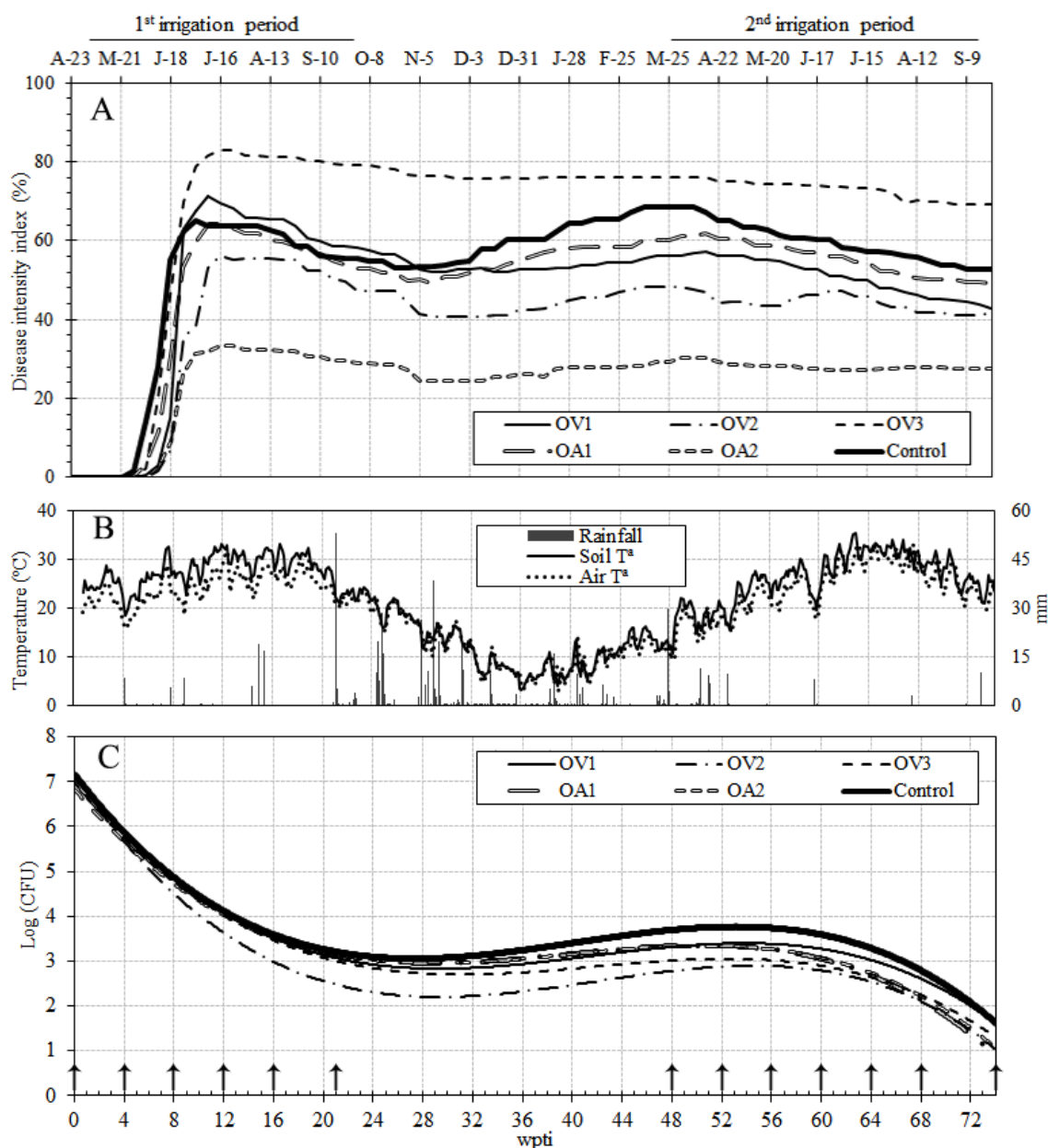
## 5.4 Results

### 5.4.1 Registered irrigation data

Soil moisture content was 16.4 % at the beginning of the experiment, with an averaged pot weight of 45.55 kg. From then onwards, weight losses due to transpiration and evaporation were offset for the 74 weeks of the experiment by means of irrigation or rainfall events. The volume of treated water applied through drip-irrigation varied over time throughout both irrigation periods. Occasional rains (Fig. 5.1B) led to irrigate using a lower amount of water than usual, impacting therefore on the amount of disinfectant applied per pot. Thus, each individual olive was irrigated with a volume of treated water ranging from 1628 mL to 5550 mL for the first irrigation period and 2350-7142 mL for the second one, depending on the application strategy. The accumulated amount of OV applied in OV1, OV2 and OV3 was respectively 55, 120 and 124 mL per pot after the first irrigation period and 99, 220 and 210 mL after the second one. Likewise, the amount of OA applied in OA1 and OA2 was respectively 70 and 148 mL per pot after the first irrigation period and 120 and 250 mL after the second one.

### 5.4.2 Disease progression

During the experiment, visual symptoms were only detected in trees growing in *V. dahliae*-infested soil. Progressive defoliation of wilting or green leaves was the most common symptom observed. Frequently, olive trees exhibited sudden wilting of twigs and branches without loss of leaves (apoplexy), and chlorosis was observed in some cases. Qualitative symptoms observed on olive trees did not differ among the different application strategies. The appearance of first symptoms occurred at 5-9 weeks post-transplant into infested soil (wpti) depending on the olive tree (Fig. 5.1A). Only in one tree from OA1 treatment the onset of the disease occurred with a marked delay (18 wpti) with respect to the rest. Thereinafter, the number of symptomatic olive trees remained constant until the end of the experiment.



**Figure 5.1** Progress of *Verticillium* wilt disease (A), average soil and air temperature (B), and total inoculum density of *V. dahliae* in soil (C) recorded in a pot trial with ‘Picual’ olive trees planted in VO161-D-infested soil and subjected to various disinfectant application strategies through drip irrigation in two irrigation periods: OX-VIRIN® applied either once a month (OV1), twice a month in alternating weeks (OV2), or twice a month in successive weeks (OV3), OX-AGUA AL25® applied either once a month (OA1), or twice a month in alternating weeks (OA2), and untreated watering (control). Experiment was conducted under natural conditions for 74 weeks (wpti = weeks post-transplant into infested soil). The periodicity of data collection for *Verticillium* wilt symptoms, temperatures and total inoculum was weekly, daily and monthly, respectively. Arrows in (C) denote soil sampling for total ID estimation.

The DI reached 100% only in the treatment subjected to untreated irrigation; in contrast, only seven olive trees (58.3%) developed verticillium wilt in OA2 treatment. However, differences in the number of diseased trees were not statistically significant for application strategy (Table 5.1). The highest increase



in symptom severity, expressed as DII, was observed in the weeks following the appearance of first symptoms, between late-May and mid-June, concurring with mean soil temperatures ranging from 23.5 to 32.5 °C (Fig. 5.1A, 1B). Most trees reached maximum values of symptom severity at 10 wpti. By then, the mean severity of symptoms was significantly lower (LSD;  $P < 0.05$ ) in trees from the OA2-application (1.3) than from the rest of application strategies (from 2.1 to 3.3, depending on the treatment; Fig. 5.1A), and the incidence of dead trees was more than double in the OV3-application (50% trees dead) in comparison with the rest of application strategies (8.3 to 25% trees dead; data not shown). In general, symptoms expression stopped during summer, period in which mean soil temperature was above 25°C in most of records (Fig. 5.1B), and plant recovery occurred until mid-fall. Recovery from the disease over time was characterized by the production of suckers at the base of the main stem (Fig. 5.3C). A second epidemic was observed in most of the treatments between early-November to mid-April, concurring with mean soil temperatures ranging from 3.9 to 21.9 °C. Exceptionally, two olive trees from OV2-application developed a second outbreak of symptoms in late-spring of the second year. The number of trees experiencing a second disease outbreak was higher in the control (seven) than in the rest of treatments (from four in OV1 to just one in OA2; data not shown). The incidence of dead trees remained more than double in OV3 (66.6%) than in the rest of applications (25 to 41.7%; data not shown) at this time. It was in this second epidemic when mean severity of symptoms reached maximum values (2.8) in trees from control treatment. During the second irrigation period a generalized recovery occurred in living trees. In some cases, the new twigs produced from the basis of the trunk enveloped old infected parts of the plant (Fig. 5.3C). Recovery occurred in a similar proportion among application strategies, although the recovery intensity was significantly higher in trees subjected to any disinfectant application than in trees irrigated with untreated water (Table 5.1). At the end of the experiment the mean symptom severity of living trees was significantly higher in the control treatment (1.53) than in the rest of treatments (0.14-0.91, depending on the application strategy; data not shown). The ANOVA conducted on SAUDPC detected significant effect of application strategy at the end of the first irrigation period ( $P = 0.0390$ ; data not shown), which was increased at the end of the experiment ( $P = 0.0125$ ). At both times, SAUDPC was

significantly higher for control trees (by above 50%) than for OA2-irrigated trees (Table 5.1).

**Table 5.1** Disease parameters assessed on ‘Picual’ olive trees grown in soil artificially infested with *Verticillium dahliae* and subjected to various disinfectant application strategies through drip-irrigation<sup>a</sup>

Application strategy	Expression of disease symptoms		Recovery from disease symptoms			Plant infection	
	SAUDPC (%)	DI (%)	DII (%)	RI (%)	DR (%)	II (%)	CI (%)
Control	54.5 <sup>b</sup> ab	100	52.6	50.0	50.1 b	100	1.06
OV1	49.6 ab	83.3	42.7	50.0	75.2 a	91.6	0.79
OV2	41.3 bc	91.6	41.1	36.4	74.1 a	91.6	0.35
OV3	69.0 a	83.3	69.3	20.0	80.7 a	83.3	0.79
OA1	50.9 ab	83.3	48.8	40.0	82.7 a	83.3	0.79
OA2	25.6 c	58.3	27.3	42.9	84.6 a	58.3	0.31
<i>P</i> -values	0.0125	<u>0.141</u>	0.104	<u>0.758</u>	0.0002	<u>0.094</u>	<u>0.3101</u>

<sup>a</sup>Severity of symptoms of each individual tree was determined at weekly intervals for 74 weeks and used to calculate standardized area under disease intensity index progress curve (SAUDPC). Other disease parameters were analyzed at the end of trial: disease incidence (DI), disease intensity index (DII), recovery incidence (RI), degree of recovery with respect the maximum DII reached (DR), infection incidence (II) and colonization index (CI).

<sup>b</sup>Values are the mean of four replications (three olive trees per replication). Different letters in the same column indicate significant differences between application strategies, according to LSD test ( $P \leq 0.05$ ). Letters are missing when no significant differences were declared on ANOVA or Kruskal-Wallis test ( $P$  values underlined).

Infection by *V. dahliae* was confirmed by reisolation of the fungus from each affected tree on the onset of the disease and on the proximity to plant death status. At the end of the experiment, *V. dahliae* was effectively reisolated from root system and aerial part of trees from all treatments. One symptomless tree from OV1 resulted infected by *V. dahliae* (Table 5.1). The detection of the fungus was given in a higher number of pieces when sampled from control treatment (15 root and 9 aerial pieces) than from other application strategies (2-12 root and 2-7 aerial pieces depending on the application). However, ANOVA performed on colonization index values did not reveal statistical differences ( $P= 0.3825$ ) among application strategies (Table 5.1).

#### 5.4.3 Inoculum density in artificially infested soil

Initial inoculum levels of *V. dahliae* ranged, according to applications, from  $1.47 \times 10^7$  to  $0.69 \times 10^7$  and  $8.95 \times 10^3$  to  $12.4 \times 10^3 \text{ g}^{-1}$  dry for ID and S<sub>d</sub>D,

respectively, and were not significantly different (Table 5.2). Progress of ID was well described by a third-order polynomial model in all treatments (adjusted  $R^2 > 0.8503$ ) (Fig. 5.1C; Table 5.3). ID decreased during spring and summer, trended to increase during fall and winter, and decreased again during the second spring-summer period for all treatments. The ANOVA for CFU values at the end of the first irrigation period (21 wpti) showed that application strategy was responsible for significance differences ( $P=0.0067$ ; data not shown). At this time, ID from OV2 was found significantly reduced (by above 80%) with respect to the control (data not shown). Significant effect by application strategy increased at the end of the experiment ( $P<0.0001$ ), time at which CFU values in OA1 and OA2 were also observed significantly reduced (by above 75%) compared to the control (Table 5.2). In overall, total ID was higher in soils subjected to untreated water than in soils subjected to any of the disinfectant applications assessed. Comparison of AUIPC values revealed that the curve from control treatment covered an area significantly greater than the rest of treatments, and that the curve from OV2 covered an area significantly smaller (Fig 5.1C; Table 5.2).

**Table 5.2** Soil-inoculum parameters in soil artificially infested with *Verticillium dahliae* and subjected to various disinfectant application strategies through drip-irrigation.

Application strategy	Total inoculum density (ID) <sup>a</sup>		Sclerotia density (S <sub>d</sub> D) <sup>b</sup>		
	AUIPC (u <sup>2</sup> )	Initial ID (CFU g <sup>-1</sup> dry soil)	Final ID (CFU g <sup>-1</sup> dry soil)	Initial S <sub>d</sub> D (CFU g <sup>-1</sup> dry soil)	Final S <sub>d</sub> D (CFU g <sup>-1</sup> dry soil)
Control	266.81 a	1.46E+07	91.4 a	1.24E+04	83.4 a
OV1	248.71 b	1.50E+07	84.0 a	1.19E+04	22.00 b
OV2	200.39 d	1.48E+07	26.2 b	8.96E+03	11.0 b
OV3	233.80 c	1.03E+07	67.9 a	1.24E+04	22.3 b
OA1	245.48 bc	1.12E+07	22.7 b	1.11E+04	22.0 b
OA2	243.62 bc	6.90E+06	22.3 b	1.08E+04	12.2 b
<i>P</i> ANOVA	<0.0001	0.374	<0.0001	0.9833	0.0484

<sup>a</sup> Total *V. dahliae* inoculum in soil (ID) was estimated by direct plating soil dilution method. The area under the cubic curves of ID over time (AUIPC) were calculated.

<sup>b</sup> Sclerotia density in air-dried soil (S<sub>d</sub>D) was estimated by the modified Andersen sampler technique.

<sup>c</sup> Values are the mean of four replications (one pot per replication). Different letters in the same column indicate significant differences between values for application strategies, according to LSD test ( $P \leq 0.05$ ).

Progress of S<sub>d</sub>D followed a similar trend than ID in some treatments (Control, OV2 and OA2), and decreased constantly over time in others (OV1, OV3 and OA1). ANOVA for CFU values denoted statistical significance ( $P<0.484$ )

of application strategy at the three estimations carried out after the beginning of the experiment (at 21, 48 and 73 wpti). The number of disinfectant treatments being significantly different from control (LSD test) increased over time. At the end of the first irrigation period (21 wpti), S<sub>d</sub>D from OV2 was observed significantly reduced (by 90.9 %) with respect to that estimated in the control (data not shown). Thereafter, at 48 wpti, all treatments incorporating OV resulted significantly different from control, with a reduction in their S<sub>d</sub>D values that ranged from 74.8 to 82.2%, depending on the application strategy (data not shown). At the end of the experiment (73 wpti), a reduction by 73.3-86.8 % was observed in any treated soil, depending on the application strategy (Table 5.2).

**Table 5.3** Estimates and appropriateness parameters of the cubic model that best described the progress of inoculum density over time in soil artificially infested with *Verticillium dahliae* and subjected to various disinfectant application strategies through drip-irrigation.

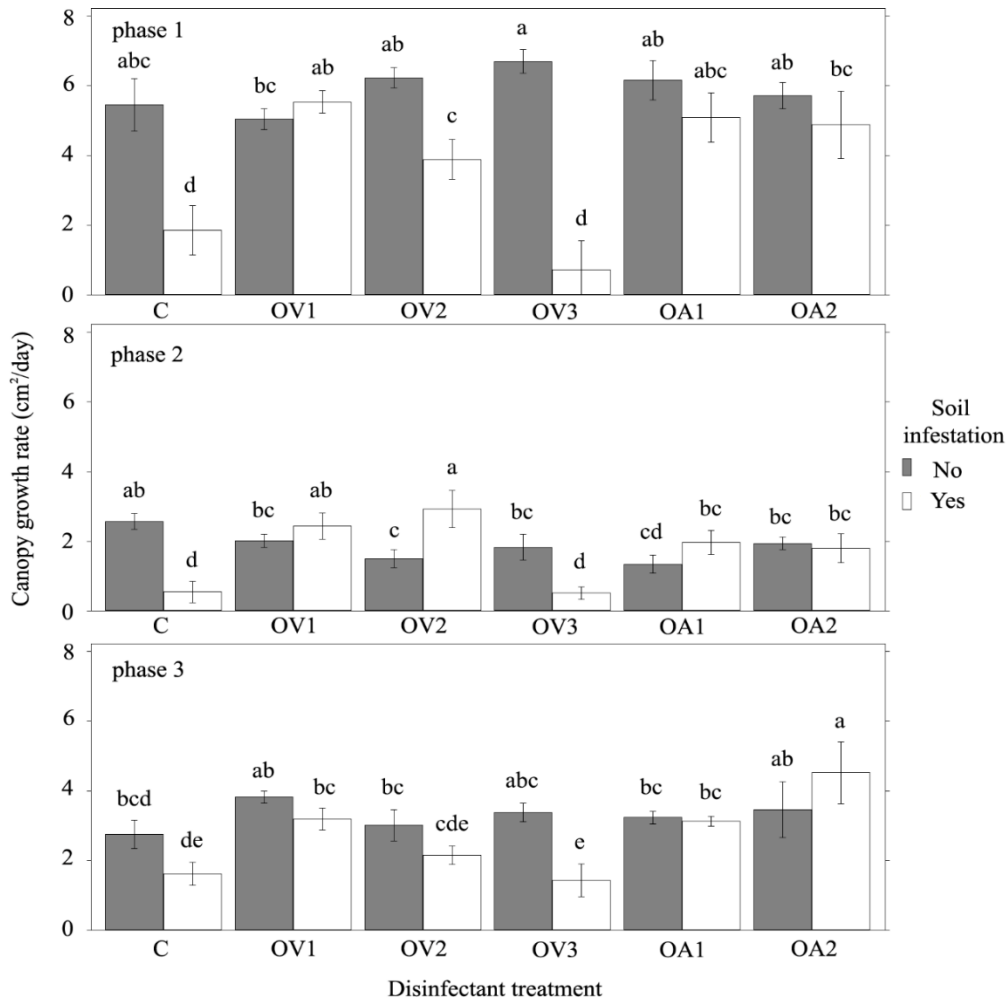
Application strategy	Polynomial model <sup>a</sup>					
	Estimates				Appropriateness	
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	adjusted-R <sup>2</sup>	AIC
Control	6.63	-0.31	8.87E-03	-7.49E-05	0.9015	-88.3
OV1	6.47	-0.30	8.33E-03	-7.14E-05	0.8503	-58.6
OV2	6.45	-0.35	9.24E-03	-7.53E-05	0.8889	-62.1
OV3	6.44	-0.29	7.67E-03	-6.35E-05	0.8923	-61.8
OA1	6.42	-0.29	8.27E-03	-7.28E-05	0.8976	-69.8
OA2	6.41	-0.30	8.35E-03	-7.32E-05	0.9258	-88.2

<sup>a</sup> Curves of total inoculum density in soil over time were adjusted to a cubic curve:  $Y(t) = a + bt + ct^2 + dt^3$ , where  $Y = \text{Log CFU g}^{-1}$  dry soil,  $t = \text{time measured in weeks}$ , and  $a, b, c$  and  $d$  are the constant values of the curve. For each application strategy, the regression included 52 observations and the t-test for coefficients was significant at  $P < 0.05$ .

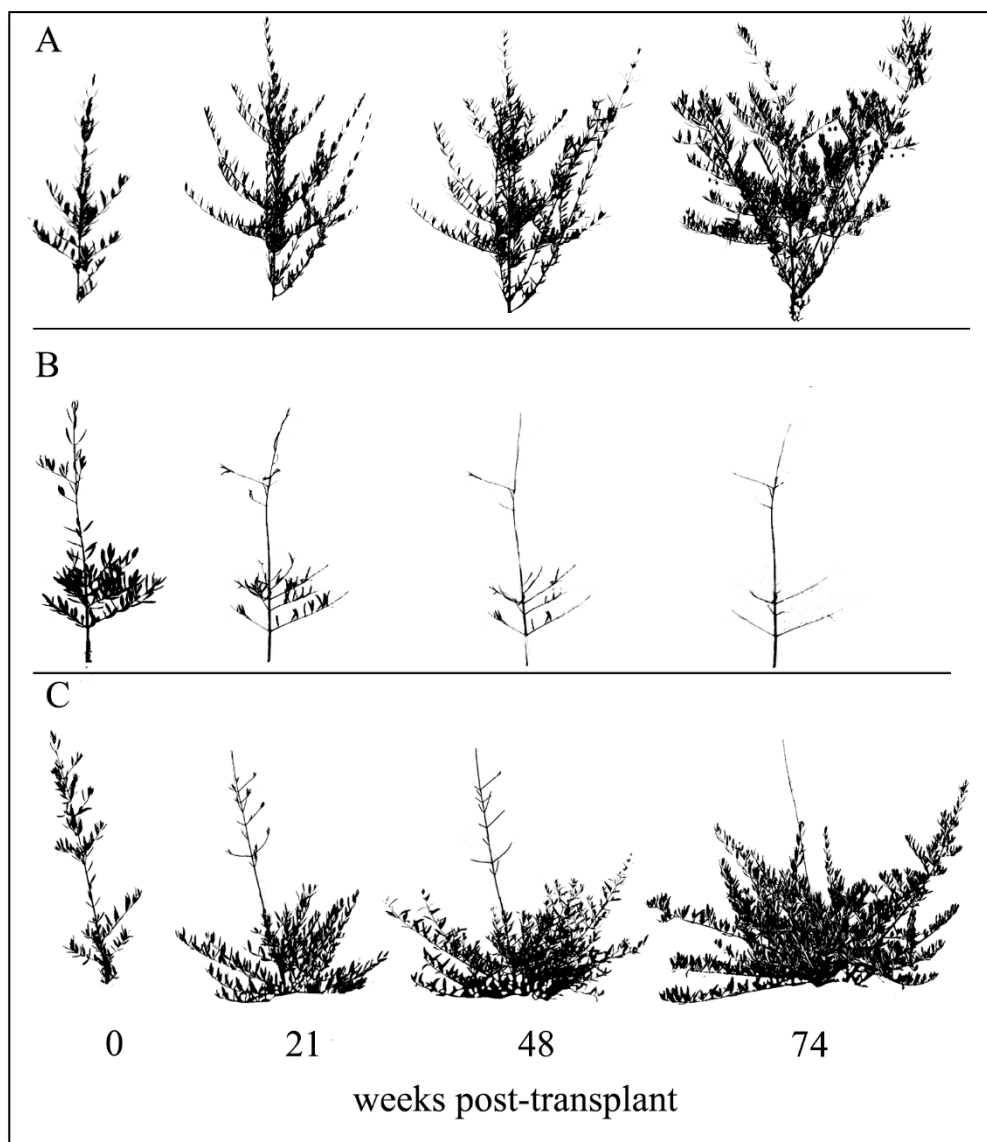
#### 5.4.4 Olive tree growth and production

'Picual' trees grown in uninfested soil and subjected to OV- or OA-treated water did not develop visual injuries due to phytotoxicity. Canopy growth was significantly affected by soil infestation, application strategy and their interaction during irrigation periods (phases 1 and 3) (Fig. 5.2 and 5.3). Soil infestation did not statistically influence canopy growth between irrigation periods (phase 2). In general, trees subjected to any disinfectant application had their canopy growth rate increased. In the case of trees raised in infested soil, the growth rate was significantly lower (at least a 48.2-69.7%, depending on the measurement phase)

when subjected to untreated water than to some disinfectant application. Exceptionally, values from OV3 in all phases or OV2 in phase 3 did not statistically differ to control. Differences were not statistically significant in non-infested soil. Olive trees from OV1, OA1 or OA2 treatments had a canopy growth rate statistically similar regardless the soil infestation factor (Fig. 5.2).



**Figure 5.2** Canopy growth rate of 'Picual' olive trees planted in infested or non-infested soil and subjected to various disinfectant application strategies through drip-irrigation during two irrigation periods: OX-VIRIN® applied either once a month (OV1), twice a month in alternating weeks (OV2), or twice a month in successive weeks (OV3), OX-AGUA AL25® applied either once a month (OA1), or twice a month in alternating weeks (OA2), and untreated watering (control; C). Canopy area was measured by means of photographic analysis, and the growth rate was calculated as the difference between consecutive measurements of canopy area divided by the number of days between them (three rates calculated). Phase 1=first irrigation period (from 0 to 21 weeks post-transplant), phase 2= time between irrigation periods (from 21 to 48 weeks post-transplant), and phase 3= second irrigation period (from 48 to 73 weeks post-transplant). Different letters above bars denote significant differences (LSD test;  $P < 0.05$ ) among treatments in the considered phase. Each bar is the mean of 12 values (four olive trees per treatment, tree pictures per tree), and error lines represent standard error of the mean.



**Figure 5.3** Processed images for canopy area calculation on 'Picual' olive trees raised in infested or non-infested soil for 74 weeks and subjected to various disinfectant application strategies through drip-irrigation during two irrigation periods. One olive tree per replication was randomly chosen at the beginning of the experiment and pictures were taken at the beginning and at the end of both irrigation periods. Three representative growth sequences are depicted: A=olive tree raised in non-infested soil, B=olive tree raised in infested soil, and C=olive tree raised in infested soil with recovery occurrence.

A mean value of  $24.7 \pm 4.31$  g was registered for canopy biomass at the beginning of the experiment. Increment of biomass through the experiment was statistically influenced by soil infestation ( $P < 0.0001$ ) and application strategy ( $P = 0.0001$ ) but not by their interaction ( $P = 0.4297$ ), so data from trees raised in non-infested and infested soils were analysed separately (Table 5.4). The amount of above-ground biomass gained in non-infested soil ( $230 \text{ g} \pm 8.01 \text{ g}$ ) was near twice that gained in infested soil ( $125 \pm 14.04 \text{ g}$ ). The increase in canopy

biomass was significantly ( $P < 0.04$ ) higher in OA2 than untreated control, both in uninfested (+30%) or infested soil (+125%). Trees subjected to OV3 were those that gained less biomass in comparison with the rest of disinfectant treatments, regardless the soil infestation factor.

**Table 5.4** Growth parameters recorded on ‘Picual’ olive trees raised in non-infested or *V. dahliae*-infested soil subjected to various disinfectant application strategies through drip-irrigation.

	Application strategy	$\Delta$ canopy biomass (g) <sup>a</sup>				Olive fruits <sup>b</sup>		
		All plants		Living plants		N	Oil content (%)	
Non-Infested	C	208.44	bc <sup>c</sup>	208.44	bc	198	10.21	
	OV1	231.88	abc	231.88	abc	193	10.85	
	OV2	213.29	bc	213.29	bc	301	9.96	
	OV3	198.7	c	198.7	c	145	6.52	
	OA1	257.85	ab	257.85	ab	330	10.76	
	OA2	270.8	a	270.8	a	240	9.15	
	<i>P</i> -values		0.04		0.04		<u>0.2642</u>	<u>0.2988</u>
Infested	C	93.707	bc	129.14	d	2	-	
	OV1	122.48	abc	190.91	bc	2	-	
	OV2	148.5	ab	198.72	bc	23	8.8	
	OV3	35.557	c	142.27	cd	4	-	
	OA1	139.62	ab	245.67	ab	68	10.02	
	OA2	210.39	a	281.39	a	58	10.3	
	<i>P</i> -values		0.0089		<0.0001		<u>0.0742</u>	<u>0.3679</u>
Non-Infested	Mean	230.16	B	230.16	B	2.1806	B	9.58
Infested	Mean	125.04	A	198.02	A	19.542	A	9.88
	<i>P</i> -values		<0.0001		0.0097		<u>0.0143</u>	<u>0.5637</u>

<sup>a</sup>The fresh weight increase of each plant was calculated at the end of the experiment. An additional analysis was conducted including only those olive trees that remained alive at the end of the experiment. Values are the mean of four replications (three olive trees per replication)

<sup>b</sup>Olive fruits yielded in each olive tree were collected at the end of the experiment and their oil content estimated by nuclear magnetic resonance. \*Chi-Squared approximation.

<sup>c</sup>For each soil infestation level, different lower-case letters in the same column indicate significant differences between application strategies according to LSD test ( $P \leq 0.05$ ). Different upper-case letters in the same column indicate significant differences among soil infestation levels according to LSD or Dunn’s test ( $P \leq 0.05$ ). Letters are missing when no significant differences were declared on ANOVA or Kruskal-Wallis test (*P* values underlined).

An additional analysis was conducted omitting data from dead trees in treatments with infested soil. In this case, the biomass gained in control trees was the lowest one. The biomass gained in most disinfectant treatments was 48-118% significantly higher than biomass produced in control trees. Only the biomass produced in OV3 (+10%) was not statistically different from the control.

The number of olive fruits yielded was significantly higher (Dunn's test;  $P=0.0143$ ) in trees grown in non-infested (1407) than infested soil (157). Application strategy did not influence statistically in this sense. In infested soils, however, the number of olive fruits collected from OA was 30 times higher than the collected from untreated trees. The oil content measured in sampled fruits did not differ according to soil infestation nor application strategy (Table 5.4).

#### 5.4.5 Discussion

The application of disinfectants via irrigation is an approach that has been scarcely studied within the integrated management of VWO. OX-VIRIN® and OX-AGUA AL25® are two disinfectants that showed effectiveness in controlling water infestations by *V. dahliae* both under laboratory and field conditions (Santos-Rufo & Rodríguez-Jurado, 2016; Gómez-Gálvez & Rodríguez-Jurado, 2018; Gómez-Gálvez *et al.*, 2018a). Their additional potential against VWO under growth camera conditions (Gómez-Gálvez & Rodríguez-Jurado, 2018) motivated the setting up of a further test under natural environmental conditions. The application of OV at 3.2 mL L<sup>-1</sup> or OA at 3.762 mL L<sup>-1</sup> through drip-irrigation resulted in a significant deleterious effect on *V. dahliae* disposed in soils of this study. Among all the application strategies evaluated, the alternate-irrigation with OA-treated water (OA2) showed better results in terms of inoculum reduction in soil and disease containment after 74 weeks of experimentation. Furthermore, the tested disinfectant applications did not cause phytotoxicity, promoted an overall increase in the olive tree growth and, encouraged the recovery from the disease. In view of the foregoing, this type of disinfestation could be postulated as a new, recommended approach within the VWO management not only in nurseries or fields using *V. dahliae*-containing water, but also in those in which the fungus is already present in the soil.

Drip-irrigating with OV- or OA-treated water prevented disease occurrence in at least one plant per treatment, with special mention to OA2, in which a total of five trees evaded from symptoms expression and infection. Although these differences were not statistically significant, they are particularly remarkable given the high disease pressure disposed at the beginning of the experiment. In a recent study, Santos-Rufo *et al.* (2017a) evaluated the effect of different



irrigation regimes on VWO using the same experimental conditions assayed here (olive cultivar, pathotype, inoculation method and experimental site). One of the treatments assessed in that study is homologous to the control treatment included in the present work. Although the disease incubation time was similar among studies, the disease development in terms of DI, maximum DII and SAUDPC was higher here (100 %, 68 % and 53.7 %, respectively) than there (75 %, 20 % and 15 %, respectively). This could be explained by the fact that ID estimated at the beginning of this experiment (about  $10^7$  cfu g<sup>-1</sup>) was more than 30 times that reported by Santos-Rufo *et al.* (2017a).

VWO is characterized by polyetic epidemics that make DI progress over time be fitted to a generalized logistic model of multiple sigmoid pattern both in natural (Levin *et al.*, 2003; Navas Cortés *et al.*, 2008) and artificial conditions (Lopez-Escudero & Blanco-Lopez, 2007; Santos-Rufo *et al.*, 2017a). This polyetic character was not observed in this present research since none of the healthy trees developed disease in following favourable conditions, even when total inoculum density accounted for above  $10^3$  cfu g<sup>-1</sup> during the next fall-to-spring period. Moreover, only one out of the 12 asymptomatic trees was positively diagnosed at the end of the experiment. It can be assumed that disinfestation had a preventive effect against root infection, whether due to a greater inoculum reduction in proximities of vulnerable secondary olive roots or to an alteration in the chemical linkage between infective propagules and root exudates. Additionally, the role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which is present in OV and OA, should not be discarded. This oxidative compound has been demonstrated to be responsible for impairing the fungal growth in roots of resistant and moderately susceptible olive cultivars (Gharbi *et al.*, 2016) or to have an inhibitory effect against *V. dahliae* sclerotia in soil (Kim *et al.*, 1987).

The potential effectiveness of OV and OA against *V. dahliae* in soil observed in previous chamber experiments was confirmed here under natural environmental conditions. In both cases, the strategy of application varied the effect of the disinfectant. The applications to soil of OV-treated water (3.2 mL L<sup>-1</sup>) with a weekly frequency or monthly in two consecutives irrigation events were identified as the most effective OV-applications for reducing ID (AUIPC reduced by 8.9-29.7% depending on the experiment) and S<sub>d</sub>D (10.1-59.2% depending on

the experiment) in soil under growth chamber conditions (Gómez-Gálvez & Rodríguez-Jurado, 2018). By contrast, OV applied twice a month in alternate weeks (OV2) was the strategy that reported the highest reduction here, both in AUIDPC (25%) and S<sub>d</sub>D (86.8%) (Table 5.3). Interestingly, OV was more efficiently used in this research than in chamber experiments. Indeed, the total amount of disinfectant applied in OV2 throughout the 74 weeks of experimentation under natural environmental conditions (3.1  $\mu\text{L g}^{-1}$ ) resulted lower than the total amount incorporated throughout 16 weeks under growth chamber conditions (3.5 or 7  $\mu\text{L g}^{-1}$  for the monthly or weekly application, respectively). As for OA incorporation, twice a month in alternate weeks (OA2) was the strategy application that reported the highest reductions both indoor (5.2-26.3% for AUIPC and 23.5-42.4 % for S<sub>d</sub>D, depending on the experiment) and outdoor (8.7% and 85.4% for AUIPC and S<sub>d</sub>D, respectively). In this case, the amount of OA applied per g dry soil practically doubled that incorporated in growth chamber experiments (0.94  $\mu\text{L g}^{-1}$  vs 0.47  $\mu\text{L g}^{-1}$ , respectively), although it remains below the amount applied of OV. An interesting finding of this study is that the S<sub>d</sub>D decline achieved by any of the disinfectant treatments (73.6-86.8%) is as consistent as the reduction of viable *V. dahliae* sclerotia observed after pre-planting applications of metham-sodium in laboratory (25-98% depending on the treatment; Saeed *et al.*, 1997) or field conditions (up to 60%; Taylor *et al.*, 2005), or after applying chloropicrin via drip-irrigation on commercial greenhouse (86%; Ślusarski & Spotti, 2016).

Chemical control has been studied against VWO using diverse systemic fungicides and application methods, but none of them have shown convincing results under field conditions (López-Escudero & Mercado-Blanco, 2011 and references therein). In this study, the OA2-treatment provoked the greatest palliative effect on VWO, with a reduction in the final DII that accounted for 40% or a significant reduction in the SAUDPC that accounted for 52.3%. These results are consistent with those observed in chamber, where this same treatment markedly reduced both the final DII (18.9-40%, depending on the experiment) and the SAUDPC (21.1-38.9%, depending on the experiment) when applied to the same Picual/VO161D pathosystem (Gómez-Gálvez & Rodríguez-Jurado, 2018). To the best of our knowledge, it is the first time that such potential efficacy

is reached by a chemical treatment under natural environmental conditions. Furthermore, the palliative effect shown by OA2 could be comparable to that reached by other biocontrol approaches listed as effective against VWO. For example, *V. dahliae*-antagonistic strain HRO-C48 of *Serratia plymuthica* reduced the DII by 23.4%, and SAUDPC by 40.6% in greenhouse bioassays using 'Picual' plants and soil infestation with the D pathotype (Müller *et al.*, 2008). Similarly, Jiménez-Díaz *et al.* (2009) showed that a commercial formulation of *Trichoderma asperellum* strain ICC012 + *T. gamsii* strain ICC080 (BIOTEN®) reduced the SAUDPC by 60% in 'Picual' plants disposed in microplots with D *V. dahliae*-infested soil. Also, Markakis *et al.* (2016) observed a reduction in DII and SAUDPC by 41.8 and 54.5%, respectively, when using a strain of *Paenibacillus alvei* to protect highly susceptible olive trees 'Amfissis' planted in a naturally infested field. On the other hand, other authors have obtained a higher reduction in the severity of symptoms: up to 97% when using selected *Pseudomonas fluorescens* isolates under greenhouse conditions (Mercado-Blanco *et al.*, 2004) or a total control (100% reduction) when applying a non-pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* under growth chamber conditions (Varo *et al.*, 2016b). However, the effect of these treatments under natural environmental conditions is still pending, and, in contrast with disinfectant application, their applicability in actual use scenarios is a major constraint that need further research.

Typical phytotoxicity symptoms described in olive tree include chlorosis, interveinal leaf yellowing, apical desiccation and abscission, twig dieback or disorders in young sprouts (i.e. curling leaves or small and fan-shaped leaves) (Sanzani *et al.*, 2012). None of these symptoms were observed on 'Picual' trees subjected to disinfectant applications in non-infested soils. However, pathogen-free trees subjected to OV twice a month in successive weeks (OV3) reported a lower canopy biomass, fewer number of fruits yielded and lower fat content than control treatment (Table 5.4). Although these differences were not significant, they differ from previous results obtained under shade net conditions, where a slight increase in shoot weight of 'Picual' and 'Arbequina' plants was observed after applying OV three times a week for four months (Gómez-Gálvez and Rodríguez-Jurado, 2018). This disorder in plant growth observed in OV3 could explain in part why olive trees from this treatment were the ones, among those

from the rest of treatments, that showed more vulnerability to initial infections when raised in infested soil (Fig. 5.1A).

Natural recovery from *Verticillium* wilt symptoms was observed in most of the living, affected olive trees of this study, regardless of the disinfectant strategy applied. The occurrence of this phenomenon even in untreated olive trees exposed to conditions favourable for *Verticillium* wilt is not a surprising fact, and it has been already reported elsewhere (López-Escudero & Blanco-López, 2005; Mercado-Blanco *et al.*, 2001; Rodríguez-Jurado, 1993). On the other hand, it is important to highlight the significant enhancement in the intensity of recovery observed in treated trees compared to untreated ones (Table 5.1). Several hypothesis can be formulated in this regard: i) disinfectants provided prevention against root infection as discussed above, avoiding therefore an extensive colonization and a severe symptomatology, ii) the tested disinfectant applications promoted, with some exception, an increase in growth parameter which allowed trees to maintain green tissues, to restart water flow, and to recover more efficiently from infections (Birem *et al.*, 2016; Santos-Rufo *et al.*, 2017b), and iii) any of the compounds present in the disinfectants, especial mention to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, could have acted as warning signal, thereby leading to a more rapid deployment of structural (gums, lignin, tylose deposition in infected vessels) and/or biochemical (production of phytoalexin and other antifungal substances) mechanisms of defence by the olive tree (Rodríguez-Jurado, 1993; López-Escudero and Blanco-López, 2005). A more in-depth study is required to investigate the role of disinfectant application strategies on the olive tree recovery. Moreover, the olive tree response to the disinfectant could vary depending on the olive cultivar, as glimpsed in previous studies (Gómez-Gálvez and Rodríguez-Jurado, 2018).

In view of the above results, application of disinfectants via drip-irrigation might constitute a new possible approach to be integrated within the management of *Verticillium* wilt in olive. A diverse range of disinfectants with different formulations are commercially available for the cleanliness and maintenance of irrigation facilities in Andalusian olive orchards. The potential efficacy shown by OV and OA against the VWO could motivate a more extended use of disinfectants based on activated peroxide or quaternary ammonium compounds within the framework of phytosanitary applications in olive orchards of Andalusia.

## **Acknowledgements**

This research was supported by the project PP.TRA.TRA201300.5 (IFAPA), partially funded by the European Regional Development Fund of Andalusia (ERDF 2007-2013). F. J. Gómez-Gálvez thanks Research Staff Training (FPI) Grants funding by Subprogram FPI-INIA of the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness.



## Capítulo

6

## Conclusiones

1. Los esclerocios de *V. dahliae* germinan y esporulan en el agua pudiendo multiplicar por 25 el nivel de inóculo inicial (capítulo 2). Esto puede explicar en parte que se hayan detectado mayor cantidad de micropropágulos que de esclerocios en las aguas de riego en previos estudios.
2. La eficacia *in vitro* de los desinfectantes OX-VIRIN® y OX-AGUA AL25®, ambos conteniendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en diferente proporción, varió con la concentración del producto y el tiempo de exposición, y escasamente con la virulencia de los aislados. El producto a base de hipoclorito sódico, Deccoklor®, fue inefectivo a las concentraciones estudiadas (capítulo 2).
3. OX-VIRIN® a una concentración  $\geq 3.2 \text{ mL L}^{-1}$  y OX-AGUA AL25® a una concentración  $\geq 0.4175 \text{ mL L}^{-1}$ , mostraron tras 5 días de exposición y durante 25 días, una eficacia supresiva de al menos el 87,8 y 99,2%, y una actividad preventiva por encima del 97,0 y 39,4%, respectivamente. El efecto preventivo de OX-AGUA AL25® fue más variable con el tiempo (capítulo 2).
4. Las concentraciones mínimas anteriores de cada desinfectante (3,2 y 0,4175 mL L<sup>-1</sup>), con eficacia conocida también frente a conidias, podrían recomendarse para el tratamiento de agua embalsada infestada por *V. dahliae*. A estas concentraciones, las pautas de aplicación de cada desinfectante podrían variar atendiendo al riesgo de infestación posterior al tratamiento del agua (capítulo 2).
5. La aplicación al suelo de los desinfectantes y concentraciones mínimas recomendables para el agua mostró potencial para reducir a *V. dahliae* en el suelo y la Verticilosis del olivo. Las aplicaciones al suelo semanal y mensual de OX-VIRIN® y la quincenal de OX-AGUA AL25® fueron las más eficaces, reduciendo de media un 17% la densidad de inóculo total y un 35% la de esclerocios. Estas aplicaciones disminuyeron también la incidencia de enfermedad en hasta un 21,1 y 43,4% en 'Picual' y 'Arbequina', respectivamente (capítulo 3).

6. La inyección de OX-VIRIN® a una concentración  $\geq 3,2 \text{ mL L}^{-1}$  y OX-AGUA AL25® a una concentración  $\geq 1,25 \text{ mL L}^{-1}$  al sistema de riego por goteo redujo en al menos un 95% la incorporación y acumulación de *V. dahliae* al suelo. La eficacia dependió más de la concentración aplicada y el tipo de propágulo presente en el agua que de las condiciones ambientales. Así, las concentraciones más altas de ambos desinfectantes ( $51,2$  y  $11,27 \text{ mL L}^{-1}$ , respectivamente) previnieron la introducción del hongo (capítulo 5).

7. El inóculo introducido y establecido en el suelo a pesar de la desinfección del agua, ocasionó una incidencia de infección marcadamente reducida y, en consecuencia, no se reprodujeron síntomas visibles en plantones 'Picual' o 'Arbequina' (capítulo 5).

8. El riego con agua infestada por conidias puede ser fuente de origen del establecimiento de estructuras más persistentes del hongo en el suelo. En nuestras condiciones experimentales, se detectaron hasta  $288 \text{ esclerocios g}^{-1}$  tras mantener el suelo 60 días sin aportación de agua y a  $26^{\circ}\text{C}$  constantes. Por otro lado, este tratamiento de secado fue insuficiente para erradicar micropropágulos del hongo en el suelo. (capítulo 5).

9. En condiciones de ambiente natural, las diferentes estrategias de aplicación de OX-VIRIN® a  $3,2 \text{ mL L}^{-1}$  y OX-AGUA AL25® a  $3,76 \text{ mL L}^{-1}$  a través del riego por goteo redujeron de media la densidad de inóculo del patotipo defoliante en el suelo en un 50% y el desarrollo de enfermedad en olivos 'Picual' en torno a un 20% (capítulo 6).

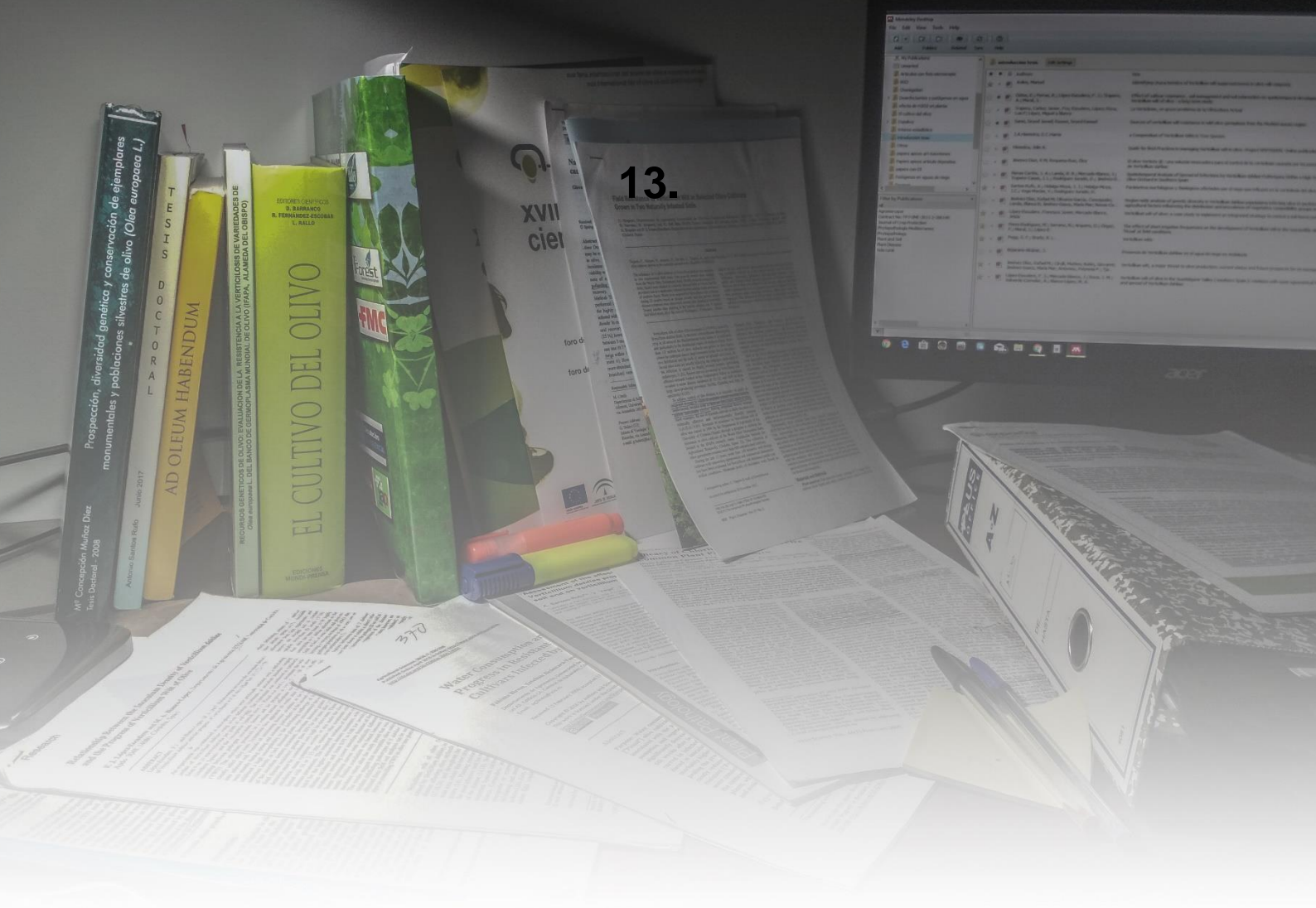
10. La aplicación quincenal fue la estrategia de riego con OX-AGUA AL25® más eficaz tanto en condiciones de cámara de cultivo como de ambiente natural, independientemente de la concentración usada. Por el contrario, no hubo coincidencia para las estrategias de aplicación de OX-VIRIN® (capítulos 3 y 5).

11. Los tratamientos desinfectantes aplicados al suelo no causaron fitotoxicidad en 'Picual' y 'Arbequina'. En condiciones de campo, el riego con agua tratada favoreció en general la tasa de crecimiento y la producción de olivos



'Picual' y potenció significativamente la recuperación natural de los síntomas causados por el patotipo defoliante del hongo (capítulos 3 y 5).

12. Los resultados que derivan de esta tesis doctoral acercan la posibilidad de contemplar la desinfestación del agua de riego no solo como una práctica de exclusión, sino también como una de erradicación y escape dentro del manejo integrado de la enfermedad, postulándose su uso en olivares y viveros que usen agua infestada por el patógeno y en aquellos en los que el hongo ya esté establecido en el suelo. Varios productos comercializados para prevenir y limpiar obstrucciones en los sistemas de riego por goteo comparten la composición de OX-VIRIN® y OX-AGUA AL25®, lo cual podría ayudar a la comercialización de estos últimos como desinfestantes de agua.



## Referencias

- Abu-Qamar M, Al-Raddad A, 2001. Integrated control of *Verticillium* wilt of olive with cryptonol in combination with a solar chamber and fertilizer. *Phytoparasitica* **29**, 223–230.
- AEMET, 2018. Agencia Estatal de Meteorología. Ministerio Para la Transición Ecológica. Servicios Climáticos, Valores Climatológicos Normales de Córdoba Aeropuerto. (consulta 09.09.2018).
- Ajwa HA, Trout T, Mueller J, Wilhelm S, Nelson SD, Soppe R, Shatley D, 2002. Application of alternative fumigants through drip irrigation systems. *Phytopathology* **92**, 1349–1355.
- Al-Ahmad MA, Mosli MN, 1993. *Verticillium* wilt of olive in Syria. *EPPO Bulletin* **23**, 521–529.
- Arbogast M, Powelson ML, Cappaert MR, Watrud LS, 1999. Response of six potato cultivars to amount of applied water and *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* **89**, 782–788.
- Arias-Calderón R, 2015. *Mejora de olivo para resistencia a la Verticilosis: evaluación de progenies y material silvestre*. Córdoba, España: Universidad de Córdoba, Tesis doctoral.
- Arias-Calderón R, Rodríguez-Jurado D, Bejarano-Alcázar J, Belaj A, de la Rosa R, León L, 2015. Evaluation of *Verticillium* wilt resistance in selections from olive breeding crosses. *Euphytica* **206**, 619–629.
- Báidez AG, Gómez P, del Río JA, Ortuño A, 2007. Dysfunctionality of the xylem in *Olea europaea* L. plants associated with the infection process by *Verticillium dahliae* Kleb. Role of phenolic compounds in plant defense mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 3373–3377.
- Baroudy F, Habib W, Tanos G, Gerges E, Saab C, Choueiri E, Nigro F, 2018. Long-distance spread of *Verticillium dahliae* through rivers and irrigation systems. *Plant Disease* **102**, 1559–1565.
- Barranco D, 2017. Variedades y patrones. In: Barranco D, Fernández Escobar R, Rallo L, eds. *El Cultivo del Olivo* 7th edition. Madrid, España: Junta de Andalucía & Ediciones Mundi-Prensa, 65–95.
- Baxter A, Mittler R, Suzuki N, 2014. ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany* **65**, 1229–1240.
- Bejarano-Alcázar J, Blanco-López MA, Melero-Vara JM, Jiménez-Díaz RM, 1996. Etiology, importance, and distribution of *Verticillium* wilt of cotton in southern Spain. *Plant Disease* **80**, 1233–1238.
- Bejarano-Alcázar J, Pérez-Artés E, 2002. Importancia de la Verticilosis del algodonero y distribución de patotipos de *Verticillium dahliae* en Andalucía. In: Book of abstracts of the XI Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, Almería: 219
- Bejarano-Alcázar J, 2005. Problemática fitosanitaria en la olivicultura de regadío. In: Pastor M, ed. *Cultivo del olivo con riego localizado*. Madrid, España: Mundi Prensa, 663–710.
- Bejarano-Alcázar J, Obregón-Cano S, Rodríguez-Jurado D, de Haro-Bravo MI, del Río-Celestino M, de Haro-Bailón A, 2008. Potencial biofumigante de especies de crucíferas para la supresión de *Verticillium dahliae* en el suelo. In: Book of abstracts of the XIV Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Lugo, España: 296.
- Ben-Yephet Y, Pinkas Y, 1977. Germination of individual microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Phytoparasitica* **5**, 159–66.
- Benlloch M, 1943. Notas de Patología olivarera en 1943. *Boletín de Patología Vegetal y Entomología Agraria* **12**, 237–248.
- Benson DM, Ashworth LJ Jr, 1976. Survival of *Verticillium albo-atrum* on nonsuscept roots and

- residues in field soil. *Phytopathology* **66**, 883–887.
- Bhattarai SP, Huber S, Midmore DJ, 2004. Aerated subsurface irrigation water gives growth and yield benefits to zucchini, vegetable soybean and cotton in heavy clay soils. *Annals of Applied Biology* **144**, 285–298.
- Birem F, Alcántara-Vara E, López-Escudero FJ, 2016. Water consumption and vegetative growth progress in resistant and susceptible olive cultivars infected by *Verticillium dahliae*. *Agricultural Sciences* **7**, 230–238.
- Blanco-López MA, Jiménez-Díaz RM, Caballero JM, 1984. Symptomatology, incidence and distribution of *Verticillium* wilt of olive trees in Andalucía. *Phytopathologia Mediterranea* **23**, 1–8.
- Blanco-López MA, Rodríguez-Jurado D, Jiménez-Díaz RM, 1990. Incidence and seasonal variation of *Verticillium* wilt in olive orchards. In: Proceedings of the 5th International *Verticillium* Symposium. Leningrad, p5.
- Brinkerhoff LA, 1969. The influence of temperature, aeration, and soil microflora on microsclerotial development of *Verticillium albo-atrum* in abscised cotton leaves. *Phytopathology* **59**, 805–808
- Bubici G, Cirulli M, 2014. Natural recovery from *Verticillium* wilt in olive: Can it be exploited in a control strategy? *Plant and Soil* **381**, 85–94.
- Butterfield EJ, DeVay JE, 1977. Reassessment of soil assays for *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* **67**, 1073–1078.
- Caballero JM, Del Rio C, 2017. Métodos de Multiplicación. In: Barranco D, Fernández Escobar R, Rallo L, eds. *El Cultivo del Olivo* 7th edition. Madrid, España: Junta de Andalucía & Ediciones Mundi-Prensa, 98–144.
- Caballero JM, Pérez-Hernández J, Blanco-López MA, Jiménez- Díaz RM, 1980. Olive, a new host of *Verticillium dahliae* in Spain. In: Proceedings of the 5th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union. Patras, p 50.
- Calderón R, Lucena C, Trapero-Casas JL, Zarco-Tejada PJ, Navas-Cortés J A, 2014. Soil temperature determines the reaction of olive cultivars to *Verticillium dahliae* pathotypes. *PLoS ONE* **9**, e110664.
- Campbell CL, Madden LV, 1990. *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. John Wiley and Sons, New York.
- CAPDER, 2015a. Plan director del olivar andaluz. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Junta de Andalucía. Servicio de Publicaciones y Divulgación, Sevilla.
- CAPDER, 2015b. Análisis de las plantaciones de olivar en Andalucía. Año 2015. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Junta de Andalucía. Servicio de Estudios y Estadística, Sevilla.
- Carrasco G, Urrestarazu M, 2010. Green chemistry in protected horticulture: the use of peroxyacetic acid as a sustainable strategy. *International Journal of Molecular Sciences* **11**, 1999-2009.
- Caruso P, Palomo JL, Bertolini E, Álvarez B, López MM, Biosca EG, 2005. Seasonal variation of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 populations in a Spanish river: recovery of stressed cells at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 140–148.
- Cayanan DF, Zhang P, Liu W, Dixon M, Zheng Y, 2009. Efficacy of chlorine in controlling five common plant pathogens. *HortScience* **44**, 157–63.
- Chaidez C, López J, Castro-del Campo N, 2007. Quaternary ammonium compounds: an alternative disinfection method for fresh produce wash water. *Journal of Water and Health* **5**, 329-333.

- COI, 2018. Estadísticas mundiales sobre producción, importaciones, exportaciones y consumo de aceite de oliva y aceituna de mesa. Madrid, España: Consejo Oleícola Internacional. [www.internationaloliveoil.org](http://www.internationaloliveoil.org). (consulta 21.08.2018).
- Conn KL, Tenuta M, Lazarovits G, 2005. Liquid swine manure can kill *Verticillium dahliae* microsclerotia in soil by volatile fatty acid, nitrous acid, and ammonia toxicity. *Phytopathology* **95**, 28-35.
- Copes WE, Chastagner GA, Hummel RL, 2003. Toxicity responses of herbaceous and woody ornamental plants to chlorine and hydrogen dioxides. Online Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2003-0311-01-RS.
- Datnoff LE, Kroll TK, Lacy GH, 1987. Efficacy of chlorine for decontaminating water infested with resting spores of *Plasmiodiophora brassicae*. *Plant Disease* **71**, 734-736.
- De Liñán-Vicente C, De Liñán-Carral C, 2018. Vademécum de productos fitosanitarios y nutricionales. Ediciones Agrotécnicas S.L., Madrid.
- Dervis S, Mercado-Blanco J, Erten L, Valverde-Corredor A, Pérez-Artés E, 2010. Verticillium wilt of olive in Turkey: a survey on disease importance, pathogen diversity and susceptibility of relevant olive cultivars. *European Journal of Plant Pathology* **127**, 287–301.
- Duniway JM, 2002. Status of chemical alternatives to methyl bromide for pre-plant fumigation of soil. *Phytopathology* **92**, 1337–1343.
- Easton GD, Nagle ME, Bailey DL, 1969. A method of estimating *Verticillium albo-atrum* propagules in field soil and irrigation water. *Phytopathology* **59**, 1171–2.
- Ehret D, Alsanus B, Wohanka W, Menzies J, Utkhede R, 2001. Disinfestation of recirculating nutrient solutions in greenhouse horticulture. *Agronomie* **21**, 323–39.
- ESYRCE, 2017. Encuesta sobre superficies y rendimientos de cultivo. Año 2017. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Secretaría general técnica. Subdirección general de estadística. Madrid.
- European Chemicals Agency. EINECS (European INventory of Existing Commercial chemical Substances). [www.echa.europa.eu/information-on-chemicals/ec-inventory](http://www.echa.europa.eu/information-on-chemicals/ec-inventory) (accessed 22.07.2016).
- Evans G, Snyder WC, Wilhelm S, 1966. Inoculum increase of the Verticillium wilt fungus in cotton. *Phytopathology* **56**, 590–4.
- Farley JD, Wilhelm S, Snyder WC, 1971. Repeated germination and sporulation of microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* in soil. *Phytopathology* **61**, 260–264.
- Fernández-Gómez R, Yruela-Morillo MC, Milla-Milla M, García-Bernal JP, Oyonarte-Gutiérrez N, Ávila-Alabarces R, Gavilán-Zafra P, 2010. *Manual de riego para agricultores: módulo 4. Riego localizado*. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía.
- Fernández JE, Moreno F, Cabrera F, Arrúe JL, Martín-Aranda J, 1991. Drip irrigation, soil characteristics and the root distribution and root activity of olive trees. *Plant Soil* **133**, 239–251.
- Filonow AB, Lockwood JL, 1983. Loss of nutrient-independence for germination by fungal propagules incubated on soils or on a model system imposing diffusive stress. *Soil Biology and Biochemistry* **15**, 567-573.
- Frederick ZA, Cummings TF, Johnson DA, 2017. Susceptibility of weedy hosts from Pacific Northwest potato production systems to crop-aggressive isolates of *Verticillium dahliae*. *Plant disease* **101**, 1500-1506.
- Garbelotto M, Harnik TY, Schmidt DJ, 2009. Efficacy of phosphoric acid, metalaxyl-M and copper hydroxide against *Phytophthora ramorum* in vitro and in planta. *Plant Pathology* **58**, 111-119.

- García-Cabello S, Pérez-Rodríguez M, Blanco-López MA, López-Escudero FJ, 2012. Distribution of *Verticillium dahliae* through watering systems in widely irrigated olive growing areas in Andalucía (southern Spain). *European Journal of Plant Pathology* **133**, 877–885.
- Gerik JS, 2005. Evaluation of soil fumigants applied by drip irrigation for *Liatris* production. *Plant Disease* **89**, 883–887.
- Gharbi Y, Barkallah M, Bouazizi E, Cheffi M, Gdoura R, Triki MA, 2016. Differential fungal colonization and physiological defense responses of new olive cultivars infected by the necrotrophic fungus *Verticillium dahliae*. *Acta Physiologiae Plantarum* **38**, 242.
- Gil PM, Ferreyra R, Barrera C, Zúñiga C, Gurovich L, 2009. Effect of injecting hydrogen peroxide into heavy clay loam soil on plant water status, net CO<sub>2</sub> assimilation, biomass, and vascular anatomy of avocado trees. *Chilean Journal of Agricultural Research* **69**, 97–106.
- Gomez KA, Gomez AA, 1984. *Statistical Procedures for Agricultural Research*. John Wiley and Sons, New York.
- Gómez-Gálvez FJ, Rodríguez-Jurado D, 2018. Potential efficacy of soil-applied disinfectant treatments against *Verticillium* wilt of olive. *Crop Protection* **106**, 190–200.
- Gómez-Gálvez FJ, Vargas-Osuna E, Rodríguez-Jurado D, 2018a. Suppressiveness and preventive activity of chemical disinfectants against sclerotia of *Verticillium dahliae* in water. *Crop Protection* **108**, 12–22.
- Gómez-Gálvez FJ, Hidalgo-Moya JC, Hidalgo-Moya JJ, Vega-Macías V, Rodríguez-Jurado D, 2018b. Reduced introduction of *Verticillium dahliae* through irrigation system and accumulation in soil by injection of peroxygen-based disinfectants. *Plant Pathology*. doi:10.1111/ppa.12917
- Green RJ, 1969. Survival and inoculum potential of conidia and microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* in soil. *Phytopathology* **59**, 874–876.
- Green RJ, 1980. Soil factors affecting survival of microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* **70**, 353–355.
- Gullino ML, Camponogara A, Gasparrini G, Rizzo V, Clini C, 2003. Replacing methyl bromide for soil disinfestation. *Plant Disease* **87**, 1012–1021.
- Hiemstra JA, Harris DC, 1998. *A compendium of Verticillium wilts in tree species*. Ponsen & Looijen, Wageningen.
- Hiemstra, J. 2015. Guide for Best Practices in managing *Verticillium* wilt in olive. Project VERTIGEEN. Contract No. FP7-SME-2011-2-286140. [www.vertigeeen.eu/files\\_media/1429516669\\_vertigeeen\\_deliverable\\_6\\_13\\_guide\\_of\\_best\\_practices\\_final.pdf](http://www.vertigeeen.eu/files_media/1429516669_vertigeeen_deliverable_6_13_guide_of_best_practices_final.pdf).
- Hoagland DR, Arnon DI, 1950. The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station **347**, 1–32.
- Hong CX, Richardson PA, Kong P, Bush EA, 2003. Efficacy of chlorine on multiple species of *Phytophthora* in recycled nursery irrigation water. *Plant Disease* **87**, 1183–89.
- Hong CX, Moorman GW, 2005. Plant pathogens in irrigation water: challenges and opportunities. *Critical Reviews in Plant Science* **24**, 189–208.
- Hu X, Bai Y, Chen T, Hu D, Yang J, Xu X, 2013. An optimized method for *in vitro* production of *Verticillium dahliae* microsclerotia. *European Journal of Plant Pathology* **136**, 225–229.
- Inderbitzin P, Bostock RM, Davis MR, Usami T, Platt HW, Subbarao KV, 2011. Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. *PLoS One* **6**, e28341.
- Ioannou N, Schneider RW, Grogan RG, Duniway JM, 1977. Effect of water potential and temperature on growth, sporulation and production of microsclerotia by *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* **67**, 637–644.

- Isaac I, 1966. Speciation in *Verticillium*. *Annual Review of Phytopathology* **5**, 201–22.
- James D, Varga A, Becker E, Sumampong G, Bailey K, Elliott M, Masri S, Shamoun SF, 2012. Screening of several disinfectants to assess their efficacy in controlling mycelia growth, sporangia germination, and recovery of viable *Phytophthora ramorum*. *Crop Protection* **42**, 186-192.
- Janisiewicz WJ, Van Der Zwet T, 1988. Bactericidal treatment for the eradication of *Erwinia amylovora* from the surface of mature apple fruit. *Plant Disease* **72**, 715-718.
- Jiménez Díaz RM, Rodríguez Jurado D, Landa del Castillo BB, Trapero Casas JL, Navas Cortés JA, 2008. Dispersión de la Verticilosis a través de las hojas de olivos infectadas por el patotipo defoliante. *Vida Rural* **265**, 40–44.
- Jiménez Díaz RM, Trapero Casas JL, Boned J, Landa BB, Navas Cortés J A, 2009. Uso de Bioten para la protección biológica de plantones de olivo contra la Verticilosis causada por el patotipo defoliante de *Verticillium dahliae*. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* **35**, 595–615.
- Jiménez-Díaz RM, Olivares-García C, Landa BB, Jiménez-Gascó MM, Navas-Cortés JA, 2011. Region-wide analysis of genetic diversity in *Verticillium dahliae* populations infecting olive in southern Spain and agricultural factors influencing the distribution and prevalence of vegetative compatibility groups and pathotypes. *Phytopathology* **101**, 304–315.
- Jiménez-Díaz RM, Cirulli M, Bubici G, Jiménez-Gasco MM, Antoniou PP, Tjamos EC, 2012. Verticillium wilt, a major threat to olive production: Current status and future prospects for its management. *Plant Disease* **96**, 304–329.
- Jiménez-Díaz RM, 2018. Avances en el conocimiento y la gestión integrada de la Verticilosis del olivo. *Vida rural* **453**, 30-38
- Jiménez-Ruiz J, Leyva Pérez M, Schilirò E, Barroso JB, Bombarely A, Mueller L, Mercado Blanco J, Luque F, 2017. Transcriptomic analysis of the *Olea europaea* L. roots during the *Verticillium dahliae* early infection process. *Plant Genome* **10**.
- Jurado-Bello J, De Haro-Bailón A, Hidalgo-Moya JJ, Hidalgo-Moya JC, Vega-Macías V, Bejarano-Alcázar J, 2013. Evaluación de la eficacia de enmiendas basadas en especies crucíferas implantadas como cubiertas vegetales para el control de la Verticilosis del Olivo en condiciones de campo. Expoliva. Foro del olivar y Medio Ambiente, Jaén: OLI-26.
- Karajeh MR, Masoud SA, 2006. Molecular detection of *Verticillium dahliae* Kleb. in asymptomatic olive trees. *Journal of Phytopathology* **154**, 496–499.
- Karaca I, Karcihoglu A, Ceylân S, 1971. Wilt disease of cotton in the Ege region of Turkey. *Journal of Turkish Phytopathology* **1**, 4–11.
- Kim KK, Fravel DR, Papavizas GC, 1987. Identification of a metabolite produced by *Talaromyces flavus* as glucose oxidase and its role in the biocontrol of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* **78**, 488–492.
- Kitis M, 2004. Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. *Environment International* **30**, 47–55.
- Leggett MJ, Schwarz JS, Burke PA, McDonell G, Denyer SP, Maillard JY, 2016. Mechanism of sporicidal activity for the synergistic combination of peracetic acid and hydrogen peroxide. *Applied and Environmental Microbiology* **82**, 1035-1039.
- Levin AG, Lavee S, Tsrur L, 2003. Epidemiology of *Verticillium dahliae* on olive (cv. Picual) and its effect on yield under saline conditions. *Plant Pathology* **52**, 212–218.
- Leyva-Pérez M, Jiménez-Ruiz J, Borroso-Albarracín JB, Mercado-Blanco J, Luque-Vázquez F, 2015. El gen del olivo permite el diagnóstico específico de la Verticilosis. *Vida rural* **393**, 82-85.

- Linderman RG, Davis EA, 2008. Evaluation of chemical agents for the control of *Phytophthora ramorum* and other species of *Phytophthora* on nursery crops. Online *Plant Health Progress*. doi: 10.1094/PHP-2008-0211-01-RS.
- Lockwood JL, 1977. Fungistasis in soils. *Biological Reviews* **52**:1-43.
- López-Escudero FJ, Blanco-López MA, 1996. Evaluación de la eficacia fungicida en el control de la Verticilosis del olivo. In: Book of abstracts of the VIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fitopatología. Córdoba, España: 197.
- López-Escudero FJ, Blanco-López MA, 2001. Effect of a single or double soil solarization to control *Verticillium* wilt in established olive orchards in Spain. *Plant Disease* **85**, 489–496.
- López-Escudero FJ, Del Río C, Caballero JM, Blanco-López MA, 2004. Evaluation of olive cultivars for resistance to *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology* **110**, 79–85.
- López-Escudero FJ, Blanco-López MA, 2005a. Recovery of young olive trees from *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology* **113**, 365–375.
- López-Escudero FJ, Blanco-López MA, 2005b. Effects of drip irrigation on population of *Verticillium dahliae* in olive orchards. *Journal of Phytopathology* **153**, 238–9.
- López-Escudero FJ, Blanco-López MA, 2007. Relationship between the inoculum density of *Verticillium dahliae* and the progress of *Verticillium* wilt of olive. *Plant Disease* **91**, 1372-1378.
- López-Escudero FJ, Mercado-Blanco J, Roca JM, Valverde-Corredor A, Blanco-López MA, 2010. *Verticillium* wilt of olive in the Guadalquivir Valley (southern Spain): Relation with some agronomical factors and spread of *Verticillium dahliae*. *Phytopathologia Mediterranea* **49**, 370-380.
- López-Escudero FJ, Mercado-Blanco J, 2011. *Verticillium* wilt of olive: a case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen. *Plant and Soil* **344**, 1–50. doi: 10.14601/Phytopathol\_Mediterr-3154.
- MAPAMA, 2016. Registro de productos fitosanitarios. <http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro/menu.asp>
- MAPA, 2018. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Anuario de estadística. [www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/](http://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/) (consulta 21.08.2018)
- Markakis EA, Tjamos SE, Antoniou PP, Paplomatas EJ, Tjamos EC. 2009. Symptom development, pathogen isolation and real-time QPCR quantification as factors for evaluating the resistance of olive cultivars to *Verticillium* pathotypes. *European Journal of Plant Pathology* **124**, 603–611.
- Markakis EA, Tjamos SE, Antoniou PP, Roussos PA, Paplomatas EJ, Tjamos EC, 2010. Phenolic responses of resistant and susceptible olive cultivars induced by defoliating and nondefoliating *Verticillium dahliae* pathotypes. *Plant Disease* **94**, 1156-1162.
- Markakis EA, Tjamos SE, Antoniou PP, Paplomatas EJ, Tjamos EC, 2016. Biological control of *Verticillium* wilt of olive by *Paenibacillus alvei*, strain K165. *BioControl* **61**, 293–303.
- Martin FN, 2003. Development of alternative strategies for management of soilborne pathogens currently controlled with methyl bromide. *Annual Review of Biochemistry* **41**, 325–350.
- Martínez F, Castillo S, Carmona E, Avilés M, 2009. Effect of soilless growing systems on the spread of *Verticillium dahliae* and the severity of the *Verticillium* wilt in strawberry. *Spanish Journal of Agricultural Research* **7**, 447-453.
- Menzies JD, 1962. Effect of anaerobic fermentation in soil on survival of sclerotia of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* **52**, 743.



- Menzies JD, Griebel GE, 1967. Survival and saprophytic growth of *Verticillium dahliae* in uncropped soil. *Phytopathology* **57**, 703–709.
- Mercado-Blanco J, Collado-Romero M, Parrilla-Araujo S, Rodríguez-Jurado D, Jiménez-Díaz RM, 2003. Quantitative monitoring of colonization of olive genotypes by *Verticillium dahliae* pathotypes with real-time polymerase chain reaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **63**, 91- 105.
- Mercado-Blanco J, Rodríguez-Jurado D, Hervás A, Jiménez-Díaz RM, 2004. Suppression of *Verticillium* wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. *Biological Control* **30**, 474–486.
- Merianos JJ, 1991. Quaternary ammonium antimicrobial compounds. In: Block SS, ed. *Disinfection, Sterilization, and Preservation*. Philadelphia, USA: Lea & Febiger, 225-255.
- Milgroom MG, Jiménez-Gasco MM, Olivares-García C., Jiménez-Díaz RM, 2016. Clonal expansion and migration of a highly virulent, defoliating lineage of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* **106**, 1038–1046.
- Moens M, Ben-Aicha B, 1986. Control of *Verticillium dahliae* on tomato in Tunisia by resistant cultivars and soil disinfestation. *EPPO Bulletin* **16**, 317–320.
- Mol L, van Riesen H, 1995. Effect of plant roots on the germination of microsclerotia of *Verticillium dahliae*. I. Use of root observation boxes to assess differences among crops. *European Journal of Plant Pathology* **101**, 673-678.
- Moraño-Moreno R, Bejarano Alcázar J, Rodríguez Jurado D, 2008. Propágulos de *Verticillium dahliae* de diferente tamaño infestan el agua utilizada en distintas campañas de riego del olivar en Andalucía. In: Book of abstracts of the XIV Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Lugo, España: 207.
- Moraño-Moreno R, Bejarano-Alcázar J, Rodríguez-Jurado D, 2011. Grupos de virulencia de *Verticillium dahliae* sobre olivo presentes en las aguas subterráneas y superficiales utilizadas para el riego de olivares en Andalucía. [www.expoliva.com/expoliva2011/simposium/resumenes/OLI-08.pdf](http://www.expoliva.com/expoliva2011/simposium/resumenes/OLI-08.pdf).
- Mozumder BK, Caroselli NE, Albert LS, 1970. Influence of water activity, temperature, and their interaction on germination of *Verticillium albo-atrum* conidia. *Plant Physiology* **46**, 347–9.
- Mulè R, Fodale AS, Tucci A, 2002. Control of olive *Verticillium* wilt by trunk injection with different doses of fosetyl-al and benomyl. *Acta Horticulturae* **586**, 761–764.
- Müller H, Tejedor-González E, Mercado-Blanco J, Rodríguez-Jurado D, Jiménez-Díaz R, Berg G, 2008. Effect of the biological control strain *Serratia plymuthica* HRO-C48 on *Verticillium* wilt of olive trees cv. Arbequina. *IOBC/wprs Bulletin* **30**, 173–177.
- Navarro C, Hidalgo JJ, Gómez del Campo M, 2017. Sistemas de plantación. In: Barranco D, Fernández Escobar R, Rallo L, eds. *El Cultivo del Olivo* 7th edition. Madrid, España: Junta de Andalucía & Ediciones Mundi-Prensa, 289–334.
- Navas-Cortés JA, Landa BB, Mercado-Blanco J, Trapero-Casas JL, Rodríguez-Jurado D, and Jiménez-Díaz RM, 2008. Spatiotemporal analysis of spread of *Verticillium dahliae* pathotypes within a high tree density olive orchard in southern Spain. *Phytopathology* **98**, 167-180
- Nedderhoff E, 2000. Hydrogen peroxide for cleaning irrigation system. *Commercial Grower* **55**, 32–34.
- Orgaz F, Fereres E, Testi L, 2017. Riego. In: Barranco D, Fernández Escobar R, Rallo L, eds. *El Cultivo del Olivo* 7th edition. Madrid, España: Junta de Andalucía & Ediciones Mundi-Prensa, 461–490.
- Pastor M, 2005. *Cultivo del olivo con riego localizado*. Junta de Andalucía & Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

- Pastor M, Serrano N, Vega V, 2005. Mantenimiento de una instalación de riego localizado. In: Pastor M, ed. *Cultivo del olivo con riego localizado*. Madrid, España: Mundi Prensa, 451-476.
- Pegg GF, 1984. The impact of verticillium diseases in agriculture. *Phytopathologia Mediterranea* **23**, 176-192.
- Pegg GF, Brady BL, 2002. *Verticillium wilts*. CAB International, Wallingford
- Pennypacker BW, Leath KT, Hill RR Jr, 1991. Impact of drought stress on the expression of resistance to *Verticillium albo-atrum* in alfalfa. *Phytopathology* **81**, 1014–1024.
- Pérez-Rodríguez M, Alcántara E, Amaro M, Serrano N, Lorite IJ, Arquero O, Orgaz F, López-Escudero FJ, 2015a. The influence of irrigation frequency on the onset and development of Verticillium wilt of olive. *Plant Disease* **99**, 488–95.
- Pérez-Rodríguez M, Orgaz F, Lorite IJ, López-Escudero FJ, 2015b. Effect of the irrigation dose on Verticillium wilt of olive. *Scientia Horticulturae* **197**, 564–7.
- Pérez-Rodríguez M, Serrano N, Arquero O, Orgaz F, Moral J, López-Escudero FJ, 2016a. The effect of short irrigation frequencies on the development of Verticillium wilt in the susceptible olive cultivar 'Picual' under field conditions. *Plant Disease* **100**, 1880–8.
- Pérez-Rodríguez M, Roca LF, López-Escudero FJ, 2016b. Influencia de la fertirrigación en la Verticilosis del olivo. In: Book of abstracts of the XVIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Palencia, España: 251.
- Petsikos-Panayotarou N, 1980. Behaviour of a systemic fungicide after injection into the trunk of an olive tree to control *Verticillium* disease. *Annales de l'Institut Phytopathologique Benaki* **12**, 227-235.
- Prieto P, Navarro-Raya C, Valverde-Corredor A, Amyotte S, Dobinson KF, Mercado-Blanco J, 2009. Colonization process of olive tissues by *Verticillium dahliae* and its in planta interaction with the biocontrol root endophyte *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *Microbial Biotechnology* **2**, 499–511.
- Poncet C, Offroy M, Bonnet G, Brun R, 2001. Disinfection of recycling water in rose cultures. *Acta Horticulturae* **547**, 121–126.
- Powelson ML, Rowe RC. 1993. Biology and management of early dying of potatoes. *Annual Review of Phytopathology* **3**, 111–126.
- Raudales RE, Parke JL, Guy CL, Fisher PR, 2014. Control of waterborne microbes in irrigation: a review. *Agricultural Water Management* **143**, 9-28.
- Robbs PG, Bartz JA, Brecht JK, Sargent SA, 1995. Oxidation-reduction potential of chlorine solutions and their toxicity to *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Geotrichum candidum*. *Plant Disease* **79**, 158– 162.
- Roca LF, Moral J, Trapero C, Blanco - López MA, López - Escudero FJ, 2015. Effect of inoculum density on Verticillium wilt incidence in commercial olive orchards. *Journal of Phytopathology* **164**, 61–64.
- Rodríguez E, García-Garrido JM, García PA, Campos M, 2008. Agricultural factors affecting Verticillium wilt in olive orchards in Spain. *European Journal of Plant Pathology* **122**, 287–295.
- Rodríguez-Jurado D, 1993. *Host-parasite interactions in Verticillium wilt of olive (Olea europaea L.) caused by Verticillium dahliae Kleb*. Córdoba, España: Universidad de Córdoba, Tesis Doctoral.
- Rodríguez-Jurado D, Blanco-López MA, Rapoport HE, Jiménez-Díaz RM, 1993. Present status of Verticillium wilt of olive in Andalucía (southern Spain). *EPPO Bulletin* **23**, 513-516.
- Rodríguez-Jurado D, Porras Alonso R, Trapero Casas JL, Jiménez Díaz RM, 2002. Potencial de las hojas de olivo caídas tras la infección por el patotipo defoliante de *Verticillium dahliae*

- como fuente de inóculo en las epidemias de Verticilosis. In: Book of abstracts of the XI Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Almería, España: P-138.
- Rodríguez-Jurado D, Bejarano-Alcázar J, 2007. Dispersión de *Verticillium dahliae* en el agua utilizada para el riego de olivares en Andalucía. *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas* **33**, 547–562.
- Rodríguez-Jurado D, Moraño-Moreno R, Bejarano-Alcázar J, 2008. Dispersion of defoliating and non-defoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* in host crops by irrigation water in southern Spain. *Journal of Plant Pathology* **90**, 419-420.
- Rosner A, Lachman O, Pearlsman M, Feigelson L, Maslenin L, Antignus Y, 2006. Characterization of *Cucumber leaf spot virus* isolated from recycled irrigation water of soil-less cucumber cultures. *Annals of Applied Biology* **149**, 313–316.
- Ruggieri G, 1946. A new disease of olive. *L'Italia Agricola* **83**, 369–372.
- Saeed I, Rouse D, Harkin J, Smith K, 1997. Effects of soil water content and soil temperature on efficacy of metham-sodium against *Verticillium dahliae*. *Plant disease* **81**, 773-776.
- Sánchez-Martínez J, Gallego-Simón V, Araque-Jiménez E, 2011. El olivar andaluz y sus transformaciones recientes. *Estudios geográficos* **270**, 203-229.
- Sánchez-Alcalá I, 2005. *Evaluación de la eficacia de sustancias fungicidas para el control de la Verticilosis del olivo y de la podredumbre radicular del olivo*. Córdoba, España: Universidad de Córdoba, Trabajo Profesional Fin de Carrera.
- Santos-Rufo A, Rodríguez-Jurado D, 2016. Evaluation of chemical disinfectants in reducing *Verticillium dahliae* conidia in irrigation water. *Crop Protection* **75**, 105-116.
- Santos-Rufo A, Vega V, Hidalgo JJ, Hidalgo JC, Rodríguez-Jurado D, 2017a. Assessment of the effect of surface drip irrigation on *Verticillium dahliae* propagules differing in persistence in soil and on Verticillium wilt of olive. *Plant Pathology* **66**, 1117-1127.
- Santos-Rufo A, Hidalgo JJ, Hidalgo JC, Vega V, Rodríguez-Jurado D, 2017b. Morphophysiological response of young olive trees to Verticillium wilt under different surface drip irrigation regimes. *Plant Pathology* **67**, 848-859.
- Sanzani SM, Schena L, Nigro F, Sergeeva V, Ippolito A, Salerno MG, 2012. Abiotic diseases of olive. *Journal of Plant Pathology* **94**, 469–491.
- Scarlett K, Collins D, Tesoriero L, Jewell L, Van Ogtrop F, Daniel R, 2016. Efficacy of chlorine, chlorine dioxide and ultraviolet radiation as disinfectants against plant pathogens in irrigation water. *European Journal of Plant Pathology* **145**, 27-38.
- Schnathorst WC, Sibbett GS, 1971. The relation of strains of *Verticillium albo-atrum* to severity of Verticillium wilt in *Gossypium hirsutum* and *Olea europaea* in California. *Plant Disease Reporter* **55**, 780–782.
- Schnathorst WC, 1981. Life cycle and epidemiology of *Verticillium*. In: Mace ME, Bell AA, Beckman CH, eds. *Fungal wilt diseases of plants*. Academic, New York, 81–111.
- Serrhini MN, Zeroual A, 1995. La verticilliose de l'olivier au Maroc. *Olivae* **58**, 58–61.
- Serrano N, Pastor M, Vega V, 2005. La instalación de riego por goteo. Materiales de riego. Calidad de los materiales. In Pastor M, ed. *Cultivo del olivo con riego localizado*. Madrid, España: Junta de Andalucía & Ediciones Mundi-Prensa., 211-300.
- Ślusarski C, Spotti CA, 2016. Efficacy of chloropicrin application by drip irrigation in controlling the soil-borne diseases of greenhouse pepper on commercial farms in Poland. *Crop Protection* **89**, 216–222.
- Stampi S, DeLuca G, Onorato M, Ambrogiani E, Zanetti F, 2002. Peracetic acid as an alternative wastewater disinfectant to chlorine dioxide. *Journal of Applied Microbiology* **93**, 725-731.

- Stewart-Wade SM, 2011. Plant pathogens in recycled irrigation water in commercial plant nurseries and greenhouses: their detection and management. *Irrigation Science* **29**, 267-297.
- Talboys PW, 1984. Chemical control of Verticillium wilts. *Phytopathologia Mediterranea* **23**, 163-175.
- Taylor RJ, Pasche JS, Gudmestad NC, 2005. Influence of tillage and method of metam sodium application on distribution and survival of *Verticillium dahliae* in the soil and the development of Verticillium wilt of potato. *American Journal of Potato Research* **82**, 451-461.
- Thanassoulopoulos CC, Biris DA, Tjamos EC, 1980. Dissemination of *Verticillium* propagules in olive orchards by irrigation water. In: Proceedings of the 5th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union. Patras, Grecia: 52-53.
- Thanassoulopoulos CC, Biris DA, Tjamos EC, 1981. Weed hosts as inoculum source of verticillium in olive orchards. *Phytopathologia Mediterranea* **30**, 164-168.
- Thani QA, Schaffer B, Liu G, Vargas AI, Crane JH, 2016. Chemical oxygen fertilization reduces stress and increases recovery and survival of flooded papaya (*Carica papaya* L.) plants. *Science Horticulturae* **202**, 173-183.
- Tjamos EC, Biris DA, Paplomatas EJ, 1991. Recovery of olive trees from Verticillium wilt after individual application of soil solarization in established olive orchards. *Plant Disease* **75**, 557-562.
- Toté K, Vanden Berghe D, Levecque S, Bénéré E, Maes L, Cos P, 2009. Evaluation of hydrogen peroxide-based disinfectants in a new resazurin microplate method for rapid efficacy testing of biocides. *Journal of Applied Microbiology* **107**, 606-615.
- Trapero-Casas A, López-Escudero FJ, Blanco-López A, 2017. Enfermedades. In: Barranco D, Fernández Escobar R, Rallo L, eds. *El Cultivo del Olivo* 7th edition. Madrid, España: Junta de Andalucía & Ediciones Mundi-Prensa, 65-95.
- Trapero C, Roca LF, Alcántara E, López-Escudero FJ, 2011. Colonization of olive inflorescences by *Verticillium dahliae* and its significance for pathogen spread. *Journal of Phytopathology* **159**, 638-640.
- Trapero C, Serrano N, Arquero O, Del Río C, Trapero A, López-Escudero FJ, 2013. Field resistance to Verticillium wilt in selected olive cultivars grown in two naturally infested soils. *Plant Disease* **97**, 668-674.
- Trapero C, 2014. *Selección de variedades y patrones de olivo resistentes a la Verticilosis*. Córdoba, España: Universidad de Córdoba, Tesis doctoral.
- Trapero C, Rallo L, López-Escudero FJ, Barranco D, Díez CM, 2015. Variability and selection of Verticillium wilt resistant genotypes in cultivated olive and in the *Olea* genus. *Plant Pathology* **64**, 890-900.
- Tsrer L, 2011. Epidemiology and control of Verticillium wilt on olive. *Israel Journal of Plant Sciences* **59**, 59-69.
- Valverde-Caballero P, Trapero C, Arquero O, Serrano N, Roca LF, López-Escudero FJ, 2016. Uso de patrones resistentes para el control de la Verticilosis del olivo. In: Book of abstracts of the XVIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Palencia, España: 96
- Van Wyk PS, Baard SW, 1971. Germination of conidia of *Verticillium dahliae* in soil. *Plant and Soil* **35**, 601-611.
- Van Wyk SJP, Boutigny AL, Coutinho TA, Viljoen A, 2012. Sanitation of a South African forestry nursery contaminated with *Fusarium circinatum* using hydrogen peroxide at specific oxidation reduction potentials. *Plant Disease* **96**, 875-880.
- Vänninen I, Koskula H, 1998. Effect of hydrogen peroxide on algal growth, cucumber seedlings

- and the reproduction of shore flies (*Scatella stagnalis*) in rockwool. *Crop Protection* **17**, 547-553.
- Varo A, Moral J, Lozano-Tóvar MD, Trapero-Casas A, 2016a. Development and validation of an inoculation method to assess the efficacy of biological treatments against *Verticillium* wilt in olive trees. *BioControl* **61**, 283–292.
- Varo A, Raya-Ortega MC, Trapero A, 2016b. Selection and evaluation of micro-organisms for biocontrol of *Verticillium dahliae* in olive. *Journal of Applied Microbiology* **121**, 767–777.
- Varo-Suárez A, 2017. *Evaluación de enmiendas orgánicas, microorganismos y productos naturales para el control biológico de la Verticilosis en olivo*. Córdoba, España. Universidad de Córdoba, Tesis doctoral.
- Vissers M, van Parys P, Audenaert J, Kerger P, De Windt W, Dick J, Gobin B, 2009. Study of use of different types of hydrogen peroxides (2006-2008). *Communication in Agricultural and Applied Biological Sciences* **74**, 941-949.
- Wilhelm S, 1955. Longevity of *Verticillium* wilt fungus in the laboratory and field. *Phytopathology* **45**, 180–181.
- Woodward JE, Wheeler TA, Cattaneo MG, Russell SA, Baughman TA, 2011. Evaluation of soil fumigants for management of *Verticillium* wilt of peanut in Texas. Online *Plant Health Progress*. doi:10.1094/PHP-2011-0323-02-RS
- Willetts HJ, 1971. The survival of fungal sclerotia under adverse environmental conditions. *Biological Reviews* **46**, 387-407.
- Yildiz A, Doğan MN, Boz Ö, Benlioğlu S, 2009. Weed host of *Verticillium dahliae* in cotton fields and characterization of *V. dahliae* isolates from weeds. *Phytoparasitica* **37**, 171–178.
- Xiao CL, Subbarao KV, 2000. Effects of irrigation and *Verticillium dahliae* on Cauliflower root and shoot growth dynamics. *Phytopathology* **90**, 995–1004.
- Zheng Y, Cayanan DF, Dixon M, 2008. Control of pathogens in irrigation water using chlorine without injury to plants. *International Plant Propagators' Society, combined proceedings* **58**, 248-249.

## Anejo: Otras contribuciones científicas

Otras contribuciones científicas derivadas de esta tesis doctoral se enumeran a continuación.

### Contribución a revistas de carácter divulgativo

Gómez-Gálvez FJ, Hidalgo JC, Hidalgo JJ, Vega V, Rodríguez-Jurado D, 2018. Control de *Verticillium dahliae* en el agua de riego mediante desinfectantes aplicados al sistema de riego por goteo. SERVIFAPA. Córdoba, España: Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera.

### Aportaciones científicas en congresos nacionales

Gómez-Gálvez FJ, Santos-Rufo A, Rodríguez-Jurado D, 2014. Eficacia *in vitro* de productos químicos comercializados para prevenir y erradicar los esclerocios de *Verticillium dahliae* en el agua. En: *Libro de Resúmenes del XVI Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Lérida, España: 303.

Gómez-Gálvez FJ, Rodríguez-Jurado D, 2015. Avances del potencial de productos químicos para erradicar los esclerocios de *Verticillium dahliae* en el agua. En: *Libro de Resúmenes del XVII Simposio Científico-Técnico Expoliva, Foro Olivar y Medio Ambiente*. Jaén, España: OLI-16.

Gómez-Gálvez FJ, Hidalgo-Moya JC, Hidalgo-Moya JJ, Vega-Macías V, Rodríguez-Jurado D, 2016. Desinfestación del agua a través del riego para prevenir la incorporación de *V. dahliae* al suelo. En: *Libro de Resúmenes del XVII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Palencia, España: POST-10.

Gómez-Gálvez FJ, Rodríguez-Jurado D, 2016. Efecto de la aplicación al suelo de desinfectantes químicos sobre el patosistema olivo-*Verticillium dahliae*. En: *Libro de Resúmenes del XVII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Palencia, España: POST-11.

Gómez-Gálvez FJ, Hidalgo-Moya JC, Hidalgo-Moya JJ, Vega-Macías V, Rodríguez-Jurado D, 2017. La inyección de productos químicos en el agua de riego reduce el inóculo de *Verticillium dahliae* aportado al suelo. En: *Libro de Resúmenes del XVIII Simposio Científico-Técnico Expoliva, Foro Olivar y Medio Ambiente*. Jaén, España: OLI-06.

Gómez-Gálvez FJ, Hidalgo-Moya JC, Hidalgo-Moya JJ, Vega-Macías V, Rodríguez-Jurado D, 2018. Inyección de desinfectantes químicos en el agua de riego para combatir la Verticilosis del olivo. En: *Libro de Resúmenes del XVIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Toledo, España: Póster 009.

Rodríguez-Jurado D, Gómez-Gálvez FJ, Santos-Rufo A, Hidalgo-Moya JC, Vega-Macías V, Hidalgo-Moya JJ, 2018. Efecto de la desinfestación química del suelo de bajo riesgo sobre *Sinapis alba* como biofumigante. En: *Libro de Resúmenes del XVIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Toledo, España: Póster 013.

### **Aportaciones científicas en congresos internacionales**

Gómez-Gálvez FJ, Santos-Rufo A, Rodríguez-Jurado D, 2013. Potential efficacy of commercial chemicals to reduce water infestations by *Verticillium dahliae*. En: *Libro de Resúmenes del XI Simposio Internacional de Verticillium*. Göttingen, Alemania: 71.

Gómez-Gálvez FJ, Hidalgo-Moya JJ, Hidalgo-Moya JC, Vega-Macías V, Rodríguez-Jurado D, 2016. Efficacy of chemical treatments in preventing arrival of *Verticillium dahliae* through irrigation system. En: *Libro de Resúmenes del XII Simposio Internacional de Verticillium*. Ljubljana, Eslovenia: PSII-03.

Rodríguez-Jurado D, Hidalgo-Moya JJ, Hidalgo-Moya JC, Vega-Macías V, Gómez-Gálvez FJ, 2018. Injection of chemical treatments into the irrigation system to deal with *Verticillium dahliae* in water. FERTINNOWA conference: Sharing fertigation best practices across Europe. Almería, España.

Rodríguez-Jurado D, Santos-Rufo A, Gómez-Gálvez FJ, Hidalgo-Moya JC, Hidalgo-Moya JJ, Vega-Macías V, 2018. Inoculum management through irrigation system to reduce *Verticillium* wilt of olive. Proceedings of the 6<sup>th</sup> Conference on the Olive Tree and Olive Products (Olivebioteq 2018) – Olive Management, Biotechnology and Authenticity of Olive Products. Sevilla, España: T04-P2

