

Aislamiento de *Verticillium dahliae* de suelo y caracterización morfológica de sus microesclerocios

F. J. LÓPEZ-ESCUADERO, D. NÚÑEZ-SANTOS, M. A. BLANCO-LÓPEZ

En este trabajo se describe una metodología que facilita el aislamiento directo de *V. dahliae* del suelo. Tras procesar la muestra por Tamizado Húmedo, se siembran alícuotas de la suspensión resultante en placas del medio Agar Polipectato Sódico Modificado (APSM) sobre las que se ha extendido una lámina de celofán. Las colonias de microesclerocios de *V. dahliae* formadas sobre el celofán se recuperan retirando la cuadrícula de la lámina que las contiene. Las colonias adheridas al celofán se tratan en un baño de ultrasonidos, se lavan y se filtran utilizando una bomba de vacío. Tras el filtrado, el residuo resultante se siembra en nuevas placas de APSM, PDA o PDA acidificado, donde las colonias de *V. dahliae* crecen libres de contaminantes, y se pueden transferir para obtener el cultivo puro. Se ha obtenido así una colección de aislados de suelo de *V. dahliae*, cuyos microesclerocios producidos sobre APSM se han caracterizado morfológicamente. Los valores de la relación longitud/anchura de los microesclerocios de los aislados obtenidos mostraron una amplia variabilidad comparados con los microesclerocios de los aislados de referencia, V117 (defoliante) y V4 (no defoliante) de *V. dahliae*. Las características morfológicas de los microesclerocios en APSM podrían estar relacionadas con el patotipo del aislado de este agente, como ha sido descrito por otros autores en otros medios de cultivo. Por ello, este método de aislamiento podría facilitar en el futuro estudios de ecología y virulencia del patógeno. Adicionalmente, la metodología desarrollada podría aplicarse de forma simultánea para la determinación de la densidad de inóculo de *V. dahliae*.

F. J. LÓPEZ-ESCUADERO, D. NÚÑEZ-SANTOS, M. A. BLANCO-LÓPEZ. Departamento de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba. Apdo. 3048, 14080 Córdoba.

Palabras clave: aislados defoliantes y no defoliantes de *Verticillium dahliae*, aislamiento del suelo, caracterización morfológica, microesclerocios.

INTRODUCCIÓN

Verticillium dahliae es un hongo de suelo que produce enfermedades denominadas Verticilosis, responsables de importantes pérdidas en una amplia gama de especies cultivadas, entre las que destacan algodón, cultivos hortícolas y olivo. Los factores más importantes que determinan el desarrollo de las Verticilosis incluyen la cantidad de agente presente en el suelo (densidad de inóculo) y su virulencia. El conocimiento de ambos

factores previamente a la siembra o plantación es fundamental para establecer niveles de riesgo y diseñar estrategias de control, aspectos especialmente importantes en huéspedes leñosos como el olivo.

Para la estimación cuantitativa de la densidad de inóculo de *V. dahliae* en el suelo se han desarrollado una gran variedad de métodos (ASHWORTH *et al.*, 1972; 1974; BEN-YEPHET y PINKAS, 1976; BUTTERFIELD y DE VAY, 1977; DE VAY *et al.*, 1974; EVANS *et al.*, 1966; HARRIS *et al.*, 1993; HARRISON y

LIVINGSTONE, 1966; HUISMAN y ASHWORTH, 1974 a y b; MENZIES y GRIEBEL, 1967) y medios de cultivo (ASHWORTH *et al.*, 1972; 1974; AUSHER *et al.*, 1975; BUTTERFIELD y DE VAY, 1977; DE VAY *et al.*, 1974; EVANS *et al.*, 1967; GREEN y PAPAVIDAS, 1968; HUISMAN y ASHWORTH, 1974 a y b; MENZIES y GRIEBEL, 1967; NADAKAVUKAREN y HORNER, 1959; TAYLOR, 1969; TSAO, 1970). Estos procesos tienen en común la siembra de una cantidad conocida de suelo en la superficie de un determinado medio de cultivo selectivo, sobre la cual *V. dahliae* produce colonias con microsclerocios (ME) (estructuras vegetativas de supervivencia formadas por agregaciones de células). El número de estas colonias referida a la cantidad inicial de suelo sembrado constituye la densidad de inóculo y se expresa como número de ME o propágulos por gramo de suelo seco. A pesar de que la mayoría de los medios empleados presentan selectividad suficiente para permitir el crecimiento de colonias reconocibles de *V. dahliae*, que posibilitan su conteo en presencia de otros microorganismos del suelo, ninguno de ellos en particular parece ser completamente satisfactorio (BUTTERFIELD y DE VAY, 1977; HARRIS *et al.*, 1993; TERMORSHUIZEN, 2000).

Otra de las grandes limitaciones que se han descrito ha sido la dificultad o imposibilidad de obtener aislados de *V. dahliae* del suelo, aspecto abordado por numerosos autores y que es necesario para caracterizar las poblaciones del patógeno en relación con su patogenicidad y virulencia, grupos de compatibilidad vegetativa, morfología y dinámica de germinación de sus propágulos. Por ello, el análisis cuantitativo de *V. dahliae* de una muestra de suelo no permite simultáneamente el aislamiento del agente de dicha muestra, sino sólo su enumeración. Es decir, la transferencia directa de los ME que *V. dahliae* produce sobre los medios semiselectivos a medios convencionales para la obtención de cultivos puros no suele ser posible debido a la gran cantidad de hongos contaminantes que crecen en este medio. Por ello, se han descrito con este objeto numerosas combinaciones o

variantes de algunos de los métodos que se emplean para su cuantificación, aunque en la mayoría de los casos el procesado de las muestras es muy complejo y laborioso, las tasas de recuperación son bajas y los aislamientos no suelen ser consistentes. Entre ellos se deben citar los intentos de recuperación directa de ME de una muestra aplicando diversos métodos de desinfección de las colonias o combinaciones de dilución en placa, decantado, centrifugación, flotación o filtrado de los propágulos recuperados (BEJARANO-ALCÁZAR, 1990; BEN-YEPHET y PINKAS, 1976; EVANS *et al.*, 1966, GROGAN *et al.*, 1979; HARRIS *et al.*, 1993; HUISMAN y ASHWORTH, 1974 a y b), así como la estimulación de la germinación de ME (BEJARANO-ALCÁZAR, 1990; ISAAC y MACGARVIE, 1962). Otros autores han evaluado el aislamiento del agente a partir de colonias desarrolladas en medios semiselectivos con ácido poligalacturónico tras sembrar una muestra utilizando un muestreador Andersen (BEJARANO-ALCÁZAR, 1990) o el método del Tamizado Húmedo (GROGAN *et al.*, 1979; JOAQUIM y ROWE, 1990) sin mejorar sensiblemente los resultados.

En resumen, la baja eficiencia de estas técnicas ha sido atribuida a: 1) la dificultad de distinguir entre las estructuras de supervivencia de este agente de las partículas de suelo y de otras estructuras fúngicas presentes (BEJARANO-ALCÁZAR, 1990; HUISMAN y ASHWORTH, 1974 a y b); 2) al elevado porcentaje de los ME presentes en la muestra de suelo que se hallan embebidos en restos microscópicos de tejidos de plantas infectadas que no permiten su identificación (ASHWORTH *et al.*, 1974; BEJARANO-ALCÁZAR, 1990; BEN-YEPHET y PINKAS, 1976; EVANS *et al.*, 1966; HUISMAN y ASHWORTH, 1974 a y b); 3) al frecuente desarrollo de otros hongos a partir de los ME sembrados, que se atribuye a contaminantes adheridos a éstos o al aislamiento erróneo de propágulos parecidos a ME (BEJARANO-ALCÁZAR, 1990; EVANS *et al.*, 1966; HUISMAN y ASHWORTH, 1974 a y b; DE VAY *et al.*, 1974; LÓPEZ-ESCUADERO *et al.*, 2000); 4) a la reducida selectividad de los medios de cultivo, que permiten el creci-

miento de contaminantes (hongos, bacterias, hiperparásitos de ME, etc.) con tasas de crecimiento muy superiores a las de *V. dahliae*; y 5) a la posible dormancia de los ME que se han producido sobre los medios semiselectivos (ISAAC y MACGARVIE, 1962).

En este trabajo se ha desarrollado una metodología para la recuperación de *V. dahliae* del suelo que reduce la mayor parte de las limitaciones expuestas y aumenta la frecuencia de obtención de aislados del agente en cultivo puro a partir de una muestra de suelo, aspecto necesario para el estudio de la ecología y virulencia del hongo en el suelo. Además, se han caracterizado morfológicamente los ME producidos por los aislados obtenidos en el medio de cultivo APSM, comparándolos con las características de los aislados defoliante y no defoliante de *V. dahliae*. Esta metodología puede ser usada también, con ligeras variantes, para la determinación cuantitativa del patógeno en el suelo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Determinación de la densidad de inóculo de las muestras

Las muestras de suelo incluidas en este estudio provenían de suelos naturalmente infestados por *V. dahliae*, en su mayoría recogidas de plantaciones de olivar afectadas por la Verticilosis del Olivo, salvo las muestras 12 y 15, hasta la fecha cultivadas de algodón o plantas madres de rosal, respectivamente (Tabla 1). Las muestras se proce-

saron inicialmente por el método del Tamizado Húmedo (LÓPEZ-ESCUADERO, 1999; LÓPEZ-ESCUADERO y BLANCO-LÓPEZ, 2001) para determinar la densidad de inóculo de *V. dahliae* en cada una de ellas. Para ello, cada muestra de suelo se deseca al aire durante un mes, se limpia de elementos gruesos y se homogeniza haciéndola pasar por un tamiz de 0.8 mm. Una submuestra de 25g se suspende en 100 ml de agua destilada y la suspensión se agita durante 1 h a 270 rpm. Después, la suspensión se tamiza a través de filtros de 150 y 35 μm situados en tándem, y el residuo retenido en el tamiz de 35 μm se recupera en 100 ml de agua destilada. Tras agitar, alícuotas de 1 ml de la suspensión se siembran en cada una de 10 placas de medio APSM, que se incuban durante 14 días a 24°C en oscuridad. Tras la incubación, las placas se lavan bajo el agua del grifo para eliminar las partículas de suelo y el micelio aéreo superficial de las colonias fúngicas. Con la ayuda de un microscopio estereoscópico se cuentan las colonias de *V. dahliae*, asumiendo que cada colonia detectada se ha formado a partir de un microesclerocio individual o un grupo de ellos presentes en el suelo, por lo que el resultado se expresa como número de propágulos o ME por gramo de suelo seco (ppg).

Obtención de aislados del patógeno en cultivo puro

Para la obtención de aislados de *V. dahliae* en cultivo puro, las muestras fueron proce-

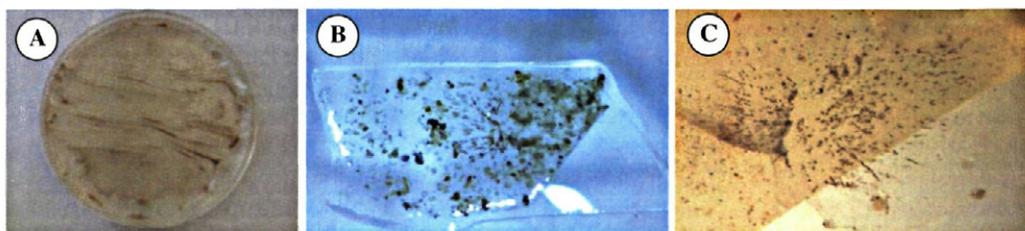


Fig. 1. Siembra de la suspensión de suelo en una placa de Agar Polipectato Sódico Modificado sobre la que se ha extendido una lámina de papel de celofán estéril de 600 μm (A); Colonia de *V. dahliae* formada sobre una cuadrícula de celofán (observarse la fina capa de micelio y microesclerocios formada por el agente sobre la lámina) (B); Colonia limpia de microesclerocios alargados crecida en el borde de la lámina de celofán (C).

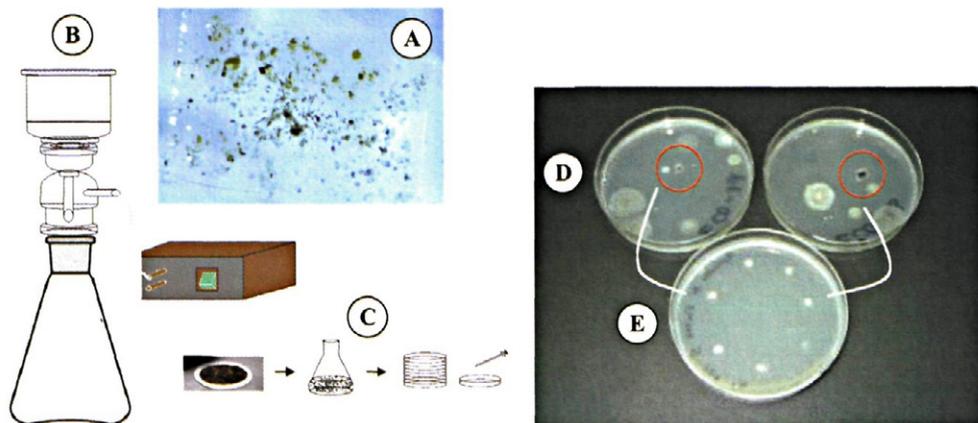


Fig.2. Procesado de una colonia de *V. dahliae* formada sobre una cuadrícula de celofán con gran cantidad de partículas de suelo tras someterla a un baño de ultrasonidos y agitación (A); Lavado y filtrado en embudo quitasato conectado a una bomba de vacío (B); Papel de filtro con el residuo del filtrado y su siembra en APSM por dilución en placa (C); Placas de APSM con pequeñas colonias de *V. dahliae* separadas de las colonias de contaminantes (D); Transferencia de colonias a PDA acidificado para la obtención de un cultivo puro (E).

cesadas aplicando algunas variantes al método anterior. Partiendo de la suspensión en 100 ml de agua destilada de partículas de suelo retenidas entre 150 y 35 μm , se sembraron alícuotas de 1 ml en placas de medio selectivo APSM sobre las que se había extendido una lámina de papel celofán permeable y estéril de 600 μm de grosor (Fig. 1 A).

Una vez sembradas las placas (Fig. 1 A) y completada la incubación (14 días a 22°C) se observaron las colonias estrelladas del agente bajo lupa, pero sin eliminar el suelo sembrado mediante lavado en el agua del grifo como se ha descrito anteriormente para estimar la densidad de inóculo del suelo. Las colonias de ME desarrolladas sobre la lámina de celofán se retiraron con unas pinzas tras cortar con un escalpelo el trozo de celofán que las contenía, evitando que el agar quedara adherido (Fig. 1 B y C). Los trozos de celofán conteniendo las colonias se almacenaron en placas petri vacías con una fina capa de agua estéril a 4°C para su procesado posterior.

En el caso de que las cuadrículas de celofán contuvieran colonias sucias, cubiertas con gran cantidad de partículas de suelo (Fig. 2 A), se suspendieron en 10 ml de agua

destilada en un tubo de fondo plano y se sometieron a un baño de ultrasonidos durante 30 s durante los cuales la suspensión se agitó con pinzas estériles. Tras el baño, el tubo se agitó durante 30 s para favorecer el desprendimiento de las partículas de suelo y de los ME que componen la colonia a la suspensión. En caso necesario la suspensión se sometió por segunda vez al mismo proceso, hasta conseguir que la cuadrícula de celofán quedara completamente limpia y pudiera ser retirada con una pinza. La suspensión se lavó a continuación a través de un embudo quitasato conectado a una bomba de vacío (Fig. 2 B) reteniendo el residuo en un papel de filtro de laboratorio estéril de forma circular, utilizando aproximadamente 500 ml de agua estéril. El residuo retenido en el filtro (Fig. 2 C) se recuperó en un tubo de fondo plano con 10 ml de agua estéril. Por último, se sembraron alícuotas de 0,5 ml de la suspensión así obtenida en placas de APSM (Fig. 2 C) (5 repeticiones), que se incubaron a 22°C en oscuridad. Entre los 6 y 14 días de incubación, las placas se observaron nuevamente bajo lupa, detectándose típicas colonias de *V. dahliae* con crecimiento independiente y libres de contaminantes sobre la superficie

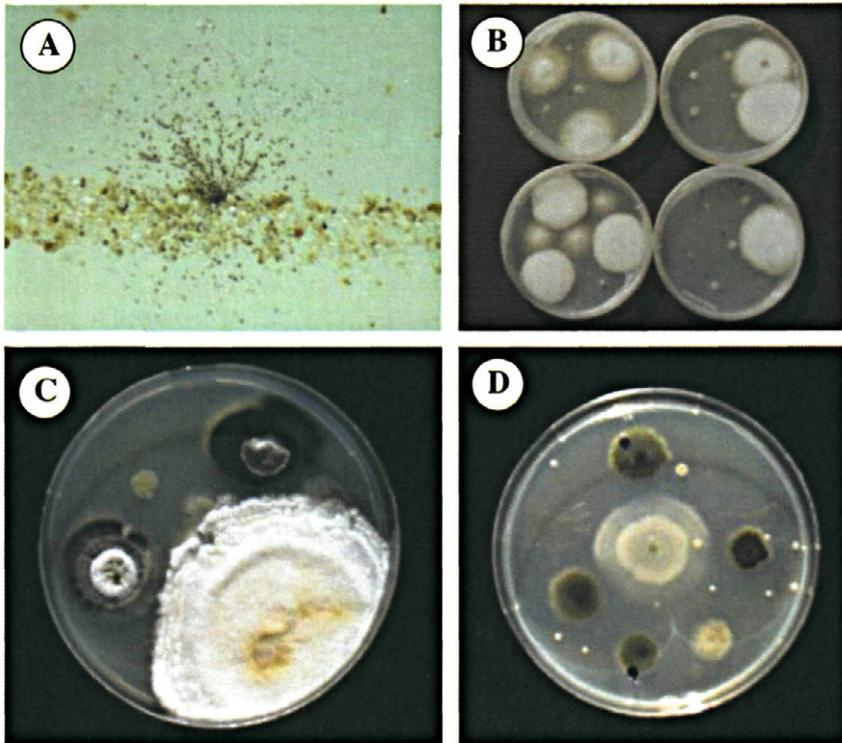


Fig. 3. Colonia semilimpia de *V. dahliae* en APSM-celofán (A); Transferencia de microesclerocios de la colonia anterior tras ser procesada por baño de ultrasonidos y agitación: en PDA acidificado a los 4 días (B) y 10 días (C) de incubación y APSM (D).

del medio (Fig. 2 D). Estas colonias se transfirieron a PDA acidificado para obtener cultivos puros (Fig. 2 E, Fig. 5).

En el caso de que las colonias tuvieran menor cantidad de partículas de suelo (Fig. 3 A) se lavaron mediante un proceso menos drástico sometiéndolas, tras su suspensión en agua estéril, a un baño de ultrasonidos durante 15 s, para facilitar el desprendimiento de las partículas de suelo a la suspensión pero manteniendo adherido al trozo de celofán la capa de micelio y ME de la colonia (Fig. 1 B). A continuación esta capa se separó del cuadrado de celofán y se transfirió a una placa petri vacía. Bajo la lupa, con la ayuda de una aguja enmangada se tomaron de esta masa vegetativa ME individuales o pequeños grupos de éstos, se lavaron en una

gota de agua estéril depositada dentro de la misma placa petri y se sembraron en placas de PDA acidificado (Fig. 3 B y C) y APSM (Fig. 3 D), incubándose a 22°C.

Finalmente, en el caso de que las colonias estuvieran más limpias, libres de partículas de suelo tales como las formadas en bordes o pliegues de la lámina de celofán (Fig. 4 A), se depositaron sobre un papel de filtro y un colador y se lavaron exclusivamente con agua estéril por goteo. Bajo la lupa, con la ayuda de una aguja enmangada se transfirieron ME individuales o pequeños grupos de éstos directamente a placas de APSM (Fig. 4 B), incubándose a 22°C en oscuridad. Las colonias libres de contaminantes se transfirieron a nuevas placas de PDA como cultivos puros (Fig. 5).

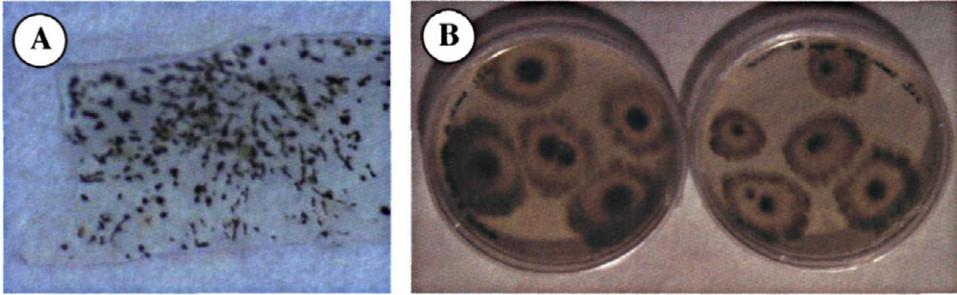


Fig. 4. Colonia de microsclerocios limpia recuperada de un pliegue en la lámina de celofán (A); Transferencia de grupos de microsclerocios de la colonia anterior lavado con agua esterilizada a placas de APSM (B).

Comparación de la eficacia cuantitativa de los medios APSM y APSM-celofán.

Además de la metodología descrita para la obtención del agente del suelo, se evaluó la eficacia del medio APSM con celofán (APSM+C) para determinar la densidad de inóculo de *V. dahliae* en el suelo tras la aplicación del método del tamizado húmedo. Para ello se realizó un experimento de comparación de análisis cuantitativo de este medio con el medio normal APSM, sin lámina de celofán. Los objetivos fueron estudiar la posible influencia de la fuente de carbono adicional (celofán) en la estimación del agente en el suelo y evaluar la posibilidad de cuantificar y aislar al agente de la muestra con la aplicación de un sólo proceso.

Para ello se procesaron 8 muestras de suelo (muestras 1-8, Tabla 1) mediante tami-

zado húmedo. A continuación, de la solución de los residuos retenidos en el tamiz de 35 μm para cada muestra, se sembraron alícuotas de 1 ml sobre los medios APSM y APSM+C, con 10 repeticiones por medio y muestra. Las placas se incubaron a 22°C y el conteo de colonias se realizó bajo lupa a los 14 días de incubación.

Caracterización morfológica de los aislados de suelo en APSM.

Los aislados de *V. dahliae* obtenidos mediante el método de siembra en APSM+C se caracterizaron morfológicamente mediante las medidas de longitud y anchura de los ME de las colonias formadas en APSM (Fig. 6). Para ello, se sembró cada aislado en APSM y las placas se incubaron como se ha descrito hasta la aparición de las colonias de

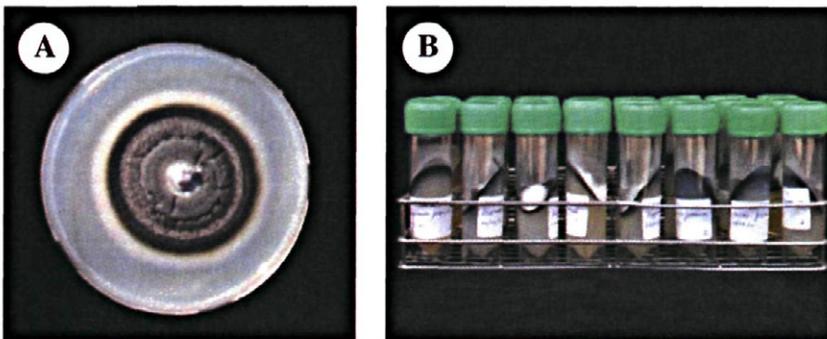


Fig. 5. Cultivo puro de *V. dahliae* en PDA acidificado (A); Conservación de aislados de suelo en tubos de estría de PDA acidificado con aceite de parafina (B).

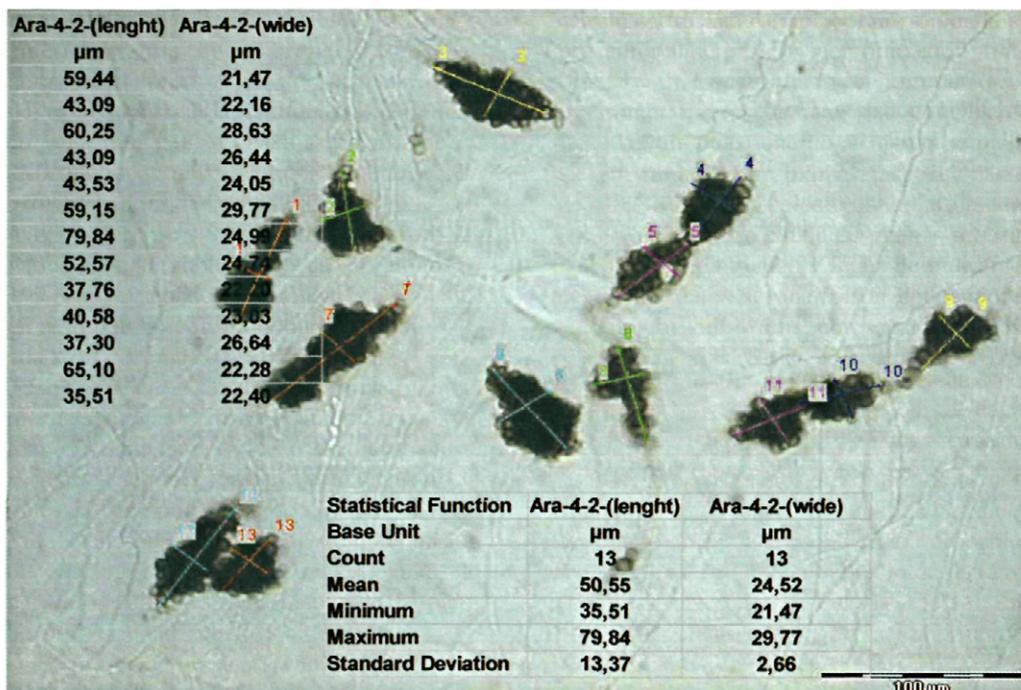


Fig. 6. Mediciones de longitud y anchura de microesclerocios de un aislado de suelo de *V. dahliae* realizados con el programa AnalySIS (Soft Imagin System) por fijación de una imagen microscópica captada por una cámara de video (Kappa).

ME del agente. De cada aislado, se seleccionaron 3 colonias al azar, de las que se hicieron 6 preparaciones microscópicas (2 por colonia) empleando fucsina ácida en lactofenol. Las colonias escogidas tenían el mismo tiempo de incubación y las transferencias se realizaron tomando porciones de agar del centro y de la periferia de las colonias para evitar diferencias morfológicas entre microesclerocios con diferente grado de madurez, o coalescencias entre dichas estructuras. De cada aislado se midieron la longitud, anchura y relación longitud/anchura (L/A) de un total de 200 ME por aislado (65-70 ME por colonia). Para ello se usó el programa analítico de imagen AnalySIS (Soft Imaging System), conectado a un microscopio Nikon Optiphot a través de una video cámara (Kappa) (Fig. 6). Estos valores se compararon con los parámetros morfológicos de dos

aislados control de la micoteca del Laboratorio de Patología Vegetal (Universidad de Córdoba) correspondientes a los patotipos defoliante (D) (aislado V117) y no defoliante (ND) (V4) de *V. dahliae*, que se incluyeron también junto al resto de los aislados. Los valores de longitud, anchura y longitud/anchura de los ME se analizaron mediante el análisis de varianza, utilizando el programa Statistix 4.1 (ANÓNIMO, 1994).

RESULTADOS

Densidad de inóculo de las muestras y comparación de la eficacia cuantitativa de los medios APSM y APSM+C

El análisis cuantitativo de las muestras de suelo mediante el procedimiento del Tamizado Húmedo y siembra en APSM mostró una gran variabilidad en las densidades de inócu-

Tabla 1. Densidad de inóculo (DI) de *Verticillium dahliae* de muestras de suelo procedentes de diferentes campos procesadas en Agar Polipectato Sódico Modificado con celofán (APSM+C) o sin celofán (APSM).

Muestra y referencia	Procedencia	Textura	DI en APSM ^a	DI en APSM+C
1 Corchuela 9	S.J. Rinconada (Sevilla)	Franca-arcillosa	7.6 b	14.8 a
2 Corchuela 15	S.J. Rinconada (Sevilla)	-	0.0	1.2
3 Corchuela 21	S.J. Rinconada (Sevilla)	Franca	4.4 a	5.2 a
4 Corchuela 22	S.J. Rinconada (Sevilla)	-	2.8 a	4.8 a
5 Piedras Altas	Marinaleda (Sevilla)	Franca-arcillosa	54.0 a	55.6 a
6 La Vega	Nac. Zambra (Córdoba)	Franca-arcillosa-limosa	4.0 a	3.6 a
7 Batán	Écija (Sevilla)	-	1.2 a	2.0 a
8 Alburquerque	La Carlota (Córdoba)	-	0.0	0.8
9 Corchuela 2	S.J. Rinconada (Sevilla)	Franca-arcillosa-arenosa	1.6	-
10 Corchuela 4	S.J. Rinconada (Sevilla)	-	10.2	-
11 Corchuela 6	S.J. Rinconada (Sevilla)	Franca-arenosa	1.2	-
12 Santana	Espeluy (Jaén)	Franca-arcillosa	12.0	-
13 Deh. Algarín	Lora del Río (Sevilla)	Franca	13.6	-
14 M. Guillén	Jaén	-	13.6	-
15 Almodóvar	Almodóvar (Córdoba)	Franca	27.6	-

^a La densidad de inóculo, expresada en microesclerocios por gramo de suelo seco, se determinó por el método del tamizado húmedo utilizando placas de Petri con APSM+C o APSM. Valores en filas seguidos por letras diferentes fueron significativamente diferentes a un nivel de probabilidad de $P=0.05$ de acuerdo al Test de Mínima Diferencia Significativa Protegida de Fisher.

lo de las muestras escogidas desde 54,0 hasta 1,2 ppg de suelo como se refleja en la Tabla 1.

De los análisis de textura disponibles de algunos suelos (Tabla 1) se observa que las densidades de inóculo más elevadas correspondieron a suelos de textura franco-arcillosa (muestras 1 y 5) o franca (muestras 3, 13 y 15), mientras que aquéllas más bajas se identifican con suelos que presentan algún componente arenoso (muestras 9 y 11).

En los 8 suelos analizados mediante el medio APSM+C, *V. dahliae* fue detectado, en tanto que en 2 de ellos no lo fue mediante el medio APSM. La densidad de inóculo obtenida por APSM+C fue superior o similar a la detectada mediante APSM (Tabla 1).

Obtención de cultivos puros del patógeno

El método de aislamiento de *V. dahliae* de muestras de suelo utilizando APSM+C resultó eficaz para recuperar cultivos puros de este agente de una amplia gama de suelos de diferentes características y procedencias

(Tabla 1). Se han obtenido 28 aislados de las 15 muestras de suelo utilizando APSM+C. Para las 8 primeras (muestras 1-8, Tabla 1), tras su recogida se compararon simultáneamente, a partir de la misma submuestra, los medios APSM y APSM+C para la determinación cuantitativa de la DI. En las 7 restantes (muestras 9-15, Tabla 1), el medio APSM+C sólo se utilizó para la obtención de aislados, aunque en el momento de ser recogidas se determinó igualmente su DI en APSM (Tabla 1).

En conjunto, el proceso de aislamiento del hongo a partir de las colonias recuperadas de APSM+C no fue excesivamente dificultoso, ya que el método permitió la elección de aquéllas colonias más desarrolladas, con mayor número de ME, y más libres de partículas de suelo. Estos dos aspectos aumentaron la eficacia de los posteriores lavados de la colonia y el éxito de obtención de un cultivo puro sin contaminación durante las transferencias. Sin embargo la detección de colonias bajo la lupa fue más labo-

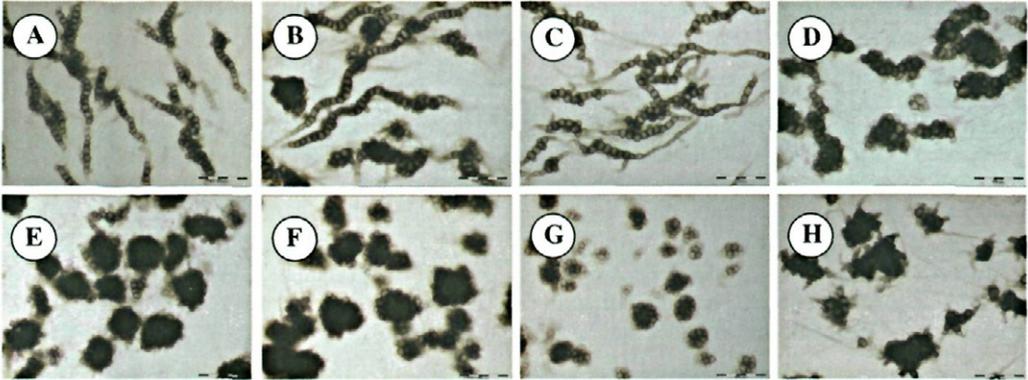


Fig. 7. Detalles de la morfología de microesclerocios alargados (A, B, C), ovalados (D), redondeados (E, F), esféricos (G) y redondeados o esféricos con proyecciones (H) (tamaño de barra de escala = 50 μ m).

riosa que en el método cuantitativo normal, ya que la observación se debió realizar sin retirar de la superficie de las placas la cantidad de suelo sembrada tras el tamizado húmedo. En cualquier caso el celofán favoreció que las colonias de *V. dahliae* formadas lo hicieran con un buen desarrollo, típicamente estrelladas y con un elevado número de ME. En los casos en los que se detectaron colonias con bajo número de ME, poco desarrolladas o en las que pudiera existir alguna duda por su similitud con propágulos o misceláneos de otros hongos, éstas fueron rechazadas.

No se realizó un estudio detallado para determinar la frecuencia de éxito en la obtención de un aislado puro en relación al grado de contaminación de las colonias y/o al número total de colonias de *V. dahliae* detectadas en cada muestra. Aún así, la frecuencia general de purificación fue elevada cuando se partió de colonias escogidas previamente por su limpieza y tamaño. Como ejemplo, de la muestra Santana se escogieron 7 colonias de las placas iniciales de APSM+C y se obtuvieron 6 aislados de *V. dahliae*.

Cada uno de los aislados finalmente transferidos a PDA en cultivo puro constituyen aislados monoesclerociales, ya que proceden de una sola colonia desarrollada sobre APSM+C, asumiendo que sobre la superficie

de este medio cada colonia se ha desarrollado a partir de la germinación de un microesclerocio individual de la muestra.

Caracterización morfológica de los aislados de suelo en APSM.

Los resultados muestran que existieron diferencias significativas en los valores morfológicos de los ME producidos sobre APSM de los aislados V4 (ND) y V117 (D) de la colección del Laboratorio de Patología Vegetal de la ETSIAM, Universidad de Córdoba (Tabla 2). La relación L/A media fue de 2.92 para el aislado no defoliante y de 4.06 para el defoliante. Esta relación, junto a los valores de longitud y anchura por separado reflejan que el aislado D (V117) produce en APSM, ME mucho más alargados y de mayor tamaño en términos de superficie proyectada, que los formados por el ND, que son más redondeados y de tamaño comparativamente menor. Los coeficientes de variación de estos parámetros fueron similares para estos aislados.

La morfología de los ME de aislados de *V. dahliae* obtenidos del suelo varió considerablemente en este medio de cultivo, desde valores de L/A de 5.15, correspondiente a los más alargados, hasta valores de 1.61, a los esféricos. En la Tabla 3 se han clasificado según su forma atendiendo a los intervalos de dicha relación en: alargados con valores

superiores a 4 (Fig. 7 A-C), en los que se halla incluido el aislado D, V117 (Tablas 2 y 3); ovalados, de 3 a 4 (Fig. 7 D); redondeados, de 2 a 3 (Fig. 7 E-F), en el que se incluye el aislado ND, V4, y que constituye el grupo más numeroso; y esféricos, de 1 a 2, que suelen además coincidir con los de menor tamaño (Fig. 7 G). En cualquier caso, esta clasificación es orientativa, ya que, incluso dentro de cada grupo, se incluyen aislados con diferencias estadísticamente significativas respecto a la relación L/A (Tabla 3).

También se ha considerado la regularidad de los ME, denominándolos homogéneos, o irregulares en los que están presentes proyecciones o agrupaciones celulares melanizadas cortas que unen el cuerpo del ME con el micelio hialino (Fig. 7 H).

Los resultados reflejan que hay diferencias morfológicas importantes entre los ME de aislados obtenidos de la misma muestra de suelo. Así, los 6 aislados de la muestra 12 presentaron entre ellos gran variabilidad morfológica dentro del mismo suelo, variando en términos de L/A desde 2.14 (aislado 31) a 5.15 (aislado 29), clasificados como redondeados y alargados, respectivamente. Igualmente, de cada una de las muestras 5, 7 ó 10 se obtuvieron aislados de diferentes tipos morfológicos (Tabla 3).

Por el contrario también se procesaron muestras cuyos aislados no presentaron diferencias en relación con los tipos morfológicos descritos. Así, los 3 aislados obtenidos de la muestra 15, mostraron características morfológicas similares, presentando microesclerocios esféricos, que fueron homogéneos o irregulares, aunque existieron diferencias estadísticas significativas entre ellos respecto a la relación L/A. Lo mismo ocurrió con los 3 aislados procedentes de la muestra 1, y los 3 de la muestra 4, clasificados todos ellos como redondeados, aún existiendo diferencias significativas entre aislados de ambas muestras y los pertenecientes a la misma muestra.

DISCUSIÓN

El método de obtención de aislados de suelo de *V. dahliae* descrito ha resultado en general efectivo para una amplia gama de suelos. Esta técnica supera las dificultades descritas por DE VAY *et al.* (1974) en la obtención de aislados de suelo, e incrementa considerablemente los resultados de otros autores que han expresado la dificultad de aislar el patógeno del suelo, e incluso la imposibilidad de obtenerlo de algunos suelos a pesar de haberlo cuantificado en ellos (BEJARANO-ALCÁZAR, 1990). El papel celo-

Tabla 2.- **Parámetros morfológicos de los microesclerocios de colonias desarrolladas en APSM de los aislados defoliante (V117) y no defoliante (V4) de *Verticillium dahliae*.**

Aislado	Colonia	Longitud				Anchura				Longitud/Anchura			
		Media	Mín.	Máx.	C.V.	Media	Mín.	Máx.	C.V.	Media	Mín.	Máx.	C.V.
V117	1	62.16	26.04	130.29	35.4	21.48	13.15	36.17	23.2	3.07	1.09	7.21	45.2
	2	66.69	32.68	188.12	23.2	24.15	9.43	43.92	38.0	3.39	1.03	9.92	65.3
	3	65.14	30.14	171.51	45.2	12.96	7.60	26.38	32.7	5.72	1.35	19.16	56.0
	Media ^a	64.67 a				19.53 a				4.06 a			
V4	1	42.11	20.02	102.76	31.6	20.23	9.27	37.78	32.7	2.46	1.03	5.92	45.3
	2	48.61	22.00	100.81	33.3	16.31	8.70	35.50	34.9	3.42	1.06	8.23	50.5
	3	43.24	21.72	95.51	31.3	16.88	9.29	31.46	30.4	2.90	0.92	8.09	47.3
	Media ^a	44.66 b				17.81 b				2.92 b			

^a Las cifras indican medias de los valores correspondientes a 200 microesclerocios del total de las 3 colonias (entre 65 y 70 por colonia). Los valores en cada columna seguidos por letras diferentes fueron significativamente diferentes a un nivel de probabilidad de P=0.05 de acuerdo al Test de Mínima Diferencia Significativa Protegida de Fisher.

Tabla 3. Parámetros morfológicos de los microesclerocios de colonias desarrolladas sobre APSM de aislados de *Verticillium dahliae* obtenidos directamente de las muestras de suelo.

Parámetros morfológicos de los microesclerocios ^a						
Muestra y referencia	Procedencia	Aislado	Longitud/ Anchura ^b	Forma	Tipo	
12	Santana	Espeluy	29	5.15 a	A	H
5	Piedras Altas	Marinaleda	2	5.06 a	A	H
14	M. Guillén	Jaén	12	4.73 b	A	H
12	Santana	S.J. Rinconada	30	4.17 c	A	H
-	Colección	Córdoba	V117	4.06 cd	A	H
12	Santana	Espeluy	26	3.82 de	O	H
7	Batán	Écija	8	3.69 e	O	H
10	Corchuela 4	S.J. Rinconada	18	3.31 f	O	H
-	Colección	Córdoba	V4	2.92 g	R	H
1	Corchuela 9	S.J. Rinconada	17	2.91 g	R	H
8	Alburquerque	La Carlota	6	2.84 g	R	H
12	Santana	Espeluy	27	2.76 gh	R	H
4	Corchuela 22	S.J. Rinconada	20	2.50 hi	R	H
9	Corchuela 2	S.J. Rinconada	14	2.35 ij	R	H
6	La Vega	Nac. Zambra	4	2.22 ijk	R	H
1	Corchuela 9	S.J. Rinconada	16	2.22 ijk	R	I
4	Corchuela 22	S.J. Rinconada	22	2.16 jkl	R	I
12	Santana	Espeluy	28	2.16 jkl	R	H
12	Santana	Espeluy	31	2.14 jkl	R	H
5	Piedras Altas	Marinaleda	3	2.10 jkl	R	H
1	Corchuela 9	S.J. Rinconada	15	2.09 jkl	R	H
5	Piedras Altas	Marinaleda	1	2.08 jkl	R	I
4	Corchuela 22	S.J. Rinconada	21	2.01 kl	R	H
15	Almodóvar	Almodóvar	10	1.99 kl	E	I
11	Corchuela 6	S.J. Rinconada	13	1.98 kl	E	H
10	Corchuela 4	S.J. Rinconada	19	1.93 lm	E	I
13	Dehesa Algarín	Lora del Río	5	1.77 m	E	H
7	Batán	Écija	7	1.69 mn	E	I
15	Almodóvar	Almodóvar	9	1.66 mn	E	H
15	Almodóvar	Almodóvar	11	1.61 n	E	I

^a Los valores son media de 200 microesclerocios de los aislados obtenidos de suelos naturalmente infestados, salvo los aislados V4 y V117 que provienen de suelos infestados artificialmente. Los aislados se clasificaron según los intervalos de la relación Longitud/Anchura en alargados (A), >4; ovalados (O), 3-4; redondeados (R), 2-3; esféricos (E), 1-2; y según la ausencia o presencia de proyecciones celulares de los microesclerocios, en homogéneos (H) o irregulares (I).

^b Valores en columnas seguidos por distintas letras fueron significativamente diferentes a un nivel de probabilidad de P=0.05 de acuerdo al Test de Mínima Diferencia Protegida de Fisher.

fán, usado extendiéndolo sobre placas de PDA para la producción artificial de ME de este patógeno (MWANZA, 2000; DAVID *et al.*, 1979; TJAMOS y FRAVEL, 1995), proporciona

además una fuente de carbono adicional para su crecimiento (DE VAY *et al.*, 1974; TALBOYS, 1958; TAYLOR, 1969). En nuestro caso, usando el medio APSM, las características

físicas del papel de celofán empleado permiten el crecimiento del hongo sobre éste durante al menos 14 días de incubación sin producir su degradación (MWANZA, 2000; 2001), lo que permite fácilmente elegir y recuperar las colonias de ME sin agar adherido, que es una de las principales fuentes de contaminación en el proceso de repicado.

El método permite escoger aquellas colonias mejor formadas y más limpias de partículas de suelo y/o otros hongos contaminantes, por lo que la eficacia de purificación del un aislado aumenta considerablemente. De la misma forma, es también conveniente comenzar las observaciones bajo lupa a partir de los 6-8 días tras la siembra, antes del periodo de incubación prescrito para el análisis cuantitativo normal (14 días). Esto evita un excesivo crecimiento micelial de las colonias de microorganismos contaminantes sobre las colonias de microesclerocios de *V. dahliae* que ya se hayan formado.

La densidad de inóculo, la textura y la composición biológica del suelo podrían ser los parámetros más influyentes en la eficacia del método para obtener aislados puros. En relación con la cantidad de hongo en el suelo, el número de aislados obtenidos en cultivo puro mediante este método es limitado, ya que no es posible procesar algunas de las colonias detectadas sobre el celofán, aunque parece razonable que sea representativo de al menos aquellos aislados que estén presentes en mayor número en la muestra. Cuanto mayor sea la densidad de inóculo, mayor será la probabilidad de detectar colonias del agente, igual que en los métodos de cuantificación normal, y de éstas se podrán procesar las más adecuadas. La textura del suelo influye en el tamizado, en la capacidad de detección del método cuantitativo, y en el proceso de limpieza de la suspensión para recuperar los aislados. Por último, la composición microbiana de la muestra influye directamente en los procesos de competencia que ocurren durante el crecimiento de *V. dahliae* sobre la lámina de celofán, ya que este agente no tiene un crecimiento saprofítico comparable con el de otras especies

como *Fusarium*, *Aspergillus*, *Gliocladium* o *Penicillium*, que crecen habitualmente sobre APSM (Barrón- Ruíz de Viana, datos no publicados).

Algunos estudios indican que la morfología de los ME producidos por *V. dahliae* en determinados medios de cultivo podría estar relacionada con la virulencia del aislado. Así en Agar Agua los aislados D producen colonias en las que aparecen mezclas de ME alargados y redondeados, y sólo redondeados cuando se trata de aislados ND (BEJARANO-ALCÁZAR, 1990; BLANCO-LÓPEZ *et al.*, 1985; SCHNATHORST y MATHRE, 1966). La composición del medio o sustrato sobre el que crece el hongo parece influir sobre la morfología de los ME y, de hecho esta característica ha servido para establecer, al menos preliminarmente, el patotipo del aislado (BEJARANO-ALCÁZAR, 1990). Sin embargo, tales relaciones deben ser corroboradas a *posteriori* mediante pruebas biológicas de patogenicidad o análisis moleculares.

En particular, en el Dpto. Agronomía de la Universidad de Córdoba, el método del tamizado húmedo y el medio de cultivo APSM se emplean habitualmente en las investigaciones de epidemiología y control de la Verticilosis del Olivo desarrolladas los últimos años (LÓPEZ-ESCUADERO, 1999; LÓPEZ-ESCUADERO y BLANCO-LÓPEZ, 2000; LÓPEZ-ESCUADERO *et al.*, 1995; 2000; MWANZA y BLANCO-LÓPEZ, 2000). Por ello resultan de interés en nuestro caso, las diferencias morfológicas consistentes que hemos observado sobre APSM entre los aislados de referencia V4 y V117 correspondientes, respectivamente, a los patotipos ND y D. En anteriores estudios también se ha observado que el aislado V117 (D) suele producir sobre APSM colonias más grandes en diámetro que el V4 (ND), con formas estrelladas más completas, y con ME alargados, en tanto que el V4 forma mayor proporción de ME redondeados. Aún así, también se ha observado con cierta frecuencia colonias mixtas en relación con la forma de sus ME con una alta proporción de propágulos ovalado-irregulares. En resumen,

el aislamiento directo de *V. dahliae* del suelo por la metodología descrita es una técnica de fácil aplicación, especialmente para técnicos habituados al estudio de hongos de suelo. Esta técnica puede mejorar el método del Tamizado Húmedo empleado por algunos grupos habitualmente en las investigaciones sobre epidemiología y control de la Verticilosis del Olivo. Además su uso puede ser de especial utilidad para los estudios de etiología, variabilidad y virulencia de *V. dahliae* en

el suelo, fundamental para el establecimiento de niveles de riesgo y sistemas de control preventivo de las Verticilosis.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto AGF97-0546 de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) y por el Proyecto QLRT-1999-1523 del V Programa Marco de la Comisión Europea.

ABSTRACT

LÓPEZ-ESCUADERO F. J., D. NÚÑEZ-SANTOS, M. A. BLANCO-LÓPEZ. 2003. Isolation of *Verticillium dahliae* from soil and morphologic characterization of its microsclerotia. *Bol. San. Veg. Plagas*, 29: 613-626.

In this work it is described a methodology to facilitate the pathogen isolation from soil samples. After processing a sample by wet sieving, aliquots of the resultant suspension are sowed onto plates of Modified Sodium Polipectate Agar media (MSPA) covered by a cellophane film. Colonies of *Verticillium dahliae* microsclerotia formed over the cellophane are recovered removing little squares that contain them. Colonies are washed by shaking, using an ultrasound bath and sieving then through a filter connected to a pressure vacuum pump. The resultant residue is sowed onto new plates of MSPA, PDA or PDA acidified, where colonies grown free of contaminants and they can be transferred to pure cultures. Therefore, a collection of soil isolates of this pathogen has been obtained, and their microsclerotia formed onto MSPA have been morphologically characterized. Values of the relation length/wide of individual microsclerotium have been compared to those of microsclerotia formed in the same media by two reference isolates, V117 (defoliating) and V4 (non-defoliating). Results show a wide range of this parameter in soil isolates, but also consistent differences of this relation between microsclerotia formed by the reference isolates. It is concluded that morphologic characteristics of microsclerotia on this media might be connected with the pathotype of the isolate, as reported by other authors using other culture media. This possibility could provide an important information simultaneously to the process of determination the inoculum density of *V. dahliae* in a soil sample. The recovery of soil isolates of *Verticillium dahliae* directly from the soil is necessary to understand the ecology and virulence of the populations of this pathogen, and to design preventive strategies for controlling the disease it causes. This aspect is particularly important to control the spreading of defoliating pathotype to new areas.

Key words: defoliating and non-defoliating isolates of *Verticillium dahliae*, soil isolation, morphologic characterization, microsclerotia.

REFERENCIAS

- ANÓNIMO, 1994. Statistix 4.1. user's manual. Analytical Software eds. Tallahassee, Florida.
- ASHWORTH L.J., WATERS J.E. GEORGE A.G., MCCUTCHEON, O.D. 1972. Assessment of microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* in field soils. *Phytopathology* 62: 715-719.
- ASHWORTH, L.J., JR, HARPER, D.M., ANDRIS, H.L. 1974. The influence of milling of air-dry soil upon apparent inoculum density and propagule size of *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology* 64: 629-632.
- AUSHER, R., KATAN, J., OVADIA, S. 1975. An improved selective medium for the isolation of *Verticillium dahliae*. *Phytoparasitica* 3(2): 133-137. 1975.
- BEJARANO-ALCÁZAR, J. 1990. Virulencia de *Verticillium dahliae* Kleb. y densidad de sus propágulos en el suelo, en relación con la epidemiología de la Verticilosis del Algodonero en el Valle del Guadalquivir. Tesis Doctoral. ETSIA. Universidad de Córdoba. 382 pp.
- BEN-YEPHET Y., PINKAS Y. 1976. A cesium chloride flotation technique for the isolation of *Verticillium dah-*

- liae* microesclerotia from soil. *Phytopathology* 66: 1252-1254.
- BLANCO LÓPEZ, M. A., JIMÉNEZ DÍAZ, R. M. 1995. Una propuesta de lucha integrada contra la Verticilosis del olivo. *Fruticultura Profesional. Especial Producción Integrada*, 70: 52-58.
- BUTTERFIELD, E.J., DEVAY, J.E. 1977. Reassessment of soil assays for *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 67: 1073-1078.
- DE VAY J.E., FORRESTER LINDA L., GARBER R.H., BUTTERFIELD, E.J. 1974. Characteristics and concentration of propagules of *Verticillium dahliae* in air-dried field soils in relation to the prevalence of *Verticillium* wilt in cotton. *Phytopathology* 64: 22-29.
- EVANS, G., SNYDER, W. C., WILHELM, S. 1966. Inoculum increase of the verticillium wilt fungus in cotton. *Phytopathology* 56: 590-594.
- EVANS, G., WILHELM S., SNYDER W.C. 1967. Quantitative studies by plate counts of propagules of *Verticillium* wilt fungus in cotton field soils. *Phytopathology* 57: 1250-1255.
- GREEN, R.J.JR., PAPAVIDAS, G.C. 1968. The effects of carbon source. *Phytopathology* 58: 567-570.
- GROGAN, R.G., IOANNOU, N. SCHNEIDER, R.W., SALL, M.A., KIMBLE, K.A. 1979. *Verticillium* Wilt on resistant tomato cultivars in California: virulence of isolates from plants and soils and relationship of inoculum density to disease incidence. *Phytopathology* 69, 1176-1180
- HARRIS D.C., YANG, J.R., RIDOUT, M.S. 1993. Estimating *Verticillium dahliae* in soil. The detection and estimation of *Verticillium dahliae* in naturally infested soil. *Plant Pathol.* 42: 238-250.
- HARRISON, M.D., LIVINGSTONE, C.H. 1966. A method for isolating *Verticillium* from field soils. *Plant Disease Reporter*, 50: 897-899.
- HUISMAN O.C., ASHWORTH, L.J.JR. 1972. Separation of microesclerotia of *Verticillium albo-atrum* from field soil residues by density flotation. *Phytopathology* 62: 766-767.
- HUISMAN O.C., ASHWORTH, L.J. 1974a. *Verticillium albo-atrum*: quantitative isolation of microesclerotia from field soils. *Phytopathology* 64: 1159-1163.
- HUISMAN O.C., ASHWORTH L.J.JR. 1974b. Quantitative assessment of *Verticillium albo-atrum* in field soil: procedural and substrate improvements. *Phytopathology* 64: 1043-1044.
- ISAAC. I., MACGARVIE, Q. D., 1962. Germination of resting bodies in *Verticillium* species. *Nature* 195: 826-827.
- JOAQUIM, T. R., ROWE, R. C., 1990. Reassessment of vegetative compatibility relationships among strains of *Verticillium dahliae* using nitrate-nonutilizing mutants. *Phytopathology* 80: 1160-1166.
- LÓPEZ-ESCUADERO, F. J. 1999. Evaluación de la resistencia de olivo a las variantes patogénicas de *Verticillium dahliae* y eficacia de la solarización en el control de la verticilosis. Tesis Doctoral, Univ. Córdoba, España. 280 pp.
- LÓPEZ-ESCUADERO, F.J., BLANCO-LÓPEZ, M.A. 2000. Influencia del riego del olivo en la densidad de inóculo de *Verticillium dahliae* en el suelo. Resúmenes del X Congreso Nacional de la Sociedad de Fitopatología, pag. 24. Valencia, Octubre.
- LÓPEZ-ESCUADERO, F.J., BLANCO-LÓPEZ, M.A. 2001. Effect of a single or double soil solarization to control *Verticillium* Wilt in established olive orchards in Spain. *Plant. Dis.* 85:489-496.
- LÓPEZ-ESCUADERO, F.J.; BLANCO-LÓPEZ, M.A.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M. 1995. Determinación de la Densidad de Inóculo de *Verticillium dahliae* en el suelo. Resúmenes del VI Congreso de La Sociedad Española de Ciencias Hortícolas; pag.181. Barcelona, Abril.
- LÓPEZ-ESCUADERO, F.J; MARTOS-MORENO, C., BLANCO-LÓPEZ, M.A. 2000. Problemas asociados con la detección cuantitativa de *Verticillium dahliae* en el suelo en medios selectivos. Resúmenes del X Congreso Nacional de la Sociedad de Fitopatología, pag 237. Valencia, Octubre.
- MENZIES J.D., GRIEBEL G.E. 1967. Survival and saprophytic growth of *Verticillium dahliae* in uncropped soil. *Phytopathology* 57: 703-709.
- MWANZA, C. 2002. Control de *Verticillium dahliae* en el suelo mediante la aplicación de residuos orgánicos. Tesis Doctoral. Univ. Córdoba, España. 245 pp.
- NADAKAVUKAREN M.J., HORNER C.H. 1959. An alcohol agar medium selective for determining *Verticillium* microesclerotia in soil. *Phytopathology* 49: 527-528.
- SCHREIBER, L. R., GREEN, R. L. 1962. Comparative survival of micelium, conidia and microesclerotia of *Verticillium albo-atrum* in mineral soils. *Phytopathology*, 52:288-289.
- SCHNATHORST, W. C., MATHRE, D. E. 1966. Host range and differentiation of a severe form of *Verticillium albo-atrum* in cotton. *Phytopathology* 56: 1155-1161.
- SMITH V.L., ROWE R.C. 1984. Characteristics and distribution of *Verticillium dahliae* in Ohio potato field soil and assessment of two assay methods. *Phytopathology* 74: 553-556.
- TALBOYS, P. W. 1958. Degradation of cellulose by *Verticillium albo-atrum*. *Trans. Br. Mic. Soc.* 41:242-248.
- TAYLOR, J. B. 1969. Fluctuation in natural soil populations of *Verticillium tricorpus*. *Can. J. Botny*, 47: 737-740.
- TERMORSHUIZEN, A. J. 2000. Interlaboratory comparison of methods to quantify microesclerotia of *Verticillium dahliae* in soil. Pages 122-124, in: Tjamos, E. C., Rowe, R. C., Heale, J. B., and Fravel, D. R. (eds), *Advances in Verticillium. Research and Disease Management*. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- THANASSOULOPOULOS, C. C., BRIS, D. A., TJAMOS, E. C. 1981. Weed host as inoculum source of *Verticillium* in olive orchards. *Phytopathol. Mediterr.* 20:164-168.
- TSAO, P.H. 1970. Selective media for isolation of pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 8: 157-186.

(Recepción: 12 febrero 2003)

(Aceptación: 23 abril 2003)