

P O N T I F I C I A
U N I V E R S I D A D C A T Ó L I C A D E C H I L E
FACULTAD DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE FRUTALES Y VIÑAS

ETIOLOGÍA DE LA MARCHITEZ VIOLENTA DEL PALTO

Proyecto de Título como
parte de los requisitos
para optar al título de
Ingeniero Agrónomo

PEDRO TOMAS ALLENDE DECOMBE

SANTIAGO-CHILE
1981

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA
 - 2.1 Organismo causal
 - 2.1.1 Morfología
 - 2.2 Síntomas
 - 2.2.1 Síntomas externos
 - 2.2.2 Síntomas internos
 - 2.2.3 Recuperación
 - 2.3 Ciclo de la enfermedad
 - 2.3.1 Fuente de inóculo
 - 2.3.2 Diseminación
 - 2.3.3 Sobrevivencia
 - 2.3.4 Hospederos
 - 2.3.5 Penetración
 - 2.3.6 Patogénesis
 - 2.4 Control
 - 2.4.1 Medidas sanitarias
 - 2.4.2 Resistencia
 - 2.4.3 Control químico
3. MATERIALES Y MÉTODOS
 - 3.1 Lugar de muestreo
 - 3.2 Obtención de los aislamientos
 - 3.2.1 Medio de cultivo
 - 3.2.2 Tejido muestreado

- 3.3.3 Mantención de los aislamientos
- 3.4 Pruebas de patogenicidad en frutos
 - 3.4.1 Determinación de patogenicidad
- 3.5 Pruebas de patogenicidad en ramillas de paltos
- 3.6 Pruebas de patogenicidad en paltos
 - 3.6.1 Cultivar
 - 3.6.2 Número de repeticiones por cepa
 - 3.6.3 Método de inoculación
- 3.7 Reaislamientos

- 4. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS
 - 4.1 Incidencia de la enfermedad
 - 4.2.1 Estimación del daño económico
 - 4.2.2 Posible efecto de cultivos precedentes sobre la incidencia de la enfermedad
 - 4.3 Aislamiento del agente causal
 - 4.3.1 Identificación
 - 4.4 Pruebas de patogenicidad
 - 4.4.1 Pruebas de patogenicidad en frutos
 - 4.4.2 Pruebas de patogenicidad en ramillas de palto
 - 4.4.3 Pruebas de patogenicidad en paltos cv. Haas

- 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

- 6. CONCLUSIONES

- 7. RESUMEN

- 8. BIBLIOGRAFÍA

1.- INTRODUCCIÓN

La enfermedad conocida en Chile como "marchitez violenta" o "verticilosis", fue descrita en paltos (Persea americana Mill.) en 1948 por George Zentmeyer, quién aisló el agente causal a partir de árboles afectados y demostró la causalidad de la enfermedad al reproducir los síntomas en inoculaciones artificiales (Halma et. al, 1953; Zentmeyer, 1948; Vergara, 1967).

Mundialmente el conocimiento de la "marchitez violenta" del palto es escaso. La mayor parte de la investigación corresponde a la década de los años 50, en que esta enfermedad se presentó en California.

En los últimos años ha aumentado significativamente la incidencia de esta enfermedad en las nuevas plantaciones de la Cruz y Quillota, particularmente en paltos cv. Haas. La enfermedad se ha caracterizado esencialmente por el desarrollo de una rápida marchitez foliar, comenzando por los brotes del último crecimiento (Figura 1 A y B). Estos síntomas inicialmente se presentaron en parte de una rama o en algunos sectores del árbol (Figura 1 C). Sin embargo, en estados avanzados del desarrollo de la enfermedad se compromete todo el árbol.

El presente estudio tuvo por objetivos:

- 1) Describir la sintomatología y evaluar el daño producido por la "marchitez violenta" en paltos cv. Haas.
- 2) Aislar y caracterizar el agente causal.
- 3) Determinar la patogenicidad en paltos, de los aislamientos obtenidos.

2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Organismo causal.

El organismo causal de la "marchitez violenta" corresponde al hongo Verticillium dahliae Klab.

El género Verticillium fue descrito por Nees Von Esenbeck en 1816, basado en la morfología de sus conidioforos (Isaac, 1967).

Gran parte de la investigación sobre Verticillium se ha concentrado en V. albo-atrum y V. dahliae debido a que son las dos especies fitopatógenas dentro del género, que causan daño a un alto rango de cultivos económicamente importantes en todo el mundo (Isaac, 1967).

Verticillium dahliae es un hongo perteneciente a la clase Deuteromycetes, orden Moniliales, familia Moniliaceae (Alexopoulos 1962; Vergara, 1967).

2.1.1. Morfología.

El hongo presenta micelio tabicado hialino y conidias unicelulares, de forma ovoide. Nacen de un conidioforo ramificado en forma verticilada. (Alexopoulos, 1962; Stevens, 1954; Vergara, 1967).

Verticillium dahliae produce abundantes microesclerocios de color negro en APÜ (agar - papa - dextrosa) (Zentmeyer, 1948; Vergara, 1967).

Las colonias son de color blanco y de aspecto algodonoso en APD (Zentmeyer, 1948).

2.2. Síntomas.

2.2.1. Síntomas externos.

El follaje, inicialmente de una sola rama o parte del árbol afectado, se marchita violentamente. (Pinto y English, 1972; Zentmeyer 1948 y 1953; Wilson y Ogawa, 1979).

Las hojas se necrosan y adquieren un color café, permaneciendo por largo tiempo adheridas al árbol (Vergara, 1967; Zentmeyer, 1948).

Los frutos, por ejemplo en vides, se deshidratan prematuramente antes de completar la maduración (Latorre, 1981).

2.2.2. Síntomas internos.

Como consecuencia del ataque en la mayoría de las plantas leñosas se forman estrías necróticas de color castaño a marrón oscuro en la madera (Wilson y Ogawa, 1979; Pinto y English, 1972; Zentmeyer, 1948).

En vides, la destrucción del xilema se presenta en las plantas afectadas tanto en el tronco como en sarmientos del año anterior y tejido verde del año, lo que sugiere que el patógeno invade todos los sectores del xilema de la planta o rama afectada (Alvarez y Sepulveda, 1977).

En paltos, las estrías son muy abundantes y cubren gran parte de la circunferencia del brazo afectado (Zentmeyer, 1948).

2.2.3. Recuperación.

En muchos casos, los árboles afectados se recuperan luego de una infección. Esto, al menos en parte, se atribuye a que el non-

go invade el xilema y no presenta movilidad lateralmente en el tronco, lo que involucra la necesidad de reinfecciones a nivel radicular para que reaparezcan los síntomas en las temporadas subsiguientes (Taylor, 1963).

En paltos, uno o dos meses después del colapso inicial, aparecen vigorosos brotes a partir de yemas adventicias, lo que coincide con la formación de nuevo xilema que reemplaza el invadido por el hongo (Zentmeyer, 1948 y 1953).

Luego de dos a tres años el árbol se recupera completamente. De acuerdo con Zentmeyer (1953) sólo ocasionalmente muere como consecuencia del ataque¹ de "verticilosis".

2.3. Ciclo de la enfermedad.

2.3.1 Fuente de inóculo.

La principal fuente de inóculo de "verticilosis" es el suelo. Verticillium dahliae es un invasor del suelo, de acuerdo con Walker (1965). Esto significa que su nivel poblacional en un suelo está condicionado por la presencia de hospederos (Isaac, 1967).

2.3.2. Diseminación.

La principal fuente de diseminación pareciera ser la comercialización de plantas enfermas. (Latorre, 1981; Pinto y English, 1972; Wilson y Ogawa, 1979).

Dado su pequeño tamaño, los microesclerocios se pueden diseminar junto a las aguas de riego y por el viento al ser arrastrados junto con partículas de suelo (Vergara, 1967). Además, es posible que se disemine localmente y a cortas distancias, por medio de instrumentos

de labranza (Latorre, 1981).

2.3.3 Sobrevivencia.

El hongo produce microesclerocios, estructuras microscópicas de resistencia, que son capaces de sobrevivir en el suelo por muchos años (Wilhelm, 1955; Pinto y English, 1972). De acuerdo con Wilhelm (1955), ciertas razas de V.albo atrum y V.dahliae sobreviven 14 años en los suelos, sin que existan hospederos y sin afectar su viabilidad y virulencia.

Estos microesclerocios soportan condiciones ambientales adversas, lo que le permite persistir por largos períodos en el suelo, aún en ausencia de hospederos (Menzies y Griebel, 1967; Isaac, 1967). Además resisten la acción de la mayoría de los fumigantes, como lo indica Scotland (1964), quién realizó ensayos durante 4 años con diferentes productos, obteniendo un control relativamente satisfactorio de las formas activas del hongo, no así de los microesclerocios, con cloropicrina y bromuro de metilo.

2.3.4. Hospederos.

Este patógeno ataca numerosos hospederos, especialmente de las familias, Solanáceas, Rosaceae, Cucurbitaceae y Lauraceae.

Existen antecedentes de su capacidad para producir una infección en plantas de 18 órdenes, 38 familias, 68 géneros, 119 especies diferentes (Vergara, 1967).

Las principales plantas hospederas de V. dahliae se indican en el Cuadro 1 (Cancino et al., 1971).

2.3.5. Penetración.

La vía de penetración, son las raíces, en forma directa o a través de heridas producidas por insectos o labores culturales (Latorre, 1981). Desde éstas el patógeno penetra al xilema, donde produce esporas que pueden ser llevadas por la corriente savial hacia las partes aéreas del árbol (Pinto y English, 1972).

Las bajas temperaturas favorecen la penetración del hongo, pero sus síntomas se manifiestan a fines de primavera y comienzos del verano, coincidiendo con los primeros calores de la temporada (Pinto y English, 1972).

La germinación de los microesclerocios ocurre sólo si existe materia orgánica en el suelo. Los exudados de las raíces son el mejor medio nutritivo para estimular la germinación y posterior colonización de las raíces (Green, 1980).

Las bajas temperaturas provocan un incremento en la exudación de azúcares y aminoácidos en la raíz, lo que aumenta las posibilidades para una infección (Bell, 1973).

Un exceso de nitrógeno en el suelo aumenta también la susceptibilidad a Verticillium (Latorre, 1981).

2.3.6. Patogénesis.

Las esporas una vez que están en el xilema, germinan en el interior de los vasos, provocando su obstrucción debido a la producción de goma, la que interfiere en la normal conducción del agua. (Pinto y English, 1972). Respecto a este punto, otros autores proponen distintas hipótesis, entre las cuales se incluyen: 1- Producción por parte del patógeno de toxinas de bajo peso molecu-

lar, similares al ácido fusárico, que afectan la permeabilidad de las membranas celulares.

2- Producción por parte del patógeno de polisacéridos y otras sustancias de alto peso molecular que obstruirían el xilema.

3- Obstrucción vascular por geles, resultantes de la degradación de las paredes celulares del xilema por enzimas del patógeno (Garret, 1970).

El hongo se establece en el sistema vascular, por el cuál se distribuye verticalmente en la planta (Latorre, 1981; Wilson y Ogawa, 1979).

Una vez producido el daño, en verano y otoño, es frecuente que muera el hongo ubicado en la parte aérea de la planta por lo que la enfermedad no necesariamente vuelve a presentarse en temporadas subsiguientes, a menos que ocurran reinfecciones posteriores (Taylor, 1963; Pinto y English, 1972).

2.4. Control.

2.4.1. Medidas sanitarias.

Lha de las medidas sanitarias de mayor importancia es la rotación cultural lo que implica evitar la plantación de un huerto en terrenos que se hayan utilizado en la producción de cultivos susceptibles que hayan favorecido un aumento considerable en las poblaciones de Verticillium en el suelo (Cancino et al., 1971; Latorre, 1981; Pinto y English, 1972; Zentmeyer, 1948).

Además se debe evitar la plantación de un huerto, con plantas que provengan de viveros infectados con Verticillium, ya que esta puede constituir una importante fuente de diseminación de la en-

fermedad (Latorre, 1961; Pinto y English, 1972; Wilson y Ggawa 1979; Zentmeyer, 1948).

Tampoco se deben utilizar las púas de árboles infectados en la propagación de un cultivar (López, 1980; Zentmeyer, 1953).

2.4.2. Resistencia.

Los portainjertos guatemaltecos se ven severamente afectados por la presencia del hongo. Presentan síntomas más tempranos y severos que en el caso de los patrones mexicanos (Halma et al., 1953; Zentmeyer, 1948; López, 1980).

En experimentos realizados por Wilhelm (1955) en la Universidad de California, en que inoculó patrones guatemaltecos y mexicanos con suspensiones del hongo en las raíces de los árboles, se presentaron luego de un mes de incubación, síntomas de la enfermedad, en un 79% de los árboles sobre patrones guatemaltecos y en un 31% en árboles sobre patrones mexicanos (Halma et al., 1953).

2.4.3. Control químico.

Los microesclerocidos resisten la acción de la mayoría de los fumigantes del suelo, obteniéndose un control relativo con cloropicri-na (Scotland, 1964; Zentmeyer, 1948; Vergara, 1967).

Cuadro 1

Principales plantas hospederas de Verticillium dahliae

Cultivo	Nombre vulgar	Nombre científico
Arboles frutales:	Almendro	Prunus amigdalus
	Cerezo	Prunus avium Prunus
	Guindo	cerasus Annona
	Chirimoyo	chirimoya Prunus
	Ciruelo	domestica Prunus
	Damasco	armen i acá Prunus
	Duraznero	persicae Olea
	Olivo	europa Persea
	Palto	americana Malus
	Manzano	silvestris Pyrus
	Peral	communis Cydonia
	Membrillo	oblonga Capsicum
	Ají	annuum Splnacea
	Espinaca	glearacea Solanum
	Berengena	melogea Fragaria
	Frutilla	chtloensls Cucumis
	Melón	meló Solanum
	Papa	<u>tuberosum</u>

Continuación Cuadro 1

Cultivo	Nombre vulgar	Nombre científico
	Pepino	<u>Cucumis sativum</u>
	Pimentón	<u>Capsicum frutescens var. grossum</u>
	Rábano	<u>Raphanus sativum</u>
	Repollo	<u>Brassica olearacea var. capitata</u>
	Sandía	<u>Citrullus lanatus</u>
	Tomate	<u>Lycopersicon esculentum</u>
	Zapallo	<u>Cucurbita maxima</u>
Ornamentales:	Dalia	<u>Dahlia variabilis</u>
	Clavel	<u>Dianthus cariophyllus</u>
	Crisantemo	<u>Chrysanthemum spp.</u>
	Rosa	<u>Rosa spp.</u>
Malezas:	Bledo	<u>Amaranthus deflexus</u>
	Diente de león	<u>Taraxacum officinalis</u>
	Hierba mora	<u>Prunella vulgaris</u>
	Malva	<u>Malva sp.</u>
	Quinguilla	<u>Chenopodium album</u>
	Penacho	<u>Amaranthus sp.</u>
	Tomatillo	<u>Solanum tomatillo</u>

Figura 1 Síntomas de "marchitez violenta" en palto. A y B. Árboles afectados por una rápida marchitez foliar que comienza por los brotes del último crecimiento. C. Los síntomas inicialmente se presentan en parte de una rama o en algunos sectores del árbol. D. Conidióforos verticilados, hialinos, con conidias agrupadas en cabezuelas sobre las phialides.



3.- MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en los laboratorios e invernaderos del Departamento de Frutales y Viñas de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

3.1. Lugar de muestreo.

El muestreo se realizó en tres huertos de paltos cv. Haas ubicados en la zona de Quillota, afectados por "marchitez violenta" en los últimos años.

a) Huerto 1.: Parcela "Esmeralda", propiedad de Dn. Pedro Tomás Allende. Se muestreó el huerto denominado "Huáscar", que tiene una alta incidencia de "marchitez violenta". Está plantado en su mayoría con el cultivar Haas, existiendo un sector con los cultivares Bacon y Edranol.

La plantación se hizo el año 1973 en suelos que anteriormente se trabajaron en forma muy intensa en cultivos hortícolas, principalmente tomates, zapallos, coliflores y repollos.

b) Huerto 2.: Parcela "La Puntilla", propiedad de Dn. Juan Alberto Decombe. Se muestreó el huerto denominado el "Sauce", en que se han presentado algunos casos de "marchitez violenta". Está plantado en su totalidad con paltos cv. Haas.

La plantación se hizo el año 1976 en terrenos que anteriormente se trabajaron intensamente en cultivos de hortalizas, principalmente tomates, zapallos, coliflores y alcachofas.

c) Huerto 3.: Parcela "Los Acacios", propiedad de Dn. Pedro Tomás Allende. Se han presentado casos de marchitez. Está plantado con

los cultivares Haas y Edranol.

Se plantó el año 1976 en terrenos intensamente utilizados con cultivos de hortalizas y flores, principalmente, tomates, zapallos, coliflores, repollos y crisantemos.

El resumen de los huertos muestreados se encuentra en el Cuadro 2.

Cuadro 2

Huertos muestreados en la obtención de aislamientos de
Verticillium dahliae a partir de palto cv. Haas.

Nombre de la Propiedad	Localidad	Nº de árboles cv. Haas muestreados	Edad del huer- to (años)
Parcela Esmeralda	Quillota	530	8
Parcela Puntilla	Quillota	2159	5
Parcela Acacios	Quillota	1800	5

3.2. Obtención de los aislamientos.

3.2.1. Medio de cultivo.

Todos los aislamientos se realizaron en agar-papa-dextrosa (ARD) acidulado. Las siembras se realizaron en placas de Petri en el huerto mismo y posteriormente se incubaron a 25° C por 4 a 7 días en el laboratorio.

3.2.2. Tejido muestreado.

Se tomaron trozos de xilema necrótico correspondiente a las estrías de color café oscuro presentes en todos los árboles afectados.

Pequeños trozos de 1-2 cm. de largo se depositaron en las placas de Petri con APD.

Antes de coleccionar las muestras se desinfectó la corteza del árbol con etanol al 95%.

3.3.3. Mantenimiento de los aislamientos.

Una vez identificada la presencia de Verticillium en las siembras originales por medio de observaciones al microscopio de luz visible, se repicó por medio de agujas esterilizadas a placas de Petri que contenían APD con el fin de aislar Verticillium de los hongos secundarios.

Cuando existió constancia de dicha pureza, se trasladó micelio de Verticillium, mediante agujas esterilizadas a tubos de ensayo con APO fresco, los que se incubaron por 3-4 días en una estufa a 25°C, guardándose posteriormente los tubos a temperatura ambiente, con el fin de conservar el hongo hasta su uso en las pruebas de patogeni-

cidad.

3.4. Pruebas de patogenicidad en frutos.

Con el fin de establecer la patogenicidad de los aislamientos obtenidos se inocularon frutos inmaduros de los cultivares Fuerte, Bacon y Haas.

3.4.1. Determinación de patogenicidad.

Se emplearon dos métodos para inocular los frutos, que consistieron en:

a) Perforar dos frutos por aislamiento en 3 sectores, mediante un sacabocados. En cada orificio se introdujo una suspensión de conidias preparada en agua estéril, a partir de cultivos de 5-7 días de edad en APD. Se verificó y contabilizó la presencia de gran cantidad de conidias en la suspensión (Cuadro 3).

Como testigo se perforaron dos frutos por cultivar, en los cuales sólo se introdujo agua estéril en cada orificio.

Posteriormente todos los frutos se incubaron en cámara húmeda a temperatura ambiente por 8 días.

b) Corte transversal de frutos superficialmente esterilizados con etanol al 95%. La superficie interna del corte se cubrió con una suspensión de micelio y conidias preparado en agua estéril en forma similar al procedimiento anterior. Posteriormente ambas mitades se mantuvieron en contacto mediante uso de cinta adhesiva y se incubaron en cámara húmeda a temperatura ambiente por 8 días.

Los frutos testigo recibieron un tratamiento similar con agua estéril.

3.5. Pruebas de patogenicidad en ramillas de paltos.

Con el propósito de establecer la patogenicidad de los aislamientos de V. dahliae obtenidos, se inocularon ramillas provenientes de paltos cv. Haas.

Se utilizaron trozos de ramillas de 1 año de edad de aproximadamente 20 cm. de largo desinfectadas superficialmente con etanol al 95%.

En la parte central de la ramilla se hizo un corte en visel de aproximadamente 1 cm. de profundidad. Sobre la herida se introdujo una suspensión de micelio y conidias, que fue contabilizada por medio de un hematómetro. (Cuadro 3).

Posteriormente se cubrió el corte con polietileno con el fin de evitar una rápida deshidratación.

Los testigos recibieron solamente agua estéril y se incubaron por 28 días en cámara húmeda a temperatura ambiente.

Se inocularon 3 ramillas por aislamiento y se dejaron 3 ramillas de testigo.

3.6. Pruebas de patogenicidad en paltos.

Las plantas utilizadas en las pruebas de patogenicidad se obtuvieron en mangas (bolsas) de polietileno negro con lo que se minimizó el posible daño por transporte desde el vivero en Quillota hasta el invernadero del Departamento de Frutales y Viñas, en Santiago.

3.6.1. Cultivar.

Las semillas utilizadas en el vivero para la obtención de patrones, portainjerto correspondieron ni cultivar mexicanoLa,

ciente al grupo mexicano.

Se utilizaron plantas de 1 año de edad injertadas con el cultivar Haas, lo que corresponde a la composición patrón-injerto de los árboles afectados en condiciones comerciales.

3.6.2. Número de repeticiones por cepa.

Por cada cepa o aislamiento del organismo causal, se inocularon cinco árboles, dejándose tres testigos, los cuales se inocularon con agua estéril.

3.6.3» Métodos de inoculación.

a) Preparación del inóculo: Las 5 distintas cepas mantenidas en APD a temperatura ambiente, se activaron, trasladando trozos de micelio y microesclerocios mediante agujas estériles a placas de Petri con APD fresco. Estas placas se incubaron por 4-7 días en una estufa a 25° C.

En la multiplicación del inóculo se emplearon 9 placas de Petri por cepa. El cultivo, mas el agar de cada placa se desprendió y se mezcló en una batidora con 150 ml de agua destilada y estéril. Esta mezcla se batió por 1-2 minutos hasta obtener una adecuada homogenización.

Este tratamiento se repitió independientemente para cada cepa.

La concentración de conidias en la suspensión se estableció mediante uso de hematocímetro en un microscopio de luz visible (Cuadro 3).

b) Métodos de inoculación; Se utilizaron dos métodos de inoculación que consistieron en:

1) Corte en visel de aproximadamente 1 cm. de profundidad en el sector correspondiente al portainjerto; de esta manera se puso en contacto directamente al patógeno con el xilema. En esta herida. se introdujo la suspensión anteriormente preparada, mediante un bisturí previamente esterilizado. Antes de inocular, el sector del corte se desinfectó con etanol al 95%.

El corte se cubrió con polietileno con el objetivo de evitar una rápida deshidratación.

Se emplearon tres plantas por capa y tres testigos inoculados con agua estéril.

2) Inoculación en las raíces, para lo cuál se descubrieron las raíces de los primeros 8-9 cm. de profundidad alrededor del tronco, las cuales se hirieron con un bisturí estéril y se trataron con 50 ml de suspensión de inóculo por planta. Posteriormente se cubrieron con tierra hasta el nivel normal de la maceta.

Se utilizaron 2 plantas por cepa y los testigos se inocularon con agua estéril.

3.7. Reaislamientos.

Una vez que los árboles y ramillas artificialmente inoculados presentaron síntomas de marchitez violenta se hicieron cortes en la madera con el fin de verificar la presencia de xilema necrótico correspondiente a los síntomas internos de "verticilosis".

Trozos de xilema necrótico se sembraron en APD con el propósito de reaislar el agente causal. Las placas se incubaron en una estufa por 4-7 días.

3.8. Posible efecto de cultivos precedentes sobre la incidencia de "verticilosis".

Con el objetivo de determinar la posible correlación existente entre los cultivos precedentes y la incidencia de "verticilosis", se procedió a encuestar y estimar la incidencia de la enfermedad en 7 huertos plantados con paltos cv. Haas provenientes del mismo vivero con la misma composición patrón-injerto y edades que fluctuaron entre 4 y 8 años.

Cuadro 3

Concentración aproximada de conidias de Verticillium dahliae por ml.
de las suspensiones utilizadas en las pruebas de patogenicidad.

Cepa	Frutos y ramillas (Conidias $\times$ ml $\times 10^7$)	Arboles (Conidias $\times$ ml $\times 10^7$)
IV	1,125	1,2
VI	1,8	1,9
XIII	1,5	1,7
B	2,0	1,8
D	1,3	1,67

4.- PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

4.1. Incidencia de la enfermedad.

Se observó una distribución aleatoria de los árboles enfermos dentro del huerto. Por lo general no presentándose sectores completos de árboles afectados. El desarrollo de los síntomas y por lo tanto de la incidencia de la enfermedad fue mayor entre los meses de octubre y abril.

El número de árboles afectados presentó notables variaciones en los distintos huertos, estimándose en un 2,92% el promedio de árboles que cursaron la enfermedad sobre un total de 3.589 árboles cv. Haas muestreados en la temporada 1980-1981.

Las variaciones fluctuaron entre 1,3% y 10,4% de árboles enfermos en los casos más extremos. La estimación de la incidencia en los 3 huertos muestreados se resume en el Cuadro 4.

4.2.1. Estimación del daño económico.

Con el objetivo de estimar el daño económico producido, se contabilizaron los árboles que cursaron la enfermedad en la temporada 1980-1981, en un sector altamente afectado del huerto 1. En este sector, de un total de 250 paltos cv. Haas, 26 manifestaron síntomas de "verticilosis", nueve totalmente afectados y 17 sólo parcialmente, comprometiendo no más del 50% del árbol. Para estimar el daño se corrigieron estos valores considerando los siguientes factores de corrección: 1 y 0,5 respectivamente para árboles totalmente enfermos y para aquellos con un 50% o menos de su follaje afectado. De este modo el número de árboles totalmente afectados fue 17,5 $((9 \times 1) + (17 \times 0,5))$,

La producción de los árboles totalmente afectados fue cero. Si consideramos que estos árboles deberían haber producido por lo menos 40 Kg. por árbol, correspondiente al rendimiento promedio obtenido, significa que se dejó de cosechar 778,4 Kg/ha en la temporada 1980-1981. Si además agregamos el hecho que los árboles tardan por lo menos 2 años en recuperarse, la pérdida real hasta su recuperación sería del orden de 80 Kg/árbol. Expresado por hectárea y considerando que 7 de cada 100 árboles se afectan completamente, la pérdida por hectárea sería igual a 1.557 kilos en dos años.

4.2.2. Posible efecto de cultivos precedentes sobre la incidencia de la enfermedad.

La presencia de "verticilosis" solamente se observó en 4 de 7 huertos de paltos cv. Haas sobre patrón Mexícola establecidos en la provincia de Guillote, todos en suelos previamente cultivados con especies susceptibles a la enfermedad (Cuadro 5). La incidencia de la enfermedad en estos huertos varió entre 1,3 y 10,4 % de plantas enfermas aproximadamente. No se observó síntomas de "verticilosis" en ningún huerto plantado a continuación de cultivos no susceptible.

4.3. Aislamiento del agente causal.

Se aisló *V. dahliae* desde 16 árboles muestreados en tres huertos diferentes de la provincia de Quillota. Los aislamientos se obtuvieron a partir de xilema necrótico de árboles afectados por "marchitez violenta".

Se observó desarrollo del hongo transcurridos 4 a 7 días de la siembra en APD e incubado a 25°C.

Cinco aislamientos provinieron de paltos cv. Haas de 5-6 años y 1 aislamiento se obtuvo a partir de palto cv. Edranol de 5 años. Los resultados se resumen en el Cuadro 6.

4.3.1. Identificación.

Macroscópicamente el hongo se identificó en forma inicial por el desarrollo de un micelio de color blanco, algodonoso, sobre y alrededor de los trozos de xilema necrótico y posteriormente por la aparición de una coloración negra debida a la presencia de microesclerocios.

Microscópicamente se estableció la presencia de conidiofóros verticilados hialinos, con conidias agrupadas en cabezuelas sobre las "phialides" (Figura 1-D). Cada conidia se caracterizó por ser unicelular y de forma ovoide.

Al cabo de 7-10 días se desarrollaron abundantes microesclerocios consistentes en pequeños cuerpos esféricos de color negro.

Cuadro 4

Estimación de la incidencia de verticilosis en. tres
huertos de paltos cv. Haas de la provincia de Quillota

Nombre	Localidad	Sector*	Total árboles muestreados	Total árboles enfermos	% árboles enfermos
P. Esmeralda	Quillota	1	180	13	7,2
		2	250	26	10,4
		3	100	5	5
P. Puntilla	Quillota	1	797	11	1,3
		2	720	12	1,6
		3	642	10	1,5
Acacios	Quillota	1	900	28	3,1
Total			3589	105	2,92

* Los huertos están divididos en sectores dados por características geográficas como caminos, potreros etc.

Cuadro 5

Presencia de verticilosis en paltos cv. Haas sobre
patrón Mexícola, de un mismo vivero y establecidos
en suelos con distintas rotaciones en Quillota.

Huerto	Total árboles	Cultivos precedentes	Verticilosis
La Verbena 1	600	No susceptibles*	Ausente
Sta. Julia	300	No susceptibles	Ausente
P. Esmeralda	530	Susceptibles	Presente
P. Puntilla	2159	Susceptibles	Presente
P. Acacios	900	Susceptibles	Presente
La Verbena 2	1200	No susceptibles	Ausente
Sta. Cristina	6000	Susceptibles	Presente

* No susceptible o susceptible a *Verticillium dahliae*.

Cuadro 6

Aislamientos obtenidos a partir de xilema necótico proveniente de
árboles afectados por marchitez violenta en tres huertos de Quillota

Huerto	Localidad	Aislamientos	% Aislación
Parcela Esmeralda	Quillota	2/8*	25
Parcela Puntilla	Quillota	1/4	25
Parcela Acacios	Quillota	3/4	75

* Número de árboles desde los cuales se aisló V. dahliae sobre el número total de árboles muestreados.

* Injerto/patrón

Cuadro 7

Procedencia de los aislamientos utilizados
en las pruebas de patogenicidad.

Cepa	Huerto	Localidad	Cultivar*	Edad (años)	Cultivos previos a plantación
IV	Acacios	Guillota	Haas/Mexicola	5	Susceptibles
VI	Esmeralda	Guillota	Haas/Mexicola	5	Susceptibles
XIII	Puntilla	Guillota	Haas/Mexicola	6	Susceptibles
B	Acacios	Guillota	Haas/Mexicola	5	Susceptibles
D	Acacios	Guillota	Edranol/Mexicola	5	Susceptibles

4.4. Pruebas de patogenicidad.

4.4.1. Pruebas de patogenicidad en frutos.

Se determinó la patogenicidad a 5 cepas aisladas e identificadas como V. dahliae. Las determinaciones se realizaron en frutos del cultivar Bacon. En ensayos preliminares las inoculaciones en frutos de paltos cv. Bacon resultaron más específico en su comportamiento a la inoculación.

Los frutos inoculados en cortes transversales, en relación con los frutos testigos tratados sólo con agua estéril, desarrollaron necrosis vascular visible a los 8 días de incubación en cámara húmeda (Figura 2 B).

El desarrollo de este necrosamiento se consideró indicativo de patogenicidad, siempre que se extendiera algunos milímetros bajo la zona de inoculación.

El método de inoculación mediante perforación de frutos con sacabocados no permitió establecer diferencias entre frutos inoculados y los testigos.

Los resultados obtenidos en las pruebas de patogenicidad en frutos se resumen en el Cuadro 8.

4.4.2. Pruebas de patogenicidad en ramillas de palto.

La patogenicidad de 5 cepas aisladas e identificadas como V. dahliae se determinó en las inoculaciones de ramillas.

Las ramillas inoculadas desarrollaron, luego de 28 días en cámara húmeda numerosas estrías necróticas de color café en el sector superficial del xilema, similares a los síntomas observados en los árboles afectados en el campo.

Se logró reaislar el hongo a partir de xilema necrótico, en el caso de todas las cepas, observándose micelio correspondiente a *Verticillium* a los 4-7 días de incubación.

Los resultados de las pruebas de patogenicidad en ramillas de palto se indican en el Cuadro 8.

4.4.3. Pruebas de patogenicidad en paltos cv. Haas.

Síntomas de "marchitez violenta" o "verticilosis" se reprodujeron mediante inoculaciones artificiales con 5 cepas de *V. dahliae*.

Los primeros síntomas se presentaron a los 24 días después de la inoculación, produciéndose en algunos casos un colapso generalizado entre los 24 y 42 días post-inoculación.

Ambos métodos de inoculación, raíces y troncos, permitieron reproducir la enfermedad. Trece árboles inoculados sobre un total de 15 enfermaron y 5 de 10 inoculados en las raíces presentaron sintomatología correspondiente al ataque del patógeno. En todos los casos los síntomas se caracterizaron por una violenta marchitez y flacidez de hojas y brotes, inicialmente en un sector del árbol, y posteriormente extendida a toda una rama o brazo (Figura 2 A). Finalmente, los síntomas afectaron completamente al árbol. Las hojas se necrosaron adquiriendo un color café y permaneciendo adheridas al árbol por largo tiempo. Se presentaron muertes de ramillas y ramas.

Asociado a estos síntomas, aparecieron numerosas estrías de color café oscuro en el xilema, normalmente en toda la circunferencia del brazo afectado.

Los árboles testigo no presentaron daño o síntomas como

consecuencia de los daños producidos en raíces o en el tallo.

Se logró reaislar el hongo a partir de xilema necrótico proveniente de por lo menos un árbol inoculado con cada una de las cinco cepas de V. dahliae.

Transcurridos 2-3 meses del ataque, aparecieron vigorosos brotes a partir de yema adventicias, no presentándose casos de re-infección en ese tiempo.

Los resultados obtenidos en las pruebas de patogenicidad en paltos se resumen en el Cuadro 8.

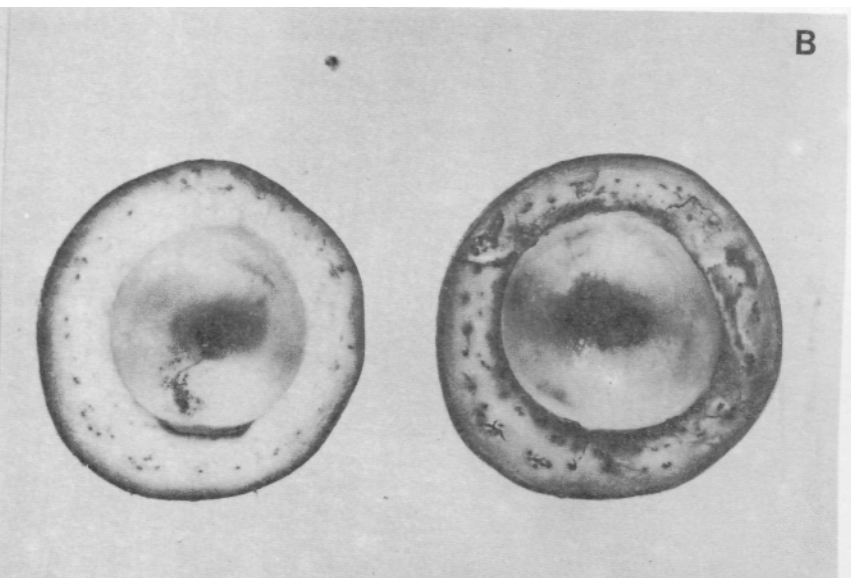
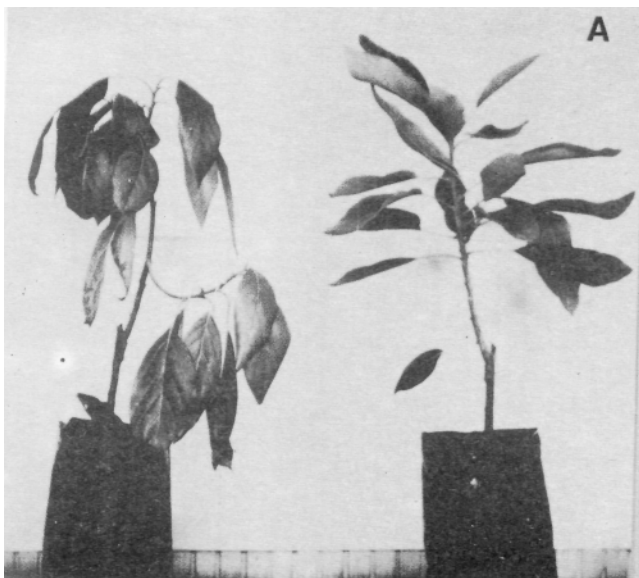
Cuadro 6

Resultados obtenidos en las pruebas de patogenicidad
de 5 cepas de verticillium dahliae

Cepa	<u>Inoculación realizada en:</u>			
	Frutos	Ramillas	<u>Arboles</u>	
			Tronco	Raíz
IV	3/3*	3/3*	2/3*	1/3*
VI	3/3	3/3	2/3	1/2
XIII	3/3	3/3	3/3	1/2
B	3/3	3/3	3/3	1/2
D	3/3	3/3	3/3	1/2
Testigo	0/3	0/3	0/3	0/2

* Número de frutos, ramillas o palto enfermos / total de frutos, ramillas o palto inoculados.

Figura 2 Pruebas de patogenicidad. A. Violenta marchitez y flacidez de hojas y brotes presentado por árboles de 1 año de edad correspondientes al cultivar Haas, transcurridos 24—42 días de su inoculación con micelio de *V. dahliae* disuelto en agua estéril. El árbol de la derecha corresponde a un testigo inoculado con agua estéril. B. Necrosis vascular presentada por frutos cv. tocón a los 0 días de incubación en cámara húmeda luego de haber sido inoculados con *V.dahliae* disuelto en agua estéril. El fruto de la izquierda corresponde a un testigo inoculado con agua estéril.



5.- DISCUCION DE LOS RESULTADOS

Los resultados y observaciones realizadas en el curso de este trabajo permiten afirmar que los síntomas atribuidos en Chile a "verticilosis" corresponden a dicha enfermedad, siendo similares a los descritos el año 1940 en paltos por Zentmeyer (1948) en California y en alguna medida similares también con síntomas de "verticilosis" en durazneros, vides, y otros frutales (Latorre, 1981; Cancino Et al., 1971; Wilson y Ggawe, 1979).

El aumento de la incidencia de "marchitez violenta" en los últimos años aparentemente se puede atribuir al incremento de las plantaciones de paltos, particularmente en zonas tradicionalmente dedicadas al cultivo de especies hospederas de V.dahliae, como tomates, zapallos, repollos, etc. Una situación similar ha sido descrita en California correspondiente a "verticilosis" en vides.

La existencia de grandes poblaciones del hongo en el suelo, puede causar un daño económico importante. Los porcentajes de infección son relativamente altos y la recuperación de los árboles es lenta. Por ejemplo, en el caso de la más alta infección (10,4%), se estimó que la pérdida en Kg. por efecto de "verticilosis" en la temporada 1980-81 fue de 778,4 Kg/ha. El precio de venta de ese año a productor fue de US\$1,7 el Kg. por lo tanto la pérdida correspondió a US\$ 1.323,28/ha. Esta cifra representa una pérdida considerable y demuestra que la enfermedad en paltos puede tener un impacto económico de importancia.

El cultivar Haas presentó en los huertos muestreados una notable proporción de infección respecto a otros cultivares, por ejemplo

los cv. Bocón y Edranol que se encontraban en gran cantidad en los huertos muestreados no mostraron síntomas de "verticilosis". Esto puede deberse a que dicho cultivar pertenece a la raza guatemalteca, señalada como altamente susceptible a la enfermedad por Halma et al. (1953); Zentmeyer (1948) y López (1980).

No se presentaron aparentemente diferencias entre las cinco cepas en estudio.

Los resultados obtenidos en las inoculaciones realizadas en frutos, ramillas y árboles de un año de edad permitieron confirmar la patogenicidad de los aislamientos de *V. dahliae* en paltos. Los 3 procedimientos fueron eficientes y objetivos, sin embargo el mejor procedimiento, recomendable en evaluaciones similares, sería la inoculación de árboles de un año de edad ya que permitió reproducir en forma fidedigna los síntomas presentados por los árboles en condiciones comerciales ante la penetración del patógeno.

En las pruebas de patogenicidad en paltos se obtuvo una menor proporción de árboles afectados entre los inoculados en raíz. Esto pudo deberse a que en el tratamiento de inoculación al tronco, existió un directo contacto del hongo con los vasos conductores de la planta, con lo cuál se minimizó la posibilidad de escape a la infección.

Situación ésta, que probablemente ocurrió en las plantas que no desarrollaron síntomas en inoculaciones radiculares, a pesar de haber herido las raíces.

Los síntomas de marchitez se manifestaron aproximadamente 1 mes a un mes y medio después de la inoculación. De esto se puede deducir que este es el tiempo que posiblemente demora el hongo en

penetrar e invadir la planta en las infecciones de campo. Igual longitud de tiempo tuvo Wilhelm (1955) en inoculaciones de paltos en la Universidad de California.

Se observó aparición de brotes a partir de yemas adventicias transcurridos aproximadamente 45 días del colapso inicial. Estos brotes se presentaron vigorosos en árboles a los cuales se podó el sector afectado por la enfermedad y hasta 120 días después del colapso inicial no volvieron a desarrollarse síntomas lo que en alguna forma estaría demostrando la recuperación de las plantas en la forma descrita por Zentmeyer (1948 y 1953).

6.- CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en esta investigación se concluye:

- Verticillium dahliae es el agente causal de la enfermedad conocida como "marchitez violenta" o "verticilosis" del palto en Chile.
- El daño producido por Verticillium dahliae en paltos cv. Haas es económicamente importante en huertos plantados sobre suelos previamente cultivados con especies susceptibles. Por el contrario no se ha observado en plantaciones ubicadas luego de cultivos no susceptibles.
- Las técnicas de inoculación descritas y utilizadas en este trabajo fueron efectivas y permitieron reproducir la sintomatología observada en el campo.
- Los resultados de este estudio permitieron cumplir con los postulados de Kock y constituye por lo tanto la primera descripción de la enfermedad en paltos, en Chile.

7.- RESUMEN

Durante la temporada 1980-81 se muestrearon tres huertos nuevos de paltos cv. Haas de la provincia de Quillota con evidencias de haber tenido una alta incidencia de "marchite?- violenta" o "verticilosis".

Los síntomas correspondieron inicialmente a una rápida marchitez de las hojas y los brotes.

Esta marchitez posteriormente se extendió a una rama o brazo e incluso afectó el árbol completo.

Posteriormente las hojas se necrosaron, adquirieron un color café y permanecieron adheridas al árbol por largo tiempo.

Asociado a estos síntomas, aparecieron estrías de color café oscuro en el sector superficial del xilema, normalmente en toda la circunferencia del brazo afectado.

Se sembraron trozos de xilema necrótico, proveniente de árboles enfermos en agar-papa-dextrosa, a 25°C por 4-7 días, observándose abundante desarrollo de micelio fungoso identificado posteriormente, como correspondiente a Verticillium dahliae.

Cinco cepas; o aislamientos, diferentes entre sí cuanto a origen, se utilizaron en pruebas de patogenicidad en frutos, ramillas y árboles del palto.

La patogenicidad de dichas cepas quedó establecida al presentarse notables diferencias, necrosis de vasos, entre frutos y ramillas inoculadas respecto a los testigos no inoculados pero tratados con agua estéril. Los síntomas de la enfermedad desarrollados en paltos cv. Haas a un año de edad, aproximadamente -15 días después

da la inoculación permitió además confirmar la acción patogénica de los aislamientos de V. dahliae obtenidos. Estos síntomas consistieron en un rápido colapso, marchiten y desecación de hojas, desarrollo de necrosis vasculares y muerte de brotes severamente afectados.

SUMMARY

During the period 1980-81 where observed three new hortyards in the Quillota County, appeared a clear evidence of a high incidence of *Verticillium* wilt.

The affected trees presented a quick wilt in its leaves on branches or on its arms. Also sometimes the whole tree was affected. Associated with these symptoms dark brown stains appeared in the xylem.

Pieces of xylem were transferred to Potato-Dextrose-Agar at a temperature of 25°C for about 4 to 7 days, when it was observed a development of mycelia that corresponded to *Verticillium dahliae*.

Five isolates were inoculated in fruits, small branches, and avocado plants, with a result that the pathogenicity of the fungus was confirmed when vascular necrosis appeared in them.

The inoculated avocado plants presented similar symptoms than the trees affected in natural conditions.

8.- BIBLIOGRAFÍA

- ALEXOPOULOS, C. 1979. Introductory Mycology, 7^o ed, New York, John Wiley and Sons Inc. 632p.
- ALVAREZ M., Y G. SEPULVEDA. 1977. *Verticillium dahliae* asociado con síntomas de "amarillamiento" en vid. Agricultura Técnica 37: 138-140.
- BELL, A. 1973. Nature of disease resistance. Verticillium wilt of Cotton. Agricultural Research Service. U.S.D.A. p 47-63
- CANCINO L., B. LATORRE y C. ARONOWOSKY. 1971. Verticillium Alboatrum un grave problema en las nuevas plantaciones de durazneros en la zona Central. Agricultura Técnica 31: 161-164.
- CARREY, S.D.. 1970. Pathogenic root infecting fungi. 1^o ed., Cambridge, Cambridge University Press. 94p.
- GREEN, R.J. 1980. Soil factors affecting survival of microorganisms of Verticillium dahliae Phytopathology 70: 353-360.
- HALMA, F. ZENTMEYER, O. y S. WILHELM. 1953. Inocultability of avocado rootstocks to Verticillium wilt. California Avocado Society. Year book p 153-155.
- ISAAC, I. 1967. Speciation in Verticillium. Annual Review of Phytopathology 5: 201-202.

- LATOHRE, O. 1901. Verticilosis de la vid. Hevista Fruticola 2 (1): 15-17.
- LOPEZ, C. 1980. Cultivo del palto El Campesino : 31-30.
- MENZIEZ, J y n. GRIEBEL. 1967. Survival and Saprohitic growth of Verticillium dahliae in uncropped soils. Phytopathology 57: 703-709.
- PINTO, A. y H. ENGLISH. 1972. Verticilosis. Boletin técnico INIA 1: 35-37.
- SCOTLAND, C.R. 1964. The efficacy of various fumigants in controlling Verticillium wilt in South Central Washintong. Plant Diseases Reporter 46: 502-506.
- STEVENS, F.C. 1954. Plan diseases fungi 4°ed. New York, Mac Millan Company, 469 p.
- TAYLOR, J. 1963. The inactivation of Verticillium Albo Atrum in apricot trees. Phytopathology 53: 1143.
- VERGARA, C. 1967. Verticilosis o corazon negro de los firboles frutales. Simiente 37: 5-6.
- WALKER, J.C. 1969. Plant pathology 3°ed. New York. Me Crow-Hill 819p.
- WILHELM, S. 1955. Longevity of the Verticillium wilt fungus in the laboratory and field. Phythopathology 45: 180-108.

WILSON, E y J. OGAWA. 1979. Fungal, bacterial and certain non-parasitic disease of fruit and nut crops in California.

ZENTMEYER, G. A. 1953. Diseases of avocado. Plant Diseases. The year book of agriculture. U.S.D.A. pp: 875-880.

ZENTMEYER, G. A. 1948. Verticillium wilt of avocado. California Avocado Socifity year book, pp: 83-87.