

Aplicación de técnicas moleculares para determinar la incidencia y extensión de la colonización de plantas de olivo por los patotipos de *Verticillium dahliae*

Jesús Mercado Blanco, Melania Collado Romero, Dolores Rodríguez Jurado y Rafael M. Jiménez Díaz

RESUMEN

La detección temprana, rápida y consistente de la infección en plantas de olivo por los patotipos (defoliante [D] y no defoliante [ND]) de *V. dahliae* es, entre otros, una acción clave para desarrollar con éxito una estrategia de control integrado de la Verticilosis del olivo, cuya aplicación para la certificación de material de plantación como libre del patógeno ayudaría a prevenir la utilización de material de olivo infectado. Nuestro grupo de trabajo ha desarrollado un procedimiento molecular para el diagnóstico específico y efectivo de los patotipos de este hongo, e introducido subsecuentemente mejoras en el mismo para eliminar cualquier ambigüedad en la detección *in planta* que pudiera producirse por la coinfección de una misma planta por ambos patotipos en condiciones naturales. En este artículo presentamos un procedimiento refinado de diagnóstico molecular de los patotipos de *V. dahliae*, basado en la amplificación simultánea de marcadores específicos de los patotipos D y ND mediante un protocolo de dúplex-“nested”-PCR. El procedimiento es efectivo en la detección rápida e inequívoca de los patotipos D y ND de *V. dahliae*, tanto en plantas de vivero inoculadas artificialmente, como en árboles adultos infectados procedentes de plantaciones comerciales; su aplicación a muestras de diverso ori-

gen geográfico indicó una alta frecuencia de infecciones por el patotipo D, que concuerda con los informes que alertan a olivicultores sobre la expansión del patotipo más virulento de *V. dahliae* a nuevas áreas de cultivo. Asimismo, el procedimiento mejorado permitió constatar que en condiciones naturales se puede dar la coinfección de una planta por los dos patotipos del patógeno, que fue posteriormente corroborada mediante inoculaciones artificiales. Por otro lado, el disponer de los iniciadores específicos y de los procedimientos de detección (protocolos de extracción de ADN y de ensayo PCR), nos ha permitido cuantificar al patógeno en tejidos de olivo infectados. Mediante la tecnología de PCR cuantitativa en tiempo real (“Real-time quantitative PCR”), hemos podido demostrar que la cantidad de ADN de *V. dahliae* presente en diferentes genotipos de olivo infectados está correlacionada en mayor medida con el grado de susceptibilidad de los mismos al patógeno que con la virulencia del patotipo de éste. Por otra parte, la cantidad de ADN del patógeno en tejidos infectados alcanzó su máximo antes de que los síntomas de la enfermedad alcanzaran su máxima expresión en genotipos susceptibles, siendo siempre menor la cantidad de ADN del patógeno en tallos que en raíces. Además, los máximos de ADN de *V. dahliae* (tanto del patotipo D como del

ND) en raíces se detectaron desde la primera semana después de la inoculación, pero la cantidad de ADN decreció después de forma paulatina. Nuestros resultados demuestran que la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real es una excelente herramienta tanto para monitorizar la colonización de los tejidos de olivo por *V. dahliae*, como para evaluar la resistencia o tolerancia de genotipos de olivo a la Verticilosis, lo que sería de una inestimable ayuda en programas de mejora de resistencia esta enfermedad.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con un creciente número de informes e investigaciones, la Verticilosis (*Verticillium dahliae* Kleb.) del olivo es una enfermedad en preocupante expansión en aquellos países donde el olivar es un cultivo relevante. En el caso de España, la Verticilosis afecta severamente tanto plantaciones de olivos adultos (Jiménez-Díaz y col., 1998), como aquellas que se han establecido recientemente (Sánchez-Hernández y col. 1998). Los aislados de *V. dahliae* que infectan olivo difieren marcadamente en virulencia y pueden ser clasificados como patotipo defoliante (D) o no defoliante (ND) según su capacidad para defoliar o no la planta, respectivamente (Rodríguez-Jurado, 1993; Schnathorst y Sibett, 1971). La infección por aislados ND provoca un cuadro

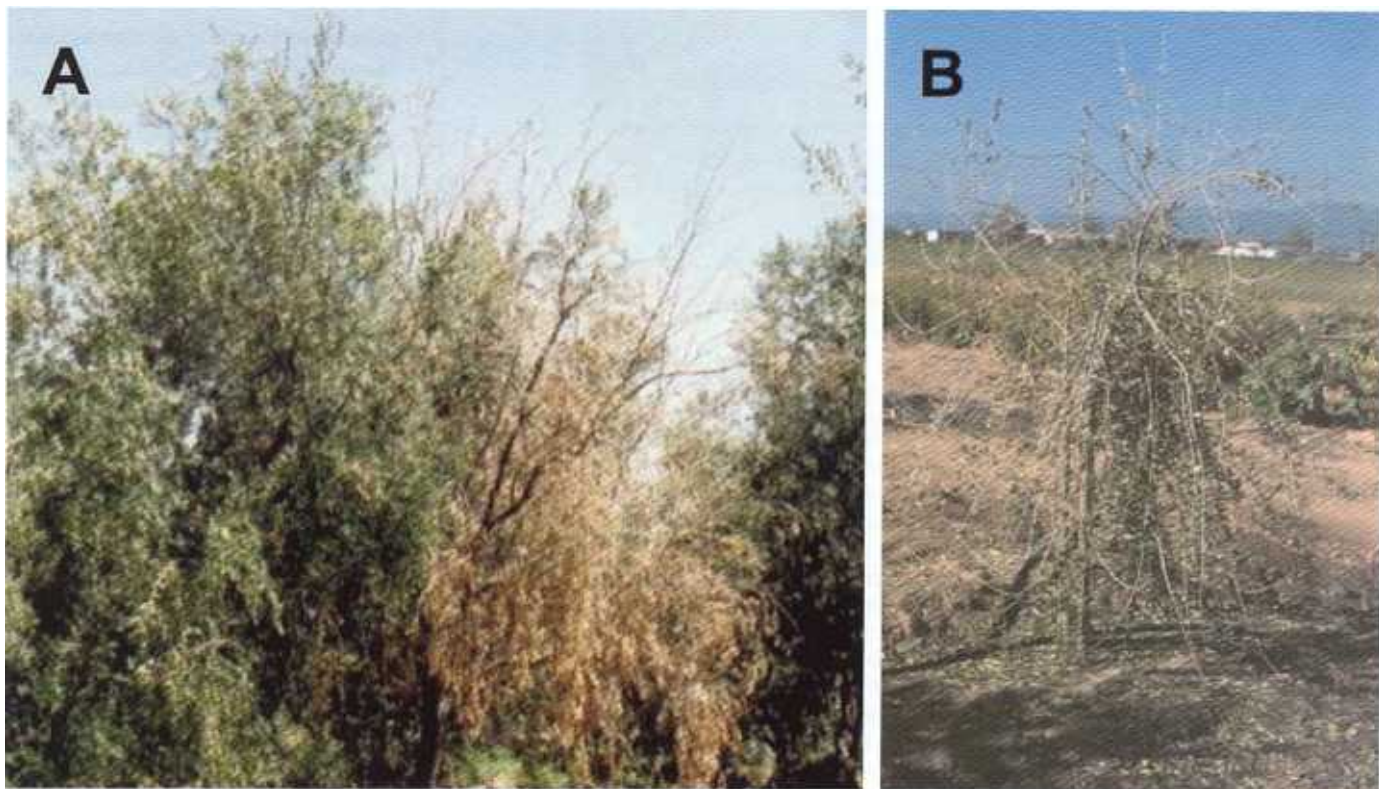


Figura 1. A: Olivo 'Picual' adulto (>25 años de edad) localizado en un olivar de la provincia de Almería con claros síntomas de Verticilosis causada por el patotipo no defoliante de *Verticillium dahliae* (el patotipo fue determinado mediante diagnóstico molecular). Se observa la severa marchitez de ramas y la marcada sectorialización de los síntomas en la copa del árbol. Obsérvese que la mayoría de las hojas permanecen adheridas a las ramas. B: Efecto de un ataque severo de Verticilosis causado por el patotipo defoliante de *Verticillium dahliae* en una planta de olivo 'Arbequina' de 4 años de edad en un olivar próximo a la ciudad de Córdoba. Obsérvese que el árbol ha sufrido una severa caída de hojas verdes.

sintomatológico menos severo en cultivares de olivo considerados como susceptibles, tales como 'Arbequina' o 'Picual', que pueden eventualmente recuperarse de la enfermedad después de haber transcurrido un tiempo desde su inoculación artificial o infección natural (Mercado-Blanco y col., 2001; Rodríguez-Jurado, 1993). Por el contrario, las infecciones por aislados D pueden resultar letales en este tipo de cultivares (López-Escudero, 1999; Rodríguez-Jurado, 1993) (Figura 1). Los estudios efectuados hasta hace poco refieren que los ataques de Verticilosis en olivares españoles eran causados principalmente por aislados del patotipo ND (Jiménez-Díaz y col., 1998). Sin embargo, trabajos muy recientes verifican la preocupante observación de que el patotipo D se ha extendido progresivamente desde

un área restringida del sur de España, donde fue detectado por primera vez (Bejarano-Alcázar y col., 1996), a zonas olivereras distantes, causando serios problemas en plantaciones jóvenes (Bejarano-Alcázar y col., 2001; López-Escudero, 1999; Navas-Cortés y col., 2001).

Los trabajos efectuados con anterioridad por nuestro grupo de investigación han permitido desarrollar un procedimiento basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que posibilita la detección temprana y diferencial de las infecciones, sintomáticas o no, causadas por los patotipos D y ND de *V. dahliae* en plantas de olivo de vivero tras inoculaciones artificiales de las mismas (Mercado-Blanco y col., 2001; 2002). Este procedimiento está basado en: a) la extracción de ADN de tejidos de olivo, infectados

o no por *V. dahliae*, con la calidad necesaria para su utilización en las reacciones de PCR; b) la utilización en dichas reacciones de iniciadores específicos para los patotipos D y ND de *V. dahliae*; y c) la puesta a punto de un protocolo de PCR secuencial ("nested"-PCR) que permite la detección del ADN del patógeno en muestra de ADN de tejido de olivo infectado aunque su abundancia en la misma sea mínima. En los estudios referidos se constataron dos observaciones de interés. La primera de ellas fue detectar que la secuencia identificativa de aislados del patotipo D también se encontraba presente en determinados aislados del patotipo ND, con una modificación que afectaba a un solo nucleótido. Esta circunstancia sólo era puesta de manifiesto tras efectuar el protocolo completo de PCR secuencial y, en determinados

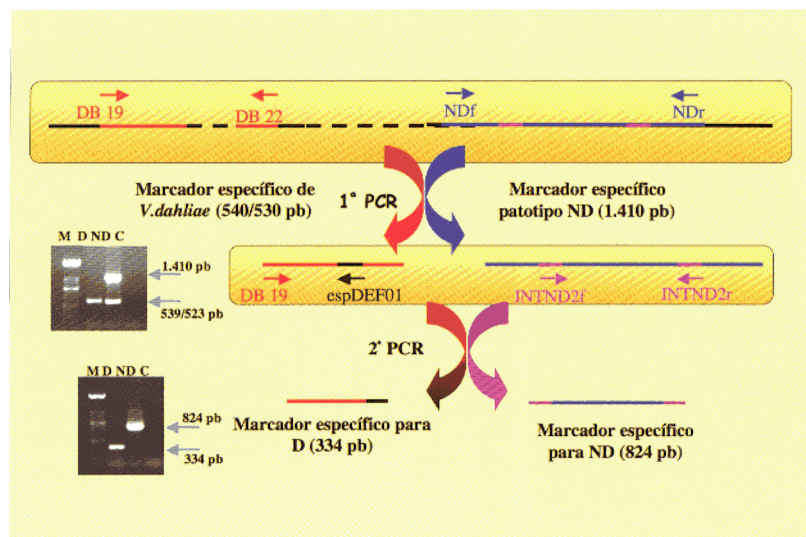


Figura 2. Esquema del procedimiento dúplex-“nested” PCR usado para la detección simultánea de *V. dahliae* y de sus patotipos D y ND.

casos, podía comprometer la correcta identificación del patotipo presente en una muestra infectada, dado que podía ocurrir amplificación heteróloga del ADN fúngico (Mercado-Blanco y col., 2002). Por lo tanto, para efectuar un diagnóstico del patotipo de *V. dahliae* presente sin ambigüedades se requieren dos ensayos (uno por patotipo) de PCR secuencial realizados en paralelo y de forma independiente para cada muestra a diagnosticar.

En segundo lugar, nuestras investigaciones indicaron reiteradamente diferencias en la intensidad de la fluorescencia en geles de agarosa (teñidos con bromuro de etidio) de los productos de amplificación, cuando se utilizaba como molde ADN genómico extraído de plantas ‘Picual’ infectadas con aislados D o ND de *V. dahliae*. Así, los productos PCR de fluorescencia más intensa se obtenían con ADN de plantas de olivo infectadas con el patotipo D de *V. dahliae* que eran muestreadas antes de la expresión máxima de síntomas de la enfermedad, y dicha intensidad decrecía después de ese momento de forma paulatina (Mercado-Blanco y col., 2002). Aunque esta observación no puede ser considerada como una determinación real de la cantidad de ADN

del patógeno presente en una muestra de tejido infectada, permite especular que la reducción en la intensidad de fluorescencia de producto PCR observada en momentos de máxima expresión de la enfermedad podría indicar un descenso en el número potencial de propágulos del patógeno dentro de una planta infectada.

En enfermedades como la Verticilosis del olivo, la extensión de la colonización vascular puede correlacionarse con la resistencia o susceptibilidad al patógeno. No obstante, la resistencia mostrada por determinados genotipos (donde el desarrollo de síntomas es poco severo) no significa necesariamente una reducción del crecimiento del patógeno (es decir, de su biomasa) en la planta (Pegg y Brady, 2002). De esta forma, la determinación cuantitativa de la biomasa de *V. dahliae* (expresada como cantidad de ADN) en una planta infectada sería de una inestimable ayuda en la caracterización de la resistencia o susceptibilidad de cultivares de olivo, así como de la virulencia de patotipos del patógeno sobre genotipos de olivo susceptibles. Sin embargo, la cuantificación de la biomasa de patógenos fúngicos vasculares (tales como *V. dahliae*) en

plantas infectadas, se ha visto tradicionalmente dificultada por el hecho de que estos hongos se encuentran confinados en los elementos no vivos del xilema a lo largo de la mayor parte del periodo de patogénesis (Pegg y Brady, 2002). Por otra parte, hasta que se ha dispuesto de técnicas moleculares basadas en la PCR no ha sido posible la cuantificación efectiva de la colonización por parte de *Verticillium* spp., si bien ello ha tenido lugar hasta ahora sólo en huéspedes herbáceos (Heinz y col., 1998; Hu y col., 1993). El reciente desarrollo de la tecnología de PCR cuantitativa en tiempo real (“real time quantitative PCR”) (Morrison y col., 1999) ha supuesto un notable avance en el campo de la cuantificación de ácidos nucleicos y tiene un enorme potencial para el diagnóstico cuantitativo de patógenos vegetales a bajos niveles de infección. Esta técnica es más exacta y rápida que los métodos tradicionales de cuantificación mediante PCR basados en el resultado final del proceso de amplificación, ya que registra la acumulación de productos PCR durante la fase exponencial del proceso, antes de que alguno de sus componentes resulte limitante. Aparte de su interés como herramienta diagnóstica cuantitativa, la PCR cuantitativa en tiempo real puede ser de utilidad para monitorizar el progreso de la infección por parte del patógeno.

Los trabajos que nuestro grupo ha desarrollado recientemente han tenido como objetivos: 1) eliminar las incertidumbres de diagnóstico de patotipos D y ND de *V. dahliae* en plantas de olivo infectadas, mediante el empleo de nuevos iniciadores y un protocolo de dúplex-“nested”-PCR que asegure la detección de la especie fúngica y de sus patotipos; 2) demostrar que este nuevo procedimiento es capaz de, una vez eliminadas las incertidumbres, detectar la presencia de los dos patotipos (D y ND) en una misma planta de olivo infectada en

condiciones naturales; y 3) estudiar si la severidad de la enfermedad causada por patotipos de diferente virulencia (D y ND) está correlacionada con la cantidad de ADN (indicadora de la cantidad de propágulos o biomasa) del patógeno presente en genotipos de olivo con diferente grado de susceptibilidad a la Verticilosis. En este artículo se resumen los resultados más relevantes de las investigaciones efectuadas.

DESARROLLO DE NUEVOS INICIADORES Y DE UN PROTOCOLO DÚPLEX-"NESTED"-PCR

En la búsqueda de nuevos marcadores moleculares para la identificación y diferenciación de aislados de *V. dahliae* que desarrollamos en nuestro laboratorio, pudimos constatar que un marcador PCR que se obtiene con los iniciadores DB19 y DB22, y que originalmente fue identificado por Carder y col. (1994) como específico de *V. dahliae*, presentaba un polimorfismo del tamaño molecular asociado con los patotipos D y ND que infectan algodón y olivo. Así, todos los aislados D amplificaban una banda de aproximadamente 540 nucleótidos, mientras que todos los aislados ND analizadas amplificaban una banda menor de ADN (aproximadamente 530 nucleótidos). La posterior secuenciación de dicho fragmento de ADN reveló la presencia, entre otras diferencias, de un inserto de 15 nucleótidos (Mercado-Blanco y col., 2003b; Collins y col., en preparación). Dicha secuencia de 15 nucleótidos sirvió como base para el diseño de un nuevo iniciador (denominado espdef01), que usado en combinación con el iniciador DB19 o con el par DB19/DB22 discriminaba en una única reacción PCR los aislados D de los ND (Mercado-Blanco y col., 2003b).

El ajuste de las condiciones de reacción PCR y "nested"-PCR per-

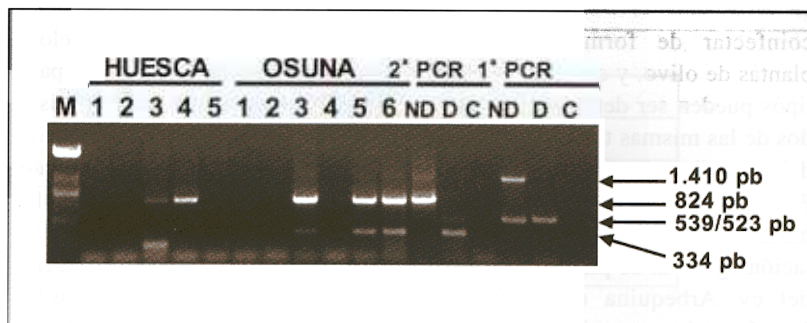


Figura 3. Detección de los patotipos defoliante (D) y no defoliante (ND) de *Verticillium dahliae* en ramas de olivos 'Arbequina' procedentes de olivares de la provincia de Huesca y de Sevilla. Se muestran los patrones electroforéticos de los productos de PCR obtenidos después de aplicar el procedimiento de dúplex-"nested"-PCR a muestras de tejidos sospechosos de estar infectados. También se muestran los resultados obtenidos después de efectuar la primera PCR y la "nested"-PCR (2ª PCR) a muestras de ADN directamente extraídas de micelio de un aislado representativo del patotipo no defoliante (ND) o del defoliante (D), al igual que una reacción control negativo sin ADN (C). Obsérvese que las muestras que dieron positivas de árboles de la provincia de Huesca sólo lo fueron para el patotipo ND (carriles 3 y 4). Las muestras de árboles procedentes de un olivar situado en el municipio de Osuna (Sevilla) que dieron resultado positivo, mostraron simultáneamente la presencia del marcador D (334 pb) y ND(824 pb) en la misma planta (carriles 3, 5 y 6), lo que indicaba que ambos patotipos han colonizado simultáneamente el tejido vascular de las ramas analizadas. M. marcador de peso molecular.

mitió desarrollar un protocolo de diagnóstico molecular *in planta* (Figura 2) que está basado en el que previamente habíamos diseñado (Mercado-Blanco y col., 2001). Así, en una primera reacción PCR dúplex se utilizan los pares de iniciadores NDf/NDr, que amplifica una banda de 1.410 pb que es específica de aislados ND (Mercado-Blanco y col., 2001), y DB19/DB22, que amplifica una banda específica de *V. dahliae* (530/540 pb) (Carder y col., 1994; Mercado-Blanco y col., 2003b). La segunda reacción de amplificación (reacción "nested") tiene lugar en presencia de los pares de iniciadores INTND2f/INTND2r, que da como resultado un amplicón de 824 pb (Mercado-Blanco y col., 2001), y el par de iniciadores DB19/espdef01, que amplifica un fragmento de 334 pb sólo en aquellas muestras de ADN que contengan ADN de aislados del patotipo D (Mercado-Blanco y col., 2003b) (Figura 2). Este protocolo de dúplex-"nested"-PCR se ha mostrado efectivo en la

detección sin ambigüedades de los patotipos D y ND en muestras de tejidos de plantas de olivo de vivero inoculadas de forma artificial. De esta manera, en una única secuencia de reacciones ("nested"), es factible determinar la especie (*V. dahliae*) y sus patotipos (D o ND) (dúplex). El reto que nos planteamos a continuación fue demostrar la efectividad del procedimiento de detección cuando se utiliza con muestras de olivos infectados de forma natural y verificar, una vez eliminadas las posibles amplificaciones heterólogas antes citadas, si las plantas pueden estar infectadas conjuntamente por aislados de los dos patotipos de *V. dahliae*.

DEMOSTRACIÓN DE LA INFECCIÓN CONJUNTA POR LOS PATOTIPOS D Y ND DE *V. DAHLIAE* EN PLANTAS DE OLIVO

La demostración de que los patotipos D y ND de *V. dahliae* pueden

coinfectar de forma simultánea plantas de olivo, y que ambos patotipos pueden ser detectados en tejidos de las mismas tras la aplicación del procedimiento dúplex-“nested”-PCR, se obtuvo en primer lugar a partir de experimentos de co-inoculación artificial de plantas de vivero del cv. Arbequina efectuados *ad hoc*. Las plantas se inocularon por inmersión del sistema radical desnudo en una secuencia, en la que primero se utilizó una suspensión de conidias del patotipo ND y a continuación otra del patotipo D, y después se transplantaron a macetas que contenían una mezcla estéril de arena:limo (2:1, v/v). Las plantas se incubaron en cámaras de cultivo en condiciones óptimas para la Verticilosis, y se muestrearon a los 7, 14, 21 y 85 días después de la inoculación. De forma paralela, y a modo de tratamientos control, se inoculó un grupo de plantas sólo con el patotipo D, otro sólo con el patotipo ND (controles positivos de infección individual), y un tercero se sumergió en agua estéril (control negativo).

El análisis PCR utilizando el ADN de raíces y tallos de plantas muestreadas indicó que las que habían sido inoculadas sólo con el patotipo D amplificaban sólo la banda característica del patotipo D (334 pb), mientras que las plantas inoculadas sólo con el patotipo ND produjeron el amplicón de 824 pb específico de patotipo ND. Sin embargo, lo más interesante fue confirmar que el ADN procedente de aquellas plantas que habían sido inoculadas de forma secuencial con los dos patotipos amplificaba ambos marcadores (334 y 824 pb) de forma inequívoca, lo que indicaba la presencia de los patotipos D y ND en una misma planta. Este resultado fue nítido en muestras de raíces y, sobre todo, a los 21 y 85 días después de la inoculación (Mercado-Blanco y col., 2003b). Aunque en estos experimentos no se pudo detectar de forma simultánea la presencia de ambos patotipos en tallos, sí fue patente una

mayor capacidad (o mayor velocidad) de colonización de la parte aérea de la planta por parte del aislado D comparado con el ND, tanto en plantas inoculadas sólo con el patotipo D como en aquellas que habían sido co-inoculadas con los dos patotipos. En todo caso, la detección positiva en las plantas infectadas fue siempre anterior al desarrollo de síntomas, en concordancia con resultados obtenidos con anterioridad (Mercado-Blanco y col., 2001; 2002).

Los resultados descritos abrían la posibilidad de valorar si nuestro procedimiento refinado de diagnóstico molecular era de aplicación eficaz en condiciones naturales, es decir, en muestras de tejidos procedentes de olivos de plantaciones comerciales que mostraban síntomas de Verticilosis. Por otra parte, con dicho procedimiento se podría demostrar si en condiciones naturales los patotipos D y ND pueden coinfectar una misma planta de olivo como habían puesto de manifiesto nuestros experimentos de co-inoculación anteriores. Con ese objetivo, se efectuaron análisis diagnósticos moleculares por el procedimiento descrito, utilizando muestras de ADN extraídas de plantas de olivo de diferente procedencia geográfica, edad y cultivar. Para los análisis se utilizaron tejidos de parte aérea (tallos y, ocasionalmente, hojas) puesto que son más accesibles al muestreo que las raíces de árboles adultos en condiciones de campo.

Nuestros resultados demostraron que es factible extraer ADN de calidad PCR de tallos y hojas de árboles adultos, si bien son más adecuados los tejidos que no estén severamente necróticos o marchitos en el caso de estar afectados de Verticilosis. En cualquier caso, el procedimiento de diagnóstico molecular superó al procedimiento tradicional de diagnóstico mediante aislamiento microbiológico en medios de cultivo (i.e., mayor número de diagnósticos positivos a favor del primero), aun cuando se use ADN extraído de tejidos

seriamente afectados por la enfermedad (Mercado-Blanco y col., 2003b). La utilización de tejido verde no sintomático para diagnóstico mediante dúplex-“nested”-PCR de patotipos de *V. dahliae* en olivos afectados de Verticilosis es potencialmente más adecuada que la de tejidos necróticos, ya que facilita la detección de infecciones latentes del patógeno en tejidos donde el patógeno pudiera estar aún biológicamente activo.

Los resultados del diagnóstico molecular en muestras de campo determinaron, en primer lugar, que todas las muestras que resultaron positivas en los aislamientos convencionales fueron confirmadas por el procedimiento dúplex-“nested”-PCR. Además, el diagnóstico molecular mejoró los resultados proporcionados por el diagnóstico convencional. Así, y a modo de ejemplo, cuando se analizaron un total de 45 muestras de ADN extraídas de tallos severamente afectados por la enfermedad de olivos ‘Arbequina’ de 4-5 años de edad de una plantación en la provincia de Córdoba, el procedimiento molecular determinó la presencia de *V. dahliae* en 25 de ellas, mientras que el aislamiento microbiológico sólo lo pudo confirmar en 13 de las 45. Lo mismo ocurrió con muestras procedentes de olivos ‘Picual’ de 8 años de edad, ya que de un total de 12 muestras de tallos (6 asintomáticos y 6 claramente afectados), en 5 de ellas (1 marchito y 4 verdes) se detectó el patógeno mediante PCR, mientras que sólo en 2 (verdes) pudo determinarse la infección mediante el aislamiento convencional.

Otro hecho a destacar es que hubo una mayor abundancia de detecciones moleculares positivas para el patotipo D en muestras procedentes de olivos del sur de España (provincias de Córdoba, Sevilla y Granada). Así, de un total de 118 muestras analizadas 66 dieron resultado positivo para el marcador D y sólo 15 para el marcador ND. Si bien este resultado puede

ser la consecuencia de muestrear árboles severamente afectados, con una clara sintomatología de infección por el patotipo D, no deja de preocupar la presencia frecuente del patotipo D en zonas alejadas de donde fue originalmente descrito (Bejarano-Alcázar y col., 1996), y alerta sobre la expansión del patotipo más virulento hacia nuevas zonas olivareras. Por el contrario, el análisis molecular reveló que muestras de tejidos de olivos supuestamente afectados por Verticilosis y procedentes de zonas alejadas de Andalucía, como la provincia de Huesca ('Arbequina', 3 años) o de Argentina (cvs. 'Manzanilla', 'Nabali' y 'Picual', 9 años), dieron resultado positivo para el patotipo ND en el primer caso y negativo en el segundo. Por último, el resultado más interesante desde los puntos de vista diagnóstico y epidemiológico fue comprobar que en determinadas muestras era posible detectar la presencia simultánea de ADN de los dos patotipos (D y ND). Así, en 13 del total de muestras analizadas en este estudio se produjeron las bandas marcadores específicas de cada uno de los patotipos, tal y como se muestra en la Figura 3, confirmando así nuestros resultados en coinoculaciones artificiales. Esto significa que los patotipos D y ND de *V. dahliae* pueden co-infectar y colonizar una misma planta de olivo en condiciones naturales.

DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD, EXTENSIÓN DE LA COLONIZACIÓN DEL PATÓGENO Y RELACIÓN CON LA SUSCEPTIBILIDAD O TOLERANCIA A LA VERTICILOSIS DE GENOTIPOS DE OLIVO

Una vez disponibles la metodología y los materiales que hacen posible el diagnóstico cualitativo de *V. dahliae* y sus patotipos en plantas de olivo, es decir, un procedimiento de extracción de ADN de calidad PCR.

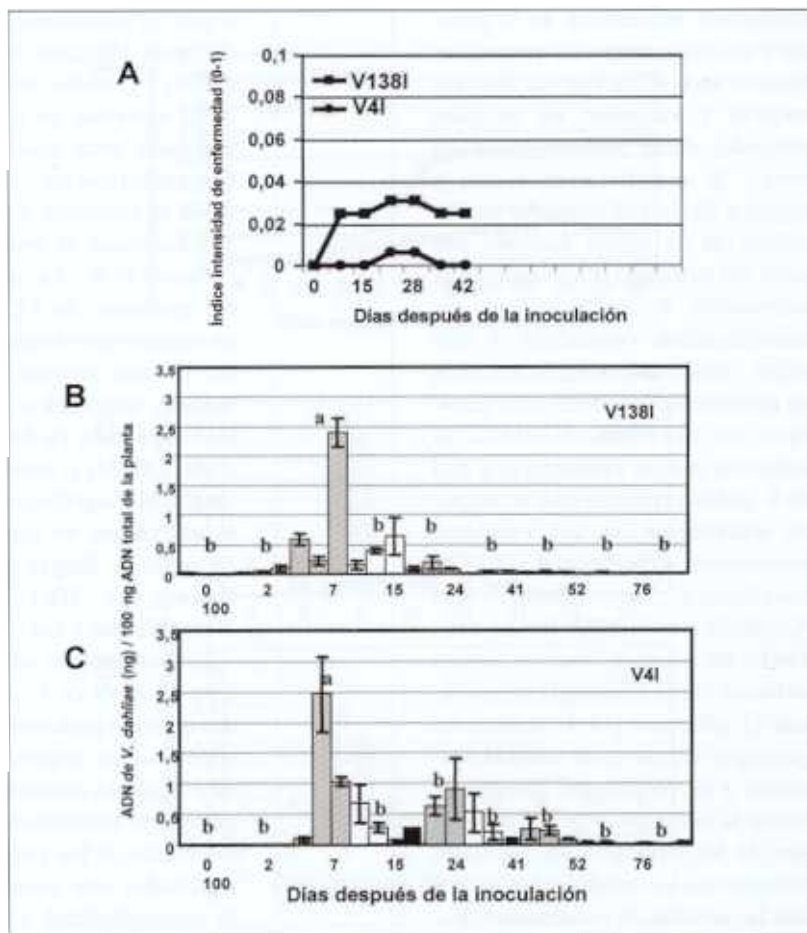


Figura 4. A: Curva de progreso de la enfermedad observada en un bioensayo con plantas del genotipo 'Acebuche-L' cuando las mismas fueron inoculadas mediante inmersión de raíces en suspensiones de conidias (107 conidias/ml) de un aislado defoliante (V138I) o de un aislado defoliante (V4I) de *Verticillium dahliae*. La severidad de los síntomas fue evaluada según una escala de 0 a 4, correspondiendo el 0 a la completa ausencia de síntomas visuales y el 4 a la planta muerta. Se calculó un índice de intensidad de enfermedad (IIE) según la expresión $IIE = \sum(S_i \cdot N_i) / 4 \cdot N_t$, que tiene un valor máximo de 1, y se representó sobre el tiempo transcurrido desde la inoculación y hasta los 42 días donde se finalizó la lectura de síntomas. Cada punto de la curva es el valor medio de la lectura efectuada sobre 20 plantas. Notéanse los valores del IIE comparados con los que se indican para plantas de 'Arbequina' en la Fig. 5. **B y C:** Cantidades de ADN de *Verticillium dahliae* cuantificadas en raíces de plantas 'Acebuche-L' que fueron inoculadas con el aislado V138I (defoliante) (**B**) o el aislado V4I (no defoliante) (**C**) después de aplicar la metodología de PCR cuantitativa en tiempo real. Las plantas proceden del mismo bioensayo cuya curva de progreso de enfermedad se muestra en el panel **A** de esta figura. El contenido de ADN está expresado en nanogramos (ng) por 100 ng de ADN genómico total extraído de raíces de las plantas infectadas. Cada barra es el valor medio de dos ensayos independientes de PCR cuantitativa en tiempo real que incluyeron tres repeticiones para cada muestra de ADN. El triángulo invertido del panel **C** indica que el ADN de dicha planta no pudo ser cuantificado. En el caso de las plantas 'Acebuche-L', y al contrario que en los cultivares susceptibles 'Picual y 'Arbequina', no se pudo cuantificar el ADN del patógeno en tallos. Letras iguales por encima de las barras indican que no hubo diferencias significativas ($P < 0.01$) entre tiempos de muestreos para cada aislado de *Verticillium dahliae* ensayado. Las barras de error representan la desviación estándar.

iniciadores específicos de la especie y de sus patotipos, y protocolos basados en la PCR, con sus diversas mejoras y variantes, es un paso obligado, desde nuestro punto de vista, la cuantificación exacta y objetiva de la colonización de los tejidos de la planta huésped por parte del patógeno. En el caso de la interacción *V. dahliae*-olivo, tal cuantificación conduciría a una mejor comprensión de la reacción de enfermedad que diferentes genotipos de olivo manifiestan a la infección por los patotipos D y ND de *V. dahliae*, para lo cual se dispone actualmente de una excelente herramienta experimental: la PCR cuantitativa en tiempo real (Cockerill y col., 2002; Ririe y col., 1997). En nuestros estudios, hemos utilizado dicha tecnología para evaluar la infección por *V. dahliae* en genotipos de olivo de variada respuesta a la Verticilosis, correlacionando la cantidad de ADN de cada uno de los patotipos del patógeno presente en los tejidos de aquéllos con la cantidad de enfermedad desarrollada (Mercado-Blanco y col., 2003a). Para efectuar esta investigación hemos inoculado plantas de olivo de los diferentes genotipos por inmersión del sistema radical desnudo en suspensiones de conidias de cada uno de los patotipos (D y ND) (Mercado-Blanco y col., 2001; Rodríguez-Jurado, 1993), e incubado las plantas inoculadas en cámaras de cultivo en condiciones óptimas para la Verticilosis. Las plantas se muestrearon después, en un curso temporal, al objeto de efectuarles el diagnóstico cuantitativo mediante PCR en tiempo real. Durante los bioensayos, el desarrollo de la enfermedad fue severo (patotipo D) o moderadamente severo (patotipo ND) en los cvs. 'Arbequina' y 'Picual', considerados como susceptibles; pero las plantas del genotipo 'Acebuche-L' (proporcionadas por Cotevisa, Valencia) se mostraron resistentes a la enfermedad. El ADN que se utilizó para la cuantificación se extrajo

según el procedimiento desarrollado por Mercado-Blanco y col. (2001), y todas las muestras de ADN extraídas de tejido vegetal y utilizadas para cuantificación fueron previamente diagnosticadas sobre la presencia del patotipo D o ND mediante el procedimiento de "nested"-PCR. La puesta a punto del protocolo de PCR cuantitativa en tiempo real excede las pretensiones de este artículo, pero para los lectores interesados queda ampliamente descrita en Mercado-Blanco y col. (2003a) y, además, existe una amplia bibliografía sobre la creciente utilización de esta metodología en estudios fitopatológicos (p. ej., Bates y col., 2001; Weller y col., 2000; Winton y col., 2002).

De los trabajos sobre cuantificación de ADN de *V. dahliae* en tejidos de olivo podemos extraer cuatro conclusiones importantes. En primer lugar, la cantidad de ADN del patógeno determinada en tejidos infectados de los genotipos de olivo analizados está correlacionada con la susceptibilidad a la Verticilosis de cada uno de ellos. Como era de esperar, el número de plantas en las cuales el ADN del patógeno pudo ser cuantificado de forma efectiva estuvo correlacionado con la incidencia y la severidad de la Verticilosis que se desarrolló en dichos genotipos. De esta manera, la cantidad de ADN del patógeno (ya sea para el aislado V4I [ND] o para el V138I [D]) presente en raíces y tallos durante los 100 días de los experimentos fue mayor en plantas 'Picual' (el genotipo de olivo más susceptible, datos no mostrados), pero menor en 'Arbequina' (Figura 5) y 'Acebuche-L' (Figura 4), en este orden. Estos dos últimos genotipos produjeron un menor número de plantas enfermas, aunque en las raíces de todas ellas fue detectado el patógeno mediante los correspondientes ensayos de "nested"-PCR. Por lo tanto, los resultados de cuantificación de ADN del patógeno obtenidos para plantas 'Arbequina'

se corresponden con la menor incidencia y severidad de la enfermedad comparadas con las que se observaron en plantas 'Picual', y la práctica ausencia de síntomas de la enfermedad en plantas 'Acebuche-L'. Es de destacar que en todos los ensayos efectuados, independientemente de la combinación patotipo *V. dahliae*/genotipo de olivo ensayada, siempre se detectó una menor cantidad de ADN del patógeno en tallos que en raíces de una misma planta infectada, y que por ello fue necesario duplicar la cantidad de ADN total (hasta 200 ng) en los ensayos de cuantificación mediante PCR en tiempo real, para poder efectuar en tallos una medida efectiva de la cantidad de ADN del patógeno presente. A pesar de ello, nunca se pudo efectuar una cuantificación fidedigna de ADN de *V. dahliae* en tallos de plantas 'Acebuche-L', lo que indica que el número potencial de propágulos del patógeno en tejidos aéreos de este genotipo (en definitiva, la biomasa del patógeno presente en ellos) era muy baja e insuficiente para una adecuada cuantificación. En cualquier caso, los tallos de algunas de estas plantas estaban infectados por *V. dahliae*, como demostraron los ensayos "nested"-PCR con dichos tejidos.

La segunda conclusión importante de este estudio fue constatar que las diferencias en la cantidad de ADN del patógeno en planta era determinada en mayor medida por el genotipo de olivo que por la virulencia de patotipo infectante (D o ND), con escasas excepciones. Así, las máximas cantidades de ADN de *V. dahliae* cuantificadas en raíces del genotipo resistente 'Acebuche-L' fueron similares, independientemente de que se determinasen en plantas inoculadas con el aislado V138I (D, altamente virulento) o en aquéllas inoculadas con V4I (ND, moderadamente virulento) (Figura 4). En el caso de plantas 'Arbequina' se encontró un patrón similar, aunque las cantidades medias de ADN del patógeno deter-

minadas en tallos fueron mayores para las plantas que habían sido inoculadas con el aislado V138I comparado con las que lo fueron con el aislado V4I (Figura 5). En términos de persistencia del patógeno en los tejidos infectados, resultó evidente en nuestros ensayos que cuanto más susceptible era el genotipo de olivo ensayado y más virulento el patotipo de *V. dahliae* inoculado, más prolongado era el intervalo de tiempo durante el que se detectaban cantidades considerables de ADN del patógeno (p. ej., en las interacciones 'Picual'/V138I o V4I, resultados no mostrados). En este cultivar (muy susceptible a la Verticilosis) y en la interacción más compatible (plantas inoculadas con el aislado V138I), la cantidad de ADN del patógeno en raíces permaneció a niveles altos (valores medios entre 1-1,5 ng/100ng ADN total de la planta) hasta los 41 días después de la inoculación. Además, se detectó un incremento significativo de la cantidad de ADN de *V. dahliae* en los tallos de dichas plantas a ese mismo tiempo. Esto sugiere que aproximadamente a los 40 días después de la inoculación, en los tallos de plantas 'Picual' tiene lugar un súbito incremento de la cantidad de ADN de *V. dahliae* (es decir, de su biomasa). Sin embargo, en interacciones menos compatibles que el caso anterior, como por ejemplo 'Picual'/*V. dahliae* V4I (resultados no mostrados) o incluso 'Arbequina'/*V. dahliae* V138I o V4I (Figura 5), no se verificaron incrementos significativos en la cantidad de ADN del patógeno, permaneciendo éste a niveles relativamente bajos y constantes a lo largo de los 100 días en que se prolongó el muestreo.

El tercer hallazgo de interés fue determinar que la máxima acumulación de ADN del patógeno en raíces de plantas de olivo de todos los genotipos estudiados, y también en tallos de 'Picual', tiene lugar antes de la máxima expresión de síntomas de la enfermedad. A partir de

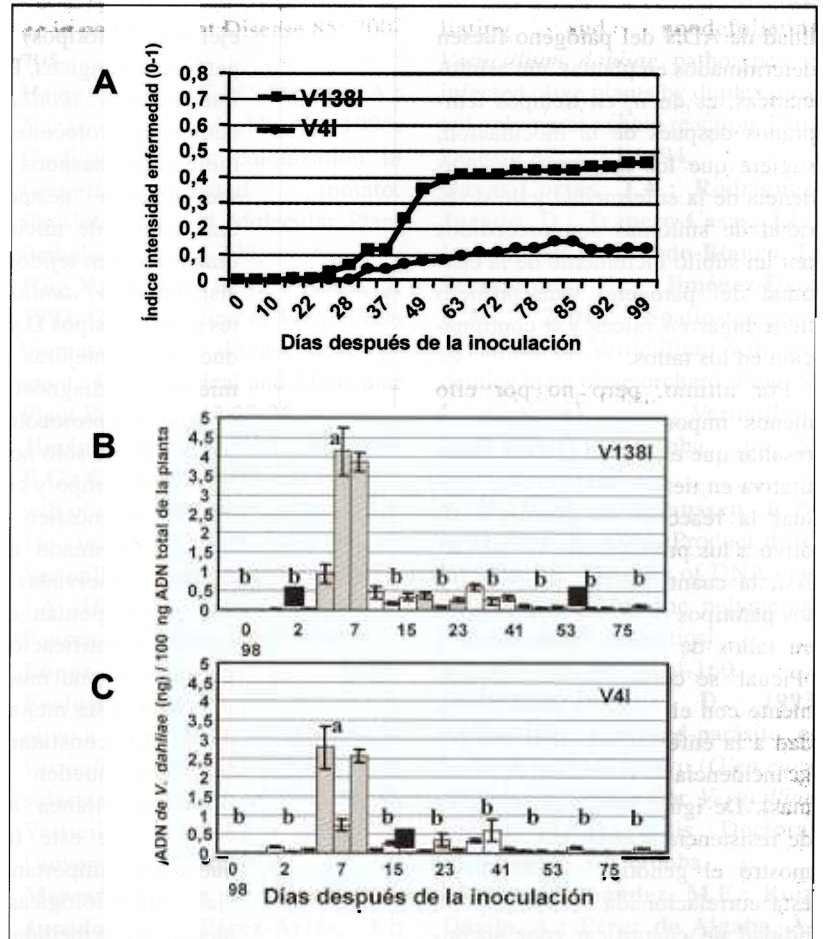


Figura 5. A: Curva de progreso de la enfermedad observada en un bioensayo efectuado con plantas del cv. 'Arbequina'. Se siguió el mismo proceso explicado en la Figura 4 para las plantas 'Acebuche-L', pero las lecturas se efectuaron hasta los 98 días después de la inoculación. B y C: Cantidades de ADN de *Verticillium dahliae* cuantificadas en raíces de plantas 'Arbequina' que fueron inoculadas con el aislado V138I (defoliante)

ese máximo, la cantidad de ADN del patógeno disminuye, bien de forma acusada como en el caso de los genotipos 'Arbequina' y 'Acebuche-L' (Figuras 4 y 5), u oscila ligeramente durante un tiempo que va desde los 7 a los 52 días después de la inoculación en el genotipo 'Picual'. Como ya se ha indicado, el ADN del patógeno cuantificado en los tallos de plantas 'Arbequina' y 'Picual' fue mucho menor que en raíces, y sus máximos se cuantificaron después de los máximos medidos en raíces. Este retraso entre los máximos de ADN del patógeno detectados primero en raíces y luego en tallos sugiere que tiene lugar una secuencia temporal

en la colonización sistémica de la planta por parte del patógeno. Es interesante destacar que plantas severamente afectadas (como ocurrió con algunas plantas 'Picual' inoculadas con el aislado V138I) y que fueron muestreadas a tiempos tardíos, después de la inoculación (76-100 días), no contenían una elevada cantidad de ADN del patógeno en raíces. Esto sugiere que el número de propágulos del patógeno en estos tejidos decrece en tiempos posteriores al completo desarrollo de la enfermedad, al mismo tiempo que tiene lugar una translocación del patógeno hacia los haces vasculares de la parte aérea. El hecho de que algunos de los máximos en can-

tividad de ADN del patógeno fuesen determinados en plantas aún asintomáticas, es decir, en tiempos tempranos después de la inoculación, sugiere que los máximos de incidencia de la enfermedad y de severidad de síntomas son precedidos por un súbito incremento de la cantidad del patógeno, que primero tiene lugar en raíces y a continuación en los tallos.

Por último, pero no por ello menos importante, es importante resaltar que el uso de la PCR cuantitativa en tiempo real permite evaluar la reacción de genotipos de olivo a los patotipos de *V. dahliae*. Así, la cuantificación de ADN de los patotipos D y ND de *V. dahliae* en tallos de olivos 'Arbequina' y 'Picual' se correlaciona adecuadamente con el nivel de susceptibilidad a la enfermedad (indicada por la incidencia y severidad de síntomas). De igual modo, la respuesta de resistencia a la enfermedad que mostró el genotipo 'Acebuche-L' está correlacionada con la imposibilidad de cuantificar (por encontrarse por debajo del umbral de cuantificación efectiva que determinamos en nuestro estudio en torno a 1 picogramo de ADN del patógeno) el ADN del patógeno en tallos. Por el contrario, la cantidad de patógeno determinada en raíces de este genotipo fue comparable a la del cultivar susceptible 'Arbequina', pero inferior que en el altamente susceptible 'Picual'.

CONCLUSIONES

El empleo en Fitopatología de las técnicas y herramientas moleculares basadas en la PCR y el uso de iniciadores específicos, ha supuesto un incuestionable avance en el campo del diagnóstico *in planta* de organismos fitopatógenos. Nuestro grupo lleva años trabajando en la implementación de protocolos de diagnóstico molecular para la identificación tanto a nivel de especie como a nivel subespecífico (por

ejemplo, patotipos) de diferentes patógenos fúngicos. En el caso de la interacción *V. dahliae*-olivo disponemos de protocolos de detección molecular basados en la PCR secuencial o "nested"-PCR, y de una batería de iniciadores para el diagnóstico en tejidos infectados de aislados de *V. dahliae* pertenecientes a los patotipos D y ND. La introducción de mejoras en el procedimiento de diagnóstico molecular cualitativo (protocolo dúplex-"nested"-PCR) no sólo nos ha permitido reducir el tiempo y coste para obtener un diagnóstico efectivo, sino que ha eliminado ciertas incertidumbres observadas con anterioridad y que ponían en cuestión la correcta identificación del patotipo presente en una muestra de tejido infectado. Esta mejora, además, ha permitido constatar que ambos patotipos pueden colonizar de forma simultánea una planta de olivo y que este fenómeno, que puede tener importantes consecuencias epidemiológicas y de implementación de medidas de control, se da en condiciones naturales. Además, se ha verificado que el patotipo D, el más amenazador para el cultivo del olivar, se extiende de forma preocupante desde las restringidas áreas donde fue identificado por primera vez hacia nuevas zonas de cultivo.

Por otra parte, la utilización de la PCR cuantitativa en tiempo real, utilizada por primera vez para evaluar el progreso de la colonización por parte de un patógeno en un huésped leñoso, no sólo es una excelente herramienta para informar sobre la extensión de la colonización en tejidos y sobre la cantidad de patógeno presente en ellos, sino que lo es también para determinar diferencias en susceptibilidad y/o tolerancia que determinados cultivares de olivo pueden tener a los diversos aislados de *V. dahliae*. Otros autores que trabajan sobre el patosistema *V. dahliae*-patata han recomendado que una cuantificación exacta de la biomasa del pató-

geno debería ser de obligada evaluación en programas de mejora de resistencia (Dan y col., 2001). Nuestros resultados avalan dicha recomendación. Por ello sugerimos que la cuantificación de la biomasa de *V. dahliae* (y de sus patotipos) en genotipos de olivo debería ser un elemento importante a tener en cuenta en los programas que para la mejora a la resistencia a la Verticilosis puedan desarrollarse o estén en desarrollo. Por último, nuestro interés se centra ahora en la utilización de este tipo de herramientas de diagnóstico molecular para determinar el patotipo y la cantidad del mismo en suelos destinados al establecimiento de nuevas plantaciones, ya que dicho conocimiento estimamos es de extrema importancia para la toma de decisiones respecto de la aplicación de estrategias de control integrado de Verticilosis de cultivos. ●

Jesús Mercado Blanco¹
Melania Collado Romero¹
Dolores Rodríguez Jurado¹
Rafael M. Jiménez Díaz^{1,2}

¹ Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Apartado 4084, 14080 Córdoba.

² Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes, Universidad de Córdoba, Apartado 3048, 14080 Córdoba.

AGRADECIMIENTOS

Estas investigaciones han sido subvencionadas por la Comisión Europea (Framework Programme 5, project reference number QLRT-1999-1523). Los autores quieren manifestar su agradecimiento a Cotevisa (Valencia, España), por proporcionarnos plantas de olivo gratuitamente. También mostramos nuestra gratitud al Profesor Juan Muñoz, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba, por

facilitar el acceso a su laboratorio y equipos, a Antonio Valverde y José Luis Trapero por su valiosa asistencia técnica, a José Bejarano por proporcionarnos muestras de olivo de campo y a Pilar Rallo y Anne Morton por suministrarnos determinados iniciadores durante el transcurso de estos trabajos.

BIBLIOGRAFÍA

- Bates, J.A.; Taylor, E.J.A.; Kenyon, D.M.; Thomas, J.E. 2001. The application of real-time PCR to the identification, detection and quantification of *Pyrenophora* species in barley seed. *Molecular Plant Pathology* 2: 49-57.
- Bejarano-Alcázar, J.; Blanco-López, M.A.; Melero-Vara, J.M.; Jiménez-Díaz, R.M. 1996. Etiology, importance, and distribution of *Verticillium* wilt of cotton in southern Spain. *Plant Disease* 80:1233-1238.
- Bejarano-Alcázar, J.; Pérez-Artés, E.; Jiménez-Díaz, R.M. 2001. Spread of the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae* to new cotton- and olive-growing areas in Southern Spain. Proc. 8th International *Verticillium* Symposium, Córdoba, p. 57 (abstract).
- Carder, J.H.; Morton, A.; Tabrett, A.M.; Barbara, D.J. 1994. Detection and differentiation by PCR of subspecific groups within two *Verticillium* species causing vascular wilts in herbaceous hosts, p. 91-97 in: *Modern Assays for Plant Pathogenic Fungi: Identification, Detection and Quantification*. A. Schots, F.M. Dewey, y R. Oliver, eds. CAB International, Oxford.
- Cockerill, F.R.; Smith, T.F. 2002. Rapid-cycle real-time PCR: a revolution for clinical microbiology. *ASM News* 68: 77-83.
- Dan, H.; Ali-Khan, A.T.; Robb, J. 2001. Use of quantitative PCR diagnostics to identify tolerance and resistance to *Verticillium dahliae* in potato. *Plant Disease* 85: 700-705.
- Heinz, R.; Lee, S.W.; Saparno, A.; Nazar, R.N.; Robb, J. 1998. Cyclical systemic colonization in *Verticillium*-infected tomato. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52:385-396.
- Hu, X.; Nazar, R.N.; Robb, J. 1993. Quantification of *Verticillium* biomass in wilt disease development. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 42:23-36.
- Jiménez-Díaz, R.M.; Tjamos, E.C.; Cirulli, M. 1998. *Verticillium* wilt of major tree hosts: olive. P. 13-16 in: *A Compendium of Verticillium Wilt in Trees Species*. J.A. Hiemstra; D.C. Harris, eds. Ponsen & Looijen, Wageningen.
- López-Escudero, 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, Universidad de Córdoba.
- Mercado-Blanco, J.; Rodríguez-Jurado, D.; Pérez-Artés, E.; Jiménez-Díaz, R.M. 2001. Detection of the nondefoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in infected olive plants by nested PCR. *Plant Pathology* 50:609-619.
- Mercado-Blanco, J.; Rodríguez-Jurado, D.; Pérez-Artés, E.; Jiménez-Díaz, R.M. 2002. Detection of the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in infected olive plants by nested PCR. *European Journal of Plant Pathology* 108:1-13.
- Mercado-Blanco, J.; Collado-Romero, M.; Parrilla-Araujo, S.; Rodríguez-Jurado, D.; Jiménez-Díaz, R.M. 2003a. 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.; Parrilla-Araujo, S.; Jiménez-Díaz, R.M. 2003b. Simultaneous detection of the defoliating and nondefoliating *Verticillium dahliae* pathotypes in infected olive plants by duplex, nested polymerase chain reaction. *Plant Disease* 87: 1487-1494.
- Navas-Cortés, J.A.; Rodríguez-Jurado, D.; Trapero-Casas, J.L.; Landa, B.B.; Mercado-Blanco, J.; Pérez-Artés, E.; Jiménez-Díaz, R.M. 2001. Spatio-temporal dynamics of *Verticillium* wilt epidemics in an olive orchard. Proc. 8th International *Verticillium* Symposium, Córdoba, p. 59 (abstract).
- Ririe K.M.; Rasmussen R.P.; Wittwer C.T. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 245: 154-160.
- Rodríguez-Jurado, D. 1993. Interacciones huésped-parásito en la Verticilosis del olivo (*Olea europaea* L.) inducida por *Verticillium dahliae* Kleb. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba.
- Sánchez-Hernández, M.E.; Ruíz-Dávila, A.; Pérez de Algaba, A.; Blanco-López, M.A.; Trapero-Casas, A. 1998. Occurrence and etiology of death of young olives trees in southern Spain. *European Journal of Plant Pathology* 104:347-357.
- Schnathorst, W.C.; Sibbett, G.S. 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* 9:780-782.
- Weller S.A.; Elphinstone J.G.; Smith N.C.; Boonham N.; Stead D.E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2853-2858.
- Winton L.M.; Stone, J.K.; Watrud L.S.; Hansen, EM. 2002. Simultaneous one-tube quantification of host and pathogen DNA with real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology* 92: 112-116.