

EFICACIA DE TRATAMIENTOS CON BIOTEN CONTRA LAS INFECCIONES DEL PATOTIPO DEFOLIANTE DE *VERTICILLIUM DAHLIAE*

Avances en el control biológico de la verticilosis del olivo

La utilización de plantones certificados libre de *V. dahliae* y tratados con agentes de biocontrol, y subsiguientes aplicaciones de dichos agentes en la proximidad del sistema radical de la planta, pueden reducir el desarrollo de infecciones severas por el patotipo D. En este artículo presentamos

resultados de experimentos realizados para contrastar dicha hipótesis mediante el tratamiento del sistema radical de plantones de olivo Picual con el formulado fúngico Bioten, en condiciones controladas y de campo óptimas para las infecciones por el patotipo D y el desarrollo de verticilosis.

Rafael M. Jiménez Díaz^{1,2},
José L. Trapero Casas², Javier Boned³,
Blanca B. Landa del Castillo² y
Juan A. Navas Cortés²

¹ Departamento de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba

² Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC; Alameda del Obispo. Córdoba.

³ Isagro España. Madrid.

La verticilosis del olivo causada por el hongo *V. dahliae* es sin lugar a dudas el problema sanitario más importante del olivar español en la actualidad. Esta enfermedad era desconocida en España hace treinta años y durante casi dos décadas desde que fuera primeramente diagnosticada se la había considerado como una enfermedad menor del cultivo. Sin embargo, en la actualidad la verticilosis está ampliamente distribuida en todas las zonas olivereras andaluzas (incluyendo las provincias de Cádiz, Córdoba, Granada, Huelva, Jaén y Sevilla) (Jiménez-Díaz *et al.*, 2008a; Rodríguez *et al.*, 2008; Sánchez-Hernández *et al.*, 1998; Jiménez Díaz, datos no publicados) afectando de forma particularmente severa a árboles jóvenes en nuevas plantaciones de regadío (figura 1a); y ha sido asimismo diagnosticada en plantaciones en

otras comunidades autónomas (Ej., Aragón, Castilla-La Mancha, Cataluña, Extremadura y Valencia) (Comunicación personal: J. Armengol; A. Azpilicueta; J. Tous; S. Triviño; R. M. Jiménez Díaz, datos no publicados)

El incremento en la extensión y severidad de los ataques de verticilosis del olivo en Andalucía ha coincidido con la expansión de la producción oleícola y las notables innovaciones tecnológicas auspiciadas por la 'Nueva olivicultura' (ejemplo: establecimiento de nuevas plantaciones intensivas o superintensivas, propagación viverista del material de plantación, extensión e intensificación del regadío, mínimo o no laboreo, etc.; Rallo, 1998a; b; Villalobos *et al.*, 2006), junto con la disemina-

ción de un patotipo defoliante (D) y letal del hongo que es el predominante en las poblaciones de *V. dahliae* que infectan olivo en Andalucía. El patotipo D es mucho más virulento que el no-defoliante (ND) (Mercado-Blanco *et al.*, 2001; 2002), de manera que puede causar síntomas de severidad moderada en variedades resistentes a este último y originar enfermedad severa en olivo Picual con una cantidad del hongo en el suelo (3 a 10 microesclerocios/g suelo seco) que, en el caso de ser del patotipo ND, no da lugar a enfermedad o si ésta se desarrolla lo hace con escasa incidencia y gravedad (López-Escudero y Blanco-López, 2007; López-Escudero *et al.*, 2004). El patotipo D fue diagnosticado originariamente en la zona de cultivo intensivo de algodón en las Marismas del Guadalquivir (Bejarano *et al.*, 1996), pero se ha extendido progresivamente hacia zonas olivereras en las provincias de Córdoba, Jaén y Sevilla, y ha sido diagnosticado en menor extensión en Granada y Huelva (figura 2) (Jiménez-Díaz *et al.*, 2008a).

La extensión y severidad de los ataques por el patotipo D ha creado honda y justificada preocupación al olivicultor y auspiciado expectativas de que la verticilosis puede ser controlada eficientemente mediante intervenciones simples e individuales. Por el contrario, el conocimiento derivado de la investigación científico-técnica sobre la etiología y epide-

El tratamiento del sistema radical de plantones de olivo Picual con el formulado fúngico Bioten antes de la inoculación con el patotipo defoliante de *V. dahliae* redujo la severidad de verticilosis en condiciones controladas y de campo

miológica de la enfermedad, indican convincentemente que su control ha de basarse en una estrategia de manejo integrado que incluya medidas de carácter preventivo aplicadas antes de la plantación y medidas posteriores a ésta que mitiguen la gravedad y repercusión de los ataques sobre el árbol (Jiménez Díaz *et al.*, 2003; Tjamos y Jiménez Díaz, 1998). Es más, la dispersión del patógeno en el agua de riego (Rodríguez Jurado y Bejarano Alcázar, 2007; Thanassolopoulos *et al.*, 1980) y el papel de las hojas infectadas caídas de olivos infectados por el patotipo D como fuente de inóculo secundario (Jiménez Díaz, 2008b; Navas-Cortés *et al.*, 2008;), cuestionan la eficiencia de un sistema de manejo basado solamente en las fuentes de inóculo primario (i.e., suelo infestado y plantón infectado) como única estrategia para el control de la verticilosis del olivo, y aconsejan la conveniencia de proteger el sistema radical de la planta contra infecciones secundarias durante el ciclo anual del cultivo.

Una característica de la patogénesis de la verticilosis del olivo, relevante para su manejo integrado, es la reducción progresiva de los síntomas en el árbol infectado en el curso de los años si la primera infección no origina enfermedad severa en aquél (lo cual se denomina recuperación sintomática de la planta enferma). Este fenómeno fue descrito por Wilhelm y Taylor (1965) en California, observado más tarde en Andalucía (Blanco López *et al.*, 1990) e Israel (Levin *et al.*, 2003), y confirmado experimentalmente mediante inoculaciones artificiales de plantones de olivo en condiciones controladas (López-Escudero y Blanco-López, 2005; Mercado Blanco *et al.*, 2001; Rodríguez Jurado, 1993). Hipotéticamente, dicha recuperación es consecuencia de la incapacidad de *V. dahliae* de crecer desde los tejidos enfermos para colonizar nuevo xilema, de manera que son necesarias nuevas infecciones a través del sistema radical de la planta antes afectada para que la enfermedad se desarrolle de nuevo. En consecuencia, re-

FIGURA 1.

Síntomas de verticilosis causados por el patotipo defoliante de *V. dahliae* en cultivares de olivo.



A) Olivo Arbequina de 1,5 años de edad plantado en un suelo con historia de verticilosis de algodón en Écija (Sevilla). Nótese la defoliación completa de las ramas del árbol. B) Plantones autoenraizados de Picual, de seis meses de edad, ocho semanas después de la inoculación por inmersión radical en una suspensión de conidias de *V. dahliae* defoliante (Vd) e incubación a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ en cámara de crecimiento.

ducir el potencial de enfermedad severa tras la primera infección y proteger contra subsiguientes infecciones al sistema radical del árbol recuperado de los síntomas, son opciones útiles para el control de la verticilosis del olivo.

Bioten WP es un formulado fitosanitario granulado de Isagro registrado en la Unión Europea y el Ministerio de Medio Ambiente, Rural y Marino (Nº de registro 25.234) para su utilización contra *V. dahliae* en olivo, compuesto por estirpes de los hongos no fitopatógenos *Trichoderma asperellum* (2%) (ICC012, Nº de registro 25.212) y *Trichoderma gamsii* (2%) (ICC080, Nº de registro 25.211), con una densidad de inóculo de cada estirpe de $4,8 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias (ufc)/g. Ambas estirpes han sido caracterizadas mole-

cularmente mediante la amplificación y secuenciación de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosómico y del gen *tef1* (factor de elongación), y subsiguiente análisis filogenéticos con diferentes especies de *Trichoderma*; dichas secuencias han sido depositadas en el GenBank (GQ351595, GQ351596, GQ351597, GQ351598).

Efectos del tratamiento en condiciones controladas

Desarrollo experimental

Se han realizado cuatro experimentos (I-IV) utilizando plantones certificados libre de *V. dahliae* de cuatro a seis meses de edad de la variedad Picual, autoenraizados de estaquillas semileñosas (Viveros Aulaga, Córdoba) (experimentos I y III) o micropropagados (Cotevisa, Alicante) (experimentos II y IV). En los experimentos I y II se empleó Bioten al 1% en una mezcla de limo:turba (2:1 v/v) pasteurizada, y los plantones se trataron primero distribuyendo 100 g de la mezcla infestada sobre el sistema radical desnudo de la planta. Los plantones tratados y testigos (i.e., sin Bioten) se transplantaron a la mezcla pasteurizada en macetas de arcilla esterilizadas (0,75 l) (1 plantón/maceta) y se incubaron durante catorce días en una cámara de crecimiento ajustada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 60-90% HR, y un fotoperiodo de 14 h/día de luz fluorescente de $360 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. La población de *T. asperellum* y *T. gamsii* establecida en la rizosfera de los plantones tras dicha incubación se determinó mediante dilución en serie del sonicado de 1 g de raíces en 10 ml de agua estéril incubada en un medio selectivo para *Trichoderma* spp. (Elad *et al.*, 1981; Nemeček *et al.* 1996) a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y 12 h/día de luz fluorescente y NUV de $180 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, y contenía una densidad de inóculo media de $3,2 \times 10^6$ ufc/g de raíz.

Para la inoculación con *V. dahliae* se utilizó el aislado monoconídico V138I del patotipo D, altamente virulento sobre algodón y olivo (Bejarano-Alcázar *et al.*, 1996; Mercado-Blanco *et al.*, 2002; 2003). El inóculo consistió en una suspensión de conidias en agua desionizada estéril obtenidas de cultivos del patógeno en caldo de patata dextrosa en agitación (130 rpm, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad, durante siete días). En los experimentos I y II, los plantones tratados y no tratados con Bioten se retiraron de las macetas y se inocularon por:

1. Inmersión de su sistema radical desnudo e intacto en una suspensión de 10^7 conidias de *V. dahliae*/ml durante 20 min y subsiguiente trasplante a macetas de arcilla de 0,75 l esterilizadas (1 plantón/maceta) conteniendo la mezcla de limo: turba esterilizada.

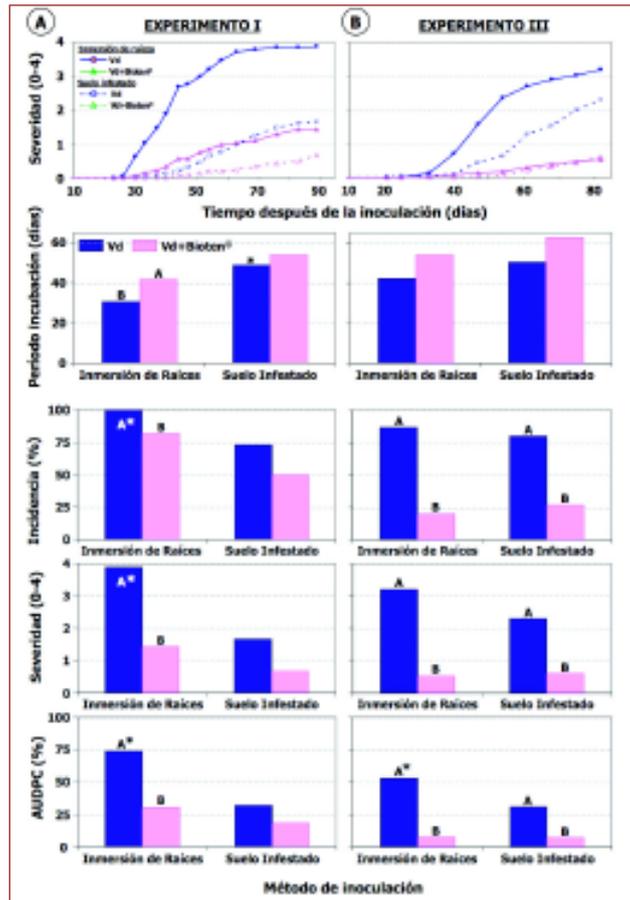
2. Trasplante a dichas macetas con la dicha mezcla estéril infestada con 2×10^6 conidias de *V. dahliae*/g de suelo.

Como controles sirvieron plantones tratados similarmente a los inoculados, excepto por la ausencia de inóculo de *V. dahliae*.

Para confirmar los resultados obtenidos, los experimentos I y II se repitieron con ligeras modificaciones (experimentos III y IV) a fin de explorar procedimientos que eventualmente podrían ser empleados para tratamientos en condiciones naturales. En el experimento III se utilizaron plantones autoenraizados similares a los utilizados en el experimento I, mientras que para el experimento IV se emplearon plantones micropropagados de cuatro meses de edad. En ambos casos, el tratamiento con Bioten se realizó durante el trasplante de los plantones desde el sustrato de enraizamiento a la mezcla de suelo pasteurizada en macetas, mediante riego del sistema radical en el cepellón del plantón con 100 ml de una suspensión del formulado al 5% (p/v) en agua desionizada estéril. Como testigo sirvieron plantones cuyo sistema radical fue similarmente tratado con agua estéril. Los plantones tratados y testigos se incubaron durante 14 días en las condiciones anteriormente descritas y la población rizosférica de *T. asperellum* y *T. gamsii* estimada por el procedimiento anterior alcanzó una densidad media de $1,6 \times 10^6$ ufc/g de raíz en los plantones micropropagados y $1,9 \times 10^6$ ufc/g de raíz en los autoenraizados. Los plantones tratados y no tratados con Bioten se inocularon con

FIGURA 2.

Efecto de Bioten sobre el desarrollo de verticilosis en plantones autoenraizados de Picual de seis meses de edad inoculados con *Verticillium dahliae* defoliante (Vd) e incubados a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ en cámara de crecimiento en los experimentos I (A) y III (B).



A) El sistema radical del plantón se trató con Bioten 1% en una mezcla de suelo pasteurizado (Bioten), o no se trató. B) El cepellón radical del plantón se trató con una suspensión de Bioten al 5% en agua desionizada estéril (Bioten), o sólo con ésta. En ambos experimentos, los plantones se inocularon por inmersión del sistema radical en una suspensión de conidias o por trasplante a suelo infestado con ella. Periodo de incubación = Tiempo transcurrido desde la inoculación hasta la aparición de los primeros síntomas; Incidencia = Proporción de plantas afectadas; Severidad = Proporción de tejido aéreo afectado estimada en una escala 0-4 (0 = sin síntomas, 4 = planta muerta). AUDPC = Área bajo la curva de progreso de la severidad de enfermedad estandarizada por el tiempo de desarrollo de ésta. Letras distintas en las barras de un histograma correspondiente a un método de inoculación indican diferencias significativas entre plantones tratados y no tratados, según el contraste de la mínima diferencia significativa protegida de Fisher (LSD) a $P \leq 0,05$. * = Diferencias significativas entre valores correspondientes a métodos de inoculación para un tratamiento indicados por las barras de un histograma según el contraste LSD a $P \leq 0,05$. (Véase el texto para más detalles).

V. dahliae mediante:

- Inmersión de su sistema radical intacto-previamente sacudido ligeramente hasta retener el cepellón de sustrato de enraizamiento-en una suspensión de 10^7 conidias de *V. dahliae* /ml durante 20 min y subsiguiente trasplante a la mezcla de suelo esterilizada.
- O bien mediante trasplante de los

plantones a la mezcla de suelo estéril infestada con 5×10^6 conidias de *V. dahliae*/g de suelo. Como controles sirvieron plantones tratados similarmente a los inoculados, excepto por la ausencia de inóculo de *V. dahliae*. Todos los plantones crecieron en macetas de arcilla de 0,75 l esterilizadas (1 plantón/maceta).

En los cuatro experimentos, los plantones se incubaron en cámaras de crecimiento a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 60-90% HR, y un fotoperiodo de 14 h/día de luz fluorescente de $360 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante dos meses, momento en que aquéllos se dieron por finalizados. Adicionalmente, la incubación de los plantones autoenraizados del experimento I se prolongó durante otras veinticinco semanas en el periodo de diciembre a principios de junio de 2006 en condiciones naturales bajo umbráculo, con lo que el periodo experimental se extendió aproximadamente hasta los ocho meses tras la inoculación con *V. dahliae*. En todos los experimentos, los plantones se regaron de forma regular, según necesidad, y se fertilizaron con la solución nutritiva de Hoagland.

Los experimentos tuvieron un diseño factorial de tratamientos con tres repeticiones completamente al azar, cada una de las cuales constó de cinco plantones (i.e., 15 plantones por combinación experimental, e igual número de plantones tratados y no tratados con Bioten pero no inoculados con *V. dahliae*. El desarrollo de verticilosis durante los experimentos se evaluó por:

(i) El periodo de incubación (i.e., tiempo transcurrido desde la inoculación hasta la aparición de los primeros síntomas).

(ii) La severidad de los síntomas en plantas individuales (estimada en una escala 0-4 según el porcentaje

de parte aérea afectada; 0 = sin síntomas, 1 = 1-33%, 2 = 34-66%, 3 = 67-100%, 4 = planta muerta) (Mercado-Blanco *et al.*, 2001; 2002) determinada a intervalos semanales.

(iii) La incidencia final de plantas enfermas (expresada en porcentaje).

(iv) El área bajo la curva de progreso de la enfermedad estandarizada por el tiempo de

desarrollo de ésta en días (ABCPE) calculada (Madden *et al.*, 2007).

En el experimento I se evaluó además el desarrollo de enfermedad durante la incubación adicional en umbráculo a intervalos de dos a cuatro semanas. Asimismo, tres meses después de la inoculación se determinó la influencia del tratamiento con Bioten y la infección por *V. dahliae* sobre el crecimiento de los plántones, estimada por la variación porcentual en la longitud total del tallo y brotes de cada planta desde el momento de la inoculación con el patógeno. Los datos se sometieron a análisis de varianza previa transformación de valores porcentuales a $\arcsen(Y/100)^{1/2}$, y las medias de tratamientos se compararon entre sí mediante el contraste de la mínima diferencia significativa protegida de Fisher (LSD) a $P \leq 0,05$. Finalizados los experimentos, se confirmó la infección de las plantas por *V. dahliae* mediante aislamientos del patógeno en agar patata dextrosa (PDA) de todos los plántones inoculados, así como de cuatro plántones de los testigos no tratados ni inoculados, o tratados sólo con Bioten, seleccionados alea-

toriamente. Asimismo, finalizados los experimentos I, III y IV se estimó la densidad de población de *T. asperellum* y *T. gamsii* que persistió en el sistema radical de tres plántones testigos o inoculados muestreados aleatoriamente.

Resultados

En todos los casos, los plántones de Pical tratados con Bioten 1% crecieron sin síntomas y de forma satisfactoria; y la inoculación con *V. dahliae* dio lugar al desarrollo de síntomas de verticilosis característicos de la infección por el patotipo D de *V. dahliae*, incluyendo clorosis de las hojas y defoliación del plánton (**figura 1b**). Por razones de brevedad y espacio, en lo que sigue se presentan los resultados de los experimentos I y III en los que se utilizaron plántones autoenraizados; los resultados con plántones micropropagados (experimentos II y IV) fueron similares.

En el experimento I, el método de inoculación con *V. dahliae* influyó significativamente sobre el desarrollo de enfermedad en los plántones autoenraizados no tratados y ello deter-

minó que los efectos del tratamiento del sistema radical del plánton con Bioten 1% variaran significativamente ($P < 0,05$) con el procedimiento utilizado para aquélla. La inoculación por inmersión radical determinó el desarrollo más temprano, extenso y severo de verticilosis (**figura 2a**). Comparativamente, la inoculación por trasplante originó valores de incidencia, severidad, y ABCPE significativamente ($P < 0,05$) inferiores, y un período de incubación significativamente ($P < 0,05$) superior, independientemente del tratamiento. El tratamiento con Bioten 1% no influyó sobre el período de incubación en los plántones inoculados por inmersión (31 y 42 días en los plántones testigo y tratados, respectivamente), pero redujo significativamente ($P < 0,05$) el desarrollo de verticilosis con una disminución del 18% en la incidencia de verticilosis, 43% en el ABCPE, y de 3,9 a 1,4 (en la escala 0 a 4) en la severidad media de los síntomas en los plántones tratados respecto de los no tratados (**figura 2a**).

El tratamiento con Bioten 1% también redujo el desarrollo de verticilosis en los plánto-

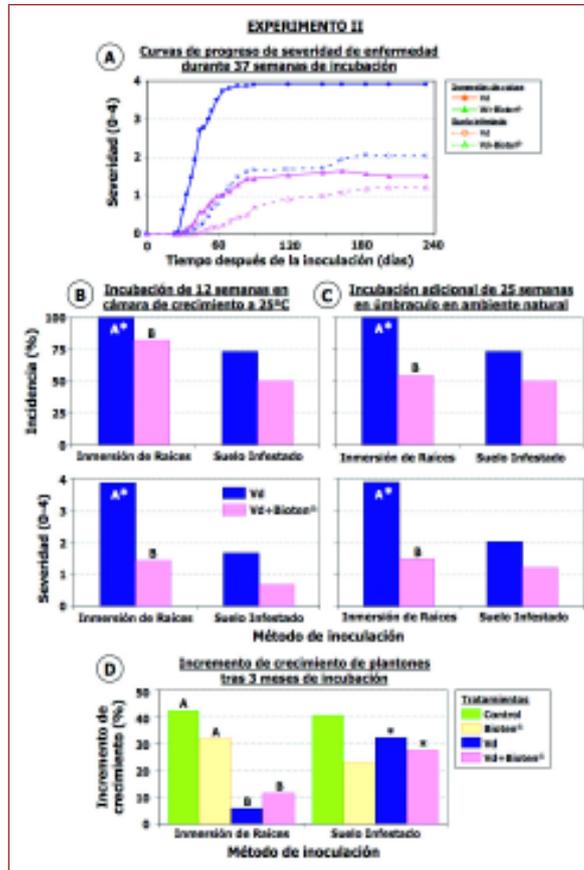
nes transplantados a suelo infestado, con un patrón similar al descrito para los plántones inoculados por inmersión de las raíces en el inóculo, pero tal reducción no fue estadísticamente significativa ($P \geq 0,05$). No obstante, dicho tratamiento incrementó de 49 a 54 días el periodo de incubación y redujo la incidencia de enfermedad de 73 a 50%, el ABCPE de 32 a 18% y la severidad media de síntomas de 1,7 a 0,7 (en la escala 0 a 4) (figura 2a).

El tratamiento con Bioten 1% no influyó significativamente sobre el crecimiento aéreo de los plántones que sirvieron como control en la inoculación por inmersión radical o trasplante, tras tres meses de incubación a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (figura 3d). Por el contrario, la infección por el *V. dahliae* redujo acentuadamente el crecimiento de los plántones inoculados por inmersión radical, pero dicha reducción no fue contrarrestada significativamente ($P \geq 0,05$) por el tratamiento con Bioten 1% (figura 3d). Comparativamente, el trasplante a suelo infestado con conidias de *V. dahliae* influyó menos sobre el desarrollo de los plántones que la inmersión de raíces en una suspensión de aquéllas, de manera que el crecimiento medio de estos últimos fue significativamente inferior ($P < 0,05$) al de los plántones inoculados por trasplante. Además, el crecimiento de los plántones inoculados mediante trasplante a suelo infestado fue comparable al de los controles no inoculados, pero el tratamiento con Bioten 1% no repercutió significativamente sobre el crecimiento de las plantas enfermas ($P \geq 0,05$) (figura 3d). Tales diferencias en los efectos del formulado podrían ser debidas a la menor cantidad de enfermedad que se desarrolló en la inoculación por trasplante comparada con la alcanzada por inmersión de raíces (figura 3b y 3c).

La incubación durante veinticinco semanas adicionales bajo umbráculo de los plántones inoculados por inmersión del sistema radical en una suspensión de conidias de *V. dahliae* D, no modificó la reducción de incidencia y severidad de verticilosis conferi-

FIGURA 3.

Duración del efecto de Bioten 1% sobre el desarrollo de verticilosis en plántones de Picual autoenraizados e inoculados con *V. dahliae* defoliante (Vd).



Los plántones se incubaron primero a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ en cámara de crecimiento durante 3 meses (experimento II; A, B), y 25 semanas adicionales en condiciones naturales bajo umbráculo (A, C). Incidencia = Proporción de plantas afectadas; Severidad = Proporción de tejido aéreo afectado estimada en una escala 0-4 (0 = sin síntomas, 4 = planta muerta). D) Variación porcentual en la longitud total del tallo y brotes de cada planta desde el momento de la inoculación con *V. dahliae* (Vd) de plántones de 6 meses de edad tratados con Bioten[®] 1% en una mezcla de suelo pasteurizado (Bioten[®]), o no tratados. Las plantas se inocularon por inmersión del sistema radical en una suspensión de conidias o por trasplante a suelo infestado con ella y se incubaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ en cámara de crecimiento. Control = Plántones no tratados ni inoculados. Letras distintas en las barras de un histograma correspondiente a un método de inoculación indican diferencias significativas entre plántones tratados y no tratados, según el contraste de la mínima diferencia significativa protegida de Fisher (LSD) a $P \leq 0,05$. * = Diferencias significativas entre valores correspondientes a métodos de inoculación para un tratamiento indicados por las barras de un histograma según el contraste LSD a $P \leq 0,05$. (Véase el texto para más detalles).

da por el tratamiento con Bioten 1% durante las ocho semanas en que habían sido incubadas previamente a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ en cámara de crecimiento (figura 3a). De hecho, en los plántones tratados se produjo una moderada reducción de la enfermedad ('recuperación'), cuya incidencia disminuyó de 82 a 55% con una severidad media de síntomas de 1,5 comparada con 3,9 en los plántones no tratados con

Bioten 1% (figura 3b y 3c). Similarmente, la incubación bajo umbráculo de los plántones que habían sido trasplantados a suelo infestado con *V. dahliae* no modificó la ausencia de efecto significativo ($P \geq 0,05$) de Bioten 1% sobre el desarrollo de la enfermedad que había sido observada tras ocho semanas de incubación en cámara de crecimiento (figura 3a). Sin embargo, tanto en los plántones control como en los tratados con Bioten 1% se produjo un ligero incremento de la severidad media de los síntomas de 0,4 y 0,5 puntos, respectivamente, respecto de los valores observados tras dicho periodo, aunque la diferencia de severidad entre dichos tratamientos a las veinticinco semanas no fue estadísticamente significativa ($P \geq 0,05$) (figura 3b y 3c).

Al final del experimento, el patógeno se aisló en cultivo puro del tallo del 100% de los plántones control afectados y del 30% de los tratados con Bioten 1% e inoculados por inmersión del sistema radical. Por el contrario, *V. dahliae* se aisló del 22% de los plántones no tratados e inoculados por trasplante a suelo infestado, pero de ninguno de los plántones similarmente inoculados y tratados con Bioten 1%. Asimismo, finalizado el experimento, 35 semanas después de la inoculación, la densidad de población rizosférica de *T. asperellum* y *T. gamsii* fue de $4,3 \times 10^4$ ufc/g de raíz en los plántones tratados no inoculados, y de $8,9 \times 10^4$ ufc/g de raíz en los plántones tratados e inoculados con *V. dahliae*. Dichas poblaciones fueron aproximadamente 1-2 órdenes de magnitud inferior a las establecidas inicialmente tras dos semanas de incubación después del tratamiento con Bioten 1% previo a la inoculación con *V. dahliae*.

La repetición del experimento I con la modificación del tratamiento del sistema radical de los plántones (i.e., mediante riego con una suspensión acuosa de Bioten 5% previo a la inoculación con *V. dahliae*) (experimento III) reprodujo los efectos sobre el desarrollo de enfermedad que se han descrito anteriormente, pero acentuó la reducción de verticilosis observada en el experimento I (figura 2b). Así, la incidencia y severidad de verticilosis en los plántones no tratados e inoculados por inmersión radical o trasplante a

suelo infestado fueron comparables a los del experimento anterior; pero el tratamiento con Bioten 5% en el experimento III redujo significativamente ($P < 0,05$) en 66% la incidencia de enfermedad y de 3,2 a 0,5 (en la escala 0 a 4) la severidad media de los síntomas en los plantones inoculados por inmersión radical en la suspensión de conidias de *V. dahliae*, y en 53% y de 2,3 a 0,6 los valores de éstos en los plantones transplantados a suelo infestado con éstas (figura 2a y 2b).

Al finalizar el experimento III, diez semanas después del tratamiento con Bioten 5%, la población de *T. asperellum* y *T. gamsii* en la rizosfera de los plantones tratados no inoculados alcanzó una densidad media de $2,5 \times 10^5$ ufc/g de raíz, que es aproximadamente un orden de magnitud inferior a la establecidas inicialmente tras dos semanas de incubación después del tratamiento con Bioten. En este caso no se estimó la densidad de población rizosférica en los plantones tratados e inoculados con *V. dahliae*.

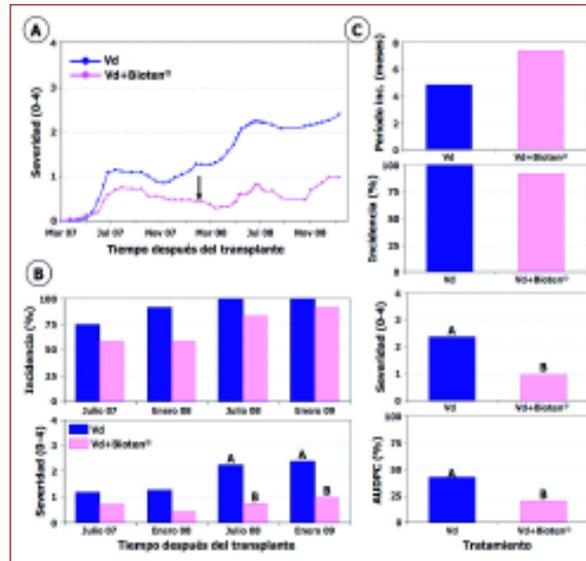
Efectos del tratamiento en condiciones de campo

Desarrollo experimental

El efecto de Bioten sobre el desarrollo de verticilosis en condiciones de campo se estudió durante el periodo 2007 a 2009 utilizando plantones de Picual autoenraizados (Viveros Aulaga, Córdoba) de nueve meses de edad, en microparcels (1,25 x 1,25 m², 0,5 m de profundidad) con suelo areno limoso (pH 8,5, 1,4% de materia orgánica) sin historia de verticilosis situadas en la Finca Alameda del Obispo del IFAPA, (Córdoba, 37,5°N, 4,8°W, altitud 110 m). El suelo de las microparcels humectado a la capacidad de retención se solarizó cubriéndolo con una lámina de polietileno transparente (50 µm de grosor) durante el periodo de 11 de julio a 30 de septiembre, 2006. El experimento se planteó para simular la eventual utilización del formulado Bioten en un esquema de producción viverista de plantones autoenraizados de olivo. Para ello, el cepellón de plantones Picual de

FIGURA 4.

Efecto del tratamiento con Bioten sobre el desarrollo de la verticilosis del olivo en condiciones de campo.



Plantones de Picual de seis meses de edad cuyo cepellón radical se trató con una suspensión de Bioten al 5% en agua desionizada estéril (Bioten), o sólo con ésta, se incubaron 3 meses a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, se transplantaron a microparcels solarizadas infestadas o no con *V. dahliae* defoliante (Vd), y se trataron o no con Bioten[®] al 2% en el momento del trasplante, y de nuevo con Bioten al 1% aproximadamente 1 año después de éste. A) Curvas de progreso de severidad de síntomas de Verticilosis (estimada por la proporción de tejido aéreo afectado en una escala 0-4; 0 = sin síntomas, 4 = planta muerta) en plantas control (Vd) y tratadas con Bioten (Vd+Bioten[®]). La flecha señala el segundo tratamiento con Bioten. Cada valor es media de 12 plantas. B) Incidencia (proporción de plantas afectadas) y severidad de Verticilosis en plantas control y tratadas con Bioten[®] a los 4, 10, 16, y 22 meses tras el trasplante e inoculación con *V. dahliae* en el mes de marzo de 2007. C) Período de incubación = tiempo transcurrido desde la inoculación hasta la aparición de los primeros síntomas; Incidencia = Proporción de plantas afectadas; Severidad = Proporción de tejido aéreo afectado estimada en una escala 0-4 (0 = sin síntomas, 4 = planta muerta). AUDPC = Área bajo la curva de progreso de la severidad de enfermedad estandarizada por el tiempo de desarrollo de ésta. Letras distintas en las barras de un histograma correspondiente a un método de inoculación indican diferencias significativas entre plantones tratados y no tratados, según el contraste de la mínima diferencia significativa protegida de Fisher (LSD) a $P \leq 0,05$. (Véase el texto para más detalles).

seis meses se trató con 100 ml de una suspensión de Bioten al 5% (p/v) en agua desionizada estéril como se ha descrito en el experimento III anterior, y los plantones tratados y testigos se incubaron durante tres meses en las mismas condiciones descritas para los experimentos anteriores. Después, los plantones se transplantaron en las microparcels (2 plantones/microparcels) el 6 de marzo de 2007 y la inoculación con *V. dahliae* D se realizó durante el trasplante. Como inóculo se empleó una mezcla de suelo solarizado y de AMA (arena: harina de maíz: agua (9:1:2, p/p) infestado con *V. dahliae* D (5%, v/v), que en el momento del trasplante contenía $1,4 \times 10^7$ propágulos del patógeno/g estimados por el método de tamizado húmedo. El potencial de dichos propágulos como inóculo

lo se había determinado previamente mediante bioensayos preliminares de patogenicidad en condiciones controladas utilizando plantones de olivo Picual autoenraizados de seis meses de edad y plántulas de sandía cv. Dulce Maravilla. Para la inoculación, se distribuyeron 2 kg de la mezcla infestada sobre el fondo del hoyo de plantación y otros 2 kg alrededor del cepellón del plantón depositado en aquél. Como controles no infestados sirvieron microparcels similares en las que se aportó mezcla de suelo solarizado y AMA no infestado. Seis meses después de la inoculación, la densidad de inóculo de *V. dahliae* en el suelo de dos microparcels no tratadas con Bioten se estimó en una media de 650 propágulos/g suelo seco mediante tamizado húmedo.

Coincidentemente con el trasplante y la inoculación con *V. dahliae* se realizó un tratamiento adicional con Bioten 2% en los plantones ya tratados e incubados en cámara de crecimiento. El formulado se hidrató durante 24 h a temperatura ambiente en agua desionizada (20 g/l) y sobre cada plantón se distribuyó 1 litro de la suspensión aportando un tercio de dicho volumen sobre el inóculo de *V. dahliae* depositado en el fondo del hoyo (o la mezcla que sirvió como testigo), otro tercio sobre el cepellón de trasplante cubierto parcialmente por dichos inóculo o mezcla, y el tercio restante sobre el suelo solarizado que cubrió de forma completa el plantón transplantado. Los plantones que sirvieron como testigo recibieron agua en igual volumen al de la suspensión de Bioten. La aplicación de

Bioten se repitió aproximadamente un año después de la plantación, mediante riego de los plantones tratados con 1 litro de suspensión del formulado hidratado al 1%, después de retirar la capa superficial de suelo en la microparcels. Tras la aplicación de Bioten, las microparcels se regaron con agua para facilitar la percolación del inóculo de *T. asperellum* y *T. gamsii* hacia las raíces de los plantones y se cubrieron con el suelo antes retirado. Las microparcels que sirvieron como testigos recibieron agua solamente. Las microparcels se fertilizaron con un complejo NPKS después del trasplante (15:15:15:15) y un año después con un complejo similar (NPKS 12:12:17:15), se regaron por goteo a satisfacción de demanda con agua de río (dos goteros de 4 l/h por plantón), y los

plantones se trataron con clorpirifos al 0,2% y abamectina 1,8 al 0,2%. Las plantas arvenses se retiraron de las microparcelsas manualmente.

El experimento tuvo un diseño en parcelas sub-subdivididas, siendo la infestación del suelo con *V. dahliae* el factor principal y el tratamiento con Bioten el factor subordinado, con seis repeticiones (microparcelsas) completamente al azar. El desarrollo de verticilosis en las microparcelsas se evaluó por la incidencia de plantas sintomáticas, la severidad de los síntomas en plantas individuales y el ABCPE, que se estimaron y analizaron estadísticamente según lo descrito para los experimentos en cámara de crecimiento. La infección de los plantones por *V. dahliae* se confirmó mediante aislamiento del patógeno de ramas afectadas y hojas caídas de plantas enfermas en PDA. Dichas hojas se mantuvieron sobre el suelo de las microparcelsas durante el curso del experimento. El experimento se finalizó a principio del mes de julio de 2009 por lo que tuvo una duración de veintiocho meses tras el trasplante.

Resultados

Los plantones no inoculados con *V. dahliae* crecieron sin síntomas y no se apreció efecto alguno del tratamiento con Bioten. Además, aislamientos microbiológicos de hojas y ramitas asintomáticas de plantones tratados, realizados ocasionalmente durante el experimento, resultaron consistentemente negativos tanto respecto de *V. dahliae* como de *Trichoderma* spp. En los plantones inoculados, los primeros síntomas de verticilosis se desarrollaron a principios del mes de junio de 2007, aproximadamente tres meses después del trasplante, tanto en plantones control (severidad media 1,1 en la escala 0-4) como en los tratados con Bioten (severidad media 0,6) (figura 4a), y correspondieron fielmente a las características del síndrome defoliante de *V. dahliae* (i.e., caída profusa de hojas cloróticas o asintomáticas). La enfermedad afectó al 75% de los plantones no tratados 4 meses después de la inoculación, al 92% de ellos a los 10 meses de aquélla, en enero de 2008, y a todos los plantones 6 meses más tarde, en julio de 2008 (figura 4b). Al final del experimento, veintiocho meses después del trasplante, cuatro de los doce olivos no tratados habían muerto como consecuencia de la infección por *V. dahliae* (figura 5a).

Comparativamente, la incidencia de

verticilosis en los plantones tratados con Bioten fue inferior en 17% y 33% a la de los controles no tratados a los cuatro y diez meses de la inoculación, respectivamente; si bien dicha incidencia aumentó hasta 83% seis meses más tarde, y a 92% a los veintidós meses de la inoculación, en enero de 2009 (figura 4b). No obstante, la incidencia de enfermedad en los plantones tratados se mantuvo siempre ligeramente inferior a la de los controles no tratados, y ninguno de los plantones tratados con Bioten murió como resultado de la infección por *V. dahliae*. El efecto más notable del tratamiento con Bioten fue la reducción de la severidad de síntomas de verticilosis en los plantones tratados comparada con los controles no tratados. Dicha reducción fue claramente discernible desde los cuatro meses del trasplante e inoculación y se acentuó desde entonces con el crecimiento de la planta (figura 5b). Así, la severidad media en los plantones no tratados aumentó de 1,1 a los cuatro meses de la inoculación a 2,2 y 2,4 a los dieciséis y veintidós meses de ésta, respectivamente; mientras que en

los plantones tratados con Bioten dicha severidad aumentó de 0,7 a 0,8 y 1,0 en los mismos periodos, pero fue significativamente ($P < 0,05$) inferior en 1,4 unidades a la severidad de síntomas en los plantones no tratados, a los dieciséis y veintidós meses de la inoculación (figura 4a y 4b). Esta reducción de la severidad de síntomas, junto con la menor incidencia de ellos antes referida, determinó una disminución significativa ($P < 0,05$) de la cantidad total de enfermedad en los plantones tratados reflejada por el ABCPE (figura 4c). La infección por *V. dahliae* redujo el crecimiento de los plantones, pero la reducción en el desarrollo de verticilosis conferida por los tratamientos con Bioten atenuó dicho efecto. En los plantones tratados, la enfermedad desarrollada dio lugar a una reducción del 29% del perímetro en la base del tronco y del 58% en el peso fresco de la planta. Sin embargo, dichos perímetro y peso fresco fueron, respectivamente, 1,5 y 1,3 veces superiores en los plantones tratados con respecto a los no tratados (datos no mostrados).

Discusión y conclusiones

Los resultados de este trabajo indican convincentemente que las estirpes ICC012 de *T. asperellum* e ICC080 de *T. gamsii* que componen el formulado Bioten tienen el potencial de reducir el desarrollo de verticilosis en plantones de olivo, en extensión adecuada para utilizar el producto en una estrategia de manejo integrado de la enfermedad basado en la capacidad del olivo de la planta adulta de recuperarse de síntomas moderadamente severos. Dicho potencial de biocontrol se ha demostrado de forma reproducible en experimentos repetidos en ambiente controlado con condiciones *ad hoc* para el desarrollo óptimo de verticilosis, que incluyó la var. Picual muy susceptible al patotipo D de *V. dahliae*, densidad de inóculo de éste que en investigaciones anteriores aseguraron el desarrollo de infección severa (Mercado-Blanco *et al.*, 2002; 2004) y temperatura de incubación favorable para el patógeno y la enfermedad.

El nivel de biocontrol de la enfermedad alcanzado en dicho escenario experimental varió con el procedimiento de inoculación; de manera que la reducción de verticilosis fue superior y más consistente cuando los plantones autoenraizados se

FIGURA 5.

Efecto del tratamiento con Bioten sobre el desarrollo de la verticilosis del olivo en condiciones de campo.



Plantones de Picual de seis meses de edad cuyo cepellón radical se trató con una suspensión de Bioten® al 5% en agua desionizada estéril (Bioten), o sólo con ésta, se incubaron 3 meses a 25±1 °C, se transplantaron a microparcelsas solarizadas infestadas o no con *Verticillium dahliae* defoliante (Vd), y se trataron o no con Bioten al 2% en el momento del trasplante, y de nuevo con Bioten® al 1% aproximadamente 1 año después de éste. A) Plantas control no tratadas con Bioten® severamente afectadas por Verticilosis (nótese el plantón muerto señalados por la flecha), 28 meses después de la inoculación con *V. dahliae*. B) Plantas tratadas con Bioten, 28 meses después de la inoculación con *V. dahliae* (nótese la menor severidad de síntomas y mayor desarrollo comparado con las plantas control).

inocularon por inmersión del sistema radical en una suspensión de conidias del patógeno, que dio lugar a una elevada incidencia y severidad de enfermedad en los plantones no tratados inoculados con *V. dahliae*. En este caso, el efecto más consistente del biocontrol fue la reducción de la severidad de síntomas de verticilosis, que fue siempre inferior en más de 30% a la del control no tratado con el formulado Bioten, aunque la incidencia de enfermedad también resultó reducida en proporción variable dependiendo de la combinación experimental. Comparativamente, la inoculación por trasplante a suelo infestado por el patógeno determinó mayor variabilidad experimental y menor desarrollo de enfermedad en los plantones no tratados con Bioten, que ha dificultado la valoración de los efectos del formulado como estadísticamente significativa. No obstante, el tratamiento con Bioten también redujo en cierta extensión la incidencia y severidad de síntomas de verticilosis en comparación con los controles no tratados. Los mecanismos que subyacen en la supresión de verticilosis en olivo por las estirpes de *T. asperellum* y *T. gamsii* no han sido objeto de esta investigación, ni son aun conocidos. Numerosas investigaciones sobre el control biológico de enfermedades de plantas indican que el biocontrol puede resultar de uno o varios mecanismos, incluyendo:

- La competición por nutrientes, nichos ecológicos o zonas de infección.
- La inhibición directa del patógeno mediante antibiosis o lisis.
- El parasitismo.
- La inducción de la expresión de mecanismos de defensa innatos en la planta (Cook y Baker, 1983).

En nuestros experimentos, que la supresión de enfermedad se produjera tanto en procesos de infección que promueven el acceso del inóculo directamente al xilema (i.e., inmersión radical), como en los que promueven la penetración de tejido radical intacto (i.e., trasplante a suelo infestado), sugiere que en dicha supresión puede intervenir más de un mecanismo.

La supresión de verticilosis por el tratamiento con Bioten en condiciones controladas fue reproducido en condiciones de campo que simulaban un proceso de plantación comercial. Dicha supresión también se caracterizó por la reducción global de la severidad de síntomas en los plantones tratados,

que determinó una disminución significativa del 60% en el ABCPE. En esta reducción subyace el incremento de la proporción de tejido sano respecto del sintomático con el crecimiento del plantón, sugiriendo que no tuvieron lugar nuevas infecciones por *V. dahliae* en el tejido radical formado de novo, a pesar del continuo aporte de nuevo inóculo del patógeno que se produjo en las microparcels por las hojas infectadas que cayeron de las plantas afectadas por la enfermedad. Indirectamente, la reducción global de la cantidad de enfermedad conferida por los tratamientos con Bioten también puede repercutir positivamente sobre la epidemiología de la verticilosis del olivo, en tanto que contribuye a reducir el aporte de hojas infectadas por *V. dahliae* D sobre el suelo. En este escenario, merece ser resaltado el elevado potencial de enfermedad determinado por la elevada densidad de inóculo en el suelo de las microparcels (650 propágulos/g suelo seco). Dicho potencial quedó reflejado por la pronta aparición de los primeros síntomas de verticilosis a los cuatro meses de la inoculación y el 100% de incidencia de enfermedad en los plantones no tratados doce meses después. Comparativamente, López-Escudero y Blanco-López (2007) tardaron ocho meses en observar los primeros síntomas de verticilosis en plantones Picual transplantados a suelo infestado con 10 microesclerocios/g suelo de *V. dahliae* D, y fueron necesarios veinticuatro meses para alcanzar una incidencia de enfermedad de 55%. Por el contrario, en plantones similares en nuestro experimento el mismo patotipo D había causado una incidencia de 91% de verticilosis en los controles no tratados con Bioten a los diez meses de la inoculación.

En nuestros experimentos, como ocurre generalmente en estudios de control biológico de enfermedades de plantas, el tratamiento con los agentes de biocontrol no impidió el desarrollo de verticilosis pero redujo de forma significativa la cantidad de enfermedad. Además, el nivel de supresión alcanzado con las estirpes de *Trichoderma* spp. de Bioten es comparable con el de investigaciones similares con el mismo o diferentes patosistemas y agentes de biocontrol (por ejemplo: Hervás *et al.*, 1998; Landa *et al.*, 2001; Mercado-Blanco *et al.*, 2004). Ello indica que los tratamientos de biocontrol deben ser concebidos y comprendidos como un componente más de una estrategia de manejo integrado de enfermedades de cultivos (Landa *et al.*, 2004), en este caso la verticilosis del olivo. En la verticilosis del olivo, dicha estrategia

debe ir dirigida a obviar escenarios de alto potencial inicial de enfermedad mediante acciones previas a la plantación, e incluye la elección de suelos que contengan la menor cantidad posible de inóculo virulento del patógeno, el empleo de las variedades de olivo menos susceptibles al patotipo D de *V. dahliae*, la utilización de plantones certificados libres del patógeno, y la protección de éstos contra infecciones subsiguientes a su plantación (Jiménez Díaz *et al.*, 2003; Tjamos y Jiménez-Díaz, 1998). Posiblemente, la utilización para nuestros experimentos de plantones Arbequina (menos susceptibles que Picual) habría potenciado el nivel de supresión de verticilosis derivado del tratamiento con Bioten (Jiménez Díaz *et al.*, no publicado). Finalmente, la utilización de Bioten en una estrategia de control integrado de la verticilosis del olivo aconseja que el tratamiento del sistema radical del plantón durante la producción viverista vaya acompañado por la subsiguiente aplicación periódica del producto durante los dos primeros años de plantación, a fin de asegurar el adecuado establecimiento del árbol y en previsión del acceso de nuevo inóculo del patógeno a través de agua o restos vegetales infestados (Jiménez-Díaz *et al.*, 1998; 2008b; Navas-Cortés *et al.*, 2008; Rodríguez Jurado y Bejarano Alcázar, 2007). En la actualidad, Bioten es el único producto biológico de uso fitosanitario autorizado en olivo para el control de la verticilosis. Aunque en el registro de productos fitosanitarios autorizados para el control de la enfermedad se incluyen los fungicidas Procloraz y Folpet (<http://www.mapa.es/es/agricultura/pags/fitos/registro>), el control de la verticilosis del olivo mediante tratamientos fungicidas permanece por ser demostrado experimentalmente a pesar de los numerosos esfuerzos de investigación y experimentación que parecen haber sido realizados. ●

Agradecimientos

Los autores (RMJD, JLTC, BBL, y JANC) son miembros del Grupo de investigación AGR 136 "Sanidad Vegetal" del PAIDI, Junta de Andalucía. Las investigaciones de los autores referidas en este artículo han sido financiadas por el proyecto "Verticilosis del olivo" subvencionado Isagro España, S.L., la Fundación Ramón Areces y ayudas de investigación del PAIDI, Junta de Andalucía.

Bibliografía

Existe una amplia bibliografía a disposición de nuestros lectores que pueden solicitar en el e-mail: redaccion@eu-media.es.