

Avances en la investigación sobre el control de la verticilosis del olivo

El control eficiente de la VO requiere la aplicación de una estrategia de gestión integrada

Rafael M. Jiménez Díaz^{1,2}, Pablo Castillo Castillo², Blanca B. Landa del Castillo², Miguel Montes Borrego², Concepción Olivares García¹, Juan Emilio Palomares Rius², José L. Trapero Casas² y Juan A. Navas Cortés².

¹ Departamento de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba (UCO), Campus Rabanales. Córdoba.

² Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), CSIC, Alameda del Obispo. Córdoba.

Durante los últimos años, el Grupo AGR136 Sanidad Vegetal del IAS-CSIC y la UCO ha centrado sus proyectos de investigación de financiación privada o pública en el desarrollo de conocimientos y tecnologías sobre medidas de lucha aplicables para la gestión integrada de la verticilosis del olivo. En este artículo presentamos sucintamente algunos de los objetivos perseguidos en dichos proyectos y los resultados más destacables alcanzados en el desarrollo de los mismos.



La verticilosis del olivo (VO) causada por el hongo de suelo *Verticillium dahliae* se ha convertido en uno de los problemas más importantes del sector oleícola andaluz (Jiménez-Díaz *et al.*, 2012). Esta enfermedad fue diagnosticada por primera vez en España en 1979, en olivares experimentales del actual Ifapa en Córdoba, si bien prospecciones aleatorias en olivares de las provincias de Córdoba, Jaén y Sevilla en 1980-1983 indicaron que ya se encontraba ampliamente establecida en el valle del Guadalquivir (Blanco-López *et al.*, 1984). Desde entonces, la distribución de la VO se ha extendido a todas las provincias andaluzas, asociada aparentemente con las innovaciones agronómicas que han tenido lugar en el manejo del cultivo para incrementar su productividad (ej., propagación viverista del material de plantación, extensión del regadío, etc.), alcanzando prevalencias de hasta el 70% de los olivares e incidencias de hasta 50% de olivos enfermos en las plantaciones afectadas (Jiménez-Díaz *et al.*, 2011; López-Escudero *et al.*, 2010; J.A. Navas-Cortés *et al.*, no publicado).

Los ataques de VO pueden ocasionar la muerte de olivos jóvenes o adultos, pero también importantes reducciones de rendimiento en árboles que sobreviven a la infección (**foto 1**); por ejemplo, infecciones moderadamente severas redujeron el 87 y 73% de la cosecha/árbol de olivos Picual de regadío en Israel el tercer y quinto año tras la plantación, respectivamente (Levin *et al.* 2003), y el 84 y 56% de la cosecha/árbol de olivos Arbequina de regadío en Córdoba el tercer y cuarto año tras la plantación, respectivamente (R.M. Jiménez Díaz y J.L. Trape-ro Casas, no publicado).

La VO es una enfermedad cuya patogénesis es compleja y determinada por varias e importantes características de *V. dahliae*, incluyendo:

(i) Su supervivencia en el suelo durante más de diez años, mediante microesclerocios.



Foto 1a. Síntomas de la verticilosis del olivo. Olivo Arbequina de 2,5 años completamente defoliado por la infección del patotipo defoliante de *Verticillium dahliae* (Écija, Noviembre de 2008).

Foto 1b. Ataque de verticilosis en un olivar de Picual.

- (ii) La capacidad de infectar centenares de plantas.
- (iii) Su crecimiento confinado en el xilema de la planta susceptible.
- (iv) La existencia de gran diversidad genética y patogénica en sus poblaciones, y en particular la prevalencia en Andalucía de un patotipo defoliante (D) altamente virulento y letal en olivos susceptibles que se ha extendido en todas las provincias olivareras andaluzas (**foto 1**) (Jiménez-Díaz *et al.*, 2011; J.A. Navas-Cortés *et al.*, no publicado)
- (v) Su fácil dispersión dentro y entre plantaciones por medio de:
 - (a) Material de plantación infectado.
 - (b) Suelo infestado.
 - (c) Restos infestados de plantas cultivadas o arvenses.
 - (d) Agua de riego.
 - (e) Uso de residuos de almazara infestados.

(f) Hojas caídas de olivos infectados por el patotipo D (García-Cabello *et al.*, 2012; Jiménez-Díaz *et al.*, 2012; Navas-Cortés *et al.*, 2008; Rodríguez Jurado y Bejarano Alcázar, 2007).

Todo ello determina que el control eficiente de la VO requiera la aplicación de una estrategia de gestión integrada (GI).

Durante los últimos años, el Grupo AGR136 “Sanidad Vegetal” del IAS-CSIC y la UCO ha centrado sus proyectos de investigación de financiación privada o pública en el desarrollo de conocimientos y tecnologías sobre medidas de lucha aplicables para la GI de la verticilosis del olivo. En este artículo presentamos sucintamente algunos de los objetivos perseguidos en dichos proyectos y los resultados más destacables alcanzados en el desarrollo de los mismos, que conciernen:

(i) La biología reproductiva de *V. dahliae*.

(ii) La biodiversidad de la microbiota rizosférica del olivo y su relación con el control biológico de la enfermedad.

(iii) Los impactos potenciales de cambios ambientales en el desarrollo de la VO.

(iv) La nematofauna rizosférica del olivo y su potencial interacción con *V. dahliae* en el desarrollo de la VO.

(v) El desarrollo de clones de acebuche resistente al patotipo D de uso como portainjertos para el control de la enfermedad en cultivares de olivo susceptibles pero de alto valor agronómico y comercial.

Novedades sobre la biología reproductiva de la verticilosis

Verticillium dahliae es un hongo mitospórico, i.e. del que no se conoce estado reproductivo sexual, cuyas poblaciones naturales en el suelo se conciben estables y de estructura estrictamente clonal; esto es, constituidas por grupos de individuos derivados de un antepasado común (linajes clonales) denominados grupos de compatibilidad vegetativa (VCG), en los cuales se ha podido producir variación genética mediante muta-

ciones. Sin embargo, investigaciones por diferentes laboratorios sobre las relaciones evolutivas entre los linajes clonales de *V. dahliae* han puesto de manifiesto discrepancias en éstas que se explican más fácilmente por la ocurrencia de eventos de recombinación genética entre los VCGs que por mutaciones (Collado-Romero *et al.*, 2006; Jiménez-Gasco *et al.*, 2014). Esta hipotética recombinación podría tener importantes repercusiones sobre la durabilidad (estabilidad) de cultivares de olivo resistentes desarrollados por la mejora genética,



Se han desarrollado mapas de riesgo para la VO en diversos escenarios de cambio climático para Andalucía en el período 2011-2100. Como consecuencia del incremento de temperatura y nivel de CO₂ ambiental, se estima un riesgo elevado de verticilosis en la mayoría de las áreas de cultivo de olivo en Andalucía para la combinación cv. Picual/patotipo D

que es un elemento clave para la GI de la verticilosis del olivo.

Para contrastar la hipótesis de que los linajes clonales que actualmente estructuran las poblaciones de *V. dahliae* se han producido por eventos de recombinación, hemos genotipado por secuenciación masiva (GBS) 141 aislados (cepas) de *V. dahliae*

procedentes de una diversidad de plantas cultivadas susceptibles en países olivareros de la cuenca mediterránea y EE.UU., en cuyo ADN se han identificado cerca de 27.000 variaciones que difieren en un solo nucleótido (SNPs), que están distribuidas a través del genoma del hongo y por lo tanto son adecuadas para el análisis de eventos de recombinación.

El análisis de estas variaciones ha permitido detectar más de 400 eventos de recombinación genética distribuidos ampliamente entre los linajes clonales de *V. dahliae* y en menor extensión entre aislados de un linaje dado, e identificar aislados recombinantes del hongo que muestran adaptación patogénica sobre pimiento en California y alcachofa en la Comunidad Valenciana. Dicha recombinación genética se ha podido derivar de reproducción sexual más que de un fenómeno parasexual, según lo sugiere la existencia en la muestra de los aislados de estudio de los dos tipos de compatibilidad sexual (MAT1-1, MAT1-2) que se han descrito en hongos ascomicetos (si bien en proporción desequilibrada hacia MAT1-2) y de homólogos de ocho de los 12 genes que regulan la meiosis en otros hongos de reproducción sexual conocida (Milgroom *et al.*, 2014).

No obstante la evidencia de recombinación y la inferencia del origen recombinante de algunos de los linajes clonales de *V. dahliae*, el análisis filogenético de los cerca de 27.000 SNPs agregó a los aislados de estudio en los mismos linajes clonales descritos anteriormente por análisis de compatibilidad vegetativa y marcadores de ADN neutrales (Collado-Romero *et al.*, 2006), confirmando que las poblaciones de *V. dahliae* actualmente existentes tienen una estructura marcadamente clonal. Además, los resultados del genotipado por GBS ha proporcionado un elevado número de marcadores SNPs específicos de cada linaje clonal (i.e., un nucleótido presente en todos los aislados de un mismo linaje y otro distinto en todos los demás linajes) que es-

(Continúa en pág. 7?)

publicidad

tán siendo útiles para desarrollar protocolos diagnósticos (ej., detección y cuantificación del patotipo D en el linaje 1/D) y de métodos para investigaciones sobre la ecología, diversidad y evolución en poblaciones naturales de *V. dahliae* (en curso).

La existencia de los genes relacionados con la compatibilidad sexual (MAT1-1 y MAT1-2) y la meiosis en *V. dahliae* es consistente con el potencial en sus poblaciones de reproducirse sexualmente y generar nuevos linajes clonales mediante recombinación, dando lugar a un incremento de la diversidad genética en aquéllas. A pesar del origen sexual de los linajes, es posible especular que la actual estructura clonal de las poblaciones de este patógeno es resultado de un proceso de selección en favor de los individuos mejor adaptados a los sistemas de cultivo más intensificados. Esto es, la reproducción sexual y recombinación que debió ocurrir en el algún momento del pasado dio lugar a un reducido número de genotipos de *V. dahliae* particularmente adaptados a determinadas especies huésped o sistemas de cultivo, cuya frecuencia aumentó asexualmente favorecido especialmente por la predominancia de poblaciones huésped (cultivos) extensas y genéticamente uniformes características de la agricultura moderna, dando lugar a poblaciones de estructura epidémica similares a las descritas en bacterias fitopatógenas, y hongos como *Sclerotinia sclerotiorum* o *Sclerotium cepivorum* que también se componen de clones originalmente derivados de recombinación sexual (Milgroom *et al.*, 2014).

La microbiota rizosférica y el control biológico de la verticilosis

Las plantas cultivadas han desarrollado una estrategia para estimular y promover el desarrollo de grupos específicos de microorganismos antagonistas autóctonos, que residen junto con los patógenos en el suelo y constituyen una primera línea de defensa contra estos últimos. Ello propicia la pro-

tección de los cultivos contra los ataques por dichos patógenos aunque las densidades de población de ellos en el suelo sean suficientemente elevadas para originar enfermedad severa en plantas susceptibles (Weller *et al.*, 2007). Este fenómeno de reducción del desarrollo de enfermedad en presencia de inóculo abundante y condiciones ambientales favorables se produce de forma natural en los denominados suelos supresivos en determinadas zonas del mundo. Por ello, tanto el sistema radical de las plantas como los suelos supresivos son un nicho de microorganismos que pueden constituir un importante reservorio de antagonistas con potencial de ser utilizados como agentes de control biológico (ACBs) contra patógenos de plantas, que en gran medida constituyen nichos insuficientemente explorados.

En nuestro grupo de investigación consideramos que la utilización de ACBs antagonistas de *V. dahliae* debe ser un componente básico de las medidas de GI de la verticilosis del olivo (Landa *et al.*, 2009); si bien las investigaciones sobre la diversidad y estructura de las poblaciones microbianas asociadas con olivo han sido escasas hasta la fecha. Nuestros trabajos, iniciados en 2008, constituyen el primer estudio centrado en determinar la estructura y diversidad de las comunidades microbianas presentes en el suelo rizosférico y raíces de olivos silvestres y cultivados en Andalucía, evaluar el nivel de supresividad natural de los suelos de olivar a la VO, y demostrar su potencial como una nueva fuente de ACBs antagonistas contra *V. dahliae*. Estas medidas tienen como fin proteger contra la infección por el patógeno tanto el material vegetal de plantación como el ya establecido en campo, mediante la aplicación o promoción de las poblaciones de ACBs autóctonos de la rizosfera de olivo.

Mediante las nuevas tecnologías moleculares disponibles, se han identificado y aislado ACBs efectivos contra *V. dahliae* a través de selección asistida, identificado

cepas con afinidad al cultivo del olivo, determinado los factores bióticos y abióticos que afectan la colonización de estos ACBs y caracterizado los genes que pueden estar involucrados en la competencia y supresión de este patógeno por parte de dichos ACBs (Aranda *et al.*, 2011a, 2001b). Adicionalmente, se han utilizado técnicas independientes del cultivo *in vitro* (EcoPlate, Apizym, T-RFLP y pirosecuenciación, etc.) para caracterizar la actividad y diversidad de las comunidades microbianas en más de un centenar de suelos de olivar de toda Andalucía, determinando los factores agronómicos, edáficos y climáticos asociados con las estructuras y actividad de las poblaciones microbianas (Landa *et al.*, 2014; Montes-Borrego *et al.*, 2013; 2014). Mediante ensayos de patogenicidad se ha caracterizado el nivel de supresividad natural de esos suelos de olivar a la VO, indicando que aproximadamente el 25% de los suelos muestreados presentan alta capacidad de suprimir el desarrollo de la enfermedad. La utilización de diferentes análisis multivariantes está permitiendo determinar los factores bióticos (diversidad funcional, grupos específicos de microorganismos, genotipos de olivo) y abióticos (edáficos y climáticos) que están altamente asociados con niveles altos de supresividad de esos suelos a la VO. De esta forma, el uso combinado de aproximaciones clásicas y de metagenómica está permitiendo desvelar qué poblaciones microbianas están específicamente asociadas con mayores niveles de supresividad a la VO, lo que va a permitir en el futuro seleccionar o potenciar sistemas de manejo del olivo y microorganismos antagonistas que incrementen o favorezcan la GI de la verticilosis y en definitiva la sanidad del cultivo.

Impacto del cambio climático

La temperatura y la concentración de dióxido de carbono (CO₂) son las variables ambientales asociadas al cambio climático que mayor impacto pueden ejercer sobre los pa-



tosistemas agrícolas. Por ello, se ha evaluado y modelizado el desarrollo de la verticilosis, y su interacción con el nivel de virulencia de los patotipos de *V. dahliae* y la susceptibilidad de cultivares de olivo para niveles actuales de temperatura y CO₂, así como sus predicciones por modelos de simulación de clima para los escenarios SRES A2 y B2 del IPCC (Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático) para Andalucía.

Los resultados indican un efecto diferencial de los componentes del patosistema olivo/*V. dahliae* sobre el desarrollo de la VO en los escenarios considerados. Así, a concentraciones de CO₂ actuales, la temperatura óptima para el desarrollo de la verticilosis se estimó en 20-24°C, siendo éste más rápido y severo en la combinación cultivar de olivo/patotipo de *V. dahliae* más favorable (i.e, Picual/D) seguida de Arbequi-

na/D, mientras que dicho desarrollo tuvo lugar con retraso y niveles de infección inferiores en la combinación Picual/patotipo no defoliante (ND, menos virulento que el patotipo D) (Calderón *et al.*, 2014). Por otro lado, para estos mismos niveles óptimos de temperatura, el incremento de la concentración de CO₂ determinó una ralentización del desarrollo, y reducción de la cantidad, de la enfermedad. Valores extremos de temperatura (28°C) y CO₂ (750 ppm) limitan el desarrollo de la VO. Es de destacar que la intensidad de colonización de olivo por el patotipo D de *V. dahliae* alcanzó los mayores niveles con condiciones de CO₂ actual a 20 y 24°C en Arbequina y Picual, respectivamente; mientras que en plantas Picual infectadas por el patotipo ND, la intensidad máxima de colonización vascular se alcanzó a 24°C y CO₂ elevado (750

ppm). Asimismo, el crecimiento y desarrollo de la planta se vio influido por la interacción de los factores en el estudio. Mientras que las plantas testigo (no infectadas) de Arbequina y Picual alcanzaron su mayor crecimiento a 24°C y concentración más elevada de CO₂ (750 ppm), cuando las plantas de ambos cultivares de olivo estuvieron infectadas por el patotipo D los valores más altos de biomasa y longitud del tallo se produjeron a 28°C y CO₂ actual, que son condiciones en las que el desarrollo de verticilosis fue más restringido. Finalmente, es de destacar que el crecimiento óptimo de las plantas Picual infectadas por el patotipo ND de *V. dahliae* se alcanzó a 24°C y valores intermedios de CO₂, de 550 ppm.

En base a estos resultados, se han desarrollado mapas de riesgo para la VO en diversos escenarios de cambio climático

publicidad

1/2 horizontal

para Andalucía en el período 2011-2100, para cada una de las combinaciones de cultivar de olivo x patotipo de *V. dahliae* antes referidas. Estos escenarios se han obtenido a partir de los elaborados por la Consejería de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente de la Junta de Andalucía disponibles en la Red de Información Ambiental de Andalucía (REDIAM), que representan la evolución prevista de temperatura para el período 2011-2100 y escenarios de emisiones A1, A2 y B2. Los modelos desarrollados se consideran para olivares de regadío, y asumen que la variación en el riesgo de VO es dependiente únicamente de variaciones ambientales en temperatura y CO₂ ambiental, y que existe inóculo virulento del patógeno en el suelo. Las estimaciones del modelo de riesgo de VO desarrollado para condiciones de clima actual se han contrastado con la información sobre la incidencia y distribución de verticilosis en olivar en Andalucía elaborada por la Red Andaluza de Información Fitosanitaria (RAIF).

Nuestros resultados indican que, en general, se estima un incremento en el riesgo de VO como consecuencia del incremento de temperatura y nivel de CO₂ ambiental, aunque el efecto neto de dicha estimación dependerá de la combinación cultivar de olivo x patotipo de *V. dahliae*. Así, se estima un riesgo elevado de verticilosis en la mayoría de las áreas de cultivo en Andalucía para la combinación cv. Picual/patotipo D, i.e., la más favorable para el desarrollo de VO, siendo el riesgo máximo para el escenario de alta emisión A2 en toda la comunidad autónoma. Dicho riesgo es moderado para este mismo cultivar infectado por el patotipo ND menos virulento, a excepción del escenario A2 y período 2071-2100, en el que se estima un incremento de riesgo debido a la mayor favorabilidad estimada para esta combinación en condiciones de CO₂ elevado. En la combinación cv. Arbequina/patotipo D se estima un riesgo moderado-bajo en condiciones de clima actual, con un incremento progresivo en el tiempo en particular pa-

ra escenarios de alta emisión A1 y A2 hasta el período 2041-2070, y una disminución del riesgo para final del período 2071-2100 ocasionado por el menor óptimo térmico estimado para esta combinación.

Interacción de la nematofauna rizosférica y *V. dahliae*

Los nematodos fitoparásitos constituyen un grupo de organismos extraordinariamente diverso y complejo que residen en el suelo y que están ampliamente distribuidos en todos los sistemas agrícolas. Prácticamente, cualquier cultivo agrícola, incluido el olivo, puede sufrir un perjuicio importante debido al parasitismo por alguno de estos nematodos. La magnitud de las pérdidas que ocasionan depende de la densidad de la población en suelo y/o raíces, de la susceptibilidad del cultivo, y de las condiciones ambientales (Castillo *et al.*, 2010). De hecho, el parasitismo por nematodos formadores de nódulos (*Meloidogyne* spp.) y por los lesionadores de raíz (*Pratylenchus* spp.) reducen el crecimiento y vigor del olivo en todos los países donde se han descrito infecciones por alguna especie de estos géneros especies (Castillo *et al.*, 2010).

Prospecciones fitonematológicas realizadas por nuestro grupo han demostrado la existencia de altas infestaciones por más de 100 especies distintas de nematodos fitoparásitos, algunas de ellas con elevadas densidades de población, en más de un centenar de campos de olivar de toda Andalucía. Entre las especies más importantes, muchas de las cuales están ampliamente distribuidas en la cuenca mediterránea, podemos citar: *Helicotylenchus* spp., *Heterodera mediterranea*, *Pratylenchus penetrans*, *P. vulnus*, y diversas especies de *Meloidogyne*, *Longidorus* y *Xiphinema*. Además, investigaciones recientes integrando el uso de metodologías clásicas y moleculares (Palomares-Rius *et al.*, 2012) evidencian un efecto significativo del genotipo de olivo sobre la comunidad de nematodos fitoparásitos. Asimismo se ha determinado que,

junto con el efecto del cultivar de olivo, también influyen sobre la abundancia y diversidad de nematodos fitoparásitos el manejo del olivar (convencional u orgánico) y el tipo de suelo; mientras que la estructura de las poblaciones de nematodos fitoparásitos en Andalucía es influida principalmente por el cultivar de olivo y la textura del suelo (Palomares-Rius *et al.*, 2015).

En diversos patosistemas agrícolas se ha demostrado que la coinfección de plantas por nematodos fitoparásitos y otros patógenos puede dar lugar a interacciones sinérgicas que acentúan el perjuicio en la planta. En olivo, el incremento en extensión y severidad de la verticilosis ha reforzado el interés por determinar los mecanismos de interacción entre *V. dahliae* y *Meloidogyne* spp. Investigaciones en nuestro grupo indican que en plantones de olivo coinfectados por el patotipo D de *V. dahliae* y *M. javanica* aceleran el desarrollo de la verticilosis comparado con olivos infectados únicamente por *V. dahliae* (P. Castillo y J.A. Navas-Cortés, no publicado). Además, más importante aún puede ser el efecto que la coinfección por ambos agentes pueda tener sobre la estabilidad de la resistencia de cultivares de olivo a la verticilosis, fenómeno que ha sido extensamente documentado en otros patosistemas agrícolas (Castillo *et al.*, 2010).

Portainjerto de clones de acebuche resistentes

La utilización de cultivares resistentes es un elemento clave para la GI de las infecciones de olivo por el patotipo D de *V. dahliae* predominante en Andalucía, al cual son muy susceptibles los cultivares de mejor adaptación pedoclimática e interés comercial (ej. Arbequina, Hojiblanca, Picual, etc.) y para el que la resistencia disponible en cultivares de menor interés es incompleta y comprometida por niveles moderados de densidad de inóculo e infecciones recurrentes (Trapero *et al.*, 2013). Por ello, la disponibilidad de portainjertos altamente resistentes al patotipo D propiciaría una alter-



Foto 2. Respuesta de los cultivares Arbequina y Picual injertados sobre los clones de acebuches Ac-13 y Ac-18, 6 semanas después del trasplante a suelo infestado con 2×10^7 propágulos de *Verticillium dahliae* defoliante/g suelo.

nativa de gran interés para la GI de la verticilosis y la utilización de cultivares de olivo susceptibles de interés comercial en áreas infestadas por el mismo. En investigaciones anteriores utilizando una amplia muestra de material obtenido de acebuchales en Andalucía, encontramos clones de acebuches tanto o más susceptibles a *V. dahliae* D que los cultivares de olivo susceptibles (ej., Picual) e identificamos dos clones de acebuches (denominados Ac-13, Ac-18) cuya resistencia es superior a la expresada por cultivares de olivo descritos como resistentes (Jiménez Díaz, 2008). Subsecuentemente, hemos confirmado y caracterizado la reacción resistente de ambos clones en bioensayos con condiciones que aseguran el desarrollo óptimo de la enfermedad, mediante inoculación por inmersión del sistema radical desnudo en una suspensión de 10^7 conidias de *V. dahliae*/ml de agua estéril o por trasplante a una mezcla de suelo pasteurizada e infestada con alta densidad de inóculo del patógeno ($4,9 \times 10^6$ - 6×10^7 propágulos de *V. dahliae*/g suelo), y subsiguientemente incubación a temperatura favorable (24°C). Dichas condiciones determinaron la muerte de las plantas de Picual entre 4 y 6 semanas después de la inoculación, pero los clones

Ac-13 y Ac-18 mostraron una reacción altamente resistente y asintomática. No obstante, dichos clones fueron infectados por *V. dahliae* en variable extensión, que fue evaluada mediante aislamiento del hongo a lo largo del tallo de la planta y la cuantificación de su ADN en el tejido caulinar asintomático utilizando un protocolo de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) con un límite de detección de 18 fg (i.e. 10^{-15} g) de ADN de *V. dahliae* (inferior al ADN contenido en una conidia del hongo) (Gramaje *et al.* 2013). La concentración de ADN de *V. dahliae* por 100 ng (i.e. 10^{-9} g) de ADN de tallo fue de 10,9 y 86,7 pg (i.e. 10^{-12} g) en plantas de Ac-13 y Ac-18, respectivamente, comparado con 42,9 pg y 16,6 ng en olivos Frantoio y Picual, respectivamente. Además, los aislamientos en cultivo puro confirmaron la presencia del hongo viable en la zona media del tallo de Ac-13 pero no así en el tallo de Ac-18, sugiriendo que la respuesta defensiva de este último determinó la muerte del patógeno en el tejido infectado.

Bioensayos de inoculación adicionales en las mismas condiciones óptimas para la infección por *V. dahliae* han demostrado que la respuesta asintomática de los clones

Ac-13 y Ac-18 se mantiene en inoculaciones con aislados de *V. dahliae* D de variada naturaleza y origen geográfico, y no es modificada por: (i) la infección conjunta de su sistema radical por el hongo micorrícico *Glomus intraradices*, que es ampliamente utilizado en la propagación viverista comercial por su efecto estimulador del crecimiento del plantón de olivo, o (ii) la coinfección de la planta por el nematodo nodulador *Meloidogyne javanica* que con frecuencia encontramos establecido en plantones procedentes de viveros comerciales (Castillo *et al.*, 2010).

Finalmente, plantones de Ac-13 y Ac-18 previamente inoculados o no con *V. dahliae* D se injertaron con yemas de olivo Arbequina o Picual y se inocularon con *V. dahliae* D en las condiciones óptimas para la infección antes referidas, que determinaron la muerte de plantas de Arbequina y Picual autoenraizadas. El injerto de patrones preinoculados dio lugar a crecimiento asintomático del tallo de olivo, y las plantas injertadas crecieron asintomáticamente tras la reinoculación (foto 2). Dicha respuesta asintomática se ha mantenido cuando las plantas se trasplantaron con el cepellón infestado a microparcels en condiciones naturales o a macetas de gran capacidad en umbráculo, donde las plantas continúan creciendo asintomáticas desde hace más de un año. ■

AGRADECIMIENTOS

Las investigaciones de los autores referidas en este artículo han sido financiadas por los proyectos AGL2008-00344 (Ministerio de Ciencia e Innovación), AGL2011-24935 y AGL2012-37521 (Ministerio de Economía y Competitividad), P08-AGR 3528, P10-AGR-5908, P10-AGR 6082, y P12-AGR 1486 (Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía), cofinanciados por fondos FEDER; y en parte por la Organización Interprofesional del Aceite de Oliva Español-CITOLIVA'.

BIBLIOGRAFÍA

Existe una amplia bibliografía a disposición de nuestros lectores que pueden solicitar a través del e-mail: redaccion@eumedia.es