

Verticilosis del olivo: realidad y perspectivas. Técnicas de diagnóstico de la verticilosis del olivo

Jesús Mercado Blanco

Instituto de Agricultura Sostenible (IAS)

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

La verticilosis del olivo causada por el hongo fitopatógeno del suelo *Verticillium dahliae* es una enfermedad en expansión en aquellos países donde el cultivo del olivo tiene relevancia. En España, la verticilosis del olivo afecta severamente tanto a plantaciones de olivos adultos como de reciente establecimiento.

Los aislados de *Verticillium dahliae* que infectan olivo pueden ser clasificados como patotipo defoliante (D) o no defoliante (ND) según su capacidad para defoliar o no la planta, respectivamente. La infección por aislados ND provoca una sintomatología menos severa en cultivares de olivo considerados como susceptibles (por ejemplo, arbequina o picual), que pueden eventualmente recuperarse de la enfermedad. Sin embargo, las infecciones por aislados D pueden resultar letales en este tipo de cultivares. Según indican trabajos recientes, el patotipo D se ha extendido de forma progresiva desde una restringida zona del sur de España, donde fue detectado por primera vez, a regiones olivareras situadas a considerable distancia, causando epidemias severas en plantaciones jóvenes.

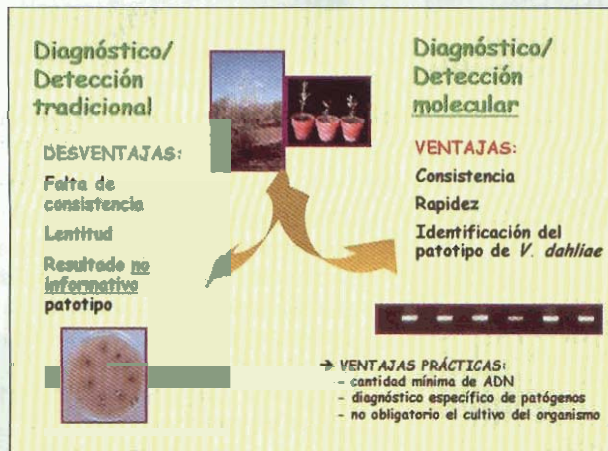
El empleo de procedimientos moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el uso de iniciadores específicos, ha supuesto un incuestionable avance en el campo de la detección in planta de organismos fitopatógenos. En el caso de la interacción *verticilliumdahliae*-olivo se han llevado a cabo desde hace algunos años investigaciones cuyo objetivo principal ha sido poner a punto una metodología de detección

precoz, consistente y específica mediante la utilización de marcadores moleculares distintivos de los patotipos de *Verticillium dahliae*, métodos adecuados de extracción de ADN y puesta a punto de protocolos basados en la PCR. Se ha perseguido desarrollar una serie de herramientas que permitan superar algunos de los inconvenientes inherentes a los métodos de detección tradicionales, es decir, el aislamiento e identificación del agente causal en medios de cultivo microbiológico apropiados. Dichos inconvenientes son la inconsistencia, el tiempo empleado en efectuar el ensayo y la ausencia de información

sobre el patotipo presente en una muestra vegetal infectada. La disponibilidad de este tipo de herramientas de detección molecular supone un considerable avance y ha de ser tenida en cuenta como una de las medidas de lucha clave (detección preventiva) en un contexto de control integrado de la enfermedad que, además, pueden (y deben) ser empleadas en programas de certificación de material de propagación.

Esta ponencia pretende ofrecer un breve repaso a los procedimientos existentes para la detección molecular de los patotipos D y ND de *Verticillium dahliae*. Diversos trabajos han permitido disponer de una metodología que posibilita la detección temprana (plantas aún asintomáticas), diferencial (patotipos D y ND) y/o simultánea (presencia de ambos patotipos) de infecciones causadas por *Verticillium dahliae* tanto en plántones de olivo de vivero como en árboles procedentes de plantaciones comerciales, bien provengan de inoculaciones artificiales y controladas como de infecciones naturales, y utilizando diversos tejidos de la planta.

Está basada en: a) la extracción de ADN de tejidos de olivo con la calidad necesaria para su utilización en las reacciones de PCR; b) el desarrollo de una batería de iniciadores diferenciadores de los patotipos D y ND de *Verticillium dahliae*; y c) la puesta a punto de protocolos de PCR simple, PCR anidada ("nested"-PCR) o dúplex-"nested"-PCR, los cuales permiten la detección del ADN del patógeno en muestras de ADN de diversos tejidos (raíz, tallo, hojas) de



olivo infectado, aunque su abundancia en aquéllas sea mínima.

La introducción de sucesivas mejoras ha permitido reducir el tiempo y coste para ofrecer un diagnóstico molecular de la enfermedad efectivo. Además, ha posibilitado constatar que ambos patotipos pueden colonizar de forma simultánea una planta de olivo y que este fenómeno, que puede tener importantes consecuencias epidemiológicas, se da en condiciones naturales. Asimismo, se ha verificado que el patotipo D, el más amenazador para el cultivo del olivar, se extiende de forma preocupante hacia nuevas zonas de cultivo. Estos protocolos permiten deter-

minar cualitativamente la presencia de *Verticillium dahliae* y sus patotipos.

Por otra parte, el desarrollo de la tecnología de PCR cuantitativa en tiempo real ("real time quantitative PCR") ha supuesto un notable avance en el campo de la cuantificación de ácidos nucleicos y tiene un enorme potencial para la detección cuantitativa 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 los productos de la PCR durante la fase exponencial del proceso, antes de que alguno

de sus componentes resulte limitante. Por otra parte, ofrece la ventaja de poder monitorizar el progreso de la infección por parte del patógeno.

Efectivamente, hemos podido utilizarla para efectuar el seguimiento del progreso de la infección de los patotipos D y ND en diversos genotipos de olivo. La utilización de la PCR cuantitativa en tiempo real, 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 *Verticillium dahliae*.

Efecto de las cubiertas vegetales sobre la epidemiología y control de la verticilosis del olivo

José Bejarano Alcázar

Área de Protección de Cultivos

IFAPA Centro "Alameda del Obispo" de Córdoba

La verticilosis del olivo fue diagnosticada por primera vez en Italia en 1946 y, desde entonces, ha sido descrita en la mayoría de los países productores de cierta relevancia en el sector oleícola, en muchos de los cuales, incluida España, está considerada la enfermedad más grave del cultivo por su amplia distribución geográfica, la magnitud de los daños que ocasiona y las dificultades que presenta su control.

La verticilosis del olivo es inducida por el hongo hifomiceto *Verticillium dahliae*, uno de los patógenos de suelo más importantes en el mundo en la actualidad. La densidad de inóculo y la virulencia de los aislados que componen las poblaciones de *Verticillium dahliae* presentes en el suelo, constituyen los principales factores dependientes del patógeno que influyen en la incidencia y gravedad de las epidemias de verticilosis que se van a desarrollar en un cultivar de olivo determinado.

El ciclo de infección se inicia generalmente a partir del inóculo de *Verticillium*



Restos de poda picados y empleados como cubiertas inertes en plantaciones de olivar.

dahliae existente en el suelo. Aunque este hongo produce diversos tipos de propágulos, se considera que los esclerocios, compuestos por agregados de células que varían en tamaño, espesor de la pared celular y grado de pigmentación, son las

principales estructuras responsables de su supervivencia en el suelo a largo plazo y, por lo tanto, con una mayor significación epidemiológica. Los esclerocios se encuentran concentrados principalmente en la capa arable del suelo y son capaces