

Uso de Bioten para la protección biológica de plantones de olivo contra la Verticilosis causada por el patotipo defoliante de *Verticillium dahliae*

R. M. JIMÉNEZ DÍAZ, J. L. TRAPERO CASAS, J. BONED, B. B. LANDA, J. A. NAVAS CORTÉS

La protección del sistema radical de plantones de olivo certificados libres de *Verticillium dahliae* de la infección severa por inóculo del patógeno residente en el suelo puede reducir el potencial de Verticilosis en árboles jóvenes y facilitar la expresión en ellos del fenómeno de recuperación sintomatológica. En este trabajo se ha contrastado esta hipótesis con el formulado de biocontrol Bioten®, compuesto por estirpes de los hongos *Trichoderma asperellum* y *T. gamsii*, utilizando plantones de olivo 'Picual' micropropagados o autoenraizados e inoculados con *V. dahliae* defoliante por inmersión radical o trasplante a suelo infestado en experimentos repetidos en condiciones controladas y en microparcelas en condiciones naturales. El tratamiento del sistema radical de la planta con Bioten® al 1% redujo en más de 30% y de forma consistente la severidad de síntomas en plantones inoculados por inmersión radical, y en proporción variable, de 18 a 60%, la incidencia de la enfermedad en ellos. El trasplante a suelo infestado también redujo la incidencia y severidad de síntomas en cierta extensión, pero la mayor variabilidad y menor desarrollo de enfermedad en los plantones no tratados con Bioten® ha dificultado la significación estadística de los efectos de éste. La supresión de Verticilosis por Bioten® en condiciones controladas fue reproducida en condiciones de campo bajo un elevado potencial de enfermedad, indicado por la aparición de los primeros síntomas de Verticilosis a los 4 meses de la inoculación y por el 100% de incidencia de enfermedad en los plantones no tratados a los 16 meses de aquélla. Dicha supresión también se caracterizó por la reducción global de la severidad de síntomas en los plantones tratados con el formulado, que determinó una disminución significativa del 60% en la cantidad total de enfermedad desarrollada en los controles no tratados.

R. M. JIMÉNEZ DÍAZ. Departamento de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba; Edificio C4 Celestino Mutis, Campus Rabanales, Apdo. 14071 Córdoba (ag1jjdir@uco.es).

J. L. TRAPERO CASAS, B. B. LANDA DEL CASTILLO, J. A. NAVAS CORTÉS. Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC; Alameda del Obispo, s/n, Apartado 4084, 14080 Córdoba.

J. BONED, ISAGRO ESPAÑA, S. L. Maldonado, 63, E-C, 2º I, 28006 Madrid.

Palabras clave: Control biológico, control integrado, *Olea europaea*, producción viverista.

INTRODUCCIÓN

Los ataques de Verticilosis causada por el hongo *Verticillium dahliae* constituyen sin duda uno de los problemas sanitarios más importantes del olivar español en la actualidad. Esta enfermedad fue diagnosticada por

vez primera en España en 1979 (CABALLERO *et al.*, 1980), en olivares experimentales del actual IFAPA en Córdoba, y pocos años más tarde se constató su amplia distribución y elevada incidencia y severidad de los ataques en las provincias de Córdoba, Jaén y Sevilla (BLANCO-LÓPEZ *et al.*, 1984). Sin embargo,

dicha información no originó entonces, -ni aparentemente en fechas inmediatas posteriores- mayor preocupación en el sector oleícola. Desde entonces, la Verticilosis se ha extendido a nuevas zonas olivareras en Andalucía (incluyendo las provincias de Cádiz, Huelva y Granada) (SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 1998, JIMÉNEZ-DÍAZ *et al.*, 2008a; RODRÍGUEZ *et al.*, 2008; JIMÉNEZ DÍAZ, datos no publicados), afectando en particular y severamente a árboles jóvenes en nuevas plantaciones de regadío; y ha sido diagnosticada en olivares en otras Comunidades Autónomas (Ej., Aragón, Castilla-La Mancha, Cataluña, Extremadura y Valencia) (J. ARMENGOL; A AZPILICUETA; J. TOUS; S. TRIVIÑO, comunicación personal; R. M. JIMÉNEZ DÍAZ, datos no publicados).

En Andalucía, tal incremento en la extensión de la Verticilosis del olivo ha coincidido

con la expansión en ella de este cultivo -que ocupa ahora *ca* 80% de las aproximadamente 2,5 millones ha de olivar existentes en España (MAPA, 2006)- así como con las notables innovaciones tecnológicas en la producción oleícola que caracterizan a la 'Nueva olivicultura'; i.e., el establecimiento de nuevas plantaciones intensivas o superintensivas, la propagación viverista del material de plantación, regadío, mínimo o no laboreo, fertilización, mecanización de la cosecha, etc. (RALLO, 1998a; b; VILLALOBOS *et al.*, 2006). Junto con dichos cambios en el cultivo se ha producido además un cambio significativo en las poblaciones de *V. dahliae* que infectan olivo en Andalucía, en las que ahora predomina el patotipo defoliante (D) que se caracteriza por ser mucho más virulento que el patotipo no-defoliante (ND) pre-

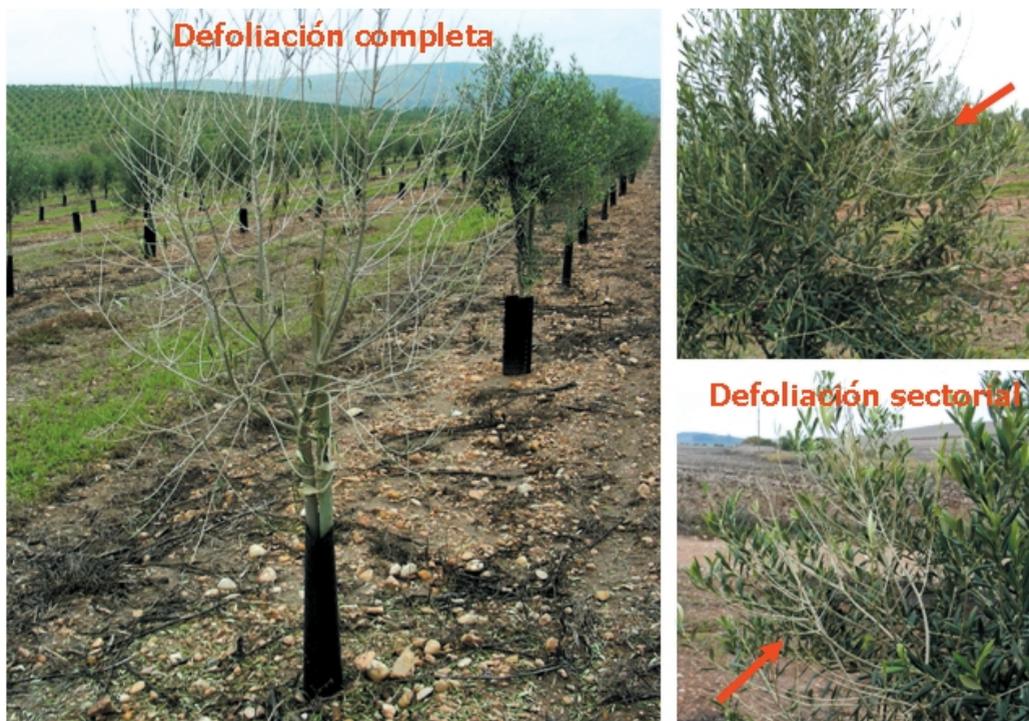


Figura 1. Síntomas de Verticilosis causados por el patotipo defoliante de *Verticillium dahliae* en olivo 'Arbequina' de 1,5 años de edad plantado en un suelo con historia de Verticilosis de algodón en Écija (Sevilla). Nótese la defoliación completa o sectorial de las ramas del árbol.

valente hasta ahora (MERCADO-BLANCO *et al.*, 2001; 2002; LÓPEZ-ESCUADERO y BLANCO-LÓPEZ, 2007), al cual son moderada o altamente susceptible los cultivares de mayor interés oleícola (LÓPEZ-ESCUADERO y BLANCO-LÓPEZ; 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 olivareras y actualmente es el patotipo de *V. dahliae* predominante en las provincias de Córdoba, Jaén y Sevilla, y ha sido diagnosticado en menor extensión en Huelva y Granada (JIMÉNEZ-DÍAZ *et al.*, 2008a).

La extensión y severidad de los ataques por el patotipo D, que con frecuencia determinan la muerte del árbol (Fig. 1), ha creado honda preocupación al olivicultor y auspiciado expectativas de que la enfermedad puede ser controlada eficientemente mediante intervenciones simples de naturaleza química sobre el olivo afectado (i.e., la “curación” del árbol enfermo), que está generando una profusión de recomendaciones y tratamientos con una variedad de productos, registrados o no, cuya eficacia no ha sido demostrada experimentalmente ni publicada en ámbitos científicos o técnicos. Por el contrario, el conocimiento que se viene produciendo durante los últimos años a través de la investigación científica y técnica sobre la naturaleza etiológica y epidemiológica de la enfermedad, indican convincentemente que la Verticilosis del olivo es una enfermedad de naturaleza compleja y su control ha de basarse fundamentalmente en la aplicación de medidas de lucha previas a la plantación en una estrategia de manejo integrado (TJAMOS, 1993; TJAMOS y JIMÉNEZ-DÍAZ, 1998; JIMÉNEZ DÍAZ *et al.*, 2003).

La oportunidad de una estrategia de control integrado de la Verticilosis del olivo es determinada por la patogénesis de la enfermedad. Entre las características generales de ésta que dificultan su control merecen ser destacadas: (i) la capacidad de *V. dahliae* de sobrevivir en el suelo durante más de una década mediante microesclerocios formados

en tejidos enfermos que se incorporan al suelo tras la degradación de éstos; (ii) el que dicho agente sea capaz de infectar varios centenares de plantas de hoja ancha, herbáceas y leñosas, cultivadas o arvenses; y (iii) el hábito infeccioso de *V. dahliae* de crecer confinado en el xilema de su huésped durante la fase parasítica de su ciclo vital; que impide poder acceder a él mediante fungicidas aplicados tópicamente. A estas características se suman además algunas peculiares de la Verticilosis en Andalucía, como son; (iv) la prevalencia del patotipo D, cuyas infecciones originan la caída extensa de hojas verdes infectadas (que no se produce en olivos infectados por el patotipo ND) y eventualmente la muerte de la planta infectada (JIMÉNEZ-DÍAZ *et al.*, 1998; NAVAS-CORTÉS *et al.*, 2008); y (v) la versatilidad de medios mediante los que se puede dispersar el patógeno en general, y el patotipo D en particular, que incluyen al menos: (1) el desplazamiento de suelo infestado mediante aperos, maquinaria, vehículos, agua de riego a pie, etc.; (2) la diseminación de material vegetal (Ej., restos de plantas enfermas, hojas de algodón y olivo) y transporte de cosechas de cultivos (particularmente algodón) infectados por el patógeno; (3) la utilización de plantones de olivo infectados por *V. dahliae*; y (4) el uso de agua de riego infestada por éste (THANASSOULOPOULOS, 1993; JIMÉNEZ-DÍAZ *et al.*, 1998; MERCADO-BLANCO *et al.*, 2003; RODRÍGUEZ JURADO y BEJARANO ALCÁZAR, 2007; JIMÉNEZ-DÍAZ *et al.*, 2008b; NAVAS-CORTÉS *et al.*, 2008). Dichos medios de dispersión han podido contribuir a la extensa distribución del patotipo D en Andalucía en la actualidad.

Uno de los aspectos más intrigantes de la Verticilosis del olivo, que es de relevancia para su manejo integrado, es la disminución progresiva de la cantidad de enfermedad que tiene lugar en el transcurso de los años después de la infección inicial por el patógeno, como consecuencia de la recuperación de la planta de los síntomas de aquélla si la primera infección no origina enfermedad severa (denominada recuperación sintomática de

la planta enferma). Este fenómeno de reducción natural de Verticilosis en olivares afectados 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 (RODRÍGUEZ JURADO, 1993; MERCADO-BLANCO *et al.*, 2001; LÓPEZ-ESCUADERO y BLANCO-LÓPEZ, 2005). La interpretación fitopatológica de dicho fenómeno es que, en condiciones de infecciones de severidad moderada, la recuperación sintomatológica de los olivos está asociada con la inactivación de *V. dahliae* en sus tejidos 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, reducir el potencial de enfermedad severa en la primera infección, y proteger el sistema radical del árbol recuperado de los síntomas contra subsiguientes infecciones son opciones para el control de la Verticilosis del olivo. A ello puede contribuir la utilización de plantones certificados libres de *V. dahliae* y tratados con agentes de biocontrol, y evitar el uso de suelos infestados por el patógeno, particularmente el patotipo D.

En este artículo se presentan resultados de experimentos realizados en condiciones controladas óptimas para el desarrollo de infecciones del patotipo D en plantones de 'Picual', así como en condiciones de campo, para determinar si el tratamiento del sistema radical de plantones de olivo con el formulado Bioten[®] es eficiente en reducir el desarrollo de Verticilosis causada por el patotipo D de *V. dahliae*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Para los experimentos se han utilizado plantones de olivo 'Picual' certificados libres de *V. dahliae* de diversa procedencia y naturaleza; incluyendo plantones de 3, 4 y 6 meses de edad, micropropagados de yemas

axilares en condiciones axénicas por Cotevinsa (Alicante); y plantones propagados por autoenraizado de estaquillas semileñosas en cama caliente, bajo nebulización, por Viveiros Aulaga (Córdoba). El cv. Picual es el más extensamente cultivado en España y es muy susceptible al patotipo D de *V. dahliae* (LÓPEZ-ESCUADERO *et al.* 2004; RODRÍGUEZ JURADO 1993). Con la elección de dicho material se ha pretendido asegurar la disponibilidad de plantones de calidad representativos de las varias formas de propagación utilizadas por viveros comerciales en España.

El formulado Bioten[®]

Bioten[®] WP es un formulado fitosanitario granulado de Isagro S. L registrado en la Unión Europea (UE) y en el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (Nº de registro 25.234) para su utilización contra *V. dahliae* en olivo, compuesto por estirpes de los hongos *Trichoderma asperellum* (2%) (ICC012, Nº de registro 25.212) y *T. gamsii* (2%) (ICC080, Nº de registro 25.211). Ambas estirpes son cultivables y morfológicamente diferenciadas en cultivo en medios microbiológicos comunes, y han sido caracterizadas molecularmente mediante la amplificación y secuenciación de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosómico y del gen *tefl* (factor de elongación), y subsiguiente análisis filogenéticos "Neighbor-Joining" y de "Máxima Parsimonia" de las secuencias amplificadas junto con las 250 secuencias más similares que están depositadas y accesibles en el Genbank. Las secuencias amplificadas han sido depositadas en el GenBank (GQ351595, GQ351596, GQ351597, GQ351598).

Efectos del tratamiento con Bioten[®] sobre el desarrollo de Verticilosis en condiciones controladas

Tratamiento con el formulado Bioten[®]

Para determinar la dosis de Bioten[®] adecuada para los experimentos de biocontrol, se estimó primero la densidad de inóculo de *Trichoderma* spp. viable contenido en el formulado mediante diluciones en serie de cinco muestras de 1 g del mismo, que se

incubaron en un medio selectivo en placas petri (ELAD *et al.*, 1981; NEMEC *et al.* 1996) a $25\pm 1^\circ\text{C}$ y un fotoperiodo de 12 h/día de luz fluorescente y NUV de $180\ \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$. Los resultados indicaron una densidad de inóculo de $4,9\times 10^8$ unidades formadoras de colonias (ufc)/g de formulado, que estuvo constituida por proporciones similares de los dos aislados que lo componen

Asimismo, en un bioensayo preliminar se determinó la población de *Trichoderma* spp. que se establece y persiste en el sistema radical de plántones de olivo tratados con Bioten®; así como en qué medida la extensión de dicha población puede ser influida por la manipulación de las plantas tratadas durante la subsiguiente inoculación de ellas con *V. dahliae*. Para ello, sobre el sistema radical desnudo de plántones micropropagados del cv. Picual de 3 meses de edad (20 repeticiones) se distribuyeron 100 g de una mezcla de suelo (limo: turba, 2:1 v/v) pasteurizado (1 h, 70°C) conteniendo Bioten® a las dosis de 1% o 10% (p/p), de manera que las raíces quedaron adecuadamente cubiertas por ella. Como testigos se utilizaron plántones similarmente tratados con la mezcla de suelo pasteurizada que no contenía Bioten®. Los plántones tratados y testigos se transplantaron a la mezcla de suelo pasteurizada en macetas de arcilla (0,75 L) (1 plánton/maceta) y se incubaron durante 14 días (10 plántones) ó 60 días (10 plántones) en una cámara de crecimiento ajustada a $25\pm 1^\circ\text{C}$, 60-90% de humedad relativa (HR), y un fotoperiodo de 14 h/día de luz fluorescente de $360\ \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Durante el desarrollo del experimento, las plantas se regaron de forma regular, según necesidad, y se fertilizaron con la solución nutritiva de Hoagland.

Transcurrido el periodo de incubación, el sistema radical de los plántones se sacudió ligeramente para retener el suelo rizosférico, las raíces se trocearon en fragmentos de 5 a 10 mm de longitud, y la población de *Trichoderma* spp. asociada con la rizosfera de los plántones se estimó en 1 g de dichos fragmentos. A tal fin, los fragmentos de raíces se suspendieron en 10 ml de agua estéril, la sus-

pensión se sometió a sonicado durante 20 min, y del sonicado se realizaron diluciones en serie en placas petri con el medio selectivo anterior incubadas en las mismas condiciones antes descritas.

Los plántones de "Picual" tratados con Bioten® 1% crecieron sin síntomas y de forma satisfactoria. A los 14 días del tratamiento, la población de *Trichoderma* spp. en la rizosfera de su sistema radical contenía una densidad de inóculo media de 10^6 ufc/g de raíz, y dicha densidad de inóculo disminuyó a $2,5\times 10^5$ ufc/g de raíz cuando las raíces de los plántones se sumergieron en agua estéril durante 20 min para simular el proceso de inoculación con *V. dahliae*. Sin embargo, transcurridos 60 días del tratamiento con Bioten® 1% dicha población rizosférica disminuyó hasta $8,7\times 10^5$ ufc/g de raíz y la inmersión en agua estéril la redujo hasta $1,2\times 10^5$ ufc/g de raíz. Contrariamente a lo anterior, el tratamiento con Bioten® 10% originó el desarrollo de clorosis y necrosis foliar, y defoliación en proporción variable, que comenzó 1 semana después del tratamiento y se acentuó 1 semana más tarde, dando lugar a la muerte de aproximadamente 50% de las plantas. Las raíces de las plantas afectadas mostraban zonas necróticas de extensión variable y podredumbres húmedas que facilitaron la retención de abundante suelo al sistema radical de las plantas extraídas de las macetas. El desarrollo de dichos síntomas en el sistema radical de los plántones desaconsejó la estimación subsiguiente de la población de los aislados fúngicos en la rizosfera de ellos.

Inóculo e inoculación con *Verticillium dahliae*

En los experimentos *in planta* se utilizó el aislado monoconídico V138I de *V. dahliae* D, altamente virulento sobre algodón y olivo (BEJARANO-ALCÁZAR *et al.*, 1996; MERCADO-BLANCO *et al.*, 2002; 2003; 2004). El inóculo consistió en una suspensión de conidias de *V. dahliae* V138I D en agua desionizada estéril obtenidas de cultivos del hongo en caldo de patata dextrosa en agitación a 130

rpm, e incubados $25\pm 1^\circ$ C, en oscuridad, durante 7 días.

Los plantones tratados y no tratados con Bioten® e incubados durante 2 semanas en la mezcla de suelo pasteurizada, se retiraron cuidadosamente de las macetas y se inocularon por uno de los siguientes procedimientos: (i) inmersión de su sistema radical desnudo e intacto en una suspensión de 10^7 conidias del patógeno/ml durante 20 min y subsiguiente trasplante a la mezcla de suelo limo: turba (2:1 v/v) esterilizada (121° C durante 1 h, dos veces consecutivas) en macetas de arcilla de 0,75 L (1 plantón/maceta); o (ii) trasplante de los plantones a dichas macetas conteniendo la mezcla de suelo estéril infestada con una densidad de inóculo de 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*.

Desarrollo experimental

La eficacia de Bioten® para el control de Verticilosis en plantones de olivo se determinó en cinco experimentos (I-V) en el escenario más favorable para el desarrollo de las infecciones y la enfermedad, incluyendo el uso del aislado V138I de *V. dahliae* D altamente virulento, el cv. Picual, altamente susceptible al mismo, y condiciones de incubación óptimas para el desarrollo de la Verticilosis. En los experimentos I y II se utilizaron, respectivamente, plantones de 6 meses de edad micropropagados o autoenraizados, que fueron inoculados con *V. dahliae* por cada uno de los dos métodos de inoculación referidos anteriormente. Los plantones se trataron con Bioten® 1% en la mezcla de suelo pasteurizada (1 plantón/maceta) como se ha descrito anteriormente, y crecieron durante 14 días en dicha mezcla en macetas de 0,75 L en una cámara de crecimiento ajustada a $25\pm 1^\circ$ C, 60-90% HR, y un fotoperiodo de 14 h/día de luz fluorescente de $360 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$. Como testigo sirvieron plantones cuyo sistema radical fue similarmente tratado con la mezcla de suelo pasteurizado

sin Bioten®. Los plantones tratados con Bioten® 1% crecieron libres de síntomas.

Para confirmar los resultados obtenidos en los experimentos I y II, se repitieron éstos 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 micropropagados de 4 meses de edad, mientras que para el experimento IV se emplearon plantones autoenraizados similares a los del experimento II. En ambos casos, el tratamiento con Bioten® se realizó durante el trasplante de los plantones desde el sustrato de enraizamiento en el vivero 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; y los plantones tratados y testigos se incubaron durante 14 días en las condiciones anteriormente mencionadas. Los plantones tratados con Bioten® 5% crecieron sin síntomas; y la población rizosférica de los aislados fúngicos del formulado estimada en su sistema radical 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 *V. dahliae* mediante: (iii) inmersión de su sistema radical intacto –previamente sacudido ligeramente hasta retener el cepellón de sustrato de enraizamiento–, en una suspensión de 10^7 conidias /ml durante 20 min y subsiguiente trasplante a la mezcla de suelo esterilizada, o (iv) trasplante de los plantones a la mezcla de suelo estéril infestada con una densidad de inóculo de 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 (1 plantón/maceta).

En el experimento V, los plantones micro-propagados o autoenraizados se trataron con la suspensión de Bioten® al 5% e inocularon al mismo tiempo con *V. dahliae* mediante transplante a la mezcla de suelo estéril infestada con 5×10^6 conidias del patógeno/g de suelo. A tal fin, durante el transplante a la mezcla de suelo infestada se depositaron 25 ml de la suspensión de Bioten® sobre un tercio del volumen total de mezcla en la maceta, 25 ml de ésta sobre el segundo tercio de mezcla alrededor del cepellón, y los 50 ml restantes sobre el resto de volumen de aquélla. Como testigos y controles sirvieron, respectivamente, plantones tratados similarmente a los descritos excepto por la ausencia del formulado Bioten®, o de inóculo de *V. dahliae*.

Los plantones utilizados en los experimentos I-V se incubaron en cámaras de crecimiento ajustadas a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, 60-90% HR, y un fotoperiodo de 14 h/día de luz fluorescente de $360 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante 2 meses, momento en que se dieron por finalizados. Adicionalmente, la incubación de los plantones autoenraizados del experimento II se prolongó durante otras 25 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 a 8 meses tras la inoculación con *V. dahliae*, aproximadamente. En todos los experimentos, los plantones se regaron de forma regular, según necesidad, y se fertilizaron con la solución nutritiva de Hoagland.

Diseño experimental, evaluación de la enfermedad y análisis de datos

Los experimentos I-V tuvieron un diseño factorial de tratamientos con tres repeticiones completamente al azar, cada una de las cuales constó de 5 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) la incidencia de plantas sintomáticas (expresada en porcentaje); (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; 2004) determinada a intervalos semanales después de la inoculación con el patógeno; y (iii) el área bajo la curva de progreso de la enfermedad estandarizada por el tiempo de desarrollo de ésta en días (ABCPE) calculada según MADDEN *et al.* (2007). En el experimento II se evaluó además el desarrollo de enfermedad durante la incubación adicional en umbráculo a intervalos de 2-4 semanas. Asimismo, 3 meses después de la inoculación se determinó la influencia del tratamiento con Bioten® y la infección por *V. dahliae* sobre el crecimiento de los plantones 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 arcosen ($Y/100$)^{1/2}, y las medias de tratamientos se compararon entre si mediante el contraste de la mínima diferencia significativa protegida de Fisher (LSD) a $P \leq 0,05$.

Para confirmar la infección las plantas por *V. dahliae*, finalizados los experimentos se realizaron aislamientos del patógeno en agar patata dextrosa (PDA) de todos los plantones inoculados con *V. dahliae*, así como de cuatro plantones de los testigos no tratados ni inoculados, o tratados sólo con Bioten®, seleccionados aleatoriamente. Las raíces y tallos de los plantones se lavaron bajo agua de grifo; los tallos defoliados y cuatro raíces por plantón elegidas arbitrariamente se desinfectaron superficialmente en lejía comercial al 10% en agua estéril durante 1min (tallos) o 1,5 min (raíces); y trozos de 0,5 cm de tallos desinfectados y descortezados, y raíces desinfectadas se incubaron en PDA suplementado con aureomicina ($30 \mu\text{g/L}$) en placas petri a $25 \pm 1^\circ \text{C}$ en oscuridad durante 3 semanas. Asimismo, finalizados los experimentos II a V se estimó la densidad de población de *Trichoderma* spp. que persistió en el sistema radical de 3 plan-

tones de olivo testigos e inoculados muestreados aleatoriamente.

Efectos del tratamiento con Bioten® sobre el desarrollo de Verticilosis en condiciones de campo

El efecto de Bioten® sobre el desarrollo de Verticilosis en condiciones de campo se estudió en microparcelas (1,25 x 1,25 m², 0,5 m de profundidad) solarizadas de un suelo areno limoso (pH 8,5, 1,4 % de materia orgánica) en la Finca Alameda del Obispo del IFAPA, (Córdoba, 37,5°N, 4,8°W, altitud 110 m) durante el periodo 2007 a 2009. El suelo de las microparcelas humectado a la capacidad de retención se solarizó cubriéndolo con una lámina de polietileno transparente (50 µm de grosor) durante el periodo 11 de Julio a 31 de Septiembre, 2006.

El suelo solarizado se infestó con inóculo del aislado *V. dahliae* V138I D en el momento de transplantar en las microparcelas plantones de 'Picual' autoenraizados (Viveros Aulaga, Córdoba). El inóculo se incrementó en matraces erlenmeyer conteniendo una mezcla de arena: harina de maíz: agua (9:1:2, p/p) (AMA) esterilizada en autoclave (2,5 h, 121°C), e infestada con 15 discos de PDA de 5 mm de diámetro colonizados por el patógeno durante 7 días a 25±1° C. El AMA infestado se incubó a 25±1°C en oscuridad durante 30 días, agitándose el cultivo vigorosamente cada 4-5 días para redistribuir el crecimiento fúngico. La densidad de propágulos de *V. dahliae* en el AMA colonizado estimada por el método de tamizado húmedo fue de 3,1x10⁸ ufc/g AMA. El potencial de dichos propágulos como inóculo se determinó en dos ensayos preliminares utilizando plantones de olivo 'Picual' autoenraizados de 6 meses de edad y plántulas de sandía cv. Dulce Maravilla, cuyos resultados permitieron ajustar la proporción de AMA infestado para la inoculación en las microparcelas.

Desarrollo experimental

El experimento en las microparcelas se planteó con un abordaje que simulara 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 6 meses se trató con 100 ml de una suspensión de Bioten® al 5% (p/v) en agua desionizada estéril, como se describe en el experimento IV anterior, y los plantones tratados y testigos se incubaron en las mismas condiciones descritas para los experimentos anteriores, durante 3 meses.

Los plantones tratados con Bioten®, de 9 meses de edad, se transplantaron en las microparcelas (2 plantones/microparcela ubicados diametralmente en ella) el 6 de Marzo de 2007 y la inoculación con *V. dahliae* se realizó durante el trasplante. Como inóculo se empleó una mezcla de suelo solarizado y AMA infestado (5%, v/v), que en el momento del trasplante contenía 1,4x10⁷ propágulos de *V. dahliae*/g estimados por el método de tamizado húmedo. Para la inoculación de cada plantón 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 microparcelas 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 próximo al sistema radical de los plantones en dos microparcelas 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 tratados anteriormente e incubados en cámara de crecimiento. Para ello, el formulado se hidrató durante 24 h a la temperatura ambiente en agua desionizada (20 g/L) y 1L de la suspensión se distribuyó sobre el plantón, aportando 1/3 de dicho volumen sobre el inóculo de *V. dahliae* depositado en el fondo del hoyo (o la mezcla que sirvió como testigo), otro 1/3 sobre el cepellón de trasplante cubierto parcialmente por dichos inóculo o mezcla, y el 1/3 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 1 año después de la plantación, mediante riego de los plantones tratados con 1L de suspensión del formulado hidratado al 1%, después de retirar la capa superficial de suelo en la microparcela. Tras la aplicación de Bioten®, las microparcels se regaron con agua para facilitar la percolación del formulado 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 transplante (15:15:15:15) y 1 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 4L/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 microparcels manualmente.

El experimento constó de 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 completamente al

azar (dos plantones/microparcela). El desarrollo de Verticilosis en las microparcels se evaluó por: (i) la incidencia de plantas sintomáticas (expresada en porcentaje); (ii) la severidad de los síntomas en plantas individuales (estimada en una escala 0-4 determinada a intervalos de 2 semanas después la inoculación con el patógeno; y (iii) el ABCPE estandarizada por el tiempo de desarrollo de la enfermedad. 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 $P \leq 0,05$. La infección de los plantones por *V. dahliae* se confirmó mediante aislamiento del patógeno de las hojas caídas de plantas afectadas en PDA. Dichas hojas se mantuvieron sobre el suelo de las microparcels durante el curso del experimento.

RESULTADOS

Efectos del tratamiento con el formulado Bioten® sobre el desarrollo de Verticilosis en condiciones controladas

Plantones 'Picual' micropropagados

En los experimentos I y II, los plantones de 6 meses de edad tratados o no tratados con

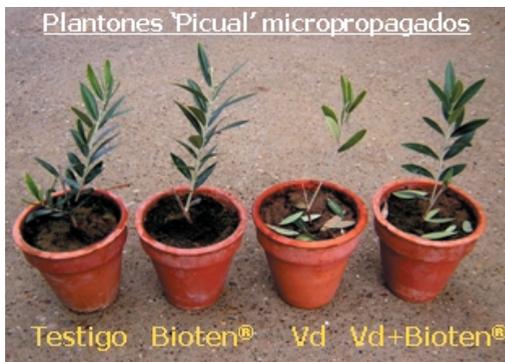


Figura 2. Síntomas de Verticilosis causados por el patotipo defoliante de *Verticillium dahliae* en plantones de 'Picual' de 6 meses de edad 8 semanas después de la inoculación por inmersión radical en una suspensión de conidias del patógeno e incubación a $25 \pm 1^\circ \text{C}$ en cámara de crecimiento (Véase el texto para más detalles).

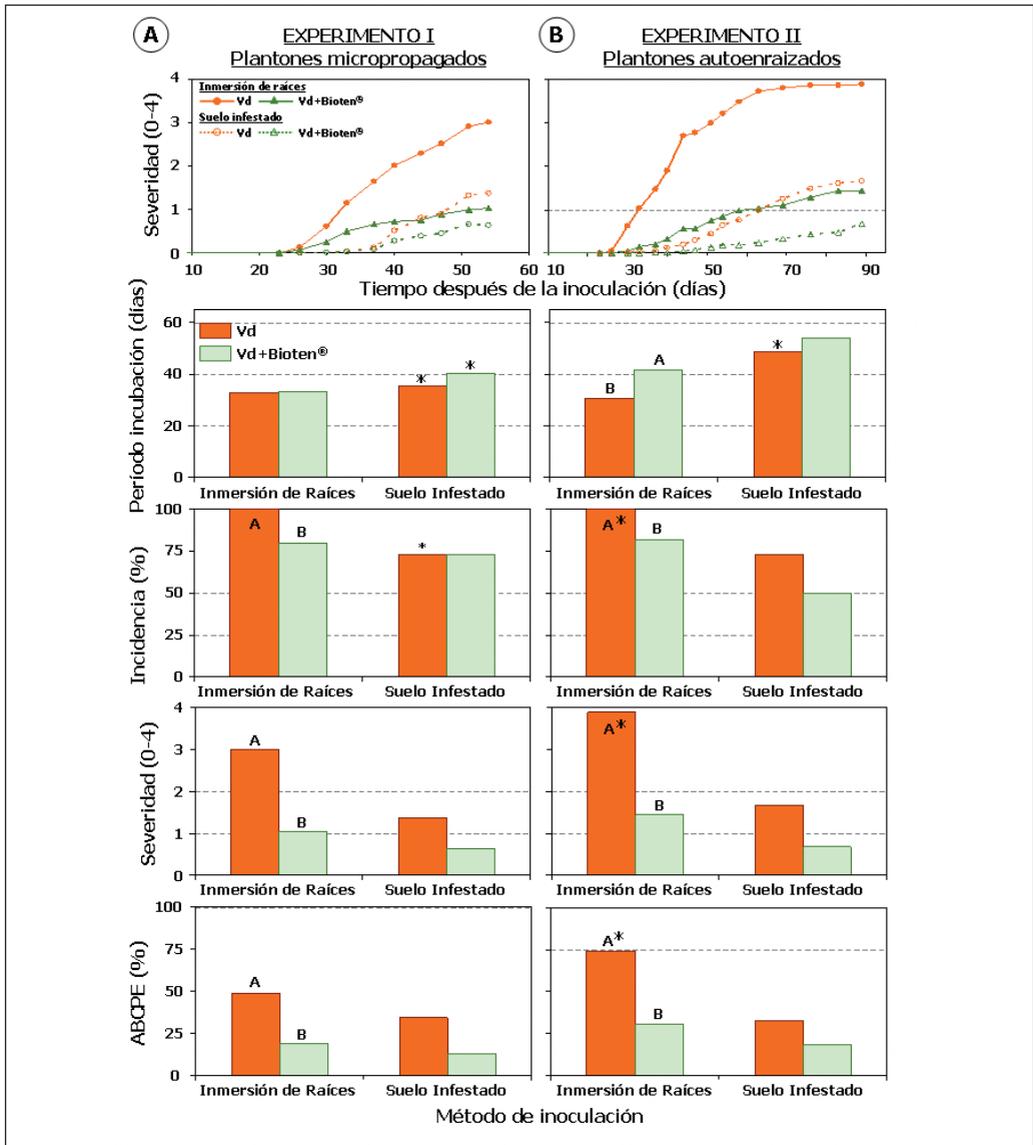


Figura 3. Efecto de Bioten® sobre el desarrollo de Verticilosis en plantones de 'Pical' micropropagados (A) o autoenraizados (B) inoculados con *Verticillium dahliae* defoliante e incubados a $25\pm 1^\circ\text{C}$ en cámara de crecimiento. A, B) El sistema radical de plantones de 6 meses de edad se trató con Bioten® 1% en una mezcla de suelo pasteurizado (Bioten®), o no se trató, y los plantones se inocularon con *V. dahliae* (Vd) por inmersión del sistema radical en una suspensión de conidias o por trasplante a suelo infestado con ella. 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, 1 = 1-33%, 2 = 34-66%, 3 = 67-100%, 4 = planta muerta). ABCPE = 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).

Bioten® 1% (p/p) pero no inoculados con *V. dahliae* crecieron sin síntomas. Por el contrario, los plantones inoculados con el patógeno mostraron los síntomas característicos inducidos por el patotipo D de *V. dahliae*, incluyendo clorosis de las hojas y defoliación (Fig. 2).

En el experimento I, el desarrollo de la enfermedad varió con el método de inoculación y el tratamiento con Bioten® 1%, de manera que la interacción entre ambos factores fue estadísticamente significativa ($P < 0,05$), siendo la reacción más acentuada en los plantones inoculados por inmersión radical (Fig. 3A). El tratamiento con Bioten® 1% no influyó sobre el periodo de incubación (i.e., tiempo transcurrido desde la inoculación hasta la aparición de los primeros síntomas), que fue 33 días en las plantas inoculadas por inmersión, y de 35 o 40 días en las inoculadas por trasplante a suelo infestado, respectivamente (Fig. 3A). Sin embargo, comparado con las plantas no tratadas, el tratamiento con Bioten® 1% redujo significativamente ($P < 0,05$) en 20% la incidencia de Verticilosis, en 30% el ABCPE, y de 3,0 a 1,1 (en una escala 0 a 4) la severidad media de los síntomas en los plantones inoculados por inmersión radical (Fig. 3A).

La inoculación por trasplante a suelo infestado originó un desarrollo de enfermedad de inferior incidencia y severidad que el causado por la inmersión del sistema radical en la suspensión de inóculo (Fig. 3A). Aunque el tratamiento con Bioten® 1% produjo en los plantones trasplantados a suelo infestado efectos similares a los indicados para los plantones inoculados por inmersión radical, particularmente en lo concerniente a la reducción de la severidad de síntomas (de 1,4 a 0,6) y del ABCPE (22% inferior) respecto de las plantas no tratadas, dicha reducción no fue estadísticamente significativa ($P \geq 0,05$) (Fig. 3A).

La repetición del experimento I utilizando plantones micropropagados de 4 meses originó en el experimento III una reacción de enfermedad más severa comparada con la obtenida en plantones de 6 meses en el experimento anterior, independientemente del

método de inoculación utilizado. Sin embargo, a diferencia del experimento I, el incremento de la densidad de inóculo del patógeno (2,5x) en la mezcla de suelo infestado del experimento III dio lugar a una incidencia de 100% de síntomas severos (Fig. 4A). En dicho experimento, a diferencia del anterior, el tratamiento del sistema radical con una suspensión acuosa de Bioten® 5% previo a la inoculación con *V. dahliae* no redujo la incidencia y severidad de síntomas de Verticilosis comparado con el control no tratado con el formulado. Sólo el tratamiento simultáneo a la inoculación redujo de forma ligera aunque significativa ($P < 0,05$) la severidad de síntomas y el ABCPE (datos no mostrados). En los plantones tratados o no tratados con Bioten® 5% (p/v) pero no inoculados con *V. dahliae* no se produjo desarrollo de síntoma alguno.

Al finalizar el experimento III, 10 semanas después de la aplicación del formulado, la población de *Trichoderma* spp. en la rizosfera de las plantas tratadas fue de $1,5 \times 10^5$ ufc/g de raíz de los plantones no inoculados con *V. dahliae* y $1,9 \times 10^5$ ufc/g de raíz de los plantones inoculados con el patógeno. Dichas poblaciones fueron aproximadamente un orden de magnitud inferior a las establecidas inicialmente tras 2 semanas de incubación después del tratamiento con Bioten® 5% previamente a la inoculación con *V. dahliae*.

Plantones 'Picual' autoenraizados de estaquillas semileñosas

Efectos de Bioten® en plantones incubados en cámara de crecimiento

El tratamiento con Bioten® 1% no originó síntoma alguno en los plantones autoenraizados; y la inoculación con *V. dahliae* dio lugar al desarrollo de Verticilosis característico de la infección por el patotipo D de *V. dahliae*, incluyendo defoliación comparable a la que tuvo lugar en los plantones micropropagados incubados en las mismas condiciones del experimento I (Fig. 2).

Al igual que los plantones micropropagados de 6 meses de edad, los efectos del tratamiento con Bioten® 1%, variaron significativamente ($P < 0,05$) con el método de inocula-

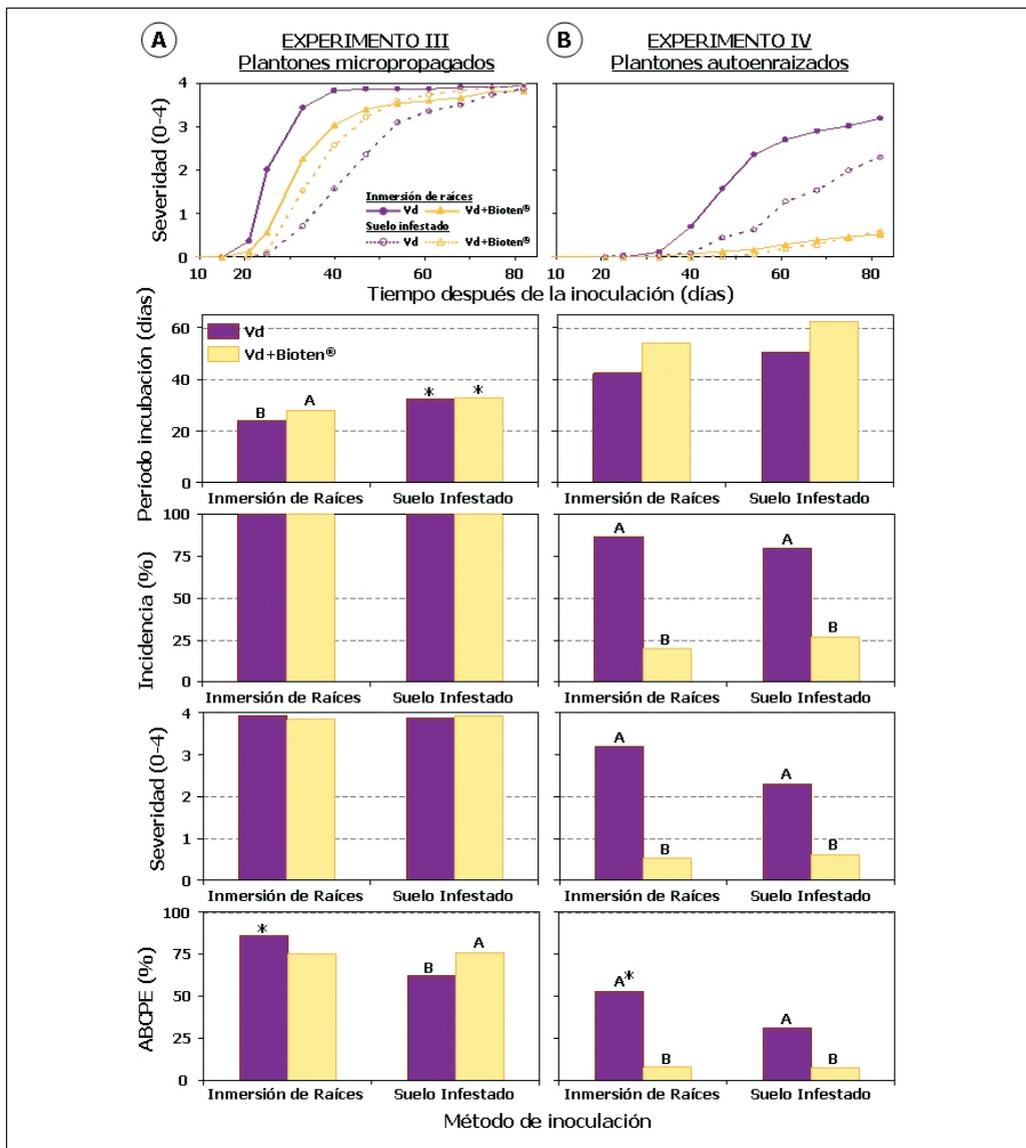


Figura 4. Efecto de Bioten® sobre el desarrollo de Verticilosis en plantones de ‘Pical’ micropropagados (A) o autoenraizados (B) inoculados con *Verticillium dahliae* defoliante e incubados a 25±1° C en cámara de crecimiento. A, B) El cepellón radical de plantones de 6 meses de edad se trató con una suspensión de Bioten® al 5% en agua desionizada estéril (Bioten®), o sólo con ésta, y los plantones se inocularon con *V. dahliae* (Vd) 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, 1 = 1-33%, 2 = 34-66%, 3 = 67-100%, 4 = planta muerta). ABCPE = 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).

ción, siendo la inoculación por inmersión radical la que determinó el desarrollo más temprano, extenso y severo de Verticilosis (Fig. 3B). Comparada con la inmersión radical, la inoculación por trasplante originó valores de incidencia, severidad, y ABCPE significativamente ($P < 0,05$) inferiores, y un periodo de incubación significativamente ($P < 0,05$) superior, independientemente del tratamiento (Fig. 3B). El tratamiento con Bioten® 1% no influyó sobre el periodo de incubación en los plántones inoculados por inmersión (31 y 42 días en las plantas testigo y tratadas, respectivamente), pero redujo significativamente ($P < 0,05$) la incidencia de Verticilosis en 18%, el ABCPE en 43%, y de 3,9 a 1,4 (en la escala 0 a 4) la severidad media de los síntomas en los plántones tratados respecto de los no tratados (Fig. 3B).

En los plántones inoculados mediante trasplante a suelo infestado, el tratamiento con Bioten® 1% determinó un patrón de reducción de Verticilosis similar al descrito para los plántones inoculados por inmersión de las raíces en el inóculo, pero en ningún caso resultó estadísticamente significativa ($P < 0,05$). 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) (Fig. 3B).

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 (Fig. 5D). Así, tras 3 meses de incubación a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, el crecimiento relativo de tallos y brotes en los plántones control de inmersión radical no tratados con Bioten® fue 10% superior ($P \geq 0,05$) al de los tratados. Por el contrario, la infección por el patógeno 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% (Fig. 5D). Comparado con la inoculación por inmersión de raíces, el trasplante a suelo

infestado con *V. dahliae* influyó menos sobre el desarrollo de los plántones, de manera que el crecimiento de los así inoculados fue significativamente ($P < 0,05$) superior al de los inoculados mediante inmersión radical. Además; el crecimiento de los plántones inoculados mediante trasplante fue comparable al de los controles no inoculados, pero el tratamiento con Bioten® 1% no repercutió significativamente sobre el crecimiento de las plantas enfermas ($P \geq 0,05$) (Fig. 5D). Tales diferencias 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 (Fig. 5B,C).

La repetición del experimento II, mediante tratamiento del sistema radical con la suspensión acuosa de Bioten® 5% previo a la inoculación con *V. dahliae* (experimento IV) reprodujo los efectos del formulado sobre el desarrollo de enfermedad descritos anteriormente pero acentuó la reducción de Verticilosis observada en el experimento II (Fig. 4B). Así, mientras que la incidencia y severidad de síntomas en los plántones no tratados e inoculados por cada uno de los dos procedimientos fueron comparables a las alcanzadas en el experimento II; el tratamiento con Bioten® 5% en el experimento IV redujo significativamente ($P < 0,05$) en 66% la incidencia de Verticilosis y de 3,2 a 0,5 la severidad media de los síntomas en los plántones inoculados por inmersión radical, y en 53 % y de 2,3 a 0,6 los valores de éstos en los plántones transplantados a suelo infestado con el patógeno (Figs. 3B, 4B). Comparativamente, el tratamiento con Bioten® 5% simultáneamente a la inoculación con *V. dahliae* (experimento V) redujo ligera pero no significativamente ($P \geq 0,05$) la incidencia y severidad de síntomas respecto de los controles no tratados con el formulado (datos no mostrados). En los plántones tratados o no tratados con Bioten® 5% (p/v) pero no inoculados con *V. dahliae* no se produjo desarrollo de síntoma alguno.

Al finalizar el experimento IV, 10 semanas después del tratamiento con Bioten® 5%,

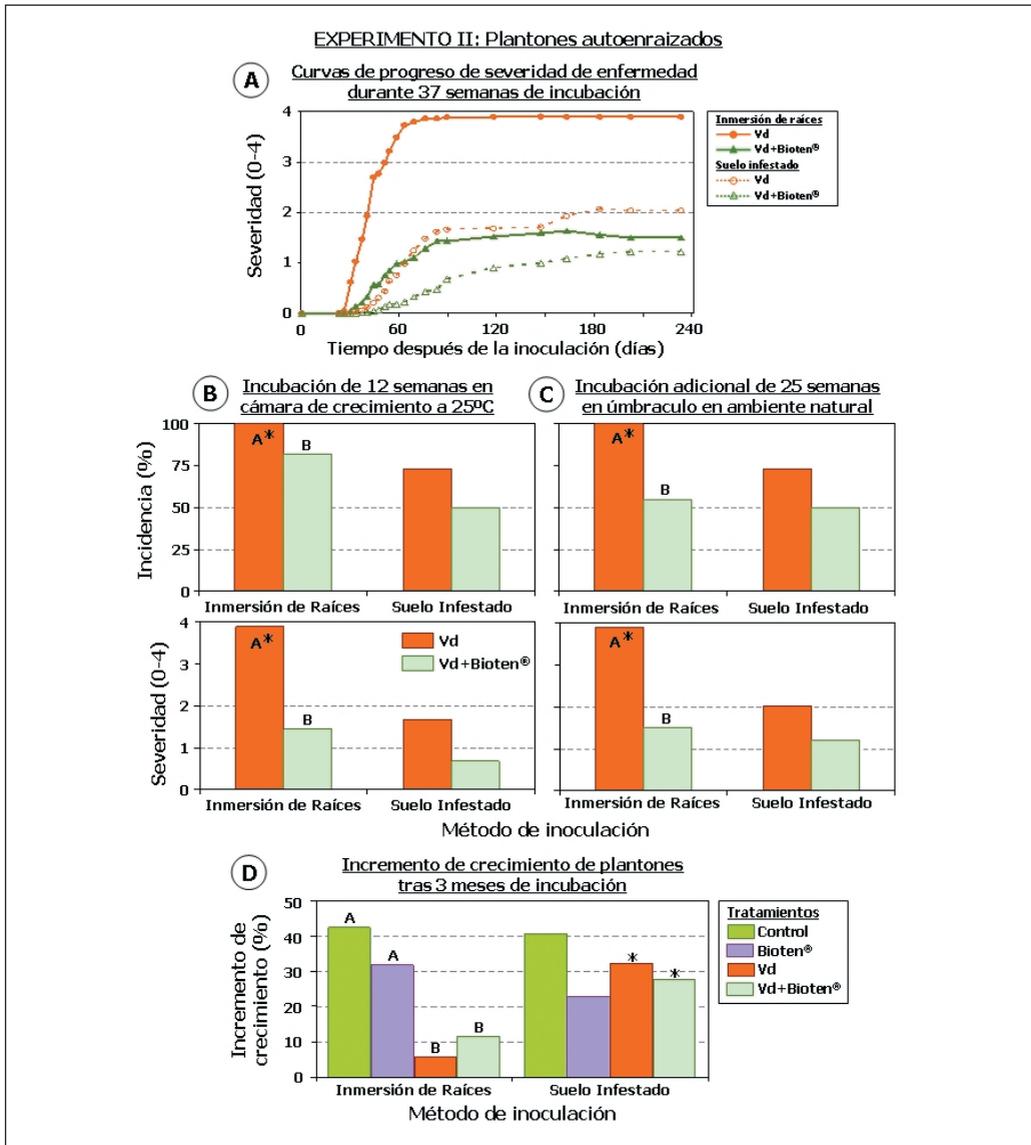


Figura 5. Duración del efecto de Bioten® 1% sobre el desarrollo de Verticilosis en plantones de ‘Pical’ autoenraizados e inoculados con *Verticillium dahliae* defoliante (Vd). Los plantones se incubaron primero a 25±1° C en cámara de crecimiento durante 3 meses (experimento II; A, B), y 25 semanas adicionales 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, 1 = 1-33%, 2 = 34-66%, 3 = 67-100%, 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 plantones 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 transplante a suelo infestado con ella y se incubaron a 25±1° C en cámara de crecimiento. Control = Plantones no tratados ni inoculados. 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 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).

la población fúngica del formulado en la rizosfera de los plantones tratados no inoculados alcanzó un valor medio de $2,5 \times 10^5$ ufc/g de raíz, que es aproximadamente un orden de magnitud inferior a la establecida inicialmente tras 2 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 de Bioten® en plantones incubados bajo umbráculo

La incubación durante 25 semanas adicionales bajo umbráculo en el experimento II, de los plantones autoenraizados inoculados con *V. dahliae* por inmersión del sistema radical, no modificó la reducción de incidencia y severidad de Verticilosis determinada por el tratamiento con Bioten® 1% durante las 8 semanas de incubación a $25 \pm 1^\circ$ C en cámara de crecimiento que tuvo lugar previamente (Fig. 5A). De hecho, en los plantones 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 plantones no tratados con Bioten® 1% (Figs. 5B,C).

Similarmente, la incubación durante 25 semanas bajo umbráculo de los plantones inicialmente trasplantados a suelo infestado con *V. dahliae*, no modificó la ausencia de significación ($P \geq 0,05$) de la diferencia en la incidencia de enfermedad entre plantones tratados y no tratados con Bioten® 1% que había sido observada tras 8 semanas de incubación a $25 \pm 1^\circ$ C (Fig. 5A). Sin embargo, tanto en los plantones control como en los tratados con Bioten® 1% se produjo un ligero incremento de severidad media de los síntomas de 0,4 y 0,5, respectivamente, respecto de los valores observados a las 8 semanas de incubación a $25 \pm 1^\circ$ C, y la diferencia de severidad de 0,8 entre dichos tratamientos a las 25 semanas no fue estadísticamente significativa ($P \geq 0,05$) (Figs. 5B,C). Este ligero incremento de severidad de síntomas pudo estar relacionado con circunstancias de estrés que también determinaron un ligero

desarrollo de síntomas foliares en los plantones testigos, no tratados con Bioten® 1% ni inoculados con *V. dahliae*.

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

Efectos del tratamiento con Bioten® sobre el desarrollo de Verticilosis en microparcels infestadas con *V. dahliae*

Los plantones tratados o no tratados con Bioten®, pero no inoculados con *V. dahliae*, crecieron durante el experimento sin síntoma alguno que pudiera indicar efecto alguno del formulado sobre la planta. Además, ocasionalmente se realizaron aislamientos de hojas y ramitas de plantones tratados en PDA, que resultaron consistentemente negativos respecto de la presencia del patógeno o de los componentes fúngicos del formulado en los tejidos asintomáticos de aquéllos.

Los primeros síntomas de Verticilosis en los plantones inoculados con *V. dahliae* D se desarrollaron a principios del mes de Junio, aproximadamente 3 meses después del trasplante en las microparcels, tanto en plantones control (severidad media 1,1 en la escala 0-4) como en aquéllos que habían sido tratados con Bioten® (severidad media 0,6).

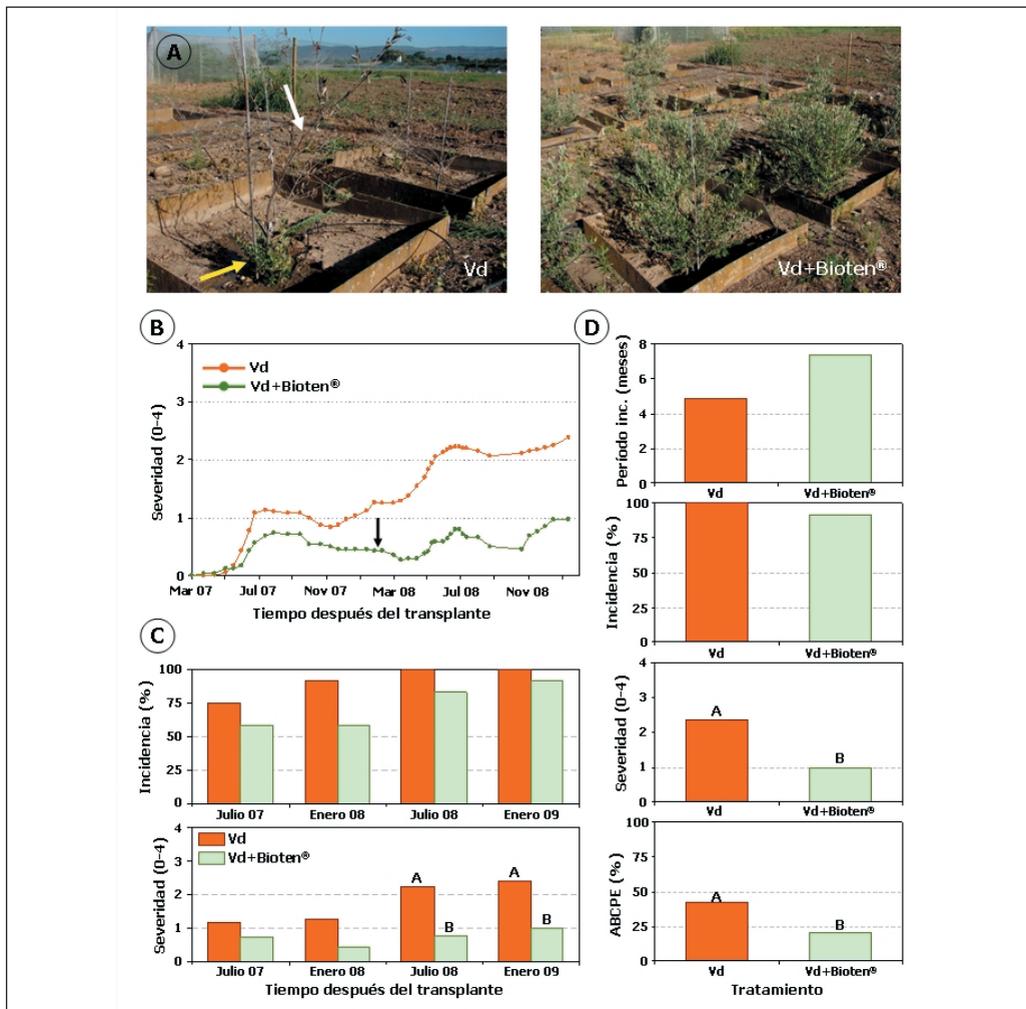


Figura 6. Efecto del tratamiento con Bioten® sobre el desarrollo de la Verticilosis del olivo en condiciones de campo. Plantones de ‘Picual’ de 6 meses de edad cuyo cepellón radical se trató con una suspensión de Bioten® al 5% en agua desionizada estéril (Bioten®), o sólo con ésta, se incubaron 3 meses a 25±1° C, se transplantaron a microparcelas solarizadas infestadas o no con *Verticillium dahliae* defoliante, y se trataron o no con Bioten® al 5% en el momento del transplante, y de nuevo con Bioten® al 1% aproximadamente 1 año después. A) Plantas inoculadas con *V. dahliae* (Vd) 14 meses después de la inoculación; Izquierda: Plantas no tratadas con Bioten® (control) severamente afectadas por Verticilosis (nótese el rebrote en la base de la planta); Derecha: Plantas tratadas con Bioten® (Vd+ Bioten®) (nótese las plantas control al fondo de la imagen). B) 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, 1 = 1-33%, 2 = 34-66%, 3 = 67-100%, 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. C) 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 transplante e inoculación con *V. dahliae* en el mes de Marzo de 2007. D) 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, 1 = 1-33%, 2 = 34-66%, 3 = 67-100%, 4 = planta muerta). ABCPE = 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).

Dichos síntomas fueron los característicos del síndrome defoliante, incluyendo la caída profusa de hojas cloróticas o asintomáticas (Fig. 5A,B). La enfermedad en los plantones no tratados alcanzó una incidencia de 75% un mes más tarde; de 92% en Enero de 2008, a los 10 meses de la inoculación, y 100% a los 16 meses de ésta (Fig. 6C). Comparativamente, a los 4 y 10 meses de la inoculación la incidencia de Verticilosis en los plantones tratados con Bioten® fue inferior en 17% y 33% a la de los controles no tratados con el formulado, respectivamente. Sin embargo dicha incidencia aumentó hasta 83% 6 meses más tarde, y a 92% 6 meses después, en Enero de 2009, a los 22 meses de la inoculación (Fig. 6C). Aún así, la incidencia de enfermedad en los plantones tratados con el formulado se mantuvo siempre ligeramente inferior a la de los controles no tratados.

El efecto más notorio del tratamiento con Bioten® sobre el desarrollo de Verticilosis en los plantones fue la reducción de la severidad de síntomas comparada con los controles no tratados, que fue claramente discernible desde los 4 meses de la inoculación y ocurrió de forma continuada y acentuada en el tiempo desde entonces. Así, la severidad media en los plantones no tratados con Bioten® aumentó de 1,1 a los 4 meses de la inoculación a 2,2 y 2,4 a los 16 y 22 meses de la inoculación, respectivamente; mientras que en los plantones tratados aumentó de 0,7 a 0,8 y 1,0 en dichos periodos, pero fue significativamente inferior ($P < 0,05$) en 1,4 unidades a la severidad de síntomas en los plantones no tratados a los 16 y 22 meses de aquélla (Fig. 6B,C). 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 (Fig. 6D).

DISCUSIÓN

La justificada alarma generada en el sector oleícola por la extensión y severidad de los ataques de Verticilosis en el olivar anda-

luz ha generado demanda de tecnologías para el control de la enfermedad, que ha auspiciado una profusión de recomendaciones y tratamientos con una variedad de productos registrados o no. Lamentablemente, en la mayoría de los casos dichas recomendaciones no se basan convincentemente sobre conocimientos científico-técnicos acreditados y accesibles para su contraste experimental, y su ineficacia abre la posibilidad de desencanto en el usuario y descrédito hacia el sector fitosanitario. A estas circunstancias se une la conveniencia de que el control de enfermedades se basen en el uso de productos biológicos, dada la escasa disponibilidad de substancias activas autorizadas en olivar y otros cultivos, consecuencia de la revisión de todas las utilizadas con fines fitosanitarios en la UE (Directiva 91/414EEC) finalizada en Marzo de 2009 y de las normativas para la Estrategia de Uso Sostenible de Productos Fitosanitarios (Directiva 2009/128/CE; Reglamento (CE) 1107/2009).

Los resultados de este trabajo indican 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 el fenómeno de la capacidad de recuperación sintomática de la planta enferma. Dicho potencial de biocontrol ha sido puesto de manifiesto de forma reproducible, en experimentos repetidos en ambiente controlado, con un escenario experimental elegido *ad hoc* para favorecer el desarrollo óptimo de Verticilosis que incluyó el cv. 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 el escenario anteriormente referido varió con el procedimiento de inoculación y el tipo de material vegetal; de

manera que la reducción de Verticilosis fue superior y más consistente cuando se inocularon plántones autoenraizados por inmersión del sistema radical en una suspensión de conidias del hongo, que dio lugar a una elevada incidencia y severidad de enfermedad en los controles inoculados con *V. dahliae* D pero no tratados con el formulado de estudio. 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, aunque la incidencia de enfermedad también resultó reducida en proporción variable de 18 a 60% dependiendo de la combinación experimental. Comparativamente, la inoculación por trasplante a suelo infestado determinó mayor variabilidad experimental y menor desarrollo de enfermedad en los plántones no tratados con Bioten[®], que ha dificultado la distinción estadísticamente significativa de los efectos del formulado. No obstante, el tratamiento con Bioten[®] también redujo en cierta extensión la incidencia y severidad de síntomas en comparación con los controles no tratados. Por otra parte, la utilización en el experimento III de una elevada densidad de inóculo en el suelo (5×10^6 conidias/g) y plántones micropropagados jóvenes de crecimiento suculento, determinaron un potencial de enfermedad de una magnitud tal que impidió diferenciar los efectos de los agentes de biocontrol en el formulado.

Numerosas investigaciones sobre el uso de diversos microorganismos para el control biológico de enfermedades de plantas indican que éste puede resultar de uno o varios mecanismos, incluyendo: (i) la competición por nutrientes, nichos ecológicos o zonas de infección; (ii) la inhibición directa del patógeno mediante antibiosis o lisis; (iii) el parasitismo; y (iv) la inducción de la expresión de mecanismos de defensa innatos en la planta (COOK Y BAKER, 1983). Los mecanismos que subyacen en la supresión de Verticilosis en olivo por los aislados fúngicos de Bioten[®] no han sido objeto de esta investigación, ni son conocidos. No obstante, experi-

mentos preliminares *in vitro* ponen en duda a la antibiosis como modo de acción fundamental de aquéllos (JIMÉNEZ DÍAZ *et al.*, no publicado). Además, 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 confluir más de un mecanismo.

EL efecto de supresión de Verticilosis del tratamiento con Bioten[®] alcanzado 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 plántones tratados, que determinó una disminución significativa del 60% en el ABCPE. En esta reducción subyace el incremento en el tiempo de la proporción de tejido sano respecto del sintomático, sugiriendo que no tuvieron lugar nuevas infecciones por *V. dahliae* en el tejido radical formado de *novo*, a pesar de que en las microparcels se produjo aporte continuado de nuevo inóculo del patógeno a través de las hojas infectadas que cayeron de las plantas afectadas. En este escenario, es digno de resaltar el elevado potencial de enfermedad que determinó la elevada densidad de inóculo en el suelo de las microparcels (650 propágulos/g suelo seco), indicado por la temprana aparición de los primeros síntomas de Verticilosis a los 4 meses de la inoculación y el 100% de incidencia de enfermedad en los plántones no tratados a los 16 meses de la inoculación. Comparativamente; los primeros síntomas en plántones 'Picual' transplantados por LÓPEZ-ESCUADERO y BLANCO-LÓPEZ (2007) a suelo infestado con 10 microesclerocios/g suelo de *V. dahliae* se produjeron a los 8 meses de la inoculación, y fueron necesarios 24 meses para alcanzar una incidencia de enfermedad de 55%. Por el contrario, en nuestro experimento se había producido una incidencia de 91% de Verticilosis en los con-

troles no tratados con Bioten® a los 10 meses de la inoculación.

El nivel de supresión de Verticilosis del olivo determinado por el tratamiento con Bioten® en nuestros experimentos es comparable al alcanzado por otros autores en investigaciones similares con el mismo o diferentes patosistemas y agentes de biocontrol (Ej., HERVÁS *et al.*, 1997; 1998; LANDA *et al.*, 2001; MERCADO-BLANCO *et al.*, 2004), e indica que la aplicación de éstos debe ser concebida y comprendida como un componente más de una estrategia de manejo integrado de enfermedades de cultivos (LANDA *et al.*, 2004). En la Verticilosis del olivo, dicha estrategia debe ir dirigida a obviar escenarios de alto potencial de enfermedad inicial mediante acciones previas a la plantación, que incluye necesariamente 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* (LÓPEZ-ESCUADERO *et al.*, 2004), la utilización de plantones certificados libres del patógeno, y la protección de éstos contra infecciones subsiguientes a su plantación (TJAMOS, 1993; TJAMOS y JIMÉNEZ-DÍAZ, 1998; JIMÉNEZ DÍAZ *et al.*, 2003). 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, utilización del formulado Bioten® en una estrategia de control integra-

do aconseja no sólo el tratamiento del sistema radical del plantón durante la producción viverista, sino también la subsiguiente aplicación periódica del producto durante los 2 primeros años de plantación para 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; RODRÍGUEZ JURADO y BEJARANO ALCÁZAR, 2007; JIMÉNEZ DÍAZ *et al.* 2008b; NAVAS-CORTÉS *et al.*, 2008). La potencial disminución del inóculo fúngico de Bioten® en el sistema radical de los plantones durante su crecimiento en el vivero, observada durante la incubación prolongada de los plantones tratados en nuestros experimentos, puede ser subsanada con aplicaciones periódicas de suspensiones del formulado al substrato de enraizamiento durante la fase de endurecimiento del plantón enraizado, hasta su distribución comercial (JIMÉNEZ DÍAZ *et al.*, no publicado).

AGRADECIMIENTOS

Los autores (RMJD, JLTC, BBLC, 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.

ABSTRACT

JIMÉNEZ DÍAZ, R. M., J. L. TRAPERO CASAS, J. BONED, B. B. LANDA, J. A. NAVAS CORTÉS. 2009. Use of Bioten® for biological protection of olive planting stocks from *Verticillium* wilt caused by defoliating *Verticillium dahliae*. *Bol. San. Veg. Plagas*, 35: 595-615.

Protection of the root system of *Verticillium dahliae*-free olive planting stocks from severe infection by residual soilborne or incoming inoculum may reduce the potential for *Verticillium* wilt in young trees and facilitate expression in them of the phenomenon of symptoms recovery. In this work we have addressed that hypothesis with the biocontrol fungal formulation Bioten®, composed by strains of *Trichoderma asperellum* and *T. gam-sii*, using micropropagated or self-rooted planting stocks of ‘Picual’ olives inoculated with defoliating *V. dahliae* by root dipping or transplanting to soil infested with the

pathogen in repeated experiments in growth chamber and field microplots. Treating the plant root system with Bioten® 1% consistently reduced by more than 30% symptoms severity in root-dip inoculated plants, and in a variable extent of 18 to 60% the disease incidence. Transplanting treated plants to *V. dahliae*-infested soil also reduced disease incidence and severity to an extent but higher variability and less disease developed in non-treated controls made difficult to demonstrate statistical significance of the effects. Suppression of *Verticillium* wilt by Bioten® under controlled conditions was reproduced under field conditions and high disease potential indicated by the development of first wilt symptoms just 4 mo after inoculation and 100% incidence of diseases by 16 mo after that. Suppression of the disease in the field was also characterized by lesser symptoms severity in treated plants that determined a significant 60% reduction of total disease in them.

Key words: Biological control, integrated control, *Olea europaea*, nursery production.

REFERENCIAS

- 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 Dis*, **80**: 1233-1238.
- BLANCO-LÓPEZ, M. A., JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M., CABALLERO, J. M. 1984. Symptomatology, incidence and distribution of *Verticillium* wilt of olive trees in Andalucía. *Phytopathol Mediterr*, **23**: 1-8.
- BLANCO-LÓPEZ, M. A., RODRÍGUEZ JURADO, D., JIMÉNEZ DÍAZ, R. M. 1990. Incidente and seasonal variation of *Verticillium* wilt in olive orchards. Pg 5 en: Proceedings 5th International *Verticillium* Symposium, Leningrado.
- CABALLERO, J. M., PÉREZ-HERNÁNDEZ, J., BLANCO-LÓPEZ, M. A., JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. 1980. Olive, a new host of *Verticillium dahliae* Kleb. in Spain. Proceedings 5th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union: 50-52.
- COOK R. J., BAKER, K. F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 539 pp.
- ELAD, Y., CHET, I., HENIS, Y. 1981. A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Phytoparasitica*, **9**: 59-67.
- HERVÁS, A., LANDA, B., JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. 1997. Influence of chickpea genotype and *Bacillus* sp. on protection from Fusarium wilt by seed treatment with nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. *Eur J Plant Pathol*, **103**: 631-642.
- HERVÁS, A., LANDA, B., DATNOFF, L. E., JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. 1998. Effects of commercial and indigenous microorganisms on Fusarium wilt development in chickpea. *Biological Control*, **13**: 166-176.
- JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M., TJAMOS, E. C., CIRULLI, M. 1998. *Verticillium* wilt of major tree hosts: olive. Páginas 13-16 en: J. Hiemstra, y D. Harris. (eds). Compendium of *Verticillium* Wilt in Trees Species. Ponsen & Looijen, Wageningen, Holanda.
- JIMÉNEZ DÍAZ, R. M., OLIVARES, C., NAVAS-CORTÉS, J. A., LANDA, B. B., JIMÉNEZ-GASCO, M. M. 2008a. A region-wide analysis of genetic diversity in *Verticillium dahliae* infecting olive in Andalusia, southern Spain. *Phytopathology*, **98**: S75.
- JIMÉNEZ DÍAZ, R. M., RODRÍGUEZ JURADO, D., NAVAS CORTÉS, J. A., MERCADO BLANCO, J., TRAPERO CASAS, J. L. 2003. Estrategias de control de la Verticilosis del olivo. *Vida Rural*, **176**: 36-40.
- JIMÉNEZ DÍAZ, R. M., RODRÍGUEZ JURADO, D., LANDA DEL CASTILLO, B. B., TRAPERO CASAS, J. L., NAVAS CORTÉS, J. A. 2008b. Dispersión de la Verticilosis a través de las hojas de olivos infectadas por el patotipo defoliante. *Vida Rural*, **265**: 40-44.
- LANDA, B. B., NAVAS-CORTÉS, J. A., JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. 2004. Integrated management of Fusarium wilt of chickpea with sowing date, host resistance, and bio-control. *Phytopathology*, **94**: 946-960.
- LANDA, B. B., NAVAS-CORTÉS, J. A., HERVÁS, A., JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. 2001. Influence of temperature and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on suppression of Fusarium wilt of chickpea by rhizosphere bacteria. *Phytopathology*, **91**: 807-816.
- LEVIN, A. G., LAVEE, S., TsrOR (LAHKIM), L. 2003. Epidemiology of *Verticillium dahliae* on olive (cv. Picual) and its effect on yield under saline conditions. *Plant Pathol*, **52**: 212-218.
- LÓPEZ-ESCUDERO, F. J., DEL RÍO, C., CABALLERO, J. M., BLANCO-LÓPEZ, M. A. 2004. Evaluation of olive cultivars for resistance to *Verticillium dahliae*. *Eur J Plant Pathol*, **110**: 79-85.
- LÓPEZ-ESCUDERO, F. J., BLANCO-LÓPEZ, M. A. 2005. Recovery of young olive trees from *Verticillium dahliae*. *Eur J Plant Pathol*, **113**: 365-375.
- LÓPEZ-ESCUDERO, F. J., BLANCO-LÓPEZ, M. A. 2007. Relationship between the inoculum density of *Verticillium dahliae* and the progress of *Verticillium* wilt of olive. *Plant Dis*, **91**: 1372-1378.
- MADDEN, L. V., HUGHES, G., VAN DEN BOSCH, F. 2007. The Study of Plant Disease Epidemics. APS Press, St Paul, MN.
- M.A.P.A. 2006. Encuesta sobre superficie y rendimiento de cultivos. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación., Madrid.
- 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 Pathol*, **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. *Eur J Plant Pathol*, **108**: 1-13.
- MERCADO-BLANCO, J., RODRÍGUEZ-JURADO, D., PARRILLA-ARAUJO, S., JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. 2003. Simultaneous detection of the defoliating and nondefoliating *Verticillium dahliae* pathotypes in infected olive plants by duplex, nested polymerase chain reaction. *Plant Dis*, **87**: 1487-1494.
- MERCADO-BLANCO, J., RODRÍGUEZ-JURADO, D., HERVÁS, A., JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. 2004. Suppression of Verticillium wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. *Biol Control*, **30**: 4774-486.
- NAVAS-CORTÉS J. A., LANDA B. B., MERCADO-BLANCO J., TRAPERO-CASAS J. L., RODRÍGUEZ-JURADO D., JIMÉNEZ-DÍAZ R. M. 2008. Spatiotemporal analysis of spread of infections by *Verticillium dahliae* within a high tree density olive orchard. *Phytopathology*, **98**: 167-180.
- NEMEC, S., DATNOFF, L. E., STRANDBERG, J. 1996. Efficacy of biocontrol agents in plant mixes to colonize plant roots and control root diseases of vegetables and citrus. *Crop Protect*, **15**: 735-742.
- RALLO, L. 1998a. Sistemas frutícolas de secano: El olivar. Pgs. 471-487 en: Jiménez Díaz y J. Lamo de Espinosa (eds.). Agricultura Sostenible. Ediciones Mundi-Prensa, Agrofuturo, Life. Mundi-Prensa Libros, S.A. Madrid.
- RALLO, L. 1998b. El olivar y la innovación tecnológica. Pgs. 19-30 en: Gestión Agraria Integrada en Olivar. Agrofuturo, Madrid.
- 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. Córdoba.
- RODRÍGUEZ JURADO, D. BEJARANO ALCÁZAR, J. 2007. Dispersión de *Verticillium dahliae* en el agua utilizada para riego de olivares en Andalucía. *Bol. San. Veg. Plagas*, **33**: 547-562.
- RODRÍGUEZ, E., GARCÍA-GARRIDO, J. M., GARCÍA, P., CAMPOS, M. 2008. Large-scale epidemiological study and spatial patterns of Verticillium wilt in olive orchards in southern Spain. *Crop Protect*. 2008. DOI: 10.1016/j.cropro.2008.08.009.
- SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, M. E., RUIZ-DÁVILA, A., PÉREZ DE ALGABA, A., TRAPERO-CASAS, A. 1998. Occurrence and etiology of death of young olive trees in southern Spain. *Eur J Plant Pathol*, **104**: 347-357.
- THANASSOULOPOULOS, C. 1993. Spread of Verticillium wilt by nursery plants in olive groves in the Chalkidiki area (Greece). *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, **23**: 548-552.
- TJAMOS, E. C. 1993. Prospects and strategies in controlling Verticillium wilt of olive. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, **23**: 505-512.
- TJAMOS, E. C., JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. 1998. Management of disease. Páginas 55-57 en: J. Hiemstra, y D. Harris. (eds). Compendium of Verticillium Wilt in Trees Species. Ponsen & Looijen, Wageningen, Holanda.
- VILLALOBOS, F. J., TESTI, L., HIDALGO, J., PASTOR, M., ORGAZ, F. 2006. Modelling potential growth and yield of olive (*Olea europaea* L.) canopies. *Eur J Agron*, **24**:296-303.
- WILHELM, S., TAYLOR, J. B. 1965. Control of Verticillium wilt of olive through natural recovery and resistance. *Phytopathology*, **55**: 310-316.

(Recepción: 21 abril 2009)

(Aceptación: 14 octubre 2009)