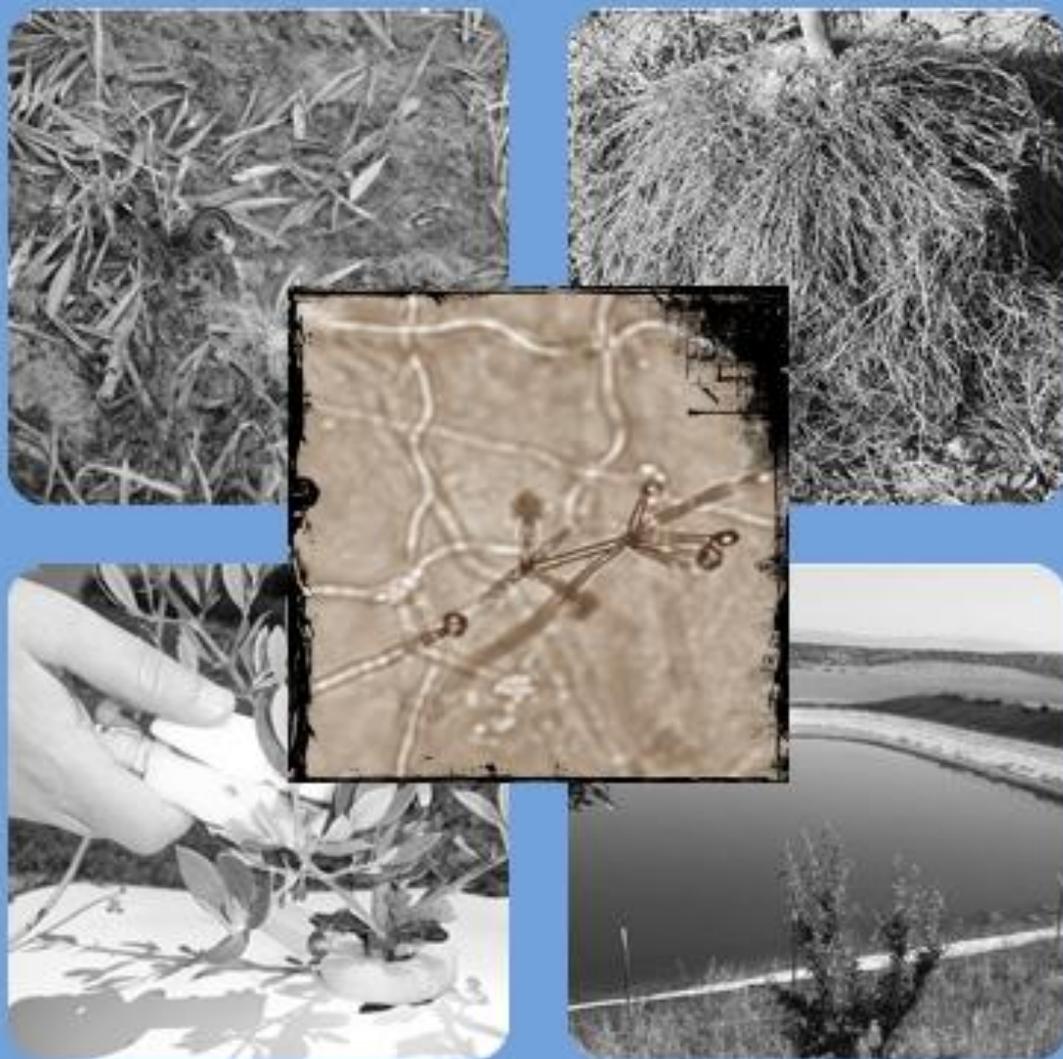


El **riego** en relación a la **Verticilosis del olivo**: manejo del agua de riego para reducir de manera **integrada** la enfermedad



TITULO: *El riego en relación a la Verticilosis del olivo: manejo del agua de riego para reducir de manera integrada la enfermedad*

AUTOR: *Antonio Santos Rufo*

© Edita: UCOPress. 2017
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Programa de doctorado Biociencias y Ciencias Agroalimentarias

Tesis Doctoral

El riego en relación a la Verticilosis del olivo: manejo del agua de riego para reducir de manera integrada la enfermedad

Irrigation and Verticillium wilt of olive: irrigation water management to reduce the disease in an integrated control framework

Doctorando

Antonio Santos Rufo

Directora

Dolores Rodríguez Jurado

*Área de Protección Vegetal Sostenible
Instituto de Investigación y Formación Agraria, Pesquera y Alimentaria (IFAPA)
Centro Alameda del Obispo de Córdoba*

Memoria de Tesis presentada para la obtención del Título de Doctor con
Mención Internacional por la Universidad de Córdoba

Junio 2017



TÍTULO DE LA TESIS:

El riego en relación a la Verticilosis del olivo: manejo del agua de riego para reducir de manera integrada a enfermedad

DOCTORANDO/A:

Antonio Santos Rufo

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

El trabajo titulado “El riego en relación a la Verticilosis del olivo: manejo del agua de riego para reducir de manera integrada a enfermedad”, realizado por Antonio Santos Rufo, se considera finalizado y reúne los requisitos necesarios para su exposición y defensa como Tesis Doctoral. Las investigaciones se han desarrollado en el Área de Protección Vegetal Sostenible del Instituto de Investigación y Formación Agraria, Pesquera y Alimentaria (FAPA) en su Centro “Alameda del Obispo” de Córdoba. Durante las mismas se han valorado los efectos de distintos tratamientos de riego por goteo superficial sobre diferentes propágulos de *Verticillium dahliae* en el suelo y sobre el desarrollo de la Verticilosis del olivo (VO), se han comparado parámetros morfológicos, de biomasa y fisiológicos en plantones de olivo sujetos a tratamientos de riego que causan respuestas diferenciales a la VO; y, para complementar el manejo del agua de riego, se ha evaluado la eficacia de desinfectantes químicos para reducir las conidias de *V. dahliae* en el agua. Se encontraron tratamientos de riego que reducen el desarrollo de VO, la infección de los plantones y los niveles de *V. dahliae* en el suelo y se identificaron parámetros de crecimiento, de biomasa y fisiológicos que modificados por el tratamiento de riego pudieron haber contribuido a la reducción de VO. Se ha demostrado que la desinfección del agua embalsada erradica o reduce las infestaciones del agua por conidias del hongo en ambiente natural.

Los resultados obtenidos han sido objeto de dos artículos científicos en revistas incluidas en el primer cuartil de la relación de revistas de la especialidad de Agronomía referidas en el Journal Citation Reports y de un artículo enviado a una revista científica de iguales características. Los resultados se han reflejado también en cinco contribuciones de carácter divulgativo, cuatro aportaciones a congresos internacionales y siete a congresos de ámbito nacional. El doctorando ha realizado estancias internacionales en una Universidad de prestigio que le han sido de utilidad para ampliar su formación y su currículum en la disciplina de la Fitopatología.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 21 de Junio de 2017

Firma del/de los director/es

Fdo.: Dolores Rodríguez Jurado



TÍTULO DE LA TESIS: El riego en relación a la Verticilosis del olivo: manejo del agua de riego para reducir de manera integrada la enfermedad.

DOCTORANDO/A: ANTONIO SANTOS RUFO

ESCRITO RAZONADO DEL RESPONSABLE DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

(Ratificando el informe favorable del director. Sólo cuando el director no pertenezca a la Universidad de Córdoba).

D. **ANTONIO TRAPERO CASAS**, Catedrático de Producción Vegetal (Patología Vegetal) de la Universidad de Córdoba, como responsable de la línea de investigación con título “Protección Vegetal”

INFORMA:

Que el trabajo de investigación titulado “**El riego en relación a la Verticilosis del olivo: manejo del agua de riego para reducir de manera integrada la enfermedad**”, realizado por el doctorando D. **Antonio Santos Rufo** bajo la dirección de la Dra. **Dolores Rodríguez Jurado**, puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en la Universidad de Córdoba y ratifico la consideración favorable emitida por la Directora de la tesis doctoral a tal efecto.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 26 de Junio de 2017

Firma del responsable de línea de investigación

Fdo.: Antonio Trapero Casas



TÍTULO DE LA TESIS: El riego en relación a la Verticilosis del olivo: manejo del agua de riego para reducir de manera integrada la enfermedad.

DOCTORANDO/A: ANTONIO SANTOS RUFO

D. FRANCISCO JAVIER LÓPEZ ESCUDERO Profesor Titular de Producción Vegetal (Patología Vegetal) de la Universidad de Córdoba, como Tutor del mencionado doctorando

INFORMA:

Que el trabajo de investigación titulado “**El riego en relación a la Verticilosis del olivo: manejo del agua de riego para reducir de manera integrada la enfermedad**”, realizado por el doctorando **D. Antonio Santos Rufo** bajo la dirección de la Dra. **Dolores Rodríguez Jurado**, puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en la Universidad de Córdoba y ratifico la consideración favorable emitida por la Directora de la tesis doctoral a tal efecto.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 26 de Junio de 2017

Firma del tutor de la Universidad de Córdoba

Fdo.: Fco. Javier López Escudero

Mención de doctorado internacional

La presente tesis cumple los requisitos establecidos por la universidad de Córdoba para la obtención del título de Doctor con Mención Internacional:

- Estancia internacional predoctoral de 3 meses (del 8 de Enero del 2014 al 7 de Abril del 2014) en la Universidad de Agricultura de Atenas (Grecia). El supervisor de la estancia fue el Prof. E. J. Paplomatas, Director del Laboratorio de Patología Vegetal.
- La tesis cuenta con el informe previo de dos doctores externos con experiencia acreditada pertenecientes a alguna institución de educación superior o instituto de investigación diferente a España:
 - Dr. Giovanni N. Bubici, Researcher. Departamento: Consiglio Nazionale delle Ricerche. Institución: Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, Bari, Italy.
 - Dr. Sotiris Tjamos, Assistant Professor. Departamento: Phytopathology. Institución: Agricultural University of Athens. Athens, Greece.
- Como miembro del tribunal, un doctor perteneciente a alguna institución de educación superior o centro de investigación no español forma parte del tribunal evaluador de la tesis:
 - Dr. José M. Moutinho Pereira, Professor. Facultad: Life and Environmental School. Institución: University of Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real, Portugal.
- Parte de la Tesis doctoral, de acuerdo a la normativa, se ha redactado y se presentará en dos idiomas, castellano e inglés.

El Doctorando



Fdo.: Antonio Santos Rufo

Agradecimientos

He de reconocer que desde que empecé esta aventura, hace ya unos cuantos años, nunca tuve muy claro si podría con ella. Hoy, habiendo conseguido finalizar esta Tesis, creo haberme superado tanto a nivel profesional como personal y por ello agradezco a todas las personas que de una forma u otra han compartido conmigo estos años de mi vida y sin cuya ayuda no me hubiera sido posible llegar hasta aquí.

Mis primeras palabras de agradecimiento van para mi directora, Dolores Rodríguez, quien ha sabido sacar de mí el máximo potencial que hasta ahora nadie logró y sin cuyo apoyo nada de esto hubiera sido posible. Gracias Lola, por tus contribuciones y confianza, por acompañarme a tu manera en los buenos y malos momentos, y por seguir estando ahí.

A Victorino Vega, Javier y Juan Carlos Hidalgo, así como a todo su equipo. Sin sus conocimientos, predisposición y buen juicio a la hora de tomar decisiones, no podríamos haber llevado a cabo nuestras ideas. Gracias

A mi tutor, Javier López Escudero, por sus consejos y charlas revitalizantes.

A Sotiris Tjamos, por su desinteresada ayuda, por haberme introducido en el mundo molecular y por hacerme creer más en mí mismo.

A todo el personal del centro IFAPA “Alameda del Obispo” de Córdoba, por su excelente labor diaria y por hacerme sentir tan a gusto en el trabajo.

A Raquel Moraño, por haberme ayudado y enseñado tanto en el poco tiempo que coincidimos.

A Fran, por ser mi compañero de penas y alegrías.

A Toni, el año que viniste a IFAPA me salvaste la vida.

A Rocío y Pepe, por el buen ambiente de trabajo que siempre hubo en el laboratorio.

A los compañeros del despacho presidencial, los que estamos y los que han pasado, en especial a Miguel.

A todo el grupo tan bueno de becarios que empezamos (Los Koalas).

A mis compañeros de la Universidad de Atenas Basilis, Danai y Stabros. Efgaristó parapolí.

A mis amigos Gonzalo, Curro, Javi, Darío, Héctor, Nacho, Estrella, Mari, Cristina, y en especial a José y Centeno, siempre habéis estado ahí.

A todo el grupo de Agrónomos de Leyenda.

A mi gente de Galicia, en especial a Raquel, mi amiga y pareja en este último tedioso periodo de la Tesis. Gracias por soportarme y por seguir a mi lado, aunque a distancia.

A mi cuñado Álvaro, siempre animándome.

A Cristi y Alvarito, sois una motivación para mí.

A mi hermana Cristina, por sus ánimos y consejos, poca gente tiene una hermana así.

A mis padres, quienes han estado, están y espero que estén por mucho tiempo sabiendo guiarme tal y como lo hacen. Sin ellos no sería nadie.

Al resto de mi familia, en especial a los que ya no están.

Y por último a Oto, mi más querido compañero y quien ha sabido conocerme mejor que nadie. Esta Tesis va por ti, colega.

Índice

Lista de Figuras	i
Lista de Símbolos	iii
Lista de Abreviaturas	v
Resumen	viii
Abstract	xii
Capítulo 1 Introducción General	1
1.1 El cultivo del olivo: importancia, distribución y antecedentes de la olivicultura moderna.....	3
1.1.1 <i>Las relaciones hídricas del olivo. El regadío del olivar</i>	4
1.2 Distribución e importancia de la Verticilosis del olivo	6
1.2.1 <i>Sintomatología de la enfermedad</i>	7
1.3 Etiología y ciclo biológico del patógeno	9
1.3.1 <i>Supervivencia y dispersión</i>	10
1.3.2 <i>Infección de la raíz</i>	12
1.3.3 <i>Colonización vascular</i>	13
1.3.4 <i>Desarrollo de síntomas</i>	14
1.4 Epidemiología de la Verticilosis del olivo	17
1.4.1 <i>Factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad</i>	18
1.4.1.1 Variabilidad patogénica de <i>V. dahliae</i> en olivo	18
1.4.1.2 Densidad de inóculo en el suelo	21
1.4.1.3 Cultivar de olivo	23
1.4.1.4 Temperatura y otros factores ambientales	25
1.4.1.5 El riego y otras prácticas de cultivo	27
1.5 Control Integrado de la Verticilosis del Olivo	34
1.5.1 <i>Medidas pre-plantación</i>	35
1.5.1.1 Utilización de material de plantación, suelo y agua libres del patógeno	35
1.5.1.2 Métodos de erradicación dirigidos al agua y al suelo	37
1.5.1.3 Utilización de cultivares resistentes.....	38
1.5.1.4 Utilización de microorganismos beneficiosos y antagonistas.....	39
1.5.2 <i>Medidas post-plantación</i>	40

El riego en relación a la Verticilosis del olivo: manejo del agua de riego para reducir de manera integrada la enfermedad

1.5.2.1	Métodos de exclusión en las aguas de riego.....	40
1.5.2.2	Métodos de erradicación y escape	41
1.6	Referencias	43
Capítulo 2 Objetivos.....		65
2.1	Esquema de la Tesis Doctoral.....	69
Chapter 3 Assessment of the effect of surface drip irrigation on <i>Verticillium dahliae</i> propagules differing in persistence in soil and on <i>Verticillium</i> wilt of olive.....		73
Chapter 4 Morpho-physiological responses of young olive trees to <i>Verticillium</i> wilt under different surface drip irrigation strategies.....		75
Chapter 5 Evaluation of chemical disinfestants in reducing <i>Verticillium dahliae</i> conidia in irrigation water		77
Chapter 6 Conclusions		79
4	Anejo 1: Otras contribuciones científicas.....	85
5	Anejo 2: Estancia predoctoral internacional	89

Lista de Figuras

Capítulo 1

- Figura 1.1 Porcentaje de distribución de las balsas según el uso del agua en Andalucía y mapa de uso mayoritario por municipio. Fuente: Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio. 5
- Figura 1.2 Porcentaje de olivos con síntomas de Verticilosis en Andalucía. Fuente: Visor de la Red de Alerta e Información Fitosanitaria de Andalucía. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. 7
- Figura 1.3 Ciclo biológico tipo del hongo de suelo *Verticillium dahliae* (Composición: A. Santos; Imagen: Beatriz Morera Oliveros; Fuente: Red de Alerta e Información Fitosanitaria. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural). 9
- Figura 1.4 Distribución en Andalucía de los patotipos Defoliante y No Defoliante de *Verticillium dahliae*. Fuente: Rafael M. Jimenez Díaz, 2009. Phytoma, 209: 29-38. 20
- Figura 1.5 Distribución territorial de las principales variedades de olivo en Andalucía. Fuente: Modelo de explotaciones olivareras. Dpto de Prospectiva. Agencia de Gestión Agraria y Pesquera de Andalucía. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. 24
- Figura 1.6 Distribución geográfica en Andalucía de los campos de olivo que utilizaron para regar agua infestada por *Verticillium dahliae*. Fuente: Rodríguez Jurado y Bejarano Alcázar, 2007. Vida Rural, 46: 48-52. 31
- Figura 1.7 Grupos de virulencia de *Verticillium dahliae* sobre olivo presentes en las aguas subterráneas y superficiales utilizadas para el riego de olivares en Andalucía en dos campañas consecutivas (A y B). Fuente: Moraño Moreno *et al.*, 2011. Expoliva OLI-08, 6 págs. 34
- Figura 1.8 Estrategia de lucha integrada contra la Verticilosis del olivo (Adaptado de López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011). 35

Lista de Símbolos

A = asymptotic parameter in the critically damped model

B = locational parameter in the critically damped model

C = locational parameter in the critically damped model

dy/dt = derivative function of the disease incidence progress curves

g_s = leaf stomatal conductance

P_n = net photosynthesis

S_Ψ = water stress integral

$\rho_{(1, 2, 3)1}$ = upper asymptotes of each of the three disease phases in the logistic model

$\rho_{(1, 2, 3)2}$ = initial level of disease of each of the three disease phases in the logistic model

$\rho_{(1, 2, 3)3}$ = rate of disease incidence increase of each of the three disease phases in the logistic model

t = time measured in weeks in the logistic and critically damped models

λ = rate parameter in the critically damped model

Ψ = leaf water potential

Lista de Abreviaturas

A = average leaf area

ANOVA = Analysis of variance

AUDPC = area under disease progress curve

AUGPC = area under the growth progress curves

AUIPC_{ID} = area under the progress curves of ID

AUIPC_{MpD} = area under the progress curves of MpD

AUIPC_{S_wD} = area under the progress curves of S_wD

AUIPC_{S_dD} = area under the progress curves of S_dD

CFU = colony-forming units

CWA = water agar amended with chlorotetracycline

CSS = cornmeal-sand substrate

D = stem diameter (Chapter 4)

D = defoliante / defoliating (Capítulo 1 y Chapter 5)

DAWT = daily accumulated water temperature

DE = densidad de esclerocios

DI = disease incidence

DII = disease intensity index

dpc = days post-chemical treatment

dpfc = days post-first chemical treatment

dpfi = days post-first infestation

DF = daily irrigation frequency

DWF = daily-weekly irrigation frequency

HR = high range of soil water content

ID = total inoculum density

IDP = incidence of dead plants

IIP = incidence of infected plants

IRP = incidence of recovered plants

L = number of leaves

LR = low range of soil water content

LS = leaf size
L_{wr} = leaf weight ratio
MpD = wet soil micropropagule density
MSPA = modified sodium polypectate agar
ND = no defoliante / non-defoliating
PCA = principal component analysis
PCR= polymerase chain reaction
PDA = potato dextrose agar
PDB = potato dextrose broth
PE = preventive efficacy
ppg = propágulos por gramo de suelo secado al aire
RA = relative aboveground biomass
RB = relative belowground biomass
RCA = rango de contenidos de agua en el suelo
R:S = root to shoot ratio
RW = relative whole biomass
RWC = range of soil water content
R_{wr} = root weight ratio
SE = suppressive efficacy
SL = shoot length
S_dD = air-dried soil sclerotia density
St_{wr} = stem weight ratio
S_wD = wet soil sclerotia density
S_{wr} = shoot weight ratio
V = canopy volume
VO = Verticilosis del olivo
VWO = Verticillium wilt of olive
WF = weekly irrigation frequency
WUE_B = water use efficiency of biomass production

Resumen

La Verticilosis del olivo (VO) causada por el hongo de suelo y colonizador vascular *Verticillium dahliae* Kleb., es la enfermedad más grave de este cultivo desde las perspectivas fitopatológica y económica. En el contexto actual de una creciente superficie de olivar en regadío unido al conocimiento de que el riego afecta a la VO y a la posible presencia de *V. dahliae* en el agua de riego en Andalucía, no solo es importante saber qué estrategia de riego (con agua no infestada) puede contribuir a paliar la VO sino también conocer el estado fitosanitario respecto a *V. dahliae* del agua de riego para desinfectarla en el caso de estar contaminada. Separar los efectos del agua sobre el desarrollo de la VO de los efectos del aporte reiterado de inóculo a través del agua de riego ayudaría a comprender mejor porqué el riego influye en la VO y a poder integrar ambas medidas de manejo cuando las circunstancias lo requieran.

El primer objetivo de este trabajo consistió en evaluar el efecto del riego sobre *V. dahliae* en el suelo y sobre la VO, ya que para un manejo integrado eficaz de la VO es importante establecer si los tratamientos de riego (usando agua libre de *V. dahliae*) que minimizan la enfermedad, también reducen el inóculo más y menos persistente del patógeno en el suelo. Para ello, se dispuso un ensayo con la combinación susceptible cultivar de olivo Picual-aislado defoliante (altamente virulento) de *V. dahliae* bajo condiciones de ambiente natural, donde los plantones crecieron en macetas de grandes dimensiones y se regaron para dos rangos de contenidos de agua en el suelo (RCA; alto y bajo) a tres frecuencias de riego superficial por goteo. En el suelo infestado e independientemente de la temperatura y del RCA, los eventos diarios de riego condujeron a mayores reducciones en la incidencia (39.2%) e índice de intensidad de la enfermedad (43.9%) en los plantones que otras frecuencias de riego, así como de micropropágulos (MpD), o propágulos del hongo menos persistentes (88.0%) en el suelo. A su vez, el RCA alto ocasionó menores niveles de esclerocios o estructuras más persistentes (70.8-84.9%) en el suelo pero un mayor porcentaje de plantones infectados (18.0%) que el RCA bajo, con independencia de la frecuencia de riego. El riego diario a RCA bajo mitigó el

desarrollo de la VO y redujo la incidencia de infección, manteniendo el suelo a los niveles más bajos de MpD y resultando en la menor cantidad de esclerocios en el suelo tras dos años y medio.

Bajo las condiciones anteriormente descritas (los mismos tratamientos de riego), el siguiente objetivo fue comparar las respuestas morfológicas y fisiológicas en plántones de olivo crecidos en suelo infestado y no infestado por *V. dahliae* sometidos a tratamientos de riego por goteo que causan reacciones diferenciales a la VO, y determinar cuáles de estas respuestas ayudan a explicar los efectos del riego sobre la enfermedad. De manera general, las respuestas comparadas fueron afectadas por el RCA, la frecuencia de riego y *V. dahliae* como factores simples. El hongo redujo los parámetros morfológicos y fisiológicos. El riego a RCA alto resultó en una relación de peso seco raíz/planta completa más baja que el RCA bajo, lo que pudo favorecer las infecciones radiculares y la colonización vascular a RCA alto. Además, el riego diario pudo prevenir el incremento en síntomas característico de otras frecuencias de riego por ocasionar los mayores incrementos de crecimiento en longitud y biomasa de la parte aérea del plánton junto con los valores más altos de potencial hídrico, mejorados por una reducción menor de la conductancia estomática.

El último objetivo consistió en evaluar la eficacia de la desinfestación química del agua para reducir las conidias de *V. dahliae*. Tres desinfestantes se testaron por su eficacia frente a infestaciones por conidias previas (eficacia supresiva) y subsiguientes (eficacia preventiva) al tratamiento químico en función de la concentración del desinfestante y la virulencia diferencial de los aislados de *V. dahliae* sobre olivo. Las concentraciones recomendadas para OX-VIRIN[®] y OX-AGUA AL 25[®], basados principalmente en agentes oxidantes y no oxidantes, respectivamente, mostraron mayor eficacia supresiva y preventiva que las recomendadas para el producto a base de hipoclorito de sodio. Los ensayos de simulación de la desinfestación del agua embalsada infestada con conidias realizados en ambiente natural en primavera, demostraron que OX-VIRIN[®] aplicado cada 28 días al agua a una concentración recomendada por el fabricante fue 100% eficaz después de 56 días.

En el contexto actual del olivar en regadío, los resultados obtenidos suponen un avance significativo con relación al manejo del riego para el control integrado de la VO. Se ha demostrado que determinadas estrategias de riego reducen el desarrollo

de VO, la infección de los plantones, los propágulos menos persistentes de *V. dahliae* en el suelo y a medio plazo también los esclerocios; las mismas estrategias de riego en presencia del hongo en el suelo son las que disminuyen menos el uso eficiente del agua y el potencial hídrico entre otros. Existen desinfectantes que aplicados directamente al agua reducen considerablemente a *V. dahliae* pudiendo disminuir el incremento del hongo en el suelo.

Abstract

Verticillium wilt of olive (VWO), caused by the vascular-colonizing, soilborne fungus *Verticillium dahliae* Kleb., is the most serious disease affecting this crop, in terms of the potential phytopathological and economic consequences. The current context of an ever-expanding area dedicated to irrigated olive groves, together with the knowledge that irrigation affects VWO and the possible presence of *V. dahliae* in irrigation water in Andalusia, makes it important to not only determine which irrigation strategy (with non-infested water) may help mitigate VWO, but also to know the phytosanitary status of irrigation water in terms of *V. dahliae* infestation, so that it can be disinfected if it is contaminated. Separating the effects of water on the development of VWO from the effects of repeated inoculum supply through irrigation water would help to better understand why irrigation has an effect on VWO, and thus to be able to integrate both management measures when circumstances require it.

The first objective of this study was to evaluate the effect of irrigation on *V. dahliae* in soil and on VWO since, to ensure efficient integrated management of VWO, it is important to establish whether irrigation treatments (with *V. dahliae*-free water) that mitigate the disease, also reduce the levels of more and less persistent propagules of the pathogen in the soil. To that end, a trial was carried out with the Picual olive cultivar and a highly virulent *V. dahliae* defoliating isolate. The susceptible combination was placed under natural environmental conditions, where plants were grown in large pots and were irrigated to two ranges of soil water content (RWC; high and low) at three surface drip-irrigation frequencies. In the infested soil, regardless of temperature and RWC, daily irrigation events led to greater reductions in disease incidence (39.2%) and disease intensity index (43.9%) than in plants under other irrigation frequencies, as well as to greater reductions in micropropagules (MpD), or less persistent fungus propagules, in the soil (88.0%). On the other hand, high RWC caused lower levels of sclerotia, or more persistent structures, in the soil (70.8-84.9%), but a higher percentage of infected plants (18.0%) than low RWC, regardless of

the frequency of irrigation. Daily irrigation to low RWC helped halt the development of VWO and reduced the incidence of infection, keeping the soil at the lowest levels of MpD and resulting in the least amount of sclerotia in the soil after two and a half years.

Under the conditions described above (the same irrigation treatments), the next objective was to compare the morphological and physiological responses in olive plants grown on *V. dahliae*-infested and non-infested soil, subjected to drip irrigation treatments that cause differential reactions in terms of VWO. The aim was to determine which of these responses help explain the effects of irrigation on the disease. In general, the comparative responses were affected by RWC, irrigation frequency and *V. dahliae*, as simple factors. The fungus showed reduced morphological and physiological parameters. High RWC irrigation resulted in a lower root weight ratio than with low RWC, meaning that high RWC could favour root infections and vascular colonization. In addition, daily irrigation could prevent the increase in symptoms characteristic of other irrigation frequencies, as a result of the greater growth increases in length and biomass of the aerial part of the plants associated with this irrigation frequency, together with highest water potential values, improved by lower stomatal conductance reduction.

The last objective was to evaluate the efficacy of chemical water disinfection in reducing *V. dahliae* conidia. Three disinfectants were tested for their efficacy against previous (suppressive efficacy) and subsequent (preventive efficacy) conidia infestations, as a function of the concentration of the disinfectant and the differential virulence of *V. dahliae* isolates to olive trees. The recommended concentrations for OX-VIRIN® and OX-AGUA AL 25®, which are based primarily on oxidizing and non-oxidizing agents, respectively, showed greater suppressive and preventive efficacy than those recommended for the product based on sodium hypochlorite. Simulated disinfection assays of stored and conidia-infested water performed under natural environmental conditions in spring demonstrated that OX-VIRIN® applied every 28 days to water at a concentration recommended by the manufacturer was 100% effective after 56 days.

In the current context of expanding irrigated olive groves, the results obtained represent a significant advance in relation to irrigation management for the

integrated control of VWO. It has been demonstrated that certain irrigation strategies reduce the development of VWO, the infection of the plants, the amount of less persistent propagules of *V. dahliae* in the soil and, in the medium term, also the sclerotia. In the presence of the fungus in the soil, those same irrigation strategies are the ones that least diminish the efficient water use and the water potential, among others. Disinfestants have also been identified which, when directly applied to the irrigation water, result in considerable reductions in *V. dahliae* and can help limit the increase of the fungus in the soil.

Capítulo 1

Introducción General

Capítulo 1: Introducción General

1.1 El cultivo del olivo: importancia, distribución y antecedentes de la olivicultura moderna

El olivo (*Olea europaea* L.) fue una de las primeras especies arbóreas domesticada y cultivada. Desde entonces, más que cualquier otro árbol frutal, ha jugado un papel vital para la especie humana por ser el eje del desarrollo de la cultura y la alimentación.

Actualmente, el olivo es cultivo leñoso no tropical más cultivado en el mundo, ocupando una superficie de 10.3×10^6 ha y produciendo un promedio anual de 15.4×10^6 t de fruto (FAO, 2014) destinado en el 90% a producción de aceite y el 10% restante a aceituna de mesa. Más del 90% del área global del cultivo y un porcentaje igual de aceite de oliva se localiza y produce en los países ribereños de la Cuenca Mediterránea, destacando España (COI, 2016; FAO, 2014). La mayor producción de fruto en España se concentra en Andalucía con el 60.2 % de las 2.6×10^6 ha cultivadas en esta comunidad (MAPAMA, 2016). Esta región mantiene, desde un punto de vista económico, un claro liderazgo mundial en el olivar, por ejemplo, en esta última campaña Andalucía produjo el 43.6 % del aceite y el 14.0 % de la aceituna de mesa del mundo (http://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/AFORO_OLIVAR_2016-2017.pdf; COI, 2016). El olivar es un elemento imprescindible de cohesión social y territorial de las comarcas en Andalucía que posee un alto valor medioambiental y su propia norma reguladora (Ley 5/2011, de 6 de octubre, del olivar de Andalucía; <http://www.juntadeandalucia.es/boja/2011/205/d1.pdf>), lo cual lo convierte en el primer cultivo en la UE al que se le atribuye una normativa específica.

En 1960, las estimaciones indicaban unas 8.5×10^6 ha de superficie de olivar a nivel mundial. El área de cultivo permaneció sin variaciones considerables hasta los años 80. A partir de esta década la introducción de técnicas agronómicas intensivas, y de nuevos cultivares, así como la puesta en marcha de esquemas de desarrollo para revitalizar o rentabilizar el olivar,

conllevó a la expansión de la superficie, que se elevó a más de 10^7 ha (COI, 2008), junto a la modernización de los olivares y el consiguiente aumento de la productividad. Estos cambios incluyeron el uso de cultivares comerciales producidos en vivero como material para establecer plantaciones de mayor densidad arbórea, la implementación del riego por goteo con laboreo reducido y aportes altos de fertilizantes (Rallo, 1998; Villalobos *et al.*, 2006). La puesta en riego del olivar, particularmente en Andalucía, ha llevado a reemplazar los olivares tradicionales con densidades de 100 árboles/ha por olivares intensivos (400 a 600 árboles/ha) o incluso superintensivos (2.000 árboles/ha) (Navarro y Parra, 2008), dando lugar a un aumento proporcional en el número de árboles. Los datos de 2005 (8.65×10^7 árboles) revelaron que el número de olivos aumentó un 20.1% con respecto a los años sesenta (7.20×10^7) a nivel mundial (COI, 2008).

1.1.1 Las relaciones hídricas del olivo. El regadío del olivar

A diferencia de los cultivos herbáceos, el olivo dispone de mecanismos de regulación estomática que le permiten modular la tasa de transpiración en función de la demanda evaporativa impuesta por la atmósfera para así evitar la deshidratación. Además, es capaz de disminuir el potencial hídrico de la hoja a valores muy bajos, lo cual le permite captar agua del suelo por debajo del punto de marchitez permanente para compensar las pérdidas por transpiración. Esta combinación de mecanismos es muy infrecuente y ha dotado al olivo de una capacidad de resistencia a la sequía extraordinaria, aunque la productividad de éste responde negativamente a la falta de agua (Orgaz y Fereres, 2008).

El olivo es tradicionalmente un cultivo de secano aunque su rendimiento incrementa significativamente con el riego (Villalobos *et al.*, 2006, Hidalgo *et al.*, 2011). En la Cuenca Mediterránea en general, y en el sur de España en particular, ha habido un importante aumento en las aéreas dedicadas al riego en los últimos 20-25 años. En este sentido, las 80.3×10^3 ha de olivar en regadío existentes en Andalucía durante el año 1980 (7.0 % de la superficie total), regadas principalmente por pozas o inundación (Pastor, 2005), incrementaron cada año tras la gran sequía de 1993-95. Así, se llegó a 16.7×10^4 ha en el año 1996 (12.1 % de la superficie total), que aumentaron a $33.3 \times$

10^4 ha en 2005 (22.1 %) y hasta más de 50.0×10^4 ha en la actualidad (33,5%) (Anónimo, 1980, 1996, 2005; CAPDER, 2014), las cuales se riegan principalmente por goteo.

La rentabilidad que proporciona el riego es el resultado de una importante inversión del sector olivarero iniciada con la formación de Comunidades de Regantes en la década de los 90, constituidas para implementar grandes infraestructuras con tecnología de riego novedosa (sistemas de impulsión, sondeos, balsas de regulación, riego superficial por goteo, etc.) que incrementara la producción (Martín-Pérez *et al.*, 2005). El agua de riego es bombeada de la balsa a las parcelas de olivar, y la misma agua se bombea generalmente para regar cultivos cercanos tales como algodón, remolacha azucarera, hortalizas y maíz. El sistema de riego localizado, fundamentalmente por goteo, se emplea en cerca del 90 % de la superficie de olivar regada (Martín-Pérez *et al.*, 2005). Además, en las últimas décadas se ha producido un aumento importante del número de balsas de regulación, debido a que garantizan la flexibilidad del manejo del agua permitiendo el riego a demanda. Así, más de la mitad de las balsas andaluzas en 2006 se utilizaban para el riego (Fig.1.1). Si nos referimos al origen del agua, el 5.5 % de la superficie se riega con aguas residuales de población, el 24 % emplea aguas subterráneas, y finalmente el 70.5 % riega con aguas superficiales (Martín-Pérez *et al.*, 2005).

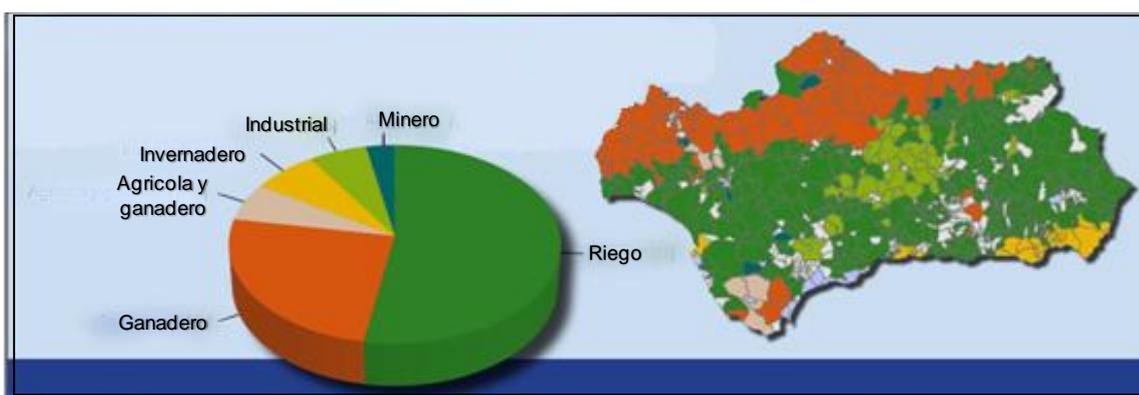


Figura 1.1 Porcentaje de distribución de las balsas según el uso del agua en Andalucía y mapa de uso mayoritario por municipio. Fuente: Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio.

1.2 Distribución e importancia de la Verticilosis del olivo

La Verticilosis del olivo (VO) es la enfermedad de este cultivo más extendida a nivel mundial, presumiblemente presente en todos los países de la Cuenca Mediterránea, y la más grave desde las perspectivas fitopatológica y económica (López-Escudero y Mercado-Blanco 2011; Tsrer, 2011; Jiménez-Díaz *et al.*, 2012).

La expansión de la olivicultura y los cambios en las prácticas de cultivo para aumentar los rendimientos se han producido concomitantemente con un aumento en la distribución e importancia de la VO a nivel mundial y regional. Así, desde que fue descrita por primera vez en Italia (Ruggieri, 1946), y poco después en California (Snyder *et al.*, 1950) y en Grecia (Zachos, 1963), se ha notificado la primera ocurrencia de la enfermedad entre 1970 y 2005 en casi todos los países de la Cuenca Mediterránea, Irán y Australia (Jiménez-Díaz *et al.*, 2012 y sus referencias; López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011 y sus referencias). A nivel regional, en el caso de Andalucía, la distribución de la enfermedad ha cambiado en las últimas casi 4 décadas. En las primeras prospecciones llevadas a cabo entre 1980 y 1983 la enfermedad estaba presente en 4 provincias (Blanco-López *et al.*, 1984), mientras que en 2014 la enfermedad estaba presente en todas, a excepción de Almería (Fig. 1.2) (Ruiz Torres, 2015).

Por otro lado, las primeras prospecciones realizadas en Grecia sobre un total de 1.4×10^7 árboles, señalaron incidencias medias del 2-3 % (Thanassouloupoulos *et al.* 1979). En España, prospecciones realizadas en Andalucía indicaron una incidencia media del 0.3% sobre un total de 6.1×10^5 árboles inspeccionados (Fig. 1.2), aunque en algunas provincias como Cádiz alcanzó incluso un 0.8 %. La prevalencia de la enfermedad en esta región, de un total de 1525 parcelas inspeccionadas, fue aproximadamente del 25 %, con provincias como Huelva y Jaén con valores del 45% y el 39.4%, respectivamente (Ruiz Torres, 2015). Similares prospecciones masivas de la VO en otros países oleícolas indicaron incidencias de 0.85-4.5% (6.5×10^6 olivos inspeccionados) en Siria (Al-Ahmad y Mosli, 1993), 18.3% de prevalencia media (1390 parcelas inspeccionadas) en la región de Apulia (Italia) (Nigro *et al.*, 2005), 35% de prevalencia de enfermedad con una incidencia media del

3.1% (919 parcelas inspeccionadas) (Dervis *et al.*, 2010) y 46.2 % de prevalencia (132 parcelas inspeccionadas) y 25.7 % de incidencia (303 olivos inspeccionados) en Líbano (Habib *et al.*, 2016).

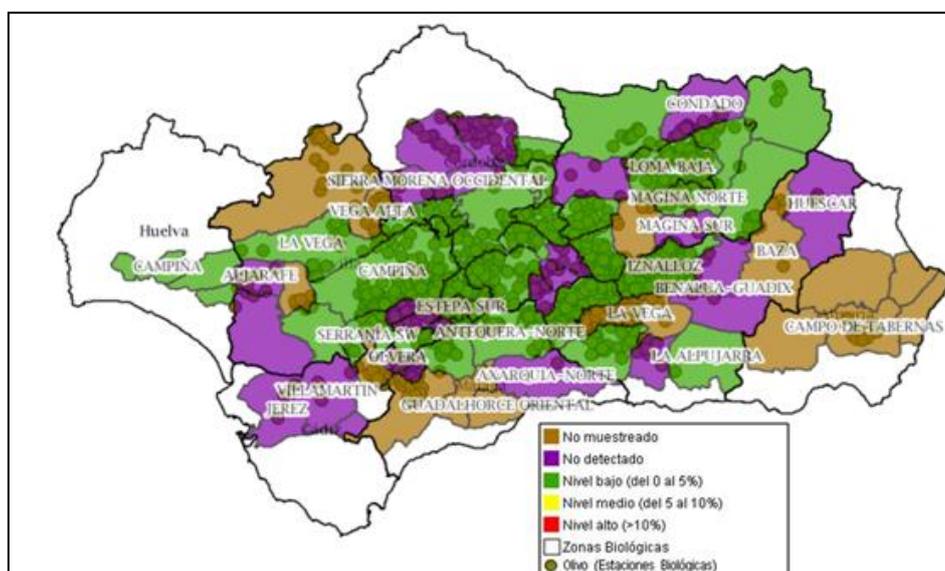


Figura 1.2 Porcentaje de olivos con síntomas de Verticilosis en Andalucía. Fuente: Visor de la Red de Alerta e Información Fitosanitaria de Andalucía. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural.

En referencia a las pérdidas ocasionadas por la VO, se han estimado pérdidas anuales del 1-2.3 % de la producción en países como Grecia y Siria (Thanassouloupoulos *et al.*, 1979; Al-Ahmad y Mosli, 1993) o reducciones del rendimiento por árbol afectado de hasta el 84 % en España (Jiménez-Díaz *et al.*, 2015) y el 87% en Israel (Levin *et al.*, 2003a; b).

1.2.1 Sintomatología de la enfermedad

Los síntomas de la VO no son tan característicos como los descritos en cultivos herbáceos y pueden ser confundidos con otras afecciones (infecciones producidas por otros hongos de suelo, desajustes minerales, asfixia radicular, ataques de insectos o los efectos de otros factores abióticos). La VO se manifiesta mediante dos tipos de síndromes denominado Apoplejía y Decaimiento Lento en España (Blanco-López *et al.*, 1984), también conocidos como Decamientos o formas aguda (Apoplejía) y crónica o gradual (Decaimiento Lento) de la VO en otros países (Zachos, 1963; Cirulli, 1981; Al-Ahmad y Mosli, 1993).

Una descripción detallada de ambos síndromes fue realizada por Blanco-López *et al.* (1984) en Andalucía, indicando que la Apoplejía se desarrolla entre final de invierno y principio de primavera comenzando con una tonalidad marrón clara de las hojas, que se enrollan longitudinalmente hacia el envés y permanecen secas adheridas al brote o rama, aunque en el caso de los árboles jóvenes pueden llegar a desprenderse en parte de los mismos. El síndrome apopléjico consiste en una muerte rápida de brotes, ramas principales y secundarias. Esta necrosis tiene lugar desde el extremo hacia la base del órgano y puede terminar con la muerte del árbol. A veces, en el xilema de las zonas afectadas se desarrolla una coloración castaño-oscura de distribución irregular. El síntoma más característico del Decaimiento Lento es la necrosis de las inflorescencias, que quedan momificadas y persisten en las ramas afectadas del árbol o caen. Las hojas de brotes afectados se tornan verde-mate y caen generalmente antes de secarse, salvo las más distales que permanecen adheridas hasta después del verano. Los síntomas en flores y hojas comienzan casi siempre al mismo tiempo, si bien en ocasiones los primeros preceden a los síntomas foliares, y ambos continúan con la muerte del brote que puede adquirir externamente un color pardo-rojizo de distribución sectorial, y en cuyos tejidos no siempre se observa una coloración castaño-oscura. Los síntomas de Decaimiento Lento empiezan a finales de abril y se desarrollan de forma gradual durante la primavera hasta principios del verano. Esto contrasta con el desarrollo de la Apoplejía, que no continúa tras la muerte de las ramas afectadas (Blanco-López *et al.*, 1984). Un mismo árbol puede sufrir ambos síndromes secuencialmente, aunque el desarrollo de éstos es distinguible en el tiempo.

Más recientemente se ha indicado en Andalucía que la enfermedad en árboles jóvenes de un cultivar susceptible (Arbequina) establecidos en regadío e infectados por una variante del patógeno muy virulenta (patotipo defoliante), puede manifestarse por una parcial o total defoliación de hojas verdes que tiene lugar principalmente desde finales de otoño a principios de primavera y que puede ocasionar la muerte de árboles (Navas-Cortés *et al.*, 2008).

1.3 Etiología y ciclo biológico del patógeno

El agente causal de la VO es el Ascomiceto mitospórico de suelo y colonizador vascular *Verticillium dahliae* Kleb. (Inderbitzin *et al.*, 2011, www.mycobank.org). El hongo se caracteriza por formar esclerocios melanizados negro-mate de forma variable y tamaño de 15-50 μm , ocasionalmente hasta 100 μm (Smith, 1965), aunque mayoritariamente superiores a 37-38 μm en suelos naturalmente infestados (Ashworth *et al.*, 1972; Smith y Rowe, 1984), y conidias de 1.4-3.2 x 2.5-8.0 μm formadas en conidióforos verticilados (Smith, 1965; Hawksworth y Talboys, 1970). Tres de los aspectos más significativos de este patógeno que hacen difícil el manejo de cualquier Verticilosis, y en concreto el de la VO, son su amplia gama de huéspedes, presentando uno de los rangos más amplios conocido entre los patógenos fúngicos de plantas, su capacidad para sobrevivir como esclerocios melanizados largo tiempo en el suelo, y el crecimiento confinado en el xilema durante su fase parasítica, pudiendo ocasionar infecciones asintomáticas (Wilhelm, 1955, Rodríguez Jurado, 1993; Mercado-Blanco *et al.*, 2001; 2003b; Karajeh y Masoud, 2006; European Food Safety Authority Panel on Plant Health, 2014). En el ciclo biológico de *V. dahliae* en olivo (Fig. 1.3), estos aspectos se materializan en una alta eficacia en supervivencia y dispersión.

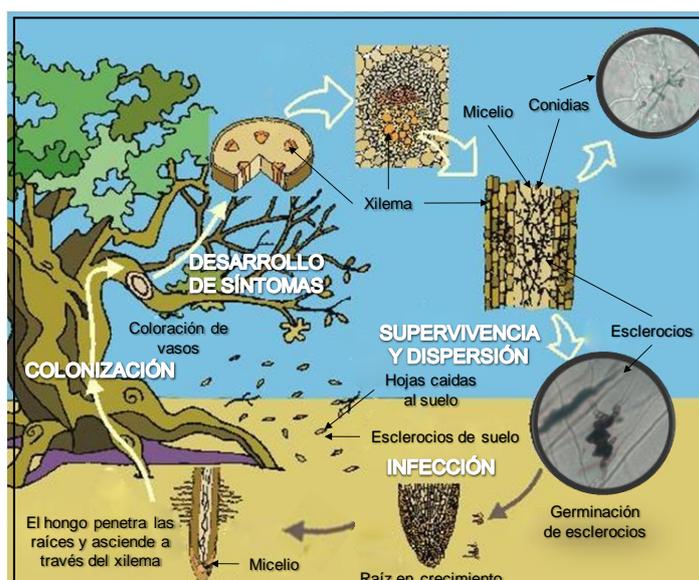


Figura 1.3 Ciclo biológico tipo del hongo de suelo *Verticillium dahliae* (Composición: A. Santos; Imagen: Beatriz Morera Oliveros; Fuente: Red de Alerta e Información Fitosanitaria. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural).

1.3.1 Supervivencia y dispersión

Durante la fase no parasítica, la capacidad de *V. dahliae* de crecer saprofiticamente es muy limitada (Isaac, 1967). El hongo es capaz de soportar condiciones adversas en el suelo por medio de esclerocios libres en el mismo, o incrustados en tejidos colonizados de hojas, tallos y raíces de diversos huéspedes (Evans, 1966; Ashworth *et al.*, 1974; Mol, 1995; Pegg y Brady, 2002; Rodríguez Jurado *et al.*, 2002; Bejarano Alcázar *et al.*, 2008). Los esclerocios están formados por células melanizadas de paredes gruesas que tienen una función de supervivencia, y células hialinas o menos pigmentadas de paredes delgadas (Schreiber y Green, 1963) y son predominantes en los diez primeros cm de suelo llegando a desaparecer a los 40 cm (Ben-Yephet y Szmulewith, 1985). Estas estructuras se forman extensamente en ramas, hojas, peciolo e inflorescencias de olivos afectados por la Verticilosis (Wilhelm y Taylor, 1965; Tjamos y Tsougriani, 1990; Estrada *et al.*, 2008; Jiménez-Díaz *et al.*, 2008; Trapero *et al.*, 2011), e incluso en las propias semillas de las aceitunas (Karajeh, 2006). En el caso de las hojas, los esclerocios se desarrollan 3-5.5 meses después de que las hojas verdes infectadas permanezcan enterradas en suelo de olivar (D. Rodríguez-Jurado y R. Jiménez-Díaz, datos no publicados). La persistencia en el suelo es favorecida además por la amplia gama de plantas huéspedes del hongo, más de 500 (Inderbitzin *et al.*, 2011), entre las que figuran malas hierbas dicotiledóneas e incluso gramíneas, las cuales pueden ser tanto portadoras sintomáticas como asintomáticas (Mathre, 1986; Vargas-Machuca, 1987; Heale, 1988). La presencia de malas hierbas huéspedes en una parcela aumentará la densidad de inóculo del hongo en el suelo y podrá dar lugar a cadenas de infección continuas que reducirían el tiempo de supervivencia (Thanassoulopoulos *et al.*, 1981; Pegg y Brady, 2002; Trapero y Blanco, 2008).

En suelos húmedos e incluso en ausencia de huésped, los esclerocios pueden germinar varias veces y dar lugar a micelio y conidias (Menzies y Grielbel, 1967; Green, 1969; Farley *et al.*, 1971; Moraño Moreno *et al.*, 2010b). Estas estructuras contribuyen a la supervivencia a corto plazo del patógeno ya

que se ha demostrado que pueden sobrevivir hasta dos semanas en el suelo (Green, 1969), y pueden persistir 1.5 meses en hojas de olivo infectadas sobre el suelo regado por goteo (D. Rodríguez-Jurado y R. Jiménez-Díaz, datos no publicados).

V. dahliae se considera un residente no agresivo del suelo y se mueve raramente más allá de algunos milímetros de donde se propaga (DeVay y Pullman, 1984). Sin embargo, cualquier factor que facilite el movimiento de suelo como agua de riego, aperos, maquinaria, vehículos y/o viento, puede dispersar a *V. dahliae* a corta distancia (Easton *et al.*, 1969; Thanassoulopoulos *et al.*, 1980; Rodríguez-Jurado y Bejarano-Alcázar, 2007; García-Cabello *et al.*, 2012). La dispersión a corta distancia dentro y entre parcelas es favorecida por la presencia en la parcela de órganos vegetales de olivo infectados, señalados antes, especialmente las hojas (Navas-Cortes *et al.*, 2008) y por la presencia de plantas huéspedes (Thanassoulopoulos *et al.*, 1981; Pegg y Brady, 2002; Trapero y Blanco, 2008). Todo lo que permita el movimiento de residuos vegetales infectados por *V. dahliae* procedentes de parcelas vecinas de olivar, algodónero, u otros huéspedes, dispersarán al hongo a corta distancia (Wilhelm y Taylor, 1965; Schnathorst y Sibbett, 1971; Navas-Cortés *et al.*, 2008). Quizás el caso más llamativo sea la transmisión del hongo en el estiércol de ovejas alimentadas con restos de cultivos infectados (Markakis *et al.*, 2014).

La dispersión de este patógeno a largas distancias, y por lo tanto su posible introducción en aéreas libres del patógeno, puede ocurrir por el uso para plantación de material vegetal infectado (Thanassoulopoulos, 1993; Hiemstra, 2015) y/o sustrato (Nigro *et al.*, 2005) infestado procedentes de los viveros. Este hecho puede deberse al establecimiento de los viveros en lugares cercanos a zonas intensamente infestadas por el patógeno (Naser y Al-Radad Al Momany, 1998) pero también, y más probablemente, a la utilización de material vegetal de partida con infecciones asintomáticas, las cuales son comunes (Mercado-Blanco *et al.*, 2001; 2003b). El Servicio de Sanidad Vegetal de Andalucía detectó en los años 2006 y 2007 olivos infectados por *V. dahliae* aunque asintomáticos en el 5,5% de más de 600 viveros registrados en el sur de España (Jiménez-Díaz *et al.*, 2011). El material procedente de los viveros, aun estando en conformidad con los requerimientos oficiales de la Unión Europea (diagnóstico visual; *Conformitas Agraria Communitatis*), pudo contribuir

a dispersar al hongo en esta zona. El agua de riego se considera uno de los principales agentes diseminante en Andalucía, donde se ha demostrado que el agua balsas, pozos y el agua de bombeo es una fuente de *V. dahliae* (Rodríguez-Jurado y Bejarano-Alcázar, 2007, Moraño Moreno *et al.*, 2008b; Rodríguez-Jurado *et al.*, 2008; Jiménez-Díaz *et al.*, 2011; García-Cabello *et al.*, 2012). Por último, se ha sugerido que en la dispersión de *V. dahliae* a olivares a grandes distancias, desempeña un papel fundamental el transporte de cosechas y restos de cultivos afectados, en particular algodónero (Wilhelm y Taylor, 1965; Schnathorst y Sibbett, 1971; Bejarano-Alcázar *et al.*, 2002).

1.3.2 Infección de la raíz

Los propágulos de *V. dahliae* son capaces de germinar en agua en condiciones de laboratorio (Mace *et al.*, 1981; Gómez-Gálvez y Rodríguez-Jurado, 2015). Sin embargo, en el suelo, la fungistasis y los microorganismos antagonistas parecen mantener la dormición de los esclerocios (Ashworth *et al.*, 1974; Green, 1980; Mace *et al.*, 1981), aunque bajo condiciones ambientales favorables, como la presencia de exudados radiculares de la planta huésped (Schreiber y Green, 1963; Lacy y Horner, 1966; Mol, 1995) o, sin la presencia de éstos, mediante el riego (Moraño Moreno *et al.*, 2010b), los esclerocios son capaces de germinar. Los esclerocios germinan a partir de las células de paredes delgadas (Schreiber y Green, 1963) con una tasa de germinación relacionada con su tamaño, siendo los esclerocios de 75 a 106 μm de tamaño los que germinan más rápido y de forma más sincronizada que aquellos de $<75 \mu\text{m}$ de tamaño (Hawke y Lazarovits, 1994). En un reciente estudio, Hu *et al.* (2014) demostraron que la germinación es óptima a 20 °C y un pH de 8.0, no siendo afectada por los distintos regímenes de nutrientes usados en su estudio. Según Saadatmand *et al.* (2006), la germinación de los esclerocios producidos en cultivo líquido decrece linealmente con el potencial matricial de 0 a -1,5 MPa, el cual influyó más en la germinación que el potencial osmótico.

Las observaciones microscópicas de Prieto *et al.* (2009) en un cultivar de olivo susceptible (Arbequina) crecido en condiciones de ambiente controlado, indican que la colonización extravascular de la superficie de las raíces es

rápida y contundente hasta alcanzar el sistema vascular. La entrada de *V. dahliae* en las células epidérmicas de la raíz fue predominantemente pasiva a través de macro y micro lesiones aunque la entrada activa del patógeno no fue descartada. De hecho se sabe que aislados del hongo procedentes de olivo expresan genes que controlan la degradación enzimática de las paredes celulares en presencia de exudados radicales de olivo (Gharbi *et al.*, 2015). En el estudio de Prieto *et al.* (2009), *V. dahliae* colonizó más intensamente las zonas de diferenciación y elongación de las raíces que las zonas meristemáticas e invadió con éxito la corteza de la raíz y los tejidos vasculares progresando a las partes aéreas de la planta a través de las células de los vasos del xilema.

No existen reseñas en nuestro conocimiento de la restricción a la infección vascular desde el córtex de la raíz en olivo. En general, todas las infecciones radicales por *V. dahliae* no consiguen entrar al tejido vascular (Gerik y Huisman, 1988). Por ejemplo, en algodónero se estimaron aproximadamente 5000 invasiones corticales de la raíz por cada infección vascular (Huisman y Gerik, 1989).

1.3.3 Colonización vascular

Las observaciones bajo microscópica óptica de Rodríguez Jurado (1993) en un cultivar susceptible (Picual), señalaron la presencia de hifas delgadas y conidias de *V. dahliae* en el xilema de la raíz 14 días después de la inoculación, al tiempo que el hongo fue aislado de tallos y brotes, lo que sugiere que las conidias fueron fácilmente transportadas longitudinalmente en el xilema gracias al sistema de transpiración de la planta. Antes de los primeros síntomas, el hongo se extendió restringido al a los vasos del xilema a lo largo del eje de la planta, colonizándola sistémicamente con rapidez y contundencia. Cuando aparecieron los primeros síntomas (24 días después de la inoculación), las hifas en el xilema de la raíz penetraron los poros de las placas de perforación y de las paredes laterales, forma en la que el hongo colonizó el xilema longitudinal y transversalmente (Rodríguez Jurado, 1993). Descripciones similares fueron realizadas por Baidez *et al.* (2007) en la parte aérea del cultivar Picual haciendo uso de microscopía electrónica de barrido y por Prieto

et al. (2009) con confocal en el cultivar Arbequina. En este cultivar el hongo se observó en el xilema de la raíz tan pronto como 9 días después de la inoculación y a los 30 y 40 días estuvo presente en el peciolo de hojas caídas y no caídas, respectivamente. Al final de la fase parasítica en reacciones susceptibles a la enfermedad, el xilema es extensamente colonizado por *V. dahliae*, el cual obstruye los vasos del xilema de la raíz y el tallo (Rodríguez Jurado, 1993; Baídez *et al.* 2007) donde puede formar esclerocios y/o crecer hacia fuera para colonizar el parénquima del xilema y los tejidos del floema, en los que también se forman esclerocios al menos en la raíz (Rodríguez Jurado, 1993).

1.3.4 Desarrollo de síntomas

La colonización vascular ocurre antes del desarrollo de síntomas en combinaciones cultivar de olivo-aislado de *V. dahliae* de diferente susceptibilidad (Rodríguez Jurado, 1993; Mercado-Blanco *et al.*, 2003a; Prieto *et al.*, 2009). Una cadena de respuestas no perceptibles a la infección tiene lugar en olivo. Hasta 18 genes han sido identificados como inducidos en los tejidos aéreos antes del desarrollo de síntomas en un estudio transcriptómico que involucraba una interacción cultivar-aislado resistente (Gómez-Lama Cabanás *et al.*, 2015). Similarmente, el análisis transcriptómico diferencial realizado a los 2 y 7 días tras la inoculación en una interacción cultivar-aislado susceptible, reveló la existencia de un gen diferencialmente expresado perteneciente a la planta altamente enriquecido en proteólisis, así como genes de plegado y biosíntesis de proteínas. Además, una especie reactiva de oxígeno fue inducida primero en el patógeno y más tarde en las raíces de la planta (Jiménez-Ruiz *et al.*, 2017). Respuestas bioquímicas diferenciales involucrando la expresión de genes relacionados con el ácido salicílico, jasmónico, proteínas PR, producción de agua oxigenada, chitinasas o etileno, entre otros, también han sido indicados (Markakis *et al.*, 2010; Gharbi *et al.*, 2016).

Los síntomas perceptibles de Verticilosis más comunes en plantones de olivo son la marchitez foliar gradual que puede finalizar con la desecación parcial o completa del plantón, la defoliación de hojas verdes y/o marchitas,

la clorosis foliar y la reducción en el crecimiento (Rodríguez Jurado *et al.*, 2009). Todos ellos son causados por los aislados denominados defoliantes. En general se admite que la marchitez vascular causada por *V. dahliae* y otros patógenos vasculares es el fenotipo que resulta del estrés hídrico por disminución de la conductancia hidráulica del xilema (Beckman, 1987; Pegg, 1989; Van Alfen, 1989). Sin embargo, el grado en que la reducción de la conductancia hidráulica explica la sintomatología de las Verticilosis es polémico (Bowden *et al.*, 1990). Las raíces y tallos del olivo reaccionan a la colonización del xilema por *V. dahliae* produciendo materiales de tipo polisacárido, agregados ópticamente densos y tilosas, los cuales obstruyen los vasos y probablemente el movimiento longitudinal y transversal del agua pudiendo disminuir la conductancia hidráulica del xilema (Rodríguez Jurado, 1993; Prieto *et al.*, 2009). La marchitez y otros síntomas, como clorosis o la reducción del crecimiento del plantón (Rodríguez Jurado *et al.*, 2009), parecen más el resultado de alteraciones fisiológicas que afectan al intercambio de gases por disminuir la transpiración, el cierre de los estomas y los niveles fotosintéticos, como ocurre en el patosistema patata-*V. dahliae* (Bowden *et al.*, 1990) y en algunas interacciones cacao-*V. dahliae* (Resende *et al.*, 1996). De otra parte, las alteraciones fisiológicas pueden resultar también de la formación de compuestos, como el etileno, originados como consecuencia de la degradación de las paredes celulares por enzimas hidrolíticas del patógeno (Mussell *et al.*, 1982). Así, a los incrementos en etileno se atribuye en parte la defoliación causada por *V. dahliae* en algodónero (Wiese y DeVay, 1970) y cacao (Resende *et al.*, 1996)

La literatura sobre el efecto de *V. dahliae* en el crecimiento y los procesos fisiológicos es extensa en cultivos herbáceos (Bowden *et al.*, 1990; Bowden y Rouse, 1991; Pennypacker *et al.*, 1991; Gaudreault *et al.*, 1995; Gent *et al.* 1995; Arbogast *et al.*, 1999; Sadras *et al.* 2000; Karagiannidis *et al.*, 2002; Pomar *et al.*, 2004; Pascual *et al.*, 2010) pero limitada para especies leñosas, especialmente olivo.

Los intentos de correlacionar los primeros síntomas visuales de la enfermedad con alteraciones de las tasas de transpiración fueron enmascarados por el estrés hídrico impuesto sobre plantas de álamo amarillo de 1 año de edad inoculadas con *V. albo-atrum* y sometidas a condiciones de

humedad del suelo favorables, periódicamente saturadas y crónicamente bajas (Morehart y Melchior, 1982). Sin embargo, en plántulas de cacao de siete días de edad inoculadas con dos aislados de *V. dahliae* de diferente virulencia (defoliante y no defoliante) y mantenidas bien regadas bajo condiciones de invernadero, Resende *et al.* (1996) observaron una rápida disminución en el potencial hídrico de las hojas y la conductancia estomática estrechamente asociada con el inicio de los síntomas foliares cuando las plántulas fueron inoculadas con el aislado menos virulento (no defoliante), mientras que la disminución de la conductancia estomática solo se dio cuando las plántulas expresaron los máximos síntomas al ser inoculadas con el aislado más virulento (defoliante).

En el caso del olivo, Calderón *et al.* (2013) midieron en verano a mediodía la conductancia estomática de la hoja en 25 árboles que cubrían un gradiente en los niveles de gravedad de la enfermedad, desde asintomáticos a árboles gravemente afectados, en una parcela de olivos 'Picual' de 12 años regados por goteo y naturalmente infectados por *V. dahliae*. La conductancia estomática mostró una tendencia negativa a medida que aumentaban los niveles de gravedad de la enfermedad, pudiendo discriminar con este parámetro entre árboles sanos y aquellos que se encontraban en las primeras etapas del desarrollo de la enfermedad.

Los cambios fisiológicos pueden traducirse en la modificación de la relación de peso entre raíz y tallo o la reducción del peso de las plantas. La reducción en peso encontrada en plantas infectada por *V. dahliae* será perceptible o no en función de la virulencia del aislado y la resistencia del cultivar pudiendo ocurrir incluso en infecciones asintomáticas (Rodríguez-Jurado *et al.*, 2009; Birem *et al.*, 2016). Calderón *et al.* (2014) describieron en condiciones artificiales una reducción promedio de la longitud (expresada como una tasa de crecimiento diaria relativa a los valores iniciales) y de peso seco de la parte aérea en una interacción cultivar de olivo-aislado de *V. dahliae* susceptible. Yaseen *et al.* (2012) encontraron también menor altura y peso seco de raíz en plántulas de un cultivar de olivo susceptible de 18 meses injertadas en *Olea oleaster* L. e inoculadas con una mezcla de aislados de *V. dahliae* poco virulentos. Más recientemente, Birem *et al.* (2016) demostraron la disminución del peso seco de la planta completa y de los brotes y hojas nuevas en

cultivares de olivo susceptibles y resistentes, respectivamente, inoculados con un aislado defoliante de *V. dahliae* en comparación con las respectivas plantas no inoculadas.

1.4 Epidemiología de la Verticilosis del olivo

El desarrollo epidémico de la VO ha sido descrito por un modelo logístico generalizado con un patrón sigmoide múltiple (Navas-Cortés *et al.*, 2008; Pérez-Rodríguez *et al.*, 2015a; 2016b). Las epidemias pueden estar influenciadas por la densidad y virulencia del inóculo en el suelo y la resistencia del cultivar, así como por la frecuencia de los encuentros del inóculo con el sistema radicular del huésped (Gilligan, 1994; Jiménez-Díaz *et al.*, 2012).

A escala de varias estaciones de crecimiento, además de los factores mencionados, otros relativos al patógeno como su supervivencia y capacidad de dispersión (Navas-Cortés *et al.*, 2008) en la parcela, e intrínsecos al cultivo como la edad, pueden afectar a la enfermedad. Se sabe que las epidemias son especialmente severas en árboles jóvenes (Thanassouloupoulos *et al.*, 1979; Blanco-López *et al.*, 1990), un aspecto muy a tener en cuenta en Andalucía, donde el 15.4% de los olivos en 2009 eran nuevos o de renovación (CAPDER, 2015) lo que ha conllevado una disminución de la edad media del olivar. Una característica de la enfermedad, es la recuperación natural de los síntomas. Este fenómeno ha sido observado en las Verticilosis de otras especies leñosas (Goud y Hiemstra, 1998) y también en olivo tanto en campo, sobre parcelas afectadas no tratadas (Wilhelm y Taylor, 1965; Blanco-López *et al.*, 1990; Levin *et al.*, 2003a; b; Bubici y Cirulli, 2014) o después de la solarización del suelo bajo la copa de árboles jóvenes afectados (López-Escudero y Blanco-López, 2001; Bubici y Cirulli, 2014) y adultos (Tjamos *et al.*, 1991), como en condiciones controladas y favorables para la enfermedad (Rodríguez-Jurado, 1993; Mercado-Blanco *et al.*, 2001; López-Escudero *et al.*, 2005a; Markakis *et al.*, 2009). En ambas situaciones (campo y condiciones controladas) la reducción de los síntomas se asoció a una disminución constante y finalmente un fracaso completo en el aislamiento del patógeno o la detección de ADN de *V. dahliae* en brotes asintomáticos y/o brotes recién desarrollados (Rodríguez

Jurado, 1993; Mercado-Blanco *et al.*, 2001; Levin *et al.*, 2003a; Markakis *et al.*, 2009; Bubici y Cirulli, 2014). En el seguimiento sintomatológico de la enfermedad realizado por Blanco-López *et al.* (1990) durante 5 años en dos parcelas (regadío y secano) bajo condiciones de moderada presión de enfermedad (cultivar susceptible-aislado poco virulento de *V. dahliae*) se observó que la incidencia de la enfermedad disminuyó exponencialmente (revisado por Jiménez-Díaz *et al.*, 2012). Otras investigaciones en similares condiciones señalan un bajo impacto de la recuperación de síntomas sobre la epidemiología de la enfermedad (Bubici y Cirulli, 2014). Aunque el patógeno fue inactivo en los tejidos del olivo, las infecciones repetidas de la raíz hicieron la recuperación transitoria, durando a menudo unos pocos meses, lo que evidentemente no retrasó el progreso de la enfermedad en la parcela.

1.4.1 Factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad

Los distintos factores de diversa naturaleza que se describen a continuación, pueden afectar a la VO. En el marco de esta Tesis Doctoral el riego tienen especial relevancia.

1.4.1.1 Variabilidad patogénica de *V. dahliae* en olivo

Las poblaciones de *V. dahliae* se consideran adaptadas al huésped en lugar de ser específicas del huésped, es decir, presentan patogenicidad cruzada pero son más virulentas (la virulencia se define aquí como la capacidad relativa de una cepa patógena para causar una cantidad de síntomas en huéspedes individuales o genotipos huéspedes) sobre el huésped de origen (Koike *et al.*, 1994; Bhat y Subbarao, 1999; Douhan y Johnson, 2001). Bajo presión de selección, la adaptación al huésped puede dar lugar a razas específicas de cultivos, como las razas 1 y 2 de *V. dahliae* identificadas sobre lechuga, tomate o girasol tras el uso de cultivares altamente resistentes de cada huésped (Alexander, 1972; Vallad *et al.*, 2006; Gulya, 2007), o a incrementos cuánticos en la virulencia, como ejemplifica el patotipo defoliante (D) de algodonero y de olivo que difiere mucho en virulencia del no defoliante (ND) (Schnathorst y Mathre, 1966; El-Zik, 1985; Bejarano-Alcázar *et al.*, 1996; Korolev *et al.*, 2008; Erdogan *et al.*, 2013). El patotipo D se describió por primera vez en California para aislados que causaron una defoliación severa en

una variedad de algodónero que previamente había sido tolerante a la Verticilosis (Schnathorst y Mathre, 1966) y dicho patotipo ocurre ahora prácticamente allá donde existen cultivos huéspedes (Jiménez-Díaz *et al.* 2012; Milgroom *et al.*, 2016). Los aislados del patotipo D causan defoliación rápida y severa sólo en algodónero, okra y olivo, pero también son patógenos en alcachofa, apio, berenjena, lino, cártamo, girasol y sandía, con un rango de virulencia (Schnathorst y Mathre, 1966; Jiménez-Díaz *et al.*, 2006; Korolev *et al.*, 2008). Por el contrario, los aislados que causan necrosis foliar y marchitez, pero no defoliación en algodónero, okra y olivo, se refiere que tienen un patotipo ND (Bell, 1994; Jiménez-Díaz *et al.*, 2012).

En líneas generales los aislados de *V. dahliae* originarios de olivo en España reproducen los dos fenotipos descritos indicándose que pertenecen a los patotipos D y ND. En condiciones controladas, el patotipo D causa con frecuencia la muerte de cultivares susceptibles mientras el otro patotipo raramente la ocasiona (Rodríguez-Jurado *et al.*, 1993; López-Escudero *et al.*, 2004) Las diferencias en la severidad de las reacciones inducidas por los patotipos D y ND en olivo están asociadas con la rapidez de distribución del patógeno en la planta, y la continuidad e intensidad de la colonización vascular, que es más intensa en las plantas con el patotipo D, según las observaciones microscópicas y moleculares, así como los aislamientos, realizados a distintos tiempos después de la inoculación (Rodríguez Jurado *et al.*, 1993; Mercado-Blanco *et al.*, 2003a; Markakis *et al.*, 2009). La naturaleza del patótipo que infecta a los árboles es un factor crucial para entender la epidemiología de la VO. En condiciones de campo y un cultivar susceptible, el tiempo hasta la aparición de la enfermedad, el progreso de la enfermedad y la distribución de los olivos afectados en la parcela son influenciados por la naturaleza del patótipo que infecta los árboles (Navas-Cortés *et al.*, 2008). En cuatro estaciones de cultivo según las investigaciones de Navas-Cortés *et al.* (2008), el número de árboles afectados aumentó de tres a 141, de los cuales 123 fueron infectados por el patotipo D y 18 por el patotipo ND. Mientras que la mayoría de los árboles infectados por ND fueron afectados al final de la primera temporada de cultivo, el número de árboles sintomáticos infectados por el patótipo D aumentó durante todo el período del estudio, posiblemente por la

alta eficacia en dispersión del patotipo D, en comparación con el ND, a través las hojas verdes infectadas caídas al suelo de la parcela.

La dispersión de aislados D en el Valle del Guadalquivir en el sur de España ha sido estudiada. Las poblaciones de aislados D se limitaban inicialmente a cultivos de algodón en las marismas del valle inferior (prospecciones realizadas en los años 80) y desde entonces, se han diseminado continuamente a zonas oleícolas distantes de ese foco inicial (Bejarano-Alcázar *et al.*, 1996; López-Escudero y Blanco-López 2001; Mercado-Blanco *et al.*, 2003b; Navas-Cortés *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2008). En 1994 fue detectado ocasionalmente por primera vez en olivos infectados en Sevilla (López-Escudero y Blanco-López, 2001). Más tarde, entre 2001 y 2005, este patotipo fue identificado por PCR en árboles infectados de forma natural en cuatro provincias, con una prevalencia del 67.7% en las tres provincias olivareras más importantes (Córdoba, Sevilla y Jaén) (Mercado-Blanco *et al.*, 2003b; Rodríguez *et al.*, 2008; López-Escudero *et al.*, 2010). Recientemente, se ha demostrado mediante análisis moleculares que el 78.1% de los aislados presentes en estas tres provincias y además en Granada y Huelva, pertenecen a este patotipo (Jiménez-Díaz *et al.*, 2011) (Fig. 1.4).

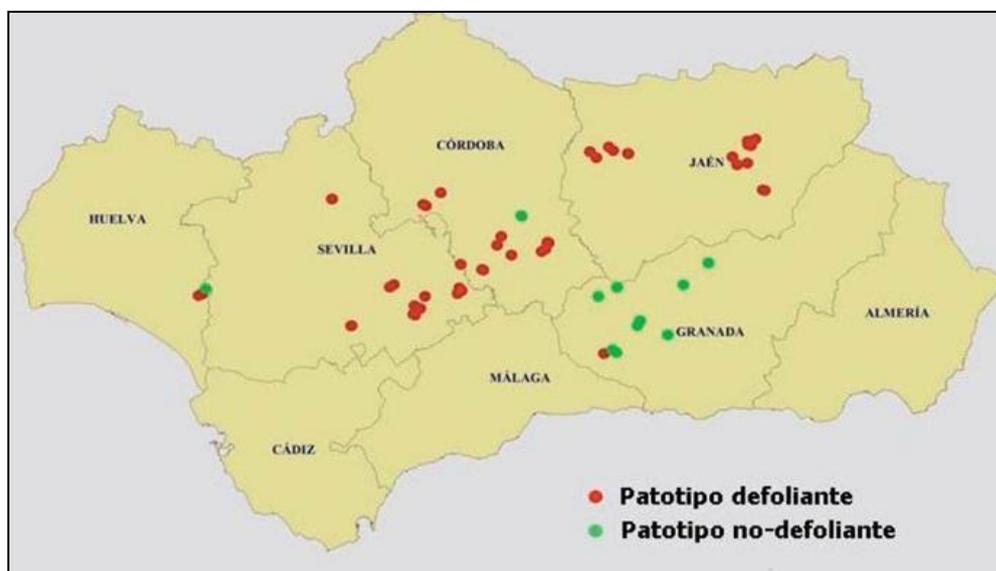


Figura 1.4 Distribución en Andalucía de los patotipos Defoliante y No Defoliante de *Verticillium dahliae*. Fuente: Rafael M. Jimenez Díaz, 2009. Phytoma, 209: 29-38.

Se ha identificado además un gradiente en virulencia entre los aislados de *V. dahliae* presentes en las aguas de riego de olivar en Andalucía. El patotipo y

la virulencia de 150 aislados monoconídicos de *V. dahliae* se caracterizó en el cultivar de olivo susceptible Picual. La virulencia de los aislados testados se comparó con la virulencia de aislados de referencia de los patotipos D y ND. Se diferenciaron cuantitativamente seis grupos de virulencia, tres de los cuales conformaron el patotipo D, y otros tres menos virulentos pertenecieron al patotipo ND. Los grupos de virulencia intermedia identificados para los patotipos D y ND (denominados DO2 y NDO2) se correspondieron con los dos grupos previamente conocidos (o grupos a los que pertenecen los aislados de referencia) y fueron en conjunto los más frecuentes en las aguas de riego de olivar. Sin embargo, para cada uno de los dos patotipos se encontraron también grupos de aislados de mayor (DO1 y NDO1) y menor (DO3 y NDO3) virulencia sobre olivo (Moraño Moreno *et al.*, 2010a; 2011).

1.4.1.2 Densidad de inóculo en el suelo

La relación entre la densidad de esclerocios (DE) del patotipo D de *V. dahliae* en la plantación, o antes de ésta, y el inicio y el progreso de la VO sobre plantas de un cultivar susceptible (Picual) fue descrita por López-Escudero y Blanco-López (2007). En su experimento, realizado en microparcelas infestadas artificialmente evaluaron siete niveles de DE que oscilaban entre 0 y 10 propágulos por gramo de suelo secado al aire (ppg). Niveles de inóculo iguales y superiores a 3 ppg estimados mediante tamizado húmedo (Huisman y Ashworth, 1974), resultaron en más del 50% de incidencia de enfermedad e incluso 1 ppg originó una incidencia del 11%. Como resultado, se concluyó que en suelos infestados por el patotipo D no deberían plantarse cultivares susceptibles (López-Escudero y Blanco-López, 2007). En el caso del patotipo ND, el umbral no ha sido establecido hasta la fecha, aunque se sabe que bajos niveles de inóculo también pueden causar una enfermedad sustancial en el olivo, especialmente en los cultivares altamente susceptibles. Por ejemplo, Roca *et al.* (2015) reportaron un 10% de árboles del cultivar Picual enfermos en una parcela con una densidad de inóculo de solo 1 ppg. Recientemente, se ha estimado mediante tamizado húmedo que la DE promedio en España es superior a 1 ppg, destacando Andalucía con una DE media de 4.5 veces la DE del resto del país (1.4 ppg) (Heis *et al.*, 2016).

Merece la pena aclarar que aunque con este bajo umbral comentado, normalmente son necesarios altos niveles de inóculo D para reproducir sólidamente la VO en cultivares altamente susceptibles bajo condiciones ambientales controladas cuando se utiliza mezcla de suelo artificial infestada (Calderón *et al.*, 2014), aún más, bajo condiciones ambientales naturales (Jiménez Díaz *et al.*, 2009). Además, son necesarios altos niveles de inóculo D para reproducir consistentemente la enfermedad y reducir el tiempo para iniciar los síntomas de VO en condiciones ambientales naturales, con el fin de no alargar los estudios durante más de dos a tres años; por ejemplo, 8 (López-Escudero y Blanco-López, 2007) ó 4 (Jiménez Díaz *et al.*, 2009) meses fueron necesarios para detectar síntomas en un cultivar susceptible cultivado en microparcelas con 10 o 650 ppg del patótipo D, respectivamente.

Goud y Termorshuizen (2003) revisaron los métodos existentes para cuantificar los esclerocios de *V. dahliae* en el suelo. Los métodos más utilizados son dilución en placas, tamizado seco o tamizado húmedo, e incubación en medios semiselectivos (Kabir *et al.*, 2004). La dilución del suelo en placas consiste en suspender una cantidad de suelo secado al aire en agua estéril (por ejemplo, 10 g de suelo en 100 ml de agua) en matraces, mezclar por agitación continua y sembrar en placas una alícuota de la suspensión (Nicot y Rouse, 1987). El método de tamizado seco consiste en distribuir las partículas de suelo lo más uniformemente posible en placas de agar colocadas en plataformas de un muestreador de aire de Andersen; esto permite que las partículas del suelo que impactan sobre el agar se seleccionen de acuerdo con el tamaño de los orificios en el fondo de una plataforma (Butterfield y DeVay, 1977). El método de tamizado húmedo incluye cribar la suspensión de suelo seco y molido para recuperar la fracción de suelo de 35 a 150 μm en agua (Huisman y Ashworth, 1974). Una comparación entre laboratorios de los métodos de tamizado seco y húmedo concluyó que no difirieron en los límites de detección, pero el tamizado seco fue menos variable a DE más altas y más variable en las más bajas que el tamizado húmedo (Termorshuizen *et al.*, 1998).

Los niveles de DE obtenidos de los análisis de suelos naturales han sido propuestos para establecer un sistema de predicción del riesgo con el fin de manejar la VO (López-Escudero y Blanco-López, 2007). La base teórica para la

comprensión de la dinámica de la DE de *V. dahliae* en el suelo es todavía limitada. Se ha avanzado poco en el modelado de esta dinámica principalmente debido a las incoherencias encontradas al correlacionar la DE en el suelo con la incidencia o intensidad de la enfermedad (Termorshuizen y Mol, 1995). Esto se podría explicar porque las ecuaciones utilizadas para el estudio del progreso de la enfermedad en el tiempo, como los modelos logísticos generalizados con un patrón sigmoide múltiple en olivo (Navas-Cortés *et al.*, 2008; Pérez-Rodríguez *et al.*, 2015a; 2016b), o mono-moleculares, Gompertz, Richards y Weibull, no pueden acomodar las curvas no monotónicas que normalmente presentan los patógenos de suelo, en las que hay un aumento, seguido por una disminución en la variable dependiente con el tiempo (Gilligan, 1990). En estos casos, los modelos amortiguados (under-damped, over-damped y critically damped models; Gilligan, 1994) podrían ser útiles para estudiar la dinámica de los niveles de esclerocios de *V. dahliae* en el tiempo, así como la variación de dicha dinámica según el método de cuantificación utilizado o tipo de propágulo cuantificado.

1.4.1.3 Cultivar de olivo

En comparación con los aislados del patótipo ND, aquellos del patótipo D son consistentemente más virulentos en los diferentes cultivares de olivo (López-Escudero *et al.*, 2004, Dervis *et al.*, 2010) y pueden causar un marchitamiento más severo con una densidad de inóculo en el suelo mucho más baja (López-Escudero y Blanco-López, 2007). Así, la resistencia de algunos cultivares frente al patótipo ND es superada por el patótipo D, aunque se han encontrado valiosos niveles de resistencia incompleta contra este patotipo que parecen ser heredados cuantitativamente en algunos cultivares, entre los cuales 'Frantoio' es uno de los más resistentes junto con 'Empeltre', 'Changlot Real' y 'Oblonga' (Rodríguez-Jurado *et al.*, 1993; López-Escudero *et al.*, 2004; Martos Moreno *et al.*, 2006; Bubici y Cirulli, 2011; Arias-Calderón *et al.*, 2015b; Trapero *et al.*, 2015). Sin embargo, los cultivares resistentes no suelen ser elegidos para el establecimiento de nuevas plantaciones debido a que no cumplen con la mayoría de requisitos demandados por los productores y/o la industria olivarera (condiciones edafoclimáticas, denominaciones de origen y necesidades del mercado). Así, la mayoría de los cultivares

actualmente cultivados son susceptibles o extremadamente susceptibles a la enfermedad, como es el caso del cultivar Picual (Sesli *et al.*, 2010; Trapero *et al.*, 2013; García-Ruiz *et al.*, 2015) dado que son los más importantes económica e históricamente en sus zonas de cultivo: 'Hojiblanca' y 'Picual' en España, y en Andalucía en concreto (Fig. 1.5), 'Konservolia' y 'Kalamon' en Grecia, y el cultivado en todo el mundo 'Manzanillo' (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011).

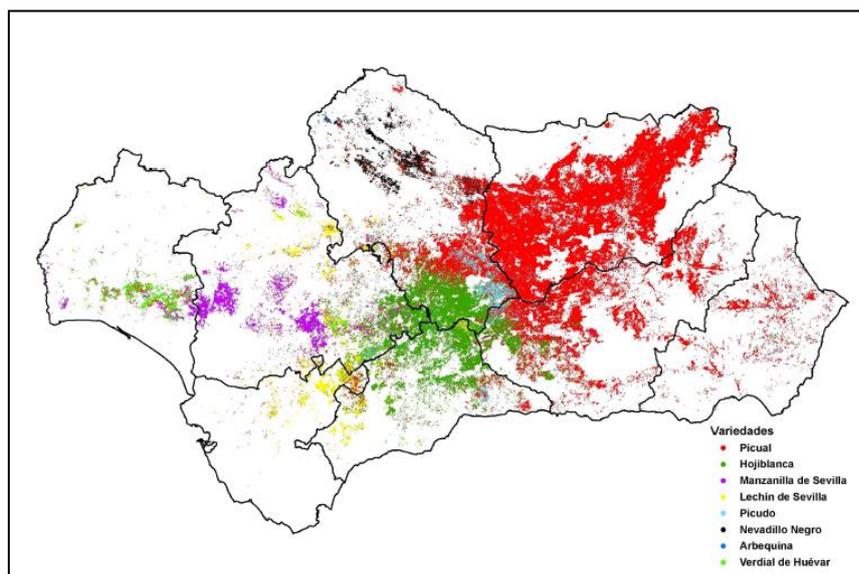


Figura 1.5 Distribución territorial de las principales variedades de olivo en Andalucía. Fuente: Modelo de explotaciones olivareras. Dpto de Prospectiva. Agencia de Gestión Agraria y Pesquera de Andalucía. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural.

La susceptibilidad del cultivar de olivo a la Verticilosis puede influir, incluso más que la virulencia del aislado y la densidad de inóculo, sobre el desarrollo de la enfermedad. Mercado-Blanco *et al.* (2003a) cuantificaron el ADN de los patotipos D y ND de *V. dahliae* sobre genotipos de olivos resistentes (Acebuche-L), y susceptibles ('Arbequina' y 'Picual'), por medio de ensayos de PCR a tiempo real. Los resultados de este estudio mostraron que la cantidad de ADN fúngico cuantificado en cada genotipo de olivo está correlacionado con la susceptibilidad del cultivar a la Verticilosis más que con la virulencia del aislado. Por otro parte, Ostos *et al.* (2016) estudiaron recientemente la relación en campo entre la cantidad final de enfermedad y la DE inicial, siendo ésta de 1.8-17.9 ppg, para tres grupos de cultivares: resistentes ('Frantoio', 'Empeltre' y 'Changlot Real'), moderadamente susceptibles ('Arbequina', 'Koroneiki' y 'Sevillenca') y susceptibles ('Picual', 'Cornicabra' y 'Manzanilla de Sevilla').

Según estos autores, las correlaciones (cantidad final de enfermedad-DE inicial) tuvieron un buen ajuste lineal excepto para el grupo susceptible, que presentó un mejor ajuste para la regresión asintótica, ya que las variedades susceptibles alcanzaron los niveles máximos de enfermedad para densidades de esclerocios ≥ 12.6 ppg.

1.4.1.4 Temperatura y otros factores ambientales

Los datos conocidos sobre la incidencia y severidad de la VO demuestran un patrón estacional de la misma (Wilhelm y Taylor, 1965; Thanassouloupoulos *et al.*, 1979; Levin *et al.*, 2003a; Navas-Cortés *et al.*, 2008; Bubici *et al.*, 2009; Pérez-Rodríguez *et al.*, 2015a; 2016b) y se ha sugerido que esta estacionalidad es impulsada por las temperaturas del aire (Navas-Cortés *et al.*, 2008). De manera general, la incidencia de la enfermedad principalmente aumenta durante el periodo invierno-primavera, y disminuye durante el periodo verano-otoño, así como la severidad de los ataques suele ser máxima durante primavera, aunque ésta parece depender de las condiciones experimentales (Levin *et al.*, 2003a; Pérez-Rodríguez *et al.*, 2015a).

Por el contrario, la variación estacional observada en la colonización vascular de olivos naturalmente infectados difiere entre países (Cirulli, 1981; Blanco-López *et al.*, 1984; Al-Ahmad y Mosli, 1993; Serrhini y Zeroual, 1995) aunque tiende a ser más alta al final del invierno y de la primavera (Vigouroux, 1975; Blanco-López *et al.*, 1984; Montes *et al.*, 1997; Levin *et al.*, 2003a; Bubici *et al.*, 2009). Las temperaturas relativamente altas en el verano pueden ser un factor importante que afecta tanto la actividad fúngica como el crecimiento de los árboles. Un ciclo de infección podría comenzar en otoño con la reinvasión de las raíces, probablemente por la germinación de esclerocios en el suelo, continuar con la proliferación de conidias en el xilema durante el invierno y la primavera, cuando la expresión de la enfermedad es máxima, y completarse cuando la población del hongo disminuye durante el verano (Tosi y Zizzerini, 1998).

Recientemente, Calderón *et al.* (2014) encontraron que la temperatura óptima del suelo para el desarrollo de la VO en condiciones controladas varía con el patótipo de *V. dahliae* y la susceptibilidad de los cultivares. Los modelos utilizados estimaron que la infección por el patótipo D fue promovida por

temperaturas del suelo que variaron de 16 a 24 °C en plantas del cultivar Picual y de 20 a 24 °C en el cultivar Arbequina. Comparativamente, se estimó que las temperaturas del suelo de 16 a 20 °C eran las más favorables para la infección de ambos cultivares por el patótipo ND. Estos resultados, juntos a otros, han servido para evaluar y modelizar el desarrollo de la VO según el patotipos de *V. dahliae* y la susceptibilidad del cultivar en las condiciones actuales y futuras (modelos de simulación), de temperatura y dióxido de carbono (CO₂) para Andalucía. Los 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-patotipo de *V. dahliae*. Así, la estimación sugiere un riesgo elevado de enfermedad en la mayoría de las áreas de cultivo en Andalucía para la combinación cultivar Picual-patotipo D (Jiménez-Díaz *et al.*, 2015).

Las características del suelo parecen tener un efecto variable tanto en el patógeno como en la enfermedad. Prospecciones realizadas en el Valle del Guadalquivir demostraron que la incidencia de enfermedad es significativamente menor en olivares establecidos en Alfisol (de acuerdo a la clasificación de la FAO) que en las parcelas establecidos en Entisol, Inceptisol o Vertisol (López-Escudero *et al.*, 2010). Recientemente, Heis *et al.* (2016) estudiaron la relación entre la DE (estimada por tamizado húmedo) y los valores de diferentes parámetros físico-químicos del suelo (textura, CIC, pH, materia orgánica, etc.) en muestras procedentes del Valle del Guadalquivir. Los suelos de textura arcillosa con una concentración de cationes intercambiables (CIC) alta presentaron una DE significativamente más elevada que los suelos arenosos con una CIC (nutrientes) más baja. Sin embargo, se sabe que la prevalencia del patótipo D en esta misma área fue menor en suelos arcillosos que en suelos arenosos, francos, franco-arcillosos, o franco-arenosos (Jiménez-Díaz *et al.*, 2011). La concentración de sales en el suelo puede influir también en el desarrollo de la VO. En Israel, ataques severos de la enfermedad han sido citados en los cultivares Picual, Barnea y Sourí debido al uso de agua de riego con una concentración de sales de 4.2 ds/m (Levin *et al.*, 2003a; b).

Por último, el ambiente del suelo en cuanto a microbiota se refiere puede influir también sobre la VO. Entre las interacciones bióticas, destaca la

interacción de la nematofauna rizosférica y *V. dahliae*. Se sabe que el nematodo nodulador de la raíz *Meloidogyne javanica* puede causar daños considerables a los olivares en aquellas zonas de cultivo donde *V. dahliae* también está presente (Saeedizadeh *et al.*, 2003). El estudio de Saeedizadeh *et al.* (2003), realizado en condiciones de invernadero, demostró que las plántulas co-inoculadas con *V. dahliae* y *M. javanica* experimentaron una reducción significativa del crecimiento en comparación con las plantas inoculadas con cualquiera de ellos, separadamente. Sin embargo, nuevas especies han sido identificadas interactuando con el olivo en Andalucía (Archidona-Yuste *et al.*, 2016) donde la estructura de las poblaciones de nematodos fitoparásitos es influida principalmente por el cultivar de olivo y la textura del suelo (Palomares-Rius *et al.*, 2015).

1.4.1.5 El riego y otras prácticas de cultivo

Los cambios en las prácticas de cultivo del olivar hacia una intensificación de su manejo podrían haber influido en la actual incidencia de la VO y/o en la prevalencia de los patotipos de *V. dahliae*, según diversos estudios.

La influencia de la densidad de plantación en la incidencia de la VO es controvertida. Rodríguez *et al.* (2008) inspeccionaron 123 parcelas en la provincia de Granada (Andalucía) con árboles infectados principalmente por el patótipo ND y encontraron que la incidencia de la enfermedad era significativamente mayor en parcelas con árboles menores de 12 años con densidades de plantación iguales o superiores a 300 árboles ha⁻¹. Por el contrario, una inspección similar de 90 parcelas en las provincias de Córdoba, Jaén y Sevilla (Andalucía), donde predomina el patótipo D, López-Escudero *et al.* (2010) hallaron una correlación positiva significativa entre la incidencia de la enfermedad y el manejo de suelo de no laboreo en parcelas menores de 25 años. Sin embargo, la incidencia de la enfermedad fue significativamente menor en parcelas con >200 árboles ha⁻¹. Otro estudio, sobre un rango geográfico más amplio en la misma región, reveló que el patótipo D ocurrió con frecuencia alta o moderada en parcelas de más de 30 años y menores de 20 años, respectivamente, y fue menos prevalente en parcelas de alta densidad arbórea (>350 árboles ha⁻¹) que en los de baja densidad (<125 árboles ha⁻¹) (Jiménez-Díaz *et al.*, 2011).

Recientemente, la influencia de la fertirrigación sobre el desarrollo de la VO en 'Picual' ha sido estudiada en suelos naturalmente infestados (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2016a). Estos autores concluyeron que la aplicación de abono NO_3Ca y N-P-K 15-15-15% incrementan el desarrollo de VO en el cultivar Picual comparado con la ausencia de abonado. El conocimiento general en otros huéspedes indica además que el abonado con potasio disminuye la enfermedad (Presley y Dick, 1951; Young *et al.*, 1959).

Distintos trabajos coinciden en señalar que la incidencia de VO es mayor en riego que en secano (Blanco-López, *et al.*, 1984; Al-Ahmad y Mosli, 1993; Serrhini y Zeroual, 1995; Ostos *et al.*, 2015; Pérez-Rodríguez *et al.*, 2015b). Las causas del efecto del riego son desconocidas.

La presencia y dispersión de *V. dahliae* en las aguas de riego de distintos cultivos incluido olivo en Andalucía han sido suficientemente contrastadas en diferentes campañas de riego (Rodríguez-Jurado y Bejarano-Alcázar, 2007; Moraño Moreno *et al.*, 2008b; Rodríguez-Jurado *et al.*, 2008; García-Cabello *et al.*, 2012). En el caso concreto de Andalucía el riego podría estar afectando a la VO por incorporar directa y repetidamente inóculo al suelo próximo a las raíces, ocasionando la introducción e incremento del patógeno o de alguno de sus aislados en el suelo.

La infestación del agua de riego no ha sido descrita en nuestro conocimiento en países donde la enfermedad incrementa con el riego. Además, en los estudios realizados en Andalucía, no todos los olivares regaron con aguas infestadas por *V. dahliae* y la infestación del agua no ocurrió en todas las campañas de riego en el mismo campo (Rodríguez-Jurado y Bejarano Alcázar, 2007; Moraño Moreno *et al.*, 2008b). Por ello, es razonable considerar también que el agua de riego en sí misma (en ausencia de infestaciones por *V. dahliae*) puede propiciar condiciones que favorezcan el desarrollo de la VO por afectar al inóculo del hongo existente en el suelo, directamente a la planta y/o a la interacción hongo-planta.

Los efectos tanto de la dosis como de la frecuencia de riego en el desarrollo de VO se han estudiado en suelos naturalmente infestados (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2015a; 2015b; 2016b). Pérez-Rodríguez *et al.* (2015a) concluyeron que el riego diario estimula el desarrollo de la VO en el cultivar Picual más que los riegos semanales, quincenales y deficitarios, no registrando ninguno de éstos

diferencias en cuanto al desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, la incidencia de la enfermedad no difirió significativamente de acuerdo con las dosis de riego en la totalidad de las parcelas muestreadas (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2015b), o entre los tratamientos de riego (diarios, quincenales y seco) en otro estudio en condiciones de campo (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2016b). En otro trabajo (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2016a) se concluye que la aplicación de abono con riegos de frecuencia diaria incrementan el desarrollo de VO en el cultivar Picual más que el mismo abonado bajo riegos deficitarios.

El agua de riego también puede modificar, entre otros aspectos, el nivel y/o el potencial del inóculo de *V. dahliae* en el suelo disponible para causar enfermedad, y la densidad de inóculo que persiste a largo plazo en el suelo. Se considera que los esclerocios de *V. dahliae* son las estructuras de supervivencia del hongo en el suelo a partir de las cuales se inician las epidemias (Schnathorst, 1981). La DE de *V. dahliae* afecta a la incidencia de enfermedad (López-Escudero y Blanco-López, 2007) y ésta es influida por el estado de humedad del suelo (López-Escudero y Blanco-López, 2005b). Sin embargo, la influencia del riego sobre el nivel de inóculo de *V. dahliae* en el suelo a lo largo del tiempo no ha sido ampliamente estudiada en relación con la VO. Además, los pocos estudios realizados parecen mostrar resultados contradictorios. Se sabe que el aumento de la DE (estimada después de secar el suelo a temperatura ambiente) en suelos de olivar es mayor en las zonas húmedas alrededor de los goteros que en las zonas secas fuera del alcance del sistema de riego (López-Escudero y Blanco-López, 2005). Estos datos concuerdan parcialmente con los obtenidos por Moraño Moreno *et al.* (2010b), que indican que la cantidad de agua y la frecuencia de riego por goteo afectan también a los niveles de esclerocios ($\geq 20 \mu\text{m}$), de micropropágulos (< 20 y $\geq 1 \mu\text{m}$) y a la suma de ambos, o densidad de inóculo total, en ausencia del huésped bajo condiciones óptimas para el crecimiento del patógeno. Los resultados de Moraño Moreno *et al.* (2010b) demuestran que el riego en ausencia de la planta estimula la germinación de los esclerocios, y sugieren que al aumentar la cantidad de agua aplicada y el distanciamiento entre los riegos (riegos menos frecuentes) aumenta a largo plazo la cantidad de estructuras fúngicas distintas de esclerocios (micropropágulos), con posibilidad de originar infecciones en las raíces, y se mantiene o incrementa la densidad

de esclerocios, por lo que la densidad de inóculo total en el suelo aumenta. En otros estudios donde se investigaron los efectos del riego sobre la VO en suelos naturalmente infestados, utilizando una técnica similar a la usada por López-Escudero y Blanco-López (2005), el número de esclerocios después de casi dos años de riego (en una mezcla de muestras de suelo no localizada con respecto a las zonas de influencia de los goteros) no difirió entre los tratamientos de riego (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2015a; 2016b).

Por último, el agua afecta al vigor del árbol y puede interferir con los niveles de infección de la raíz y de colonización vascular en la planta. La disponibilidad de humedad en el suelo puede alterar la liberación de exudados radicales, modificar el ambiente del suelo próximo a las raíces y la probabilidad de contactos hongo-planta. Se ha señalado que las infecciones radicales efectivas por *V. dahliae* en coliflor incrementan bajo regímenes de riego elevados, frente a moderados o deficitarios, debido a que en el primer caso las raíces exploran un mayor volumen de suelo, lo que aumenta el número de contactos entre el inóculo en el suelo y las raíces de la planta (Xiao y Subbarao, 2000). Sin embargo, la colonización radical por *V. dahliae* es menor en condiciones de alta humedad en otros patosistemas. De otra parte, la disponibilidad de agua en el suelo y atmósferas secas favorecen la transpiración de las plantas, lo cual podría ayudar al transporte de conidias de *V. dahliae* en el xilema y resultar en una mayor cantidad de síntomas o incidencia de enfermedad que en plantas mantenidas bajo déficit hídrico (Pennypacker *et al.*, 1991). Por el contrario, en otros trabajos se ha encontrado que las alteraciones fisiológicas ocasionadas por el déficit hídrico contribuyen a incrementar los síntomas de Verticilosis (Arbogast *et al.*, 1999) o que los síntomas aumentan cuando el régimen de agua en el suelo reduce la biomasa de la planta porque ésta es más colonizada debido al aumento de la cantidad de hongo por unidad de tejido del huésped (Gaudreault *et al.*, 1995; Saadatmand *et al.*, 2008).

Reducir el aporte de agua al cultivo del olivo será insuficiente en situaciones en las que el agua de riego esté infestada con *V. dahliae* considerando los niveles de inóculo necesarios para causar enfermedad, expuestos en anteriores apartados, y los encontrados en las aguas de riego en el caso de Andalucía. Rodríguez-Jurado y Bejarano-Alcázar (2007) determinaron y cuantificaron durante primavera la presencia de *V. dahliae* en aguas

subterráneas (pozos) y superficiales (balsas almacenando agua de río) sobre un total de 33 campos de olivo afectados por la Verticilosis en las provincias de Jaén y Sevilla (Andalucía) en 2004 (5 y 18, respectivamente) y 2005 (7 y 14, respectivamente). *V. dahliae* no se aisló de las muestras de agua analizadas en el año 2004 posiblemente debido al reducido volumen de agua analizada (2-8 muestras de 0.5 L/campo) respecto al año 2005 (3-4 muestras de 1000 L/campo). En 2005, el patógeno se aisló del agua de riego del 85,7% de los campos inspeccionados en cada una de las provincias de Jaén (6 de 7 campos) y Sevilla (12 de 14 campos) (Fig. 1.6), siendo los valores medios estimados en los campos regados con agua infestada de cada provincia de 213.1 (intervalo 0.5-1000.0) y 3579.9 (intervalo 0.7-27006.3) propágulos viables por 1000 L de agua, respectivamente. *V. dahliae* fue recuperado del agua de riego del 87.5 % (14 campos) de los 16 campos regados con agua de pozo, 2 de los cuales estuvieron localizados en Jaén y los 12 restantes en Sevilla (Fig. 1.6), con un valor medio de 3070.4 (intervalo 0.7-27006.3) propágulos viables por 1000 L de agua. El patógeno se aisló del 80% (4 campos) de los 5 campos regados con agua superficial embalsada de origen en el río Guadalquivir, todos ellos situados en Jaén, con una media de 312.9 (intervalo 0.5-1000.0) propágulos viables por 1000 L de agua.



Figura 1.6 Distribución geográfica en Andalucía de los campos de olivo que utilizaron para regar agua infestada por *Verticillium dahliae*. Fuente: Rodríguez Jurado y Bejarano Alcázar, 2007. Vida Rural, 46: 48-52.

En otras investigaciones, Moraño Moreno *et al.* (2008b) abordaron la ocurrencia de infestación del agua en diferentes campañas de riego, y exploraron si dicha infestación presentaba un patrón que se repitiera con los años. Las aguas de riego de un total de 37 campos de olivo afectados por la Verticilosis, 20 en el año 2006 (7 y 13 en Jaén y Sevilla, respectivamente) y 19 de ellos y 17 nuevos campos en 2007 (10, 12 y 14 campos en Córdoba, Jaén y Sevilla, respectivamente) fueron muestreadas. Los campos se abastecieron para regar con aguas de pozos (3, 5 y 15 en Córdoba, Jaén y Sevilla, respectivamente) o aguas superficiales embalsadas o canalizadas desde los ríos Genil (4 en Córdoba), Guadalimar (1 en Jaén) y Guadalquivir (3 y 6 en Córdoba y Jaén, respectivamente). Los resultados mostraron que *V. dahliae* infestó el agua de riego del 86 y 77% de los campos prospectados en 2006 en Jaén y Sevilla, respectivamente, y de todos ellos en 2007 excepto de un campo en cada provincia. El hongo se aisló del agua del 90, 92 y 93% de los campos prospectados en 2007 en Córdoba, Jaén y Sevilla, respectivamente. Los campos que regaron con agua contaminada por *V. dahliae* representaron el 100 y 93% del total de los campos que se abastecieron con aguas subterráneas y aguas superficiales de origen en los distintos ríos, respectivamente. La infestación del agua por *V. dahliae* no mostró un patrón repetible, debido a la variabilidad de su presencia en el agua entre campos cada año y entre años en cada campo.

Los niveles de propágulos totales del hongo en el agua de riego de olivar en Andalucía varían también con el campo, la campaña de riego y en el curso temporal de una campaña de riego en cada provincia estudiada (Rodríguez-Jurado y Bejarano-Alcázar, 2007; Moraño Moreno *et al.*, 2008b). La cantidad promedio de propágulos en los campos que regaron con aguas infestadas durante estos estudios mostró una tendencia a alcanzar valores máximos en algunos de los meses más favorables para el desarrollo de síntomas de la enfermedad. Además, se demostró que los micropropágulos de tamaño <20 y ≥ 1 μm eran más numerosos en el agua que los esclerocios de $\geq 20\mu\text{m}$ de tamaño. Los niveles medios de micropropágulos recuperados del agua fueron 3158.9/1000 L comparados con 1.5 esclerocios por la misma cantidad de agua utilizada para el riego de los campos infestados en las investigaciones de Rodríguez-Jurado y Bejarano-Alcázar, 2007. El número y tamaño de los

micropropágulos sugirió que deben consistir en conidias y micelio. Los esclerocios de *V. dahliae* se han cuantificado también en cantidades de 3.75 por 1000 L de agua dispensada por el sistema de riego a diferentes parcelas localizadas en Córdoba (García-Cabello *et al.*, 2012).

La infestación del agua de riego en Andalucía es de consideración por su extensión e intensidad, y su importancia para los cultivos es obvia debido a la variabilidad en virulencia del patógeno en las agua y la amplia presencia de aislados pertenecientes al patotipo capaz de originar la muerte de plantas. La presencia de los patotipos D y ND en las aguas de riego de algodón en Andalucía ha sido contrastada en diferentes campañas de riego (Moraño Moreno *et al.*, 2008a; Rodríguez-Jurado *et al.*, 2008). La virulencia de 115 aislados (42, 47 y 26 de Córdoba, Jaén y Sevilla, respectivamente) monoconídicos de *V. dahliae* obtenidos de las aguas de riego de algodón en 2006 (57) y 2007 (58), se caracterizó mediante inoculaciones artificiales del cultivar de algodón Acala SJ-2. El 81 y 12% de los aislados caracterizados pertenecieron, respectivamente, al patotipo D y ND, y el 7% restante no causaron síntomas ni infectaron las plantas. Los aislados D representaron el 74, 94 y 69% de los aislados testados de Córdoba, Jaén y Sevilla, respectivamente. El patotipo D estuvo presente en las aguas procedentes de todas las balsas y canales considerados (Moraño Moreno *et al.*, 2008a; Rodríguez-Jurado *et al.*, 2008).

Mayor diversidad fue hallada en las aguas de riego de olivar. El patotipo y la virulencia de 150 aislados monoconídicos de *V. dahliae* originarios de la aguas de riego de olivar se determinó en el cultivar de olivo susceptible Picual. De los seis grupos de virulencia encontrados, los grupos de virulencia intermedia identificados para los patotipos D y ND (denominados DO2 y NDO2, respectivamente) se correspondieron con los dos grupos previamente conocidos (o grupos a los que pertenecen los aislados utilizados de referencia) y fueron en conjunto los más frecuentes en las aguas de riego de olivar. Para cada uno de los dos patotipos se encontraron además grupos de aislados de mayor (DO1 y NDO1) y menor (DO3 y NDO3) virulencia que los anteriores sobre olivo, todos ellos en las aguas de Sevilla y tres y dos de dichos grupos en Córdoba y Jaén, respectivamente. Uno de los nuevos grupos de virulencia (DO1), identificado en Córdoba y Sevilla, estuvo formado por aislados más

virulentos que los D previamente conocidos y solo fue detectado en las aguas de riego subterráneas, en tanto las aguas superficiales destacaron por ser un vehículo de dispersión importante de los aislados del D de referencia (DO2) (Moraño Moreno *et al.*, 2010a; 2011) (Fig. 1.7).

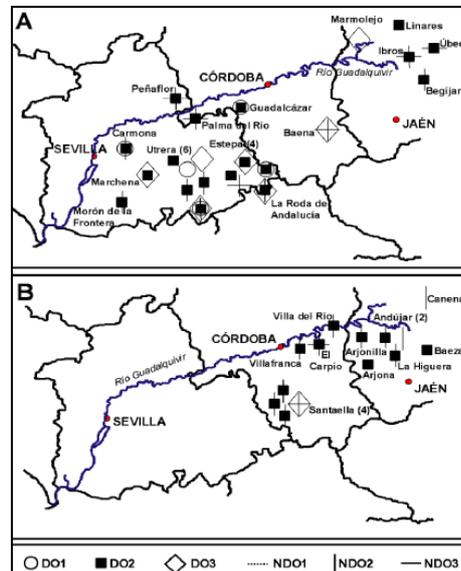


Figura 1.7 Grupos de virulencia de *Verticillium dahliae* sobre olivo presentes en las aguas subterráneas y superficiales utilizadas para el riego de olivares en Andalucía en dos campañas consecutivas (A y B). Fuente: Moraño Moreno *et al.*, 2011. Expoliva OLI-08, 6 págs.

La presencia de aislados del patotipo D en el agua de riego ha podido originar que los aislados de *V. dahliae* que infectan olivo en Andalucía sean en la actualidad predominantemente del patotipo D (Figura 1.4). Ello es además de especial trascendencia para los cultivos en general en Andalucía, ya que muchas de las balsas y pozos utilizados para el riego de olivar se emplean también para regar otros cultivos huéspedes del patógeno.

1.5 Control Integrado de la Verticilosis del Olivo

Actualmente, ninguna medida de control aplicada individualmente es totalmente efectiva para el manejo de la VO, por ello, para un control eficiente de la misma, y a día de hoy obligatorio de acuerdo a la Directiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 21/10/2009 (<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=celex:32009L0128>), se requiere la aplicación de una estrategia de gestión integrada que combine el uso de

medidas pre- y postplantación (Tjamos 1993; Tjamos y Jiménez-Díaz, 1998; López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011; Tsrer, 2011; Jiménez-Díaz *et al.*, 2012; <http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/servifapa/export/sites/default/Sectores/OliverYAceite/doc/Innovaciones cultivo del olivo.pdf>; MAPAMA, 2014; Hiemstra, 2015) (Fig. 1.8).

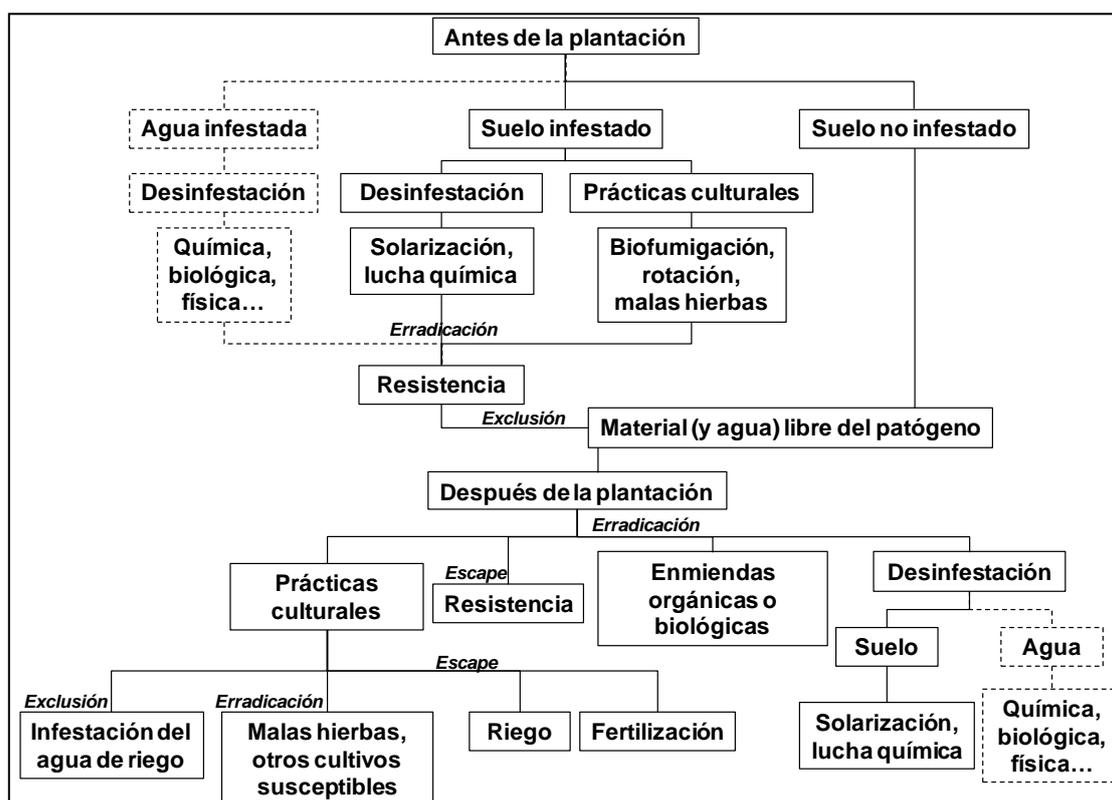


Figura 1.8 Estrategia de lucha integrada contra la Verticilosis del olivo (Adaptado de López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011).

1.5.1 Medidas pre-plantación

Para que el establecimiento del olivar sea rentable, las medidas preventivas son sin duda las más efectivas y plausibles. Las acciones preplantación están dirigidas básicamente a la exclusión y/o erradicación del patógeno.

1.5.1.1 Utilización de material de plantación, suelo y agua libres del patógeno

Dado que la recuperación natural de los síntomas permite infecciones asintomáticas en los árboles (Mercado-Blanco *et al.*, 2001; Levin *et al.*, 2003a), los requerimientos oficiales de la Unión Europea consistentes en el diagnóstico visual (*Conformitas Agraria Communitatis*) son insuficientes para utilizar con

certeza material de plantación libre del patógeno. Ello requiere de un sólido sistema de certificación que asegure la ausencia del hongo en la planta. La aplicación de protocolos basados en PCR (Mercado-Blanco *et al.*, 2003b) para la detección *in situ* del patógeno sería útil para este fin.

Para la selección del lugar de plantación se debe contar con información precisa sobre el estado fitosanitario del suelo y del agua de riego. En el caso del suelo, es fundamental conocer el historial de los problemas fitopatológicos del mismo; particularmente en el caso de que cultivos huéspedes como el algodón hayan sido cultivados debido a la virulencia cruzada de *V. dahliae*. Además, es aconsejable evitar campos cercanos con cultivos susceptibles a *V. dahliae* (revisado por Jiménez-Díaz *et al.*, 2012). En cualquier caso, la detección y cuantificación de los esclerocios de *V. dahliae* en el suelo antes de la plantación, y a ser posible el/los patotipos presentes, es extremadamente importante en la prevención de la enfermedad. Los métodos más utilizados (Ver apartado 1.4.1.2) se caracterizan por el secado al aire del suelo con el fin de analizar los esclerocios o estructuras persistentes del suelo (Ashworth *et al.*, 1972; DeVay *et al.*, 1974) y en el caso del tamizado húmedo, se descuentan los esclerocios mayores de 135 o 125 μm (Huisman y Ashworth, 1974) así como los propágulos tales como el micelio y los conidias que, aunque pueden ser de corta vida, se producen en suelo húmedo en campos de algodón (Evans *et al.*, 1966) y en de olivar (Navas-Cortés *et al.*, 2008). La amplia adopción de los distintos métodos de cuantificación en suelo sobre medio de cultivo semiselectivo (Goud y Termorshuizen, 2003) no les exime de dificultades que pueden cuestionar su uso. Termorshuizen *et al.* (1998) encontraron amplia variabilidad en los resultados de diferentes laboratorios en el análisis de muestras comunes de suelo de variada naturaleza por los métodos de tamizado húmedo y seco. En la actualidad se han desarrollado diferentes técnicas moleculares basada en PCR que muestran resultados satisfactorios en la detección y cuantificación de *Verticillium* spp., incluido *V. dahliae*, en suelos naturalmente infestados (Debode *et al.*, 2011; Moradi *et al.*, 2014).

Para la producción de plantones y en nuevas plantaciones en regadío, en la medida de lo posible se usarán aguas para el riego no contaminadas (http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/servifapa/export/sites/default/Sectores/OliverYAceite/doc/Innovaciones_cultivo_del_olivo.pdf; MAPAMA, 2014).

Independientemente de la procedencia del agua (río o pozo), la detección y cuantificación de esclerocios de *V. dahliae* antes de la plantación, así como otras estructuras del hongo como micelio y conidias, es extremadamente importante en la prevención de la enfermedad. La metodología utilizada por Rodríguez-Jurado y Bejarano-Alcázar (2007), basada en la filtración del agua y siembra sobre medio de cultivo, resultó adecuada para detectar esclerocios ($\geq 20 \mu\text{m}$) y micropropágulos ($< 20 \mu\text{m}$ y $\geq 1 \mu\text{m}$) de *V. dahliae* en las aguas de canales, balsas y pozos. La detección del hongo en el agua mediante PCR ha sido excepcionalmente valorada (Rodríguez *et al.*, 2007). Al igual que los métodos para cuantificación en suelo, la cuantificación en agua presenta limitaciones como el bajo umbral de detección debido a los elevados volúmenes de agua en los lugares objeto de muestreo.

1.5.1.2 Métodos de erradicación dirigidos al agua y al suelo

Si en el suelo y/o en el agua el resultado es positivo, se debe proceder a la desinfestación para erradicar o reducir la población del patógeno.

En el caso del suelo, la solarización es uno de los métodos físicos más efectivo (Katan, 1987; Tjamos *et al.*, 1991; Katan, 2000; López-Escudero y Blanco-López, 2001). La solarización suele emplearse para tratamientos puntuales, individuales o parciales, y aún no se ha probado a gran escala como práctica de preplantación en olivar. En este caso, para la desinfestación del suelo antes del establecimiento de la parcela se han utilizado prácticas culturales y biológicas. Por ejemplo, el retraso en el establecimiento de la plantación del olivar para la rotación de cultivos no susceptibles y/o intervenciones culturales como el enterrado en verde del cultivo en rotación. En este sentido, han sido seleccionadas en el caso concreto de Andalucía diversas especies de crucíferas cultivadas y silvestres que tienen un elevado potencial para reducir la viabilidad del inóculo de *V. dahliae* en el suelo cuando se aplican como enmiendas en verde al suelo (“Biofumigación”) en condiciones ambientales controladas (Bejarano-Alcázar, 2005) y en campo (Jurado Bello *et al.*, 2013). El Pasto de Sudán (*Sorghum halepense* var. *sudanense*) también ha mostrado ser efectivo al ser enterrado en verde en otras Verticilosis (Devay y Pullman 1984). La desinfestación de *V. dahliae* en el suelo por tratamientos químicos ha sido revisada por Goicoechea (2009). La aplicación individual de

dosis bajas de metan-sodio o dazomet (mezcla de dicloropropeno/isotiocianato de metilo), o conjuntamente con enmiendas orgánicas y/o solarización del suelo, sería una acción aconsejable en el suelo del olivar (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011).

En el caso del agua, erradicar o reducir los niveles de inóculo del patógeno es una prioridad que debe ser contemplada en el control integrado de las Verticilosis (antes y después de la plantación) debido a la amplia gama de huéspedes y escasa especificidad huésped que este patógeno presenta, así como las repercusiones epidemiológicas que pudiera tener. La importancia de esta erradicación requiere medidas rápidas y fácilmente accesibles para el agricultor. Entre el muy limitado número de estudios que han abordado la erradicación de *V. dahliae* en el agua, la filtración de arena de la solución recirculante en un sistema cerrado de cultivo sin suelo, no eliminó los propágulos de *V. dahliae* (Martínez *et al.*, 2009). La filtración de arena utilizada en el sistema de riego de algunos olivares retiene sólo algunos esclerocios de *V. dahliae* (García-Cabello *et al.*, 2012). Explorando técnicas más costosas, Runia (1994) encontró que la inyección de 20 g de ozono en el agua de recirculación de invernaderos redujo irregularmente (25.0-2.5%) la infectividad de *Verticillium* spp. en el tiempo, y sugirió que las conidias en lugar de los esclerocios fueron las estructuras fúngicas eliminadas. Así, la erradicación o reducción de *V. dahliae* en el agua de riego está por resolver.

1.5.1.3 Utilización de cultivares resistentes

La utilización de cultivares resistentes o patrones portainjertos es un elemento clave para la gestión integrada de la VO dada su eficiencia en el tiempo, bajo coste y respeto por el medio ambiente (revisado por López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011; Tsrer, 2011; y, Jiménez-Díaz *et al.*, 2012). Se han realizado diferentes esfuerzos para evaluar la resistencia a la VO en condiciones de campo, de invernadero o cámara de cultivo (López-Escudero *et al.*, 2004; Markakis *et al.*, 2009; Trapero *et al.*, 2013; García-Ruiz *et al.*, 2014). Sin embargo, la resistencia disponible al patotipo D (predominante en Andalucía) entre los cultivares de olivo es incompleta y está comprometida por niveles moderados de densidad de inóculo e infecciones recurrentes (Trapero *et al.*, 2013). Recientemente, la resistencia del huésped ha sido probada

usando un gran número de genotipos de olivo de distinta procedencia (Arias-Calderón *et al.*, 2015a, 2015b; 2015c; Trapero *et al.*, 2015), así como portainjertos resistentes provenientes de clones de olivos silvestre (Jiménez-Fernández *et al.*, 2016) o de cultivares (Bubici y Cirulli, 2012; Valverde-Caballero *et al.*, 2016). En todos los trabajos en mayor o menor proporción, generalmente baja, se encontraron materiales vegetales resistentes aunque para determinados portainjertos resistentes, una elevada presión de enfermedad pudo superar con el tiempo (a partir de los 16 meses después de la plantación) la resistencia inicialmente conferida por el patrón (Valverde-Caballero *et al.*, 2016).

1.5.1.4 Utilización de microorganismos beneficiosos y antagonistas

Un enfoque interesante para el control de VO dentro de un marco de control integrado es el uso de agentes de control biológico, el cual puede aplicarse tanto antes como después de la plantación (revisado por López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011; Tsrer, 2011; y, Jiménez-Díaz *et al.*, 2012). Entre las bacterias, recientemente se ha demostrado por primera vez la eficacia de *Paenibacillus alvei* (cepa K165) para controlar la VO en suelos naturalmente infestados con altas densidades de inóculo (Markakis *et al.*, 2016). Esta cepa suprimió con éxito los síntomas de la enfermedad y la biomasa fúngica en los tejidos del cultivar Amfissis (susceptible), mientras que en el cultivar resistente Kalamon se observó una notable pero no significativa disminución. Otra de las cepas más prometedoras es PICF7 de la especie *Pseudomonas fluorescens* (Gómez-Lama-Cabanás *et al.*, 2014), cuya eficacia en campo está por comprobar. Entre los hongos, actualmente, la única bioformulación comercial disponible para el control de VO en España es una mezcla de dos especies de *Trichoderma* sp., pero esta mezcla sólo está aprobada para el tratamiento de plantas de olivo en el vivero, antes de la plantación (Jiménez Díaz *et al.*, 2009). Recientemente, en un ensayo sobre un total de 47 cepas (hongos y bacterias) y nueve mezclas de microorganismos, se detectaron cepas prometedoras de hongos y bacterias con actividad antagonista frente a *V. dahliae*, tales como *Phoma* sp., *P. fluorescens*, una cepa no patógena de *Fusarium oxysporum* y dos mezclas de microorganismos que pueden poseer múltiples modos de

acción. Varias de las cepas o aislados poseen efecto protector frente a la Verticilosis en planta (Varo *et al.*, 2016).

1.5.2 Medidas post-plantación

A partir del establecimiento de la plantación, las medidas de lucha deben de ir dirigidas a evitar la proliferación, propagación y/o nuevas entradas de propágulos de *V. dahliae*, reducir el inóculo del patógeno (pre)existente en la parcela y reducir la eficacia de la infección por el patógeno presente en la plantación. Las estrategias deben consistir en la aplicación de métodos excluyentes, erradicativos y de escape, junto a la resistencia (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011; Jiménez-Díaz *et al.*, 2012).

1.5.2.1 Métodos de exclusión en las aguas de riego

Como se comentó, una de las principales características dentro del ciclo de vida de *V. dahliae* es su alta eficacia en la dispersión y supervivencia. El hongo puede acceder a la plantación asociado a partículas de suelo, o bien, dispersarse mediante restos de tejidos de plantas infectadas o partículas de suelo a través del agua de escorrentía, del agua de riego o del viento. En el caso de plantaciones establecidas sin antecedentes de la enfermedad pero próximas a suelos con historia de la enfermedad y en plantaciones de olivo en las que el hongo está presente en el suelo se deberá prevenir la infestación de las aguas. Para ello habrá que evitar que las aguas de escorrentía y las sobrantes de riegos arrastren suelo entre parcelas y viertan a fuentes de agua, no reutilizar el agua sobrante de riegos copiosos, mantener balsas, pozos y canales tapados el máximo tiempo posible, limpiar y desinfestar las balsas de riego cada vez que se llenen, desinfestar equipos y herramientas de campo antes de introducirlos en el agua, eliminar del suelo todo material vegetal procedente de olivos y huéspedes del hongo afectados por la enfermedad, sacar del agua y destruir los restos vegetales, no utilizar útiles de riego previamente empleados en campos con antecedentes de enfermedad y reducir las prácticas de cultivo que impliquen movimiento de suelo por maquinaria o vehículos y no realizarlas en días de viento dentro o fuera de la parcela (http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/servifapa/export/sites/default/Sectores/OliverYAceite/doc/Innovaciones_cultivo_del_olivo.pdf).

1.5.2.2 Métodos de erradicación y escape

En plantaciones establecidas en las que la enfermedad y el hongo estén presentes y el agua de riego no esté infestada por el patógeno, habrá que prevenir el incremento de los niveles de inóculo en el suelo y reducir, en la medida en la se pueda, dichos niveles así como, reducir la eficacia infectiva del hongo reduciendo su actividad, disminuyendo la probabilidad de contacto con la planta, limitando la infección y la colonización del huésped o atenuando los efectos de la enfermedad.

En cuanto a los métodos culturales se encuentra la eliminación de los restos de olivos infectados por *V. dahliae*, incluido el árbol cuando esté muerto, y eliminación de malas hierbas, que contribuyen a incrementar la población del patógeno en el suelo y a su dispersión (Tjamos y Botseas, 1987; Navas-Cortés *et al.*, 2008). La solarización como método físico erradicativo después de la plantación puede llegar a ser una técnica muy efectiva siempre que se utilice de manera localizada y dentro de una estrategia de control integrado (López-Escudero *et al.*, 2001; López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011). La solarización del suelo mejoró la recuperación natural del árbol al reducir la viabilidad de los esclerocios de *V. dahliae* en el suelo (Tjamos *et al.*, 1991; López-Escudero y Blanco-López, 2001; 2005). La cianamida cálcica aplicada al suelo proporcionó mayor recuperación natural a la Verticilosis que la solarización en el estudio de Bubici y Cirulli (2014). Después de una drástica reducción del inóculo en el suelo, incluso los cultivares de olivo susceptibles se recuperaron de la enfermedad, especialmente bajo una presión moderada o baja de la enfermedad (Bubici y Cirulli, 2014).

El control de la VO por tratamiento químico al árbol, principalmente fungicidas sistémicos, ha sido abordado en varios trabajos aunque no ha mostrado ser efectivo en condiciones de campo (revisado por López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011; Tsrer, 2011; y, Jiménez-Díaz *et al.*, 2012).

La utilización de agentes de control biológico expuesta en apartados anteriores es aplicable también en postplantación. La aplicación al suelo de enmiendas orgánicas se puede entender como método biológico o práctica cultural dependiendo principalmente de su modo de acción. Se sabe que *Brassica carinata* y *Sinapis alba* presentan características agronómicas

adecuadas para ser utilizadas como cubiertas vegetales en plantaciones de olivar y han resultado eficaces cuando se añadieron como enmiendas en verde al suelo tanto para la reducción de la enfermedad como del inóculo en el suelo en condiciones de campo (Jurado Bello *et al.*, 2013). Otras enmiendas orgánicas como el compost de vid y de alperujos mejorados con microorganismos resultaron muy eficaces contra la VO cuando se aplicaron al suelo naturalmente infestado en condiciones controladas (Varo Suarez., 2017). También, diversos extractos de plantas y aceites esenciales han sido testados en condiciones controladas. Entre ellos, el aceite esencial de *Thymus* sp. mostró una lata eficacia *in vitro* contra el patógeno en el suelo (inhibición del 100%) y contra la enfermedad en plantas del cultivar Picual (reducción del 42-65% de la severidad) (Varo *et al.*, 2017).

La resistencia del cultivar entendida como método que reduce la eficacia del inóculo para causar enfermedad es una medida de escape a la enfermedad que se puede aplicada para la sustitución de árboles individuales o grupos de ellos enfermos y que a largo plazo reducirá el aporte de inóculo al suelo y su incremento en el mismo. La resistencia como medida de control se expuso previamente (ver apartado 1.5.1.3). Como medidas de escape a la enfermedad, Pérez-Rodríguez *et al.* (2015a) recomendaron evitar los riegos diarios basándose en la hipótesis de que, en sus condiciones experimentales en microparcels, disminuyeron la temperatura del suelo durante el verano facilitando el establecimiento de la infección. En otro trabajo en condiciones de campo se recomendó programar tratamientos de riego basados en la precipitación para mantener la humedad del suelo por debajo de los niveles que favorecen el desarrollo de la enfermedad (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2016b). Complementar la programación del riego con la reducción de la fertilización parece conveniente (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2016a).

Las medidas anteriores, excepto donde se indica, pueden ser aplicadas individualmente al hoyo de plantación después de eliminar el árbol afectado, a grupos de árboles afectados o a la plantación, según la extensión de la enfermedad en la parcela y cómo la medida de control pueda aplicarse. Es conveniente emplear medidas que se complementen en el tiempo y en el modo de acción según las situaciones particulares de cada parcela o un conjunto de ellas.

Por último, destacar que en plantaciones establecidas en las que la enfermedad esté presente y el agua de riego esté infestada con el patógeno, habrá que prevenir el incremento de los niveles de inóculo en el agua y en el suelo, así como reducirlos en su caso o reducir su eficacia infectiva igualmente. Para ello, serán de aplicabilidad todas las medidas de exclusión en el agua y en el suelo anteriores, incluido no regar si es posible, y de erradicación y escape descritas previamente. Entre todas las medidas citadas, la erradicación o reducción del patógeno en el agua de riego es la menos estudiada.

1.6 Referencias

- Al-Ahmad MA, Mosli MN, 1993. Verticillium wilt of olive in Syria. *EPPO Bulletin* **23**, 521–529.
- Alexander LJ, 1972. Susceptibility of certain Verticillium resistant tomato varieties to an Ohio isolate of the fungus. *Phytopathology* **52**, 998–1000.
- Anónimo, 1980. Anuario de Estadística Agraria. Olivar y otros cultivos leñosos industriales. En: *Plataforma de conocimiento para el medio rural y pesquero. Artículos de revista*. Madrid, España: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 370–388.
- Anónimo, 1996. Anuario de Estadística Agraria. Parte segunda, Superficies y producciones de cultivos. Olivar. En: *Plataforma de conocimiento para el medio rural y pesquero. Artículos de revista*. Madrid, España: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
- Anónimo, 2005. Anuario de Estadística Agraria. Parte segunda, Superficies y producciones de cultivos. Olivar. En: *Plataforma de conocimiento para el medio rural y pesquero. Artículos de revista*. Madrid, España: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
- Arbogast M, Powelson ML, Cappaert MR, Watrud LS, 1999. Response of six potato cultivars to amount of applied water and *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* **89**, 782–788.
- Archidona-Yuste A, Navas-Cortés JA, Cantalapiedra-Navarrete C, Palomares-Rius JE, Castillo P, 2016. Unravelling the biodiversity and molecular phylogeny of needle nematodes of the genus *Longidorus* (Nematoda:

- Longidoridae) in olive and a description of six new species. *PLoS ONE* **11**, e0147689.
- Arias-Calderón R, León L, Bejarano-Alcázar J, Belaj A, de la Rosa R, Rodríguez-Jurado D. 2015a. Resistance to *Verticillium* wilt in olive progenies from open-pollination. *Scientia Horticulturae* **185**, 34–42.
- Arias-Calderón R, Rodríguez-Jurado D, Bejarano-Alcázar J, Belaj A, de la Rosa R, León L, 2015b. Evaluation of *Verticillium* wilt resistance in selections from olive breeding crosses. *Euphytica* **206**, 619–629.
- Arias-Calderón R, Rodríguez-Jurado D, León L, Bejarano-Alcázar J, de la Rosa R, Belaj A. 2015c. Pre-breeding for resistance to *Verticillium* wilt in olive: Fishing in the wild relative gene pool. *Crop Protection* **75**, 25–33.
- Ashworth LJ Jr, Huisman OC, Harper DM, Stromberg, LK, 1974. Free and bound microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* in soils. *Phytopathology* **64**, 563–564.
- Ashworth LJ Jr, Waters JE, George AG, McCutcheon OD, 1972. Assessment of microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* in field soils. *Phytopathology* **62**, 715–9.
- Báidez AG, Gómez P, del Río JA, Ortuño A, 2007. Dysfunctionality of the xylem in *Olea europaea* L. plants associated with the infection process by *Verticillium dahliae* Kleb. Role of phenolic compounds in plant defense mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 3373-3377.
- Beckman CH, 1987. The nature of wilt diseases of plant. St. Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathological Society Press.
- Bejarano Alcázar J, 2005. Control de la Verticilosis del olivo mediante la aplicación de enmiendas orgánicas. *Oleo* **106**, 40–51.
- Bejarano-Alcázar J, Blanco-López MA, Melero-Vara JM, Jiménez-Díaz RM, 1996. Etiology, importance, and distribution of *Verticillium* wilt of cotton in southern Spain. *Plant Disease* **80**, 1233–1238.
- Bejarano Alcázar J, Obregón Cano S, Rodríguez Jurado D, de Haro Bravo MI, del Río Celestino M, de Haro Bailón A, 2008. Potencial biofumigante de especies de crucíferas para la supresión de *Verticillium dahliae* en el suelo. En: *Libro de Resúmenes del XIV Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Lugo, España: 296.

- Bejarano-Alcázar JL, Pérez-Artés E, 2002. Importancia de la Verticilosis del algodonero y distribución de patotipos de *Verticillium dahliae* en Andalucía. En: *Libro de Resúmenes del XI Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Almería, España: 228.
- Bell AA, 1994. Mechanisms of disease resistance in *Gossypium* species and variation in *Verticillium dahliae*. In: Constable GA, Forrester NW, eds. *Proceedings of the World Cotton Research Conference 1994*. Melbourne, Australia: CSIRO, 225–35.
- Ben-Yephet Y, Szmulewich Y, 1985. Inoculum levels of *Verticillium dahliae* in the soils of the hot semi-arid Negev region of Israel. *Phytoparasitica* **13**, 193–200.
- Bhat RG, Subbarao KV, 1999. Host range specificity in *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* **89**, 1218–1285.
- Birem F, Alcántara-Vara E, López-Escudero FJ, 2016. Water Consumption and Vegetative Growth Progress in Resistant and Susceptible Olive Cultivars Infected by *Verticillium dahliae*. *Agricultural Sciences* **7**, 230–238.
- Blanco-López MA, Jiménez-Díaz RM, Caballero JM, 1984. Symptomatology, incidence and distribution of *Verticillium* wilt of olive trees in Andalucía. *Phytopathologia Mediterranea* **23**, 1–8.
- Blanco-López MA, Rodríguez Jurado D, Jiménez Díaz RM, 1990. Incidence and seasonal variation of *Verticillium* wilt in olive orchards. En: *Resúmenes del V Simposio Internacional de Verticillium*. Leningrado, Rusia: 5.
- Bowden RL, Rouse DI, 1991. Effects of *Verticillium dahliae* on gas exchange of potato. *Phytopathology* **81**, 293–301.
- Bowden RL, Rouse DI, Sharkey TD, 1990. Mechanism of photosynthesis decrease by *Verticillium dahliae* in potato. *Plant Physiology* **94**, 1048–1055.
- Bubici G, Cirulli M, 2011. *Verticillium* Wilt of Olives. In: Schena L, Agosteo GE, Cacciola SO, eds. *Olive Diseases and Disorders*. Transworld Research Network, Kerala, 191–222.
- Bubici G, Cirulli M, 2012. Control of *Verticillium* wilt of olive by resistant rootstocks. *Plant Soil* **352**, 363–376.
- Bubici G, Cirulli M, 2014. Natural recovery from *Verticillium* wilt in olive: Can it be exploited in a control strategy? *Plant and Soil* **381**, 85–94.

- Bubici G, Nigro F, Ferrara M, Cirulli M, 2009. Epidemiological study on *Verticillium* wilt of olive in southern Italy. *Journal of Plant Pathology* **91**, 51.
- Butterfield EJ, DeVay JE, 1977. Reassessment of soil assays for *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* **67**, 1073–1078.
- Calderón R, Lucena C, Trapero-Casas JL, Zarco-Tejada PJ, Navas-Cortés J A, 2014. Soil temperature determines the reaction of olive cultivars to *Verticillium dahliae* pathotypes. *PLoS ONE* **9**, e110664.
- Calderón R, Navas-Cortés JA, Lucena C, Zarco-Tejada PJ, 2013. High-resolution airborne hyperspectral and thermal imagery for early detection of *Verticillium* wilt of olive using fluorescence, temperature and narrow-band spectral indices. *Remote Sensing of Environment* **139**, 231–245.
- CAPDER, 2014. Anuario de Estadísticas Agrarias y Pesqueras de Andalucía. Sevilla, España: Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Servicio de Publicaciones y Divulgación. Capítulo 5, Olivar.
- CAPDER, 2015. Plan director del olivar andaluz. Sevilla, España: Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Servicio de Publicaciones y Divulgación.
- Cirulli M, 1981. Attuali cognizioni sulla verticilliosi dell'olivo. *Informatore Fitopatologico* **31**, 101–105.
- COI, 2008. Olive nursery production and plant production techniques. In: *Olive growing and nursery production*. Madrid, España: Consejo Oleico Internacional. <http://www.internationaloliveoil.org/projects/paginas/Section-a.htm>
- COI, 2016. Estadísticas mundiales sobre producción, importaciones, exportaciones y consumo de Aceite de oliva y Aceitunas de Mesa. Madrid, España: Consejo Oleico Internacional. <http://www.internationaloliveoil.org>.
- Debode J, Van Poucke K, França SC, Maes M, Höfte M, Heungens K, 2011. Detection of multiple *Verticillium* species in soil using density flotation and real-time polymerase chain reaction. *Plant Disease* **95**, 1571–1580.
- Dervis S, Mercado-Blanco J, Erten L, Valverde-Corredor A, Pérez-Artés E, 2010. *Verticillium* wilt of olive in Turkey: A survey of disease importance, pathogen diversity and susceptibility of relevant olive cultivars. *European Journal of Plant Pathology* **127**, 287–301.

- DeVay JE, Forrester LL, Garber RH, Butterfield EJ, 1974. Characteristics and concentration of propagules of *Verticillium dahliae* in air-dried field soils in relation to the prevalence of Verticillium wilt in cotton. *Phytopathology* **64**, 22–9.
- DeVay J, Pullman G, 1984. Epidemiology and ecology of diseases caused by Verticillium species, with emphasis on Verticillium wilt of cotton. *Phytopathologia Mediterranea* **23**, 95–108.
- Douhan LI, Johnson DA, 2001. Vegetative compatibility and pathogenicity of *Verticillium dahliae* from spearmint and peppermint. *Plant Disease* **85**, 297–302.
- Easton GD, Nagle ME, Bailey DL, 1969. A method of estimating *Verticillium albo-atrum* propagules in field soil and irrigation water. *Phytopathology* **59**, 1171–2.
- El-Zik KM, 1985. Integrated control of Verticillium wilt of cotton. *Plant Disease* **69**, 1025–1032.
- Erdogan O, Nemli S, Oncu T and Tanyolac B, 2013. Genetic variation among pathotypes of *Verticillium dahliae* Kleb. from cotton in western Turkey revealed by AFLP. *Canadian Journal of Plant Pathology* **35**, 354–362.
- Estrada P, López-Escudero FJ, Mercado-Blanco J, Valverde-Corredor A, Blanco-López MA, 2008. Detección molecular de *Verticillium dahliae* en peciolos de hojas de cultivares de olivo con diferentes niveles de resistencia. En: *Libro de Resúmenes del XIV Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Lugo, España: 261.
- European Food Safety Authority Panel on Plant Health, 2014. Scientific opinion on the pest categorization of *Verticillium dahliae* Kleb. *EFSA Journal* **12**, 3928. doi: 10.2903/j.efsa.014.3928.
- Evans G, Snyder WC, Wilhelm S, 1966. Inoculum increase of the Verticillium wilt fungus in soil. *Phytopathology* **56**, 590–594.
- Farley JD, Wilhelm S, Snyder WC, 1971. Repeated germination and sporulation of microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* in soil. *Phytopathology* **61**, 260–264.
- FAO. 2014. La Base de Datos Estadística (FAOSTAT). Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <http://www.fao.org/faostat/en/#home>. Consultado el 25 de mayo de 2017.

- García-Cabello S, Pérez-Rodríguez M, Blanco-López MA, López-Escudero FJ, 2012. Distribution of *Verticillium dahliae* through watering systems in widely irrigated olive growing areas in Andalucía (southern Spain). *European Journal of Plant Pathology* **133**, 877–85.
- García-Ruiz GM, Trapero C, del Río C, López-Escudero FJ, 2014. Evaluation of resistance of Spanish olive cultivars to *Verticillium dahliae* in inoculations conducted in greenhouse. *Phytoparasitica* **42**, 205–212.
- García-Ruiz GM, Trapero C, Varo-Suárez A, Trapero A, López-Escudero FJ, 2015. Identifying resistance to *Verticillium* wilt in local Spanish olive cultivars. *Phytopathologia Mediterranea* **54**, 453–460.
- Gaudreault SM, Powelson ML, Christensen NW, Crowe FJ, 1995. Soil water pressure and *Verticillium dahliae* interactions on potato. *Phytopathology* **85**, 1542–1546.
- Gent MP, Ferrandino FJ, Elmer WH, 1995. Effect of verticillium wilt on gas exchange of entire eggplants. *Canadian Journal of Botany* **73**, 557–565.
- Gerik JS, Huisman OC, 1988. Study of field-grown cotton roots infected with *Verticillium dahliae* using an immunoenzymatic staining technique. *Phytopathology* **78**, 1174–1178.
- Gharbi Y, Barkallah M, Bouazizi E, Cheffi M, Gdoura R, Ali Triki M, 2016. Differential fungal colonization and physiological defense responses of new olive cultivars infected by the necrotrophic fungus *Verticillium dahliae*. *Acta Physiologiae Plantarum* **38**: 242.
- Gilligan CA, 1990. Antagonistic interactions involving plant pathogens: fitting and analysis of models to non-monotonic curves for population and disease dynamics. *New Phytologist* **115**, 649–65.
- Gilligan CA, 1994. Temporal aspects of the development of root disease epidemics. In: Campbell CL, Benson DM, eds. *Epidemiology and Management of Root Diseases*. Berlin, Germany: Springer Berlin Heidelberg, 148–94.
- Goicoechea N, 2009. To what extent are soil amendments useful to control *Verticillium* wilt? *Pest Management Science* **65**, 831–839
- Gómez-Gálvez FJ, Rodríguez-Jurado D, 2015. Avances del potencial de productos químicos para erradicar los esclerocios de *Verticillium dahliae* en el agua. En: *Comunicaciones del XVII Simposio Científico-Técnico Expoliva*,

- Foro del Olivar y el Medio Ambiente, OLI-16*. CD-ROM, ISBN 978-84-938900-5-6. Jaén, España: Fundación del Olivar.
- Gómez-Lama Cabanás C, Schilirò E, Valverde-Corredor A, Mercado-Blanco J, 2014. The biocontrol endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* PICF7 induces systemic defense responses in aerial tissues upon colonization of olive roots. *Frontiers in Microbiology*. **5**, 427. doi: 10.3389/fmicb.2014.00427
- Gómez-Lama Cabanás C, Schilirò E, Valverde-Corredor A, Mercado-Blanco J, 2015. Systemic responses in a tolerant olive (*Olea europaea* L.) cultivar upon root colonization by the vascular pathogen *Verticillium dahliae*. *Frontiers in Microbiology* **6**, 928. Doi:10.3389/fmicb.2015.00928.
- Goud JC, Hiemstra JA, 1998. Other tree species. In: Hiemstra JA, Harris DC, eds. *A compendium of verticillium wilts in tree species*. Wageningen, the Netherlands: CPRO-DLO; West Malling, UK: HRI, 37–40.
- Goud JC, Termorshuizen AJ, 2003. Quality of methods to quantify microsclerotia of *Verticillium dahliae* in soil. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 523–534.
- Green RJ, 1969. Survival and inoculum potential of conidia and microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* in soil. *Phytopathology* **59**, 874-876.
- Green RJ Jr, 1980. Soil factors affecting survival of microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* **70**, 353–355.
- Gulya T, 2007. New strain of *Verticillium dahliae* in North America. *Helia* **30**, 115–120.
- Habib W, Choueiri E, Baroudy F, Tabet D, Gerges E, Saab C, Nigro F, 2016. Soil inoculum density of *Verticillium dahliae* and Verticillium wilt of olive in Lebanon. *Annals of Applied Biology* **in press**. doi:10.1111/aab.12323.
- Hawke MA, Lazarovits G, 1994. Production and manipulation of individual microsclerotia of *Verticillium dahliae* for use in studies of survival. *Phytopathology* **84**, 883–890.
- Hawksworth DL, Talboys PW, 1970. *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*. Kew, UK: Commonwealth Mycological Institute.
- Heale JB, 1988. *Verticillium* spp., the cause of vascular wilts in many species. *Advances in Plant Pathology* **6**, 291–312.
- Heis J, Pérez-Rodríguez M, Roca LF, López-Escudero FJ, 2016. Densidad de inóculo de *Verticillium dahliae* en la península ibérica y su relación con las

- propiedades fisico-químicas del suelo. En: *Libro de Resúmenes del XVIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Palencia, España: 250.
- Hidalgo J, Vega V, Hidalgo JC, Pastor M, Orgaz F, Fereres E, 2011. Responses to different irrigation strategies of a traditional and an intensive olive orchard cultivar 'Picual' in Andalusia, Spain. *Acta Horticulturae* **888**, 53–62.
- Hiemstra, J. 2015. Guide for Best Practices in managing *Verticillium* wilt in olive. Project VERTIGEEN. Contract No. FP7-SME-2011-2-286140. http://www.vertigeeen.eu/files_media/1429516669_vertigeeen_deliverable_6_1_3_guide_of_best_practices_final.pdf.
- Hu D, Wang C, Tao F, Cui Q, Xu X, Shang W, Hu X, 2014. Whole genome wide expression profiles on germination of *Verticillium dahliae* microsclerotia. *PLoS ONE* **9**, e100046.
- Huisman OC, Ashworth LJ, 1974. Quantitative assessment of *Verticillium albo-atrum* in field soils: Procedural and substrates improvement. *Phytopathology* **64**, 1043–1044.
- Huisman OC, Gerik JS, 1989. Dynamics of colonization of plant roots by *Verticillium dahliae* and other fungi. In: Tjamos EC, Beckman CH, eds. *Vascular Wilt Diseases of Plants*. Berlin, Germany: Springer Berlin Heidelberg, 1–17.
- Inderbitzin P, Bostock RM, Davis RM, Usami T, Platt HW, Subbarao KV, 2011. Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. *PLoS ONE* **6**, e28341.
- Isaac, I. 1967. Speciation in *Verticillium*. *Annual Review of Phytopathology* **5**, 201- 222.
- Jiménez Díaz RM, Castillo Castillo P, Landa del Castillo BB, Montes Borrego M, Olivares García C, Palomares Rius J E, Trapero Casas JL, Navas Cortés JA, 2015. Avances en la investigación sobre el control de la Verticilosis del olivo. *Vida Rural* **392**, 44–52.
- Jiménez-Díaz RM, Cirulli M, Bubici G, Jiménez-Gasco MM, Antoniou PP, Tjamos EC, 2012. *Verticillium* wilt, a major threat to olive production: Current status and future prospects for its management. *Plant Disease* **96**, 304–329.
- Jiménez-Díaz RM, Mercado-Blanco J, Olivares-García C, Collado-Romero M, Bejarano-Alcázar J, Rodríguez-Jurado D, Giménez-Jaime A, García-Jiménez

- J, Armengol J, 2006. Genetic and virulence diversity in *Verticillium dahliae* populations infecting artichoke in eastern-central Spain. *Phytopathology* **96**, 288–98.
- Jiménez-Díaz RM, Olivares-García C, Navas-Cortés JA, Landa BB, Jiménez-Gasco MM, 2011. A region-wide analysis of genetic diversity in *Verticillium dahliae* infecting olive in southern Spain and agricultural factors influencing the distribution and prevalence of vegetative compatibility groups and pathotypes. *Phytopathology* **101**, 304–315.
- Jiménez Díaz RM, Rodríguez Jurado D, Landa del Castillo BB, Trapero Casas JL, Navas Cortés JA, 2008. Dispersión de la Verticilosis a través de las hojas de olivos infectadas por el patotipo defoliante. *Vida Rural* **265**, 40–44.
- Jiménez Díaz RM, Trapero Casas JL, Boned J, Landa BB, Navas Cortés J A, 2009. Uso de Bioten para la protección biológica de plantones de olivo contra la Verticilosis causada por el patotipo defoliante de *Verticillium dahliae*. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* **35**, 595–615.
- Jiménez-Fernández D, Trapero-Casas JL, Landa BB, Navas-Cortés JA, Bubici G, Cirulli M, Jiménez-Díaz RM, 2016. Characterization of resistance against the olive-defoliating *Verticillium dahliae* pathotype in selected clones of wild olive. *Plant Pathology* **65**, 1279–91.
- Jiménez-Ruiz J, Leyva Pérez M, Schilirò E, Barroso JB, Bombarely A, Mueller L, Mercado Blanco J, Luque F, 2017. Transcriptomic analysis of the *Olea europaea* L. roots during the *Verticillium dahliae* early infection process. *Plant Genome* **10**. Doi: 10.3835/plantgenome2016.07.0060.
- Jurado Bello J, Haro Bailón A, Hidalgo Moya JJ, Hidalgo Moya JC, Vega Macías V, Bejarano-Alcázar J, 2013. Evaluación de la eficacia de enmiendas basadas en especies crucíferas implantadas como cubiertas vegetales para el control de la Verticilosis del olivo en condiciones de campo. En: *Comunicaciones del XVI Simposio Científico-Técnico Expoliva, Foro del Olivar y el Medio Ambiente, OLI-26*. CD-ROM, ISBN 978-84-938900-1-8. Jaén, España: Fundación del Olivar.
- Kabir Z, Bhat RG, Subbarao KV, 2004. Comparison of media for recovery of *Verticillium dahliae* from soil. *Plant Disease* **88**, 49–55.
- Karagiannidis N, Bletsos F, Stavropoulos N, 2002. Effect of *Verticillium* wilt (*Verticillium dahliae* Kleb.) and mycorrhiza (*Glomus mosseae*) on root

- colonization, growth and nutrient uptake in tomato and eggplant seedlings. *Scientia Horticulturae* **94**, 145–156.
- Karajeh MR, 2006. Seed transmission of *Verticillium dahliae* in olive as detected by a highly sensitive nested PCR-based assay. *Phytopathologia Mediterranea* **45**, 15–23.
- Karajeh MR, Masoud SA, 2006. Molecular detection of *Verticillium dahliae* Kleb. in asymptomatic olive trees. *Journal of Phytopathology* **154**, 496–499.
- Katan J, 1987. Soil solarization. In: Chet I, ed. *Innovative approaches to plant disease management*. New York, USA: Wiley, 77–105.
- Katan J, 2000. Physical and cultural methods for the management of soil-borne pathogens. *Crop Protection* **19**, 725–731.
- Koike ST, Subbarao KV, Davis RM, Gordon TR, Hubbard JC, 1994. Verticillium wilt of cauliflower in California. *Plant Disease* **78**, 1116–1121.
- Korolev N, Pérez-Artés E, Mercado-Blanco J, Bejarano-Alcázar J, Rodríguez-Jurado D, Jiménez-Díaz RM, Katan T, Katan J, 2008. Vegetative compatibility of cotton-defoliating *Verticillium dahliae* in Israel and its pathogenicity to various crop plants. *European Journal of Plant Pathology* **122**, 603–617.
- Lacy ML, Horner CE, 1966. Behavior of *Verticillium dahliae* in the rhizosphere and on roots of plants susceptible, resistant, and immune to wilt. *Phytopathology* **56**, 427-430
- Levin AG, Lavee S, Tsrer (Lahkim) L, 2003a. Epidemiology of *Verticillium dahliae* on olive (cv. Picual) and its effect on yield under saline conditions. *Plant Pathology* **52**, 212–218.
- Levin AG, Lavee S, Tsrer (Lahkim) L, 2003b. Epidemiology and effects of Verticillium wilt on yield in olive (cvs. Barnea and Souri) irrigated with saline water in Israel. *Phytoparasitica* **31**, 333–343.
- López-Escudero FJ, Blanco-López MA, 2001. Effect of a single or double soil solarization to control Verticillium wilt in established olive orchards. *Plant Disease* **85**, 489-496.
- López-Escudero FJ, Blanco-López MA, 2005a. Recovery of young olive trees from *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology* **113**, 365–375.

- López-Escudero FJ, Blanco-López MA, 2005b. Effects of drip irrigation on population of *Verticillium dahliae* in olive orchards. *Journal of Phytopathology* **153**, 238–9.
- López-Escudero FJ, Blanco-López MA, 2007. The relationship between the inoculum density of *Verticillium dahliae* and the progress of Verticillium wilt of olive. *Plant Disease* **91**, 1372–1378.
- López-Escudero FJ, Mercado-Blanco J, 2011. Verticillium wilt of olive: a case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen. *Plant and Soil* **344**, 1–50.
- López-Escudero FJ, Mercado-Blanco J, Roca JM, Valverde-Corredor A, Blanco-López MA, 2010. Verticillium wilt of olive in the Guadalquivir Valley (southern Spain): relations with some agronomical factors and spread of *Verticillium dahliae*. *Phytopathologia Mediterranea* **49**, 370–380.
- López-Escudero FJ, del Río C, Caballero JM, Blanco-López MA, 2004. Evaluation of olive cultivars for resistance to *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology* **110**, 79–85.
- Mace ME, 1981. Biochemistry and Physiology of Resistance. In: Mace ME, Bell AA, Beckman CH, eds. *Fungal wilt diseases of plants*. New York, USA: Academic Press, Inc, 431–486.
- MAPAMA, 2014. Guía de gestión integrada de plagas olivar. Madrid, España: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Secretaría General Técnica.
- MAPAMA, 2016. Encuesta sobre Superficies y Rendimientos Cultivos (ESYRCE). Madrid, España: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
- Markakis EA, Ligoxigakis EK, Avramidou EV, Tzanidakis N, 2014. Survival, persistence, and infection efficiency of *Verticillium dahliae* passed through the digestive system of sheep. *Plant Disease* **98**, 1235–1240.
- Markakis EA, Tjamos SE, Antoniou PP, Paplomatas EJ, Tjamos EC, 2009. Symptom development, pathogen isolation and Real-time QPCR quantification as factors for evaluating the resistance of olive cultivars to *Verticillium* pathotypes. *European Journal of Plant Pathology* **124**, 603–611.

- Markakis EA, Tjamos SE, Antoniou PP, Paplomatas EJ, Tjamos EC, 2016. Biological control of *Verticillium* wilt of olive by *Paenibacillus alvei*, strain K165. *BioControl* **61**, 293–303.
- Markakis EA, Tjamos SE, Antoniou PP, Roussos PA, Paplomatas EJ, Tjamos EC, 2010. Phenolic responses of resistant and susceptible olive cultivars induced by defoliating and nondefoliating *Verticillium dahliae* pathotypes. *Plant Disease* **94**, 1156–1162.
- Martín-Pérez J, Rubio-Campos JC, Pastor Muñoz-Cobos M, 2005. Estructura del regadío de olivar en Andalucía y origen y disponibilidad de agua para riego. En: Pastor Muñoz-Cobos M, ed. *El cultivo del olivo con riego localizado*. Madrid, España: Mundi-Prensa y Junta de Andalucía, 17–37.
- Martínez F, Castillo S, Carmona E, Avilés M, 2009. Effect of soilless growing systems on the spread of *Verticillium dahliae* and the severity of the *Verticillium* wilt in strawberry. *Spanish Journal of Agricultural Research* **7**, 447–453.
- Martos Moreno C, López-Escudero FJ, Blanco López MA, 2006. Resistance of olive cultivars to the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*. *HortScience* **41**, 1313–1316.
- Mathre D, 1986. Occurrence of *Verticillium dahliae* on barley. *Plant Disease* **70**, 981.
- Menzies JD, Grielbel GE, 1967. Survival and saprophytic growth of *Verticillium dahliae* in uncropped soil. *Phytopathology* **57**, 703–709.
- Mercado-Blanco J, Collado-Romero M, Parrilla-Araujo S, Rodríguez-Jurado D, Jiménez-Díaz RM, 2003a. Quantitative monitoring of colonization of olive genotypes by *Verticillium dahliae* pathotypes with real-time polymerase chain reaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **63**, 91–105.
- Mercado-Blanco J, Rodríguez-Jurado D, Parrilla-Araujo S, Jiménez-Díaz RM, 2003b. Simultaneous detection of the defoliating and nondefoliating *Verticillium dahliae* pathotypes in infected olive plants by duplex, nested polymerase chain reaction. *Plant Disease* **87**, 1487–1494.
- Mercado-Blanco J, Rodríguez-Jurado D, Pérez-Artés E, Jiménez-Díaz RM, 2001. Detection of the nondefoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in infected olive plants by nested PCR. *Plant Pathology* **50**, 609–619.

- Milgroom MG, Jiménez-Gasco MM, Olivares-García C, Jiménez-Díaz RM, 2016. Clonal expansion and migration of a highly virulent, defoliating lineage of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* **106**, 1036–46.
- Mol L, 1995. Formation of microsclerotia of *Verticillium dahliae* on various crops. *Netherland Journal of Agricultural Science* **43**, 205–215.
- Montes F, Páez JI, Vega, JM, Duhart ME, 1997. Épocas de aislamiento de *Verticillium dahliae* Kleb. en olivar en la provincia de Sevilla. *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas* **23**, 439–447.
- Moradi A, Almasi MA, Jafary H, Mercado-Blanco J, 2014. A novel and rapid loop-mediated isothermal amplification assay for the specific detection of *Verticillium dahliae*. *Journal of Applied Microbiology* **116**, 942–954.
- Moraño Moreno R, Bejarano Alcázar J, Rodríguez Jurado D, 2008a. Presencia de los patotipos defoliante y no defoliante de *Verticillium dahliae* en las aguas de riego de cultivos en Andalucía. En: *Libro de Resúmenes del XIV Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Lugo, España: 206.
- Moraño Moreno R, Bejarano Alcázar J, Rodríguez Jurado D, 2008b. Propágulos de *Verticillium dahliae* de diferente tamaño infestan el agua utilizada en distintas campañas de riego del olivar en Andalucía. En: *Libro de Resúmenes del XIV Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Lugo, España: 207.
- Moraño Moreno R, Bejarano Alcázar J, Rodríguez Jurado D, 2010a. Virulencia de aislados de *Verticillium dahliae* originarios de las aguas de riego de olivar en Andalucía sobre olivo. En: *Libro de Resúmenes del XV Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Vitoria-Gasteiz, España: 283.
- Moraño Moreno R, Bejarano Alcázar J, Rodríguez Jurado D, 2010b. Efecto de la dosis y frecuencia de riego sobre los niveles de distintos propágulos de *Verticillium dahliae* en el suelo. En: *Libro de Resúmenes del XV Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Vitoria-Gasteiz, España: 284.
- Moraño Moreno R, Bejarano Alcázar J, Rodríguez Jurado D, 2011. Grupos de virulencia de *Verticillium dahliae* sobre olivo presentes en las aguas subterráneas y superficiales utilizadas para el riego de olivares en Andalucía. En: *Comunicaciones del XVII Simposio Científico-Técnico Expoliva, Foro del Olivar y el Medio Ambiente, OLI-08*. CD-ROM, ISBN 978-84-938900-0-1. Jaén, España: Fundación del Olivar.

- Morehart AL, Melchior GL, 1982. Influence of water stress on *Verticillium* wilt of yellow poplar. *Canadian Journal of Botany* **60**, 201–209.
- Mussell HW, Stillwell P, Peck S, 1982. The possible origin of ethylene in *Verticillium* wilt of tomato. *Phytopathology* **72**, 968.
- Naser ZW, Al-Raddad Al-Momany A, 1998. Dissemination factors of *Verticillium* wilt of olive in Jordan. *Dirasat Journal of Agricultural Sciences* **25**, 16–21.
- Navarro D, Parra MA, 2008. Plantación. En: Barranco D, Fernández Escobar R, Rallo L, eds. *El Cultivo del Olivo sexta edición*. Madrid, España: Junta de Andalucía and Ediciones Mundi-Prensa, 167–180.
- Navas-Cortés JA, Landa BB, Mercado-Blanco J, Trapero-Casas JL, Rodríguez-Jurado D, Jiménez-Díaz RM, 2008. Spatiotemporal analysis of spread of *Verticillium dahliae* pathotypes within a high tree density olive orchard in southern Spain. *Phytopathology* **98**, 167–180.
- Nicot PC, Rouse DI, 1987. Precision and bias of three quantitative soil assays for *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* **77**, 875–881.
- Nigro F, Gallone P, Romanazzi G, Schena L, Ippolito A, Salerno MG, 2005. Incidence of *Verticillium* wilt on olive in Apulia and genetic diversity of *Verticillium dahliae* isolates from infected trees. *Journal of Plant Pathology* **87**, 13–23.
- Orgaz F, Fereres E, 2008. El riego. En: Barranco D, Fernández Escobar R, Rallo L, eds. *El Cultivo del Olivo sexta edición*. Madrid, España: Junta de Andalucía y Ediciones Mundi-Prensa, 301-322.
- Ostos E, Porrás R, López-Escudero FJ, Trapero-Casas A, Moral J, 2015. Effect of cultivar resistance, soil management and soil solarization on spatio-temporal development of *Verticillium* wilt of olive: a long-term study. En: *Resúmenes de la Reunión Anual APS 2015*. Pasadena, California, USA: 596.
- Ostos E, Trapero C, Trapero A, López-Escudero FJ, 2016. Relación entre la densidad de inóculo de *Verticillium dahliae* y el progreso de la Verticilosis en cultivos de olivo con diferente nivel de resistencia. En: *Libro de Resúmenes del XVIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Palencia, España: 296.
- Palomares-Rius JE, Castillo P, Montes-Borrego M, Navas-Cortés JA, Landa BB, 2015. Soil properties and olive cultivar determine the structure and

- diversity of plant-parasitic nematode communities infesting olive orchards soils in southern Spain. *PLoS ONE* **10**, e0116890.
- Pascual I, Azcona I, Morales F, Aguirreolea J, Sánchez-Díaz, M.. 2010. Photosynthetic response of pepper plants to wilt induced by *Verticillium dahliae* and soil water deficit. *Journal of Plant Physiology* **167**, 701–708.
- Pastor M, 2005. Cultivo del olivo con riego localizado. Madrid, España: Mundi-Prensa y Junta de Andalucía.
- Pegg GF, 1989. Pathogenesis in vascular diseases of plants. In: Tjamos EC, Beckman CH, eds, *Vascular wilt diseases of plants: basic studies and control*. New York, USA: Springer-Verlag, 51–94.
- Pegg GF, Brady BL, 2002. *Verticillium Wilts*. New York, USA: CABI Publishing.
- Pennypacker BW, Leath KT, Hill RR Jr, 1991. Impact of drought stress on the expression of resistance to *Verticillium albo-atrum* in alfalfa. *Phytopathology* **81**, 1014–1024.
- Pérez-Rodríguez M, Alcántara E, Amaro M, Serrano N, Lorite IJ, Arquero O, Orgaz F, López-Escudero FJ, 2015a. The influence of irrigation frequency on the onset and development of *Verticillium* wilt of olive. *Plant Disease* **99**, 488–95.
- Pérez-Rodríguez M, Orgaz F, Lorite IJ, López-Escudero FJ, 2015b. Effect of the irrigation dose on *Verticillium* wilt of olive. *Scientia Horticulturae* **197**, 564–7.
- Pérez-Rodríguez M, Roca LF, López-Escudero FJ, 2016a. Influencia de la fertirrigación en la Verticilosis del olivo. En: *Libro de Resúmenes del XVIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Palencia, España: 251.
- Pérez-Rodríguez M, Serrano N, Arquero O, Orgaz F, Moral J, López-Escudero FJ, 2016b. The effect of short irrigation frequencies on the development of *Verticillium* wilt in the susceptible olive cultivar ‘Picual’ under field conditions. *Plant Disease* **100**, 1880–8.
- Pomar F, Novo M, Bernal MA, Merino F, Ros Barceló A (2004) Changes in lignins (monomer composition and crosslinking) and peroxidase are related with the maintenance of leaf photosynthetic integrity during *Verticillium* wilt in *Capsicum annuum*. *New Phytologist* **163**, 111–123.
- Presley JT, Dick JB, 1951. Fertilizer and weather affect *Verticillium* wilt. *Mississippi Farm Research* **14**: 1–6.

- Prieto P, Navarro-Raya C, Valverde-Corredor A, Amyotte S, Dobinson KF, Mercado-Blanco J, 2009. Colonization process of olive tissues by *Verticillium dahliae* and its *in planta* interaction with the biocontrol root endophyte *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *Microbial Biotechnology* **2**, 499–511.
- Rallo L, 1998. Sistemas frutícolas de secano: El olivar. En: Jiménez Díaz RM, Lamo de Espinosa J, eds. *Agricultura Sostenible*. Madrid, España: Mundi-Prensa, 471–487.
- Resende ML V, Mepsted R, Flood J, Cooper RM, 1996. Water relations and ethylene production as related to symptom expression in cocoa seedlings infected with defoliating and non-defoliating isolates of *Verticillium dahliae*. *Plant Pathology* **45**, 964–972.
- Roca LF, Moral J, Trapero C, Blanco-López MA, López-Escudero FJ, 2016. Effect of inoculum density on *Verticillium* wilt incidence in commercial olive orchards. *Journal of Phytopathology* **164**, 61–64.
- Rodríguez E, Campos M, Fernández ML, Ocampo JA, García-Garrido JM, 2007. Detection of *Verticillium dahliae* in irrigation water. *IOBC WPRS Bulletin* **30 (9)**, 41.
- Rodríguez E, García-Garrido JM, García PA, Campos M, 2008. Agricultural factors affecting *Verticillium* wilt in olive orchards in Spain. *European Journal of Plant Pathology* **122**, 287–295.
- Rodríguez Jurado D, 1993. *Interacciones Huésped-Parásito en la Marchitez del Olivo (Olea europaea L.) Inducida por Verticillium dahliae Kleb.* Córdoba, España: Universidad de Córdoba, Tesis doctoral.
- Rodríguez-Jurado D, Bejarano-Alcázar J, 2007. Dispersión de *Verticillium dahliae* en el agua utilizada para el riego de olivares en Andalucía. *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas* **33**, 547–62.
- Rodríguez-Jurado D, Blanco-López MA, Rapoport HE, Jiménez-Díaz RM, 1993. Present status of *Verticillium* wilt of olive in Andalucía (southern Spain). *EPPO Bulletin* **23**, 513–6.
- Rodríguez Jurado D, Jiménez Martínez R, Mercado Blanco J, Jiménez Díaz RM, 2009. Virulencia sobre plantones de olivo picual de aislados de *Verticillium dahliae* que difieren en el patrón de marcadores moleculares. En: *Actas del Simposio Científico-Técnico Expoliva 2007*. Jaén, España: Fundación del Olivar, (II) 41–54.

- Rodríguez-Jurado D, Moraño-Moreno R, Bejarano-Alcázar J, 2008. Dispersion of defoliating and non-defoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* in host crops by irrigation water in southern Spain. *Journal of Plant Pathology* **90**, 419–420.
- Rodríguez Jurado D, Porrás Alonso R, Trapero Casas JL, Jiménez Díaz RM, 2002. Potencial de las hojas de olivo caídas tras la infección por el patotipo defoliante de *Verticillium dahliae* como fuente de inóculo en las epidemias de Verticilosis. En: *Libro de Resúmenes del XI Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Almería, España: P-138.
- Ruggieri G, 1946. Una nuova malattia dell'olivo. *L'Italia Agricola* **83**, 369–372.
- Ruiz Torres MJ, 2015. Balance fitosanitario del olivar andaluz en el año 2014. *Vida Rural* **392**, 36–42.
- Runia WT, 1994. Disinfection of recirculation water from closed cultivation systems with ozone. *Acta Horticulturae* **361**, 388–396.
- Saadatmand AR, Banihashemi Z, Sepaskhah AR, Maftour M, 2006. Effect of water potential on germination of *Verticillium dahliae* microsclerotia. *Phytopathologia Mediterranea* **45**, 225–230.
- Saadatmand AR, Banihashemi Z, Sepaskhah AR, Maftour M, 2008. Soil salinity and water stress and their effect on susceptibility to *Verticillium* wilt diseases, ion composition and growth of pistachio. *Journal of Phytopathology* **156**, 287–292.
- Sadras VO, Quiroz F, Echarte L, Escande A, Pereyra VR, 2000. Effect of *Verticillium dahliae* on photosynthesis, leaf expansion and senescence of field-grown sunflower. *Annals of Botany* **86**, 1007–1015.
- Saeedizadeh A, Kheiri A, Okhovat M, Hoseininejad A, 2003. Study on interaction between root-knot nematode *Meloidogyne javanica* and wilt fungus *Verticillium dahliae* on olive seedlings in greenhouse. *Communications in agricultural and applied biological sciences* **68**, 139–43.
- Schnathorst WC, 1981. Life-cycle and epidemiology of *Verticillium*. En: Mace ME, Bel AA, Beckman CH, eds. *Fungal wilt diseases of plants*. New York, USA: Academic Press, Inc, 81–108.
- Schnathorst WC, Mathre DE, 1966. Host range and differentiation of a severe form of *Verticillium albo-atrum* in cotton. *Phytopathology* **56**, 1155–1161.

- Schnathorst WC, Sibbett GS, 1971. The relation of strains of *Verticillium albo-atrum* to severity of Verticillium wilt in *Gossypium hirsutum* and *Olea europaea* in California. *Plant Disease Report* **9**, 780–782.
- Schreiber LR, Green RJ, 1963. Effect of root exudates on germination of conidia and microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* inhibited by soil fungistatic principle. *Phytopathology* **53**, 260–264.
- Serrhini MN, Zeroual A, 1995. Verticillium wilt in Morocco. *Olivae* **58**, 58–61.
- Sesli M, Onan E, Oden S, Yener H, Yegenoglu ED, 2010. Resistance of olive cultivars to *Verticillium dahliae*. *Scientific Research and Essays* **5**, 1561–1565.
- Smith HC, 1965. The morphology of *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae* and *V. tricorpus*. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **8**, 450–478.
- Smith VL, Rowe RC, 1984. Characteristics and distribution of propagules of *Verticillium dahliae* in Ohio potato field soils and assessment of two assay methods. *Phytopathology* **74**, 553–556.
- Snyder WC, Hansen HN, Wilhelm S, 1950. New host of *Verticillium albo-atrum*. *Plant Disease Report* **34**, 26–27.
- Termorshuizen AJ, Davis JR, Gort G, Harris DC, Huisman OC, Lazarovitis G, Locke T, Melero Vara JM, Mol L, Paplomatas EJ, Platt HW, Powelson M, Rouse DI, Rowe RC, Tsrer L, 1998. Interlaboratory comparison of methods to quantify microsclerotia of *Verticillium dahliae* in soil. *Applied Environmental and Microbiology* **64**, 3846–3853.
- Termorshuizen AJ, Mol L, 1995. Modelling the dynamics of *Verticillium dahliae*. En: Haverkort AJ, MacKerron DKL, eds. *Potato Ecology and Modelling of Crops under Conditions Limiting Growth*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 265–80.
- Thanassoulopoulos CC, 1993. Spread of Verticillium wilt by nursery plants in olives grows in the Halkidiki area (Greece). *EPPO Bulletin* **23**, 517–520.
- Thanassoulopoulos CC, Biris DA, Tjamos EC, 1979. Survey of Verticillium wilt of olive trees in Greece. *Plant Disease Report* **63**, 936–940.
- Thanassoulopoulos CC, Biris DA, Tjamos EC, 1980. Dissemination of *Verticillium* propagules in olive orchards by irrigation water. En: *Actas del V Congreso de la Unión Fitopatológica Mediterránea*. Patras, Grecia: 52-53.

- Thanassoulopoulos CC, Biris DA, Tjamos EC, 1981. Weed hosts as inoculum source of *Verticillium* in olive orchards. *Phytopathologia Mediterranea* **20**, 164–168.
- Tjamos EC, 1993. Prospects and strategies in controlling *Verticillium* wilt of olive. *EPPO Bulletin* **23**, 505–512.
- Tjamos EC, Biris DA, Paplomatas EJ, 1991. Recovery of olive trees from *Verticillium* wilt after individual application of soil solarization in established olive orchards. *Plant Disease* **75**, 557–562.
- Tjamos EC, Botseas D, 1987. Occurrence of *Verticillium dahliae* in leaves of *Verticillium*-wilted olive trees. *Canadian Journal of Plant Pathology* **9**, 86.
- Tjamos EC, Jiménez Díaz RM, 1998. Management of disease. En: Hiemstra JA, Harris DC, eds. *A Compendium of Verticillium Wilt in Tree Species*. Wageningen, Países Bajos: CPRO-DLO; West Malling, UK: HRI, 55–57.
- Tjamos EC, Tsougriani H, 1990. Formation of microsclerotia in partially disintegrated leaves of *Verticillium* affected olive trees. En: *Resúmenes del V Congreso Internacional de Verticillium*. Leningrado, Rusia: 20.
- Tosi L, Zizzerini A, 1998. An epidemiological study on *Verticillium* wilt of olive in central Italy. *Olivae* **71**, 50–55.
- Trapero A, Blanco-López MA, 2008. Enfermedades. En: Barraco D, Fernández-Escobar R, Rallo L, eds. *El Cultivo del Olivo sexta edición*. Madrid, España: Junta de Andalucía y Ediciones Mundi-Prensa, 595–656.
- Trapero C, Rallo L, López-Escudero FJ, Barranco D, Díez CM, 2015. Variability and selection of *Verticillium* wilt resistant genotypes in cultivated olive and in the *Olea* genus. *Plant Pathology* **64**, 890–900.
- Trapero C, Roca LF, Alcántara E, López-Escudero FJ, 2011. Colonization of olive inflorescences by *Verticillium dahliae* and its significance for pathogen spread. *Journal of Phytopathology* **159**, 638–640.
- Trapero C, Serrano N, Arquero O, Del Río C, Trapero A, López-Escudero FJ, 2013. Field resistance to *Verticillium* wilt in selected olive cultivars grown in two naturally infested soils. *Plant Disease* **97**, 668–674.
- Tsrer (Lahkim) L, 2011. Epidemiology and control of *Verticillium* wilt on olive. *Israel Journal of Plant Sciences* **59**, 59–69.
- Valverde-Caballero P, Trapero C, Arquero O, Serrano N, Roca LF, López-Escudero FJ, 2016. Uso de patrones resistentes para el control de la

- Verticilosis del olivo. En: *Libro de Resúmenes del XVIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Palencia, España: 96.
- Vallad GE, Qin QM, Grube R, Hayes RJ, Subbarao KV, 2006. Characterization of race-specific interactions among isolates of *Verticillium dahliae* pathogenic on lettuce. *Phytopathology* **96**, 1380–1387.
- Van Alfen NK, 1989. Reassessment of plant wilt toxins. *Annual Review of Phytopathology* **27**, 533–550.
- Vargas-Machuca R, Martin C, Galindez W, 1987. Recovery of *Verticillium dahliae* from weed plants in farmers' fields in Peru. *Plant Disease* **71**, 756–758.
- Varo Suárez A, 2017. *Evaluación de enmiendas orgánicas, microorganismos y productos naturales para el control biológico de la Verticilosis en olivo*. Córdoba, España: Universidad de Córdoba, Tesis doctoral.
- Varo A, Mulero-Aparicio A, Adem M, Roca LF, Raya-Ortega MC, López-Escudero FJ, Trapero A, 2017. Screening water extracts and essential oils from Mediterranean plants against *Verticillium dahliae* in olive, *Crop Protection* **92**, 168–175.
- Varo A, Raya-Ortega MC, Trapero A. 2016. Selection and evaluation of microorganisms for biocontrol of *Verticillium dahliae* in olive. *Journal of applied Microbiology* **121**, 767–777.
- Vigouroux A, 1975. *Verticillium dahliae*, agent d'un dépérissement de l'olivier en France. *Annales de Phytopathologie* **7**, 37–44.
- Villalobos FJ, Testi L, Hidalgo J, Pastor M, Orgaz F, 2006. Modelling potential growth and yield of olive (*Olea europaea* L.) canopies. *European Journal of Agronomy* **24**, 296–303.
- Wiese MV, Devay JE, 1970. Growth regulator changes in cotton associated with defoliation caused by *Verticillium albo-atrum*. *Plant Physiology* **45**, 304-309.
- Wilhelm S, 1955. Longevity of *Verticillium* wilt fungus in the laboratory and field. *Phytopathology* **45**, 180–181.
- Wilhelm S, Taylor JB, 1965. Control of verticillium wilt of olive through natural recovery and resistance. *Phytopathology* **55**, 310–316.
- Xiao CL, Subbarao KV, 2000. Effects of irrigation and *Verticillium dahliae* on cauliflower root and shoot growth dynamics. *Phytopathology* **90**, 995–1004.

- Yaseen T, Dawalibi V, D'Onghia AM, Ippolito A, Nigro F, 2012. Effect of organic media, alone or in combination with bio-products, on olive plantlets growth and *Verticillium dahliae* infection. *Acta Horticulturae* **949**, 289–296.
- Young VH, Foulton ND, Waddle BA, 1959. Factors affecting the incidence and severity of *Verticillium* wilt disease of cotton. *Bulletin of the Arkansas Agricultural Experiment Station* **612**: 1–26.
- Zachos DG, 1963. La verticilliose de l'oliver en Grèce. *Annales Institut Phytopathologique Benaki (NS)* **5**, 105–7.

Capítulo 2

Objetivos

Capítulo 2: Objetivos

La superficie de olivar en regadío aumenta cada año en Andalucía, representando en la actualidad algo más de un tercio de la superficie dedicada a este cultivo. La implementación del riego para incrementar la producción ha contribuido a la gravedad y extensión de la VO en esta región, donde la presencia y extensión del patotipo D es crucial para la rentabilidad del cultivo por ocasionar la muerte de árboles del cultivar Picual, el más extendido en Andalucía, pérdidas de producción incluso en cultivares menos susceptibles, y poner en riesgo el patrimonio oleícola en los casos en los que un cultivar tradicional susceptible es sustituido por otro resistente. El riego incrementa la VO en distintos países, en ninguno de los cuales exceptuando España, se ha demostrado que las aguas de riego estén infestadas por *V. dahliae*. Basándonos en ello y en el efecto del riego en otras Verticilosis, es aceptable razonar que determinados contenidos en humedad del suelo, que variarán con el intervalo entre eventos de riego, puedan favorecer la multiplicación y/o supervivencia del hongo en el suelo, la interacción hongo-raíz y/o la colonización de la planta por modificar su crecimiento y/o perturbar los procesos fisiológicos. Para reducir los efectos del riego sobre la VO será necesario conocer la estrategia de riego con agua no infestada por *V. dahliae* que desfavorece uno o varios de los aspectos anteriores. En el caso particular de Andalucía, no se debe obviar que las epidemias de Verticilosis se inician tras la puesta en riego por goteo superficial de la parcela de olivar. Por lo que otra explicación plausible al incremento de la VO en regadío es la introducción de *V. dahliae* en la parcela y su incremento en el suelo próximo a las raíces a través del agua de riego. El predominio del patotipo D (altamente virulento) en las aguas de riego de olivar en Andalucía y de micropropágulos del patógeno en cantidades elevadas, considerando las necesarias para causar enfermedad, sostienen el razonamiento anterior. La elevada proporción de campos de olivo y algodonero regados con aguas contaminadas por *V. dahliae* en distintas campañas de riego indica además que la infestación es extensa afectando a la

sanidad de los suelos en Andalucía. El riego es necesario para que el olivar en Andalucía sea competitivo, por lo que en el marco de una estrategia de control integrado de la VO, el manejo del riego para paliar la enfermedad debe consistir en aplicar estrategias de riego que reduzcan el incremento del inóculo en el suelo, limiten su eficacia infectiva y/o la enfermedad, las cuales tienen que ser complementadas con medidas de erradicación o reducción de *V. dahliae* en las aguas utilizadas para regar, porque ello contribuirá a reducir el incremento del inóculo en el suelo y su dispersión, y podría prevenir su introducción.

Por ello, se plantearon tres objetivos principales para cuya consecución se abordaron una serie de objetivos específicos:

1. Valorar el efecto de diferentes estrategias de riego superficial por goteo sobre los propágulos de *Verticillium dahliae* que difieren en persistencia en el suelo y sobre la Verticilosis del olivo.

Valorar los efectos de un rango de contenidos de agua en el suelo y de frecuencias de riego por goteo con agua libre de *V. dahliae* sobre: i) el progreso de la VO; ii) los niveles de esclerocios y de estructuras menos persistentes y más pequeñas de *V. dahliae* (como micelio y conidias) en el suelo a lo largo del tiempo; y, iii) estudiar la relación de la enfermedad con los niveles de esclerocios y estructuras fúngicas menos persistentes.

2. Determinar las respuestas morfológicas y fisiológicas de olivos jóvenes a la Verticilosis bajo diferentes estrategias de riego.

Comparar parámetros morfológicos (crecimiento), de biomasa y fisiológicos relacionados con el riego, en plantones de olivo cultivados en suelo infestado y no infestado por *V. dahliae* y sujetos a tratamientos de riego que causan respuestas diferenciales a la VO; y, determinar qué parámetros ayudan a explicar la respuesta a la VO bajo diferentes tratamientos de riego.

3. Evaluar la eficacia de la desinfestación química para reducir las conidias de *Verticillium dahliae* en el agua de riego.

Evaluar *in vitro* la eficacia supresiva y preventiva de desinfestantes basados en agentes oxidantes y no oxidantes frente a infestaciones del agua por conidias de aislados de *V. dahliae* que difieren en virulencia; y, validar la

eficacia supresiva y preventiva de los tratamientos del agua que mostraron alta eficacia *in vitro* en condiciones de ambiente natural.

2.1 Esquema de la Tesis Doctoral

La Tesis se presenta como capítulos, parte de los cuales trata por separado los tres objetivos principales anteriormente descritos, que constituyen dos artículos aceptados y uno enviado, y que se corresponden con los Capítulos 3, 4 y 5.

El Capítulo 3 aborda el objetivo principal 1 mediante los objetivos específicos referidos con anterioridad.

En este Capítulo los efectos de un rango de contenidos de agua en el suelo (rango alto y bajo de contenido de agua en el suelo) y de frecuencias de riego por goteo (diaria, semanal y diaria durante algunos períodos y por lo demás semanalmente) con agua libre de *V. dahliae*, fueron evaluados bajo condiciones ambientales naturales sobre el progreso de la VO y la dinámica temporal del inóculo de *V. dahliae* que difiere en persistencia en el suelo, en un contexto cultivar-aislado con garantías para el desarrollo de la enfermedad. Los plantones del cultivar de olivo Picual crecieron en una mezcla de suelo infestada o no infestada con un aislado defoliante de *V. dahliae*. Se estimaron la severidad de síntomas de Verticilosis y la densidad de inóculo total en suelo húmedo, la densidad de micropropágulos y de esclerocios por separado, o menos y más persistentes estructuras, en el suelo húmedo, y la densidad de esclerocios en suelo secado al aire. Este capítulo ha sido aceptado para su publicación en la revista de investigación *Plant Pathology*:

Santos-Rufo A, Vega V, Hidalgo JC, Hidalgo JJ, Rodríguez-Jurado D, 2016. Assessment of the effect of surface drip irrigation on *Verticillium dahliae* propagules differing in persistence in soil and on *Verticillium* wilt of olive. *Plant Pathology* **in press**. Doi: 10.1111/ppa.12652

El Capítulo 4 se ocupa del objetivo principal 2 conformado por los objetivos específicos señalados previamente.

Este capítulo está centrado en la estimación de las respuestas morfológicas o de crecimiento y fisiológicas de olivos jóvenes crecidos en suelo infestado y no infestado por *V. dahliae* regado de la misma manera y mantenido en las condiciones expuestas en el capítulo 3. Se estudia si los tratamientos de riego que promueven una respuesta diferencial a la VO promueven también cambios distintivos en diversos parámetros morfológicos (crecimiento de brotes, diámetro de tallos, área foliar, volumen de copa entre otros), de biomasa (biomasa relativa aérea y de raíz y ratios de crecimiento), uso eficiente del agua y parámetros fisiológicos (potencial hídrico, conductancia estomática, fotosíntesis neta). Se determina, cuáles de estos parámetros ayudan a explicar la respuesta a la VO bajo diferentes tratamientos de riego. Este capítulo ha sido enviado para su revisión a la revista de investigación *Plant Pathology*:

Santos-Rufo A, Hidalgo JJ, Hidalgo JC, Vega V, Rodríguez-Jurado D, 2017. Morpho-physiological response of young olive trees to *Verticillium* wilt under different surface drip irrigation strategies. *Plant Pathology* **submitted**.

El Capítulo 5 trata el objetivo principal 3 a través de los objetivos específicos indicados antes.

Este Capítulo aborda la desinfestación del agua infestada por conidias con productos químicos registrados para ser incorporados a la misma para fines distintos de los que aquí nos ocupan. Se testaron *in vitro* tres desinfestantes químicos con diferentes agentes activos (entre ellos, peróxido de hidrogeno, amonio cuaternario e hipoclorito de sodio) por su eficacia supresiva y persistencia preventiva frente a infestaciones del agua por conidias de *V. dahliae*. La eficacia de los desinfestantes se evaluó en función de la concentración de los mismos y la virulencia de los aislados de *V. dahliae*. Las concentraciones de los desinfestantes más efectivas en reducir las infestaciones del agua por conidias *in vitro* se evaluaron en experimentos que simulaban la desinfestación del agua embalsada en ambiente natural. Este capítulo ha sido publicado en la revista de investigación *Crop Protection*:

Santos-Rufo A, Rodríguez-Jurado D, 2016. Evaluation of chemical disinfectants in reducing *Verticillium dahliae* conidia in irrigation water. *Crop Protection* **79**, 105–16.

Finalmente, se resumen las conclusiones generales de esta Tesis ya que en cada capítulo se discuten los resultados obtenidos.

Chapter 3

Assessment of the effect of surface drip irrigation on *Verticillium dahliae* propagules differing in persistence in soil and on Verticillium wilt of olive

Authors: A. Santos-Rufo^a, V. Vega^b, J. J. Hidalgo^b, J. C. Hidalgo^b, D. Rodríguez-Jurado^a

^aLaboratory of Plant Pathology, Area of Crop Protection; and ^bArea of Agricultural Production, Andalusian Institute of Agricultural Research and Training (IFAPA), Centro 'Alameda del Obispo', Apartado 3092, 14080 Córdoba, Spain

Accepted for publication in: *Plant Pathology* Doi: 10.1111/ppa.12652

Chapter 4

Morpho-physiological responses of young olive trees to Verticillium wilt under different surface drip irrigation strategies

Authors: Antonio Santos-Rufo^a, Javier J. Hidalgo^b, Juan C. Hidalgo^b, Victorino Vega^b and Dolores Rodríguez-Jurado^a

^aLaboratory of Plant Pathology, Area of Sustainable Crop Protection; and ^bArea of Agricultural Production, Andalusian Institute of Agricultural Research and Training (IFAPA), Centro 'Alameda del Obispo', Apartado 3092, 14080 Córdoba, Spain

Submitted to: *Plant Pathology* Manuscript ID PP-17-268

Chapter 5

Evaluation of chemical disinfectants in reducing *Verticillium dahliae* conidia in irrigation water

Authors: Antonio Santos-Rufo, Dolores Rodríguez-Jurado

Laboratory of Plant Pathology, Area of Crop Protection, Andalusian Institute of Agricultural Research and Training (IFAPA), Centro 'Alameda del Obispo', Apartado 3092, 14080 Córdoba, Spain.

Published in: *Crop Protection* (2016) **79**, 105–116

Chapter 6

Conclusions

Chapter 6: Conclusions

1. In a pot trial under natural environmental conditions, the combination of Picual olive cultivar and *V. dahliae* defoliating isolate was irrigated (with pathogen-free water) to two ranges of soil water content (RWC) — high (HR) and low (LR) — at three surface drip-irrigation frequencies — daily (DF), weekly (WF), and daily-weekly (DWF) — with different effects on the VWO and more and less persistent *V. dahliae* structures in the soil (Chapter 3).

2. Less persistent and potentially infective *V. dahliae* structures other than sclerotia, novelty quantified in wet soil as micropropagule density (MpD), were more affected by the irrigation frequency than by RWC. Compared to other irrigation frequencies, daily irrigation resulted in significantly lower Disease Incidence (DI) and Disease Intensity Index and MpD values as areas, regardless of the RWC. This could indicate that MpD, mainly composed of conidia and mycelium, played a part in disease development, though no relationship was found between inoculum levels and disease (Chapter 3).

3. RWC had a greater effect on the Incidence of Infected Plants (IIP) and total inoculum density, quantified as a whole, and sclerotia density estimated in air-dried and wet soil, than irrigation frequency did. However, whereas HR significantly reduced *V. dahliae* sclerotia as areas, it significantly increased the IIP, regardless of the irrigation frequency. This points to the likely involvement in disease development of other factors concerning the effect of water on plants or plant–pathogen interaction (Chapter 3).

4. Assessing the effect of different irrigation treatments on VWO in terms of growth and physiological responses in young olive plants grown in *Verticillium dahliae*-infested (+V) and non-infested (-V) soils under the abovementioned conditions (Chapter 3), we found that, in general, the growth and physiological responses

Conclusions

differed with the irrigation factors (RWC and irrigation frequency) and *V. dahliae*-soil infestation (Chapter 4).

5. Greater increases in shoot length (SL) as area (AUGPC), number of leaves, leaf area, relative aboveground (RA) and belowground (RB) biomass (morphological and biomass parameters) and biomass water-use efficiency (WUE_B) were reported with LR than with HR. Compared to other frequencies, DF treatments resulted in greater increases in these parameters plus stem diameter, SL and canopy volume. *V. dahliae*-soil infestation reduced all of the above parameters. Irrigation to HR led to a lower root weight ratio (R_{wr}) but higher shoot and stem weight ratios than LR (Chapter 4).

6. Irrigation frequency also affected physiological parameters. DF caused lower water stress (S_ψ) at the end of the first year and S_ψ was increased by the soil infestation only in WF and DWF treatments at the end of the trial. Moreover, although soil infestation reduced stomatal conductance (g_s) compared with -V soil at maximum time values of the derivative function of the DI progress curves, under DF irrigation, the high g_s values generated became even higher in +V plants than with other frequencies, which could have improved net photosynthesis (P_n) levels (Chapter 4).

7. Lower AUGPC, R_{wr} and RB resulting from HR irrigation, along with the higher SL, AUGPC, RA and g_s values but lower S_ψ values at DF, could lead to fewer root infections and vascular colonization at LR, and lower disease at DF in +V plants (Chapter 4).

8. Both -V and +V olive plants were clearly separated from each other in the multivariate trait space, except for the single +V plant irrigated to LR-DF treatment. Daily irrigation to low RWC, which minimizes the disease, kept the levels of growth, relative biomass and WUE_B , S_ψ , g_s and P_n in +V plants close to the levels achieved with -V treatments (Chapter 4).

9. Exploring chemical disinfestation of water as a way of reducing the most abundant *V. dahliae* inoculum in irrigation water in Andalusia, we found *in vitro* chemical disinfestants, based on oxidizing and nonoxidizing agents, which reduce and/or

eradicate water infestations by conidia of *V. dahliae* isolates with differential virulence to olive. The potential efficacy of these chemical treatments was higher against previously-infested water (Suppressive efficacy; SE) than against subsequently-infested water (Preventive Efficacy; PE) (Chapter 5).

10. The potential efficacy of disinfestants *in vitro* differed strongly over time and depended on the product concentration, principally for the product based on sodium hypochlorite (Deccoklor[®]), but was scarcely influenced by the isolate virulence of *V. dahliae*. In contrast to other disinfestants, chlorination had minimal or no effect. Two recommended concentrations for OX-VIRIN[®] (3.2 and 0.8 mL L⁻¹) and one for OX-AGUA AL 25[®] (46.4 µL L⁻¹) (products based principally on oxidizing and nonoxidizing agents, respectively), showed an efficacy (SE and PE) of 100 and 80.0 % after 30 and 5 to 30 days, respectively (Chapter 5).

11. Validation assays carried out under natural environmental conditions in spring confirmed that OX-VIRIN[®] at the recommended concentration of 3.2 mL L⁻¹, applied every 28 days to water, was the most effective treatment (SE and PE), with a 100% reduction of the average relative viability after 56 days. Although OX-VIRIN[®] is recommended for other uses, it could be useful in the context of integrated disease management in order to reduce and/or eradicate the most abundant *V. dahliae* inoculum in irrigation water in Andalusia (Chapter 5).

Anejo 1: Otras contribuciones científicas

Otras contribuciones científicas derivadas de esta tesis doctoral se enumeran a continuación.

Contribución a revistas de carácter divulgativo

Rodríguez-Jurado D, Santos A, Hidalgo J, Hidalgo JC, García-Cuevas E, Vega V, 2013. Influencia del riego sobre la Verticilosis del olivo. SERVIFAPA. Córdoba, España: Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera.

Santos Rufo A, Hidalgo JJ, Hidalgo JC, García Cuevas E, Vega V, Rodríguez Jurado D, 2013a. Estudio de la influencia del riego superficial por goteo sobre la Verticilosis del olivo. *Vida Rural* **358**, 36–42.

Santos Rufo A, Hidalgo Moya JJ, Hidalgo Moya JC, Vega V, Rodríguez Jurado D, 2013b. Primeros resultados de la influencia del riego superficial por goteo sobre el desarrollo de la Verticilosis del olivo. En: *Comunicaciones del XVI Simposio Científico-Técnico Expoliva, Foro del Olivar y el Medio Ambiente, OLI-30*. CD-ROM, ISBN 978-84-938900-1-8. Jaén, España: Fundación del Olivar.

Santos Rufo A, Hidalgo J, Hidalgo JC, Vega V, Rodríguez Jurado D, 2014. Influencia del riego superficial por goteo sobre la Verticilosis del olivo en condiciones de ambiente natural. En: *Libro de actas del VII Congreso Ibérico de Agroingeniería y Ciencias Hortícolas: Innovar y Producir para el Futuro (ISBN 10 84-695-9055-3)*. Madrid, España: Fundación General de la Universidad Politécnica de Madrid, 198–203.

Santos Rufo A, Rodríguez-Jurado D, 2013. Evaluación del potencial de productos químicos para el control de las conidias de *Verticillium dahliae* en el agua de riego. En: *Comunicaciones del XVI Simposio Científico-Técnico Expoliva, Foro del Olivar y el Medio Ambiente, OLI-29*. CD-ROM, ISBN 978-84-938900-1-8. Jaén, España: Fundación del Olivar.

Aportaciones científicas en congresos nacionales

Gómez-Gálvez FJ, Santos-Rufo A, Rodríguez-Jurado D, 2014. Eficacia *in vitro* de productos químicos comercializados para prevenir y erradicar los esclerocios de *Verticillium dahliae* en el agua. En: *Libro de Resúmenes del XVI Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Lérida, España: 303.

- Santos Rufo A, Hidalgo J, Hidalgo JC, Vega V, Rodríguez Jurado D, 2013a. Influencia del riego superficial por goteo sobre la Verticilosis del olivo en condiciones de ambiente natural. En: *Libro de Resúmenes del VII Congreso Ibérico de Agroingeniería y Ciencias Hortícolas (ISBN 978-84-695-8844-4)*. Madrid, España: Fundación General de la Universidad Politécnica de Madrid, 49.
- Santos Rufo A, Hidalgo Moya JJ, Hidalgo Moya JC, Vega V, Rodríguez Jurado D, 2013b. Primeros resultados de la influencia del riego superficial por goteo sobre el desarrollo de la Verticilosis del olivo. En: *Comunicaciones del XVI Simposio Científico-Técnico Expoliva, Foro del Olivar y el Medio Ambiente, OLI-30*. Jaén, España: Fundación del Olivar.
- Santos Rufo A, Hidalgo Moya JJ, Hidalgo Moya JC, Vega V, Rodríguez Jurado D, 2014. Influencia del rango de humedad en el suelo y la frecuencia de riego sobre la Verticilosis del olivo. En: *Libro de Resúmenes del XVI Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Lérida, España: 306.
- Santos Rufo A, Rodríguez Jurado D, 2012. Eficacia potencial de productos químicos para reducir las infestaciones del agua por conidias de distintos grupos de virulencia de *Verticillium dahliae* sobre olivo. En: *Libro de Resúmenes del XVI Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Málaga, España: 205.
- Santos Rufo A, Rodríguez-Jurado D, 2013. Evaluación del potencial de productos químicos para el control de las conidias de *Verticillium dahliae* en el agua de riego. En: *Comunicaciones del XVI Simposio Científico-Técnico Expoliva, Foro del Olivar y el Medio Ambiente, OLI-29*. Jaén, España: Fundación del Olivar.
- Santos Rufo A, Vega V, Hidalgo J, Hidalgo JC, Rodríguez Jurado D, 2012. Evaluando la influencia del riego por goteo sobre el desarrollo de la Verticilosis del olivo en condiciones de ambiente natural. En: *Libro de Resúmenes del XVI Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Málaga, España: 278.

Aportaciones científicas en congresos internacionales

- Gkizi D, Santos Rufo A, Rodríguez Jurado D, Paplomatas EJ, Tjamos SE, 2015. The role of starch metabolism on the host plant–*Verticillium dahliae* interaction. En: *Libro de Resúmenes del VI Conferencia de la Sociedad Científica Helena MikroBioKosmos (MBK)*. Atenas, Grecia: 115.
- Gómez-Gálvez FJ, Santos-Rufo A, Rodríguez-Jurado D, 2013. Potential efficacy of commercial chemicals to reduce water infestations by *Verticillium dahliae*. En: *Libro de Resúmenes del XI Simposio Internacional de Verticillium*. Göttingen, Alemania: 71 (Comunicación oral).
- Santos-Rufo A, Hidalgo JJ, Vega V, Hidalgo JC, Rodríguez-Jurado D, 2012. Study of the influence of surface drip irrigation on *Verticillium* wilt of olive in natural

environmental conditions. En: *Libro de Resúmenes del VII TH Simposio Internacional del Cultivo del Olivo*. San Juan, Argentina: P-81.

Santos-Rufo A, Vega V, Hidalgo JJ, Hidalgo JC, Rodríguez-Jurado D, 2013. Effects of surface drip irrigation on Verticillium wilt of olive in natural environmental conditions. En: *Libro de Resúmenes del XI Simposio Internacional de Verticillium*. Göttingen, Alemania: 124.

Anejo 2: Estancia predoctoral internacional

Trabajo publicado en la revista *Plant Pathology* correspondiente a la estancia en el extranjero.

The β -amylase genes: negative regulators of disease resistance for *Verticillium dahliae*

Authors: Danai Gkizi, Antonio Santos-Rufo, Dolores Rodríguez-Jurado, Epaminondas J. Paplomatas and Sotirios E. Tjamos

Published in: *Plant Pathology* (2015) **64**, 1484–1490

La Verticilosis del olivo (VO) causada por el hongo de suelo y colonizador vascular *Verticillium dahliae* Kleb., es la enfermedad más grave de este cultivo desde las perspectivas fitopatológica y económica. En el contexto actual de una creciente superficie de olivar en regadío unido al conocimiento de que el riego afecta a la VO y a la posible presencia de *V. dahliae* en el agua de riego en Andalucía, no solo es importante saber qué estrategia de riego (con agua no infestada) puede contribuir a paliar la VO sino también conocer el estado fitosanitario respecto a *V. dahliae* del agua de riego para desinfectarla en el caso de estar contaminada. La presente Tesis aporta nuevos conocimientos sobre los efectos de la gestión del riego sobre el desarrollo de la VO. En particular, se demostró que los propágulos menos persistentes de *V. dahliae* en el suelo participan en el desarrollo de la enfermedad y sus niveles son reducidos en mayor magnitud al regar diariamente que con otras frecuencias. Se encontró una reducción del desarrollo radicular como posible explicación de una mayor incidencia de la enfermedad bajo regímenes de riego alto. Además, el riego diario pudo prevenir el incremento en síntomas característico de otras frecuencias de riego por ocasionar los mayores incrementos de crecimiento en longitud y biomasa de la parte aérea junto con los valores más altos de potencial hídrico, mejorados por una reducción menor de la conductancia estomática. Por último, se proporcionaron directrices importantes para el uso de algunos desinfectantes para el agua de riego.



JUNTA DE ANDALUCÍA

Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Junio 2017