



Diseño y evaluación de formulados precomerciales para el control biológico de la Verticilosis del olivo

El control de la Verticilosis del olivo (VO) constituye uno de los retos más importantes de la olivicultura española actual. Las soluciones químicas a esta enfermedad no son efectivas, por lo que el control integrado de la misma, y, dentro de éste, el biológico, destaca como una de las alternativas más prometedoras en campo. En este sentido, el Grupo de Patología Agroforestal de la Universidad de Córdoba (AGR-216) ha trabajado durante los últimos diez años en la búsqueda y evaluación de productos de origen natural frente a la VO. Entre los productos biológicos evaluados por su eficacia frente a *V. dahliae*, destacan diversos hongos y bacterias de suelo antagonistas del patógeno. Sin embargo, su aplicación efectiva al olivar necesita un gran esfuerzo de transferencia tecnológica entre organismos públicos de investigación y empresas privadas. Por ello, en 2019 se formalizó el proyecto de compra pública Innolivar, donde su Línea 8, titulada 'Formulados precomerciales de microorganismos antagonistas para el control de la Verticilosis del olivo', tiene como objetivo principal desarrollar dos formulados precomerciales de microorganismos eficaces en condiciones reales contra la VO, uno basado en cepas bacterianas extremófilas y el otro en una cepa no patogénica de *Fusarium oxysporum*. En este artículo se describe el proceso y los principales resultados obtenidos, desde los trabajos de selección masiva de compuestos naturales llevados a cabo por el Grupo AGR-216, hasta el desarrollo, estado actual y perspectivas futuras de dicho proyecto.

Palabras clave: Agentes de control biológico, Biocontrol, *Olea europaea*, Innolivar, *Verticillium dahliae*.

**Antonio Mulero-Aparicio¹,
Joaquín Romero¹,
Ángela Varo-Suárez¹,
Ana López-Moral¹,
Carlos Agustí-Brisach¹,
Luis F. Roca¹,
M. Carmen Raya-Ortega¹,
Antonio Santos-Rufo¹,
Fco. Javier López-Escudero¹,
Clara Narrillos²,
Samantha Besse²,
Luis Salido-Navarro³,
Antonio Trapero¹.**

¹Grupo Patología Agroforestal, Departamento de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edif. C4, Córdoba.

²UPL-IBERIA, Barcelona.

³HEROGRAS ESPECIALES, Albolote, Granada.

La Verticilosis del olivo (VO), causada por el hongo de suelo *Verticillium dahliae*, constituye uno de los problemas sanitarios más importantes del olivar en la mayoría de los países productores de este cultivo causando elevadas pérdidas económicas al provocar la muerte de olivos (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011). Debido a la dificultad que presenta el control de esta enfermedad, seguir una estrategia de manejo integrado es el método más eficaz para reducir tanto su incidencia como su dispersión. Por otro lado, durante los últimos años se ha incrementado la búsqueda de métodos alternativos de control. Así, el control biológico surge como una alternativa potencialmente eficaz y sostenible para incorporar dentro de una estrategia de control integrado cuando otras medidas de control, como la resistencia genética, no son aplicables (Montes-Osuna y Mercado-Blanco, 2020).

Selección masiva de compuestos naturales contra la Verticilosis del olivo

Ante la carencia de tratamientos biológicos eficaces en el olivar en la actualidad, el grupo de Patología Agroforestal de la Universidad de Córdoba (AGR-216) viene desarrollando desde 2011 una línea de investigación sobre control biológico de la VO mediante sucesivos proyectos cofinanciados por la Interprofesional del Aceite de Oliva Español (OIAOE), uno de ellos ya finalizado de la Junta de Andalucía (proyecto de excelencia AGR08-3635), y otro proyecto vigente del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (MICINN; proyecto AGL2016-76240-R: 'Gestión Integrada de la Verticilosis del Olivo mediante resistencia genética, prácticas agronómicas y control biológico'). De esta manera, desde esta línea se abordó la selección masiva de productos de origen natural en condiciones controladas, siendo los tratamientos más efectivos en estas condiciones evaluados a su vez en condiciones naturales de campo con el fin de seleccionar aquellos potencialmente eficaces para su desarrollo como formulados comerciales.



Figura 1. Diferencias en la expresión de síntomas de Verticilosis en plantones de olivo tratados con diferentes compuestos de origen natural.

Tabla 1. Reducción de la densidad de inóculo de *Verticillium dahliae* en suelo naturalmente infestado y tratado con diferentes productos de origen natural. Números con diferente letra representan diferencias significativas según el test LSD protegido de Fisher ($P < 0,05$).

Tratamientos	Reducción densidad de inóculo (%)
Compost Orujo de Vid (CGR03)	97,4 a
Mezcla de microorganismos (EM5®)	94,0 a
Compost alperujo + FO-12	86,7 a
FO12	85,2 a
Folicupro®	41,8 ab
<i>P. fluorescens</i> (PICF4) + FO-12	40,4 abc
Compost alperujo+gallinaza	5,4 bcd
Testigo agua	0 d
Bioten®	0 d
<i>P. fluorescens</i> (PICF4)	0 d
Compost alperujo + Ac. láctico	0 d
Extracto compost alperujo y gallinaza (CB02)	0 d

En los primeros cinco años de investigación en esta línea de control biológico, se realizó por primera vez una evaluación masiva de más de 230 productos de origen natural, los cuales fueron divididos en cuatro grupos: i) 60 microorganismos antagonistas (hongos, bacterias y sus extractos) (Lozano-Tovar, 2013; Varo y col., 2016), ii) 66 enmiendas orgánicas (residuos de animales y de la industria agroalimentaria) (Varo-Suárez y col., 2018), iii) 84 aceites esenciales y extractos vegetales (Varo y col., 2017), y iv) 23 bioestimulantes e inductores de resistencia. Dicha evaluación se llevó a cabo mediante un proceso de selección dividido en cuatro fases: 1) ensayos *in vitro*, para evaluar el efecto directo sobre el crecimiento micelial o la germinación de esporas de *V. dahliae*; 2) ensayos en suelo, para evaluar su efecto en la reducción de inóculo (microesclerios)

del patógeno en suelo naturalmente infestado; 3) bioensayos *in planta*, para evaluar su efecto en la reducción de enfermedad en plantones de olivo en condiciones controladas; y 4) ensayos en campo, para evaluar su efecto en la reducción de enfermedad en condiciones de infección natural.

De entre todos los productos evaluados, varios aislados no patogénicos del hongo *Fusarium oxysporum* y algunas mezclas de bacterias y hongos, entre otros, inhibieron entre un 90% y 100% el crecimiento micelial de *V. dahliae*, en ensayos de cultivos duales en medio patata dextrosa agar (PDA). Por otro lado, varios aislados no patogénicos de *F. oxysporum* y algunas enmiendas orgánicas como el compost de orujo de vid (CGR03) redujeron en más del 85% la densidad de inóculo de *V. dahliae* en suelo naturalmente infestado (Tabla 1).

En cuanto al desarrollo de la enfermedad en plantas de olivo del cv.

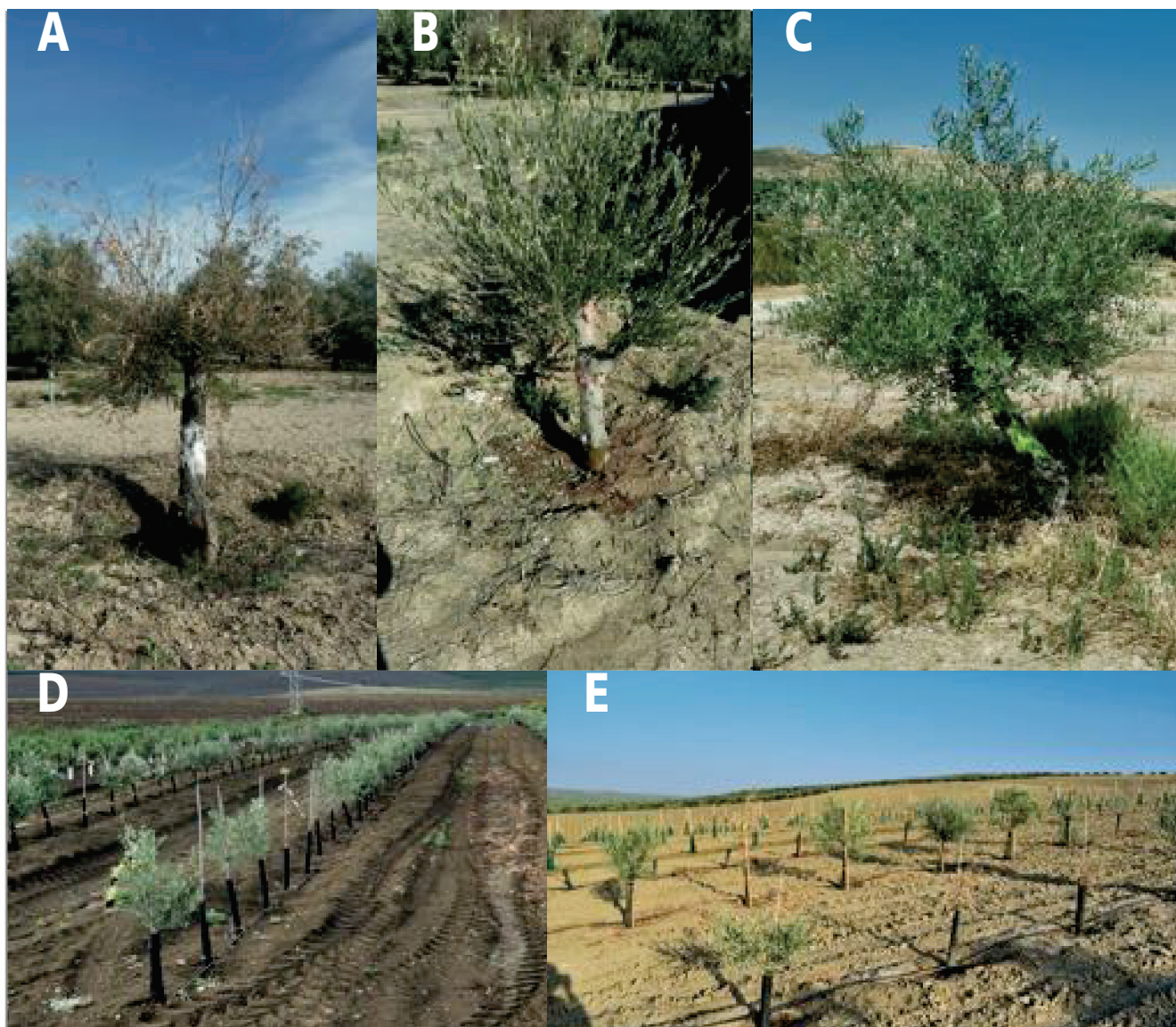


Figura 2. Experimentos realizados en condiciones de campo. (A) Árbol muerto por Verticilosis correspondiente al testigo sin tratar; (B) Árbol tratado con la cepa no patogénica de *Fusarium oxysporum* FO12 con leves síntomas de defoliación; (C) Árbol tratado con el compost de orujo de vid CGR03 sin síntomas de Verticilosis; (D) Nuevos experimentos para la evaluación de los compostos de origen natural frente a la Verticilosis del olivo situados en el término municipal de Écija (Sevilla) y (E) Andújar (Jaén).

Picual en condiciones controladas, tanto el aislado no patogénico de *F. oxysporum* FO12 como el compost de orujo de vid CGR03 fueron los tratamientos más efectivos, consiguiendo una reducción de la incidencia de enfermedad del 100% (Figura 1).

Tras el proceso de selección anterior, se eligieron los mejores candidatos para su evaluación en condiciones de campo. Hasta el momento, se han completado tres experimentos de campo, localizados en diferentes regiones representativas del olivar en Andalucía, con diferentes características edafoclimáticas y densidades de inóculo del patógeno en suelo (Mulero-Aparicio y col., 2019). En

dos de ellos, la cepa no patogénica de *F. oxysporum* FO12 y el compost de orujo de vid CGR03 redujeron la densidad del patógeno en el suelo en más de un 95%. Así, en un tercer ensayo de campo se evaluó tanto la cepa no patogénica de *F. oxysporum* FO12 como el compost de orujo de vid CGR03, en el que ambos tratamientos redujeron de manera significativa la incidencia de enfermedad respecto al tratamiento control (sin tratar) (Figura 2A-C), mostrando valores finales de 33%, 53% y 80% para el compost de orujo de vid (CGR03), *F. oxysporum* FO12 y control, respectivamente.

Actualmente se está continuando con el proceso de evaluación en

campo de los compostos más prometedores con el objetivo de seleccionar aquellos más eficaces para, posteriormente, desarrollar estrategias de control adecuadas según la naturaleza de cada producto. Para ello, recientemente se han establecido dos nuevos campos de ensayo en dos fincas comerciales, una en la localidad sevillana de Écija (Figura 2D) y otra en el término municipal de Andújar, Jaén (Figura 2E).

En base a los resultados ya obtenidos durante los distintos procesos de selección, tanto en condiciones controladas como de campo, la cepa no patogénica de *F. oxysporum* FO12 y el orujo de vid CGR03 fueron los candidatos más prometedores, al-

canzando alrededor del 100% de inhibición de la enfermedad en condiciones controladas y la erradicación del patógeno en suelo naturalmente infestado. Sin embargo, sería necesario dar solución a la existente demanda de un producto eficaz frente a la VO, económicamente viable y respetuoso con el medio ambiente, y por ello, como paso siguiente, el grupo AGR-216 viene desarrollando el proyecto Innolivar, uno de cuyos objetivos es el desarrollo de formulados precomerciales que puedan ser utilizados por los agricultores en un futuro próximo.

Proyecto Innolivar: innovación y tecnología para un olivar sostenible

Innolivar, presentado por la Universidad de Córdoba (UCO), es un programa de innovación dirigido a la mejora de la prestación del servicio público de Educación Superior, que la entidad ofrece a la sociedad, a través de la mejora en sus ámbitos de trabajo: docencia, investigación y estudio. El programa se articula en doce líneas, agrupadas en cinco bloques temáticos, abordando los diferentes aspectos de la olivicultura. Dentro de la Línea 8, perteneciente al bloque de biotecnología, se formalizó un contrato de compra pública de innovación en su modalidad precomercial como parte de dicho proyecto, entre las empresas Hero-gra Especiales y UPL Iberia, y la UCO, de acuerdo con lo establecido en el Convenio entre el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad y la UCO, cofinanciado con fondos FEDER. En el presente artículo se describen la fase de adjudicación de las empresas o fase de preprototipado, así como los resultados preliminares del proyecto que incluyen el final de la consecución de la fase 2 o fase de prototipado (Figura 3).

Fase I. Preprototipado

Las empresas mencionadas resultaron adjudicatarias en el proceso de Compra Pública de Innovación emitido por la UCO en el marco de propuesta de soluciones innovadoras para el desarrollo de innovaciones en la mecanización y tecnologías aplicadas al sector del olivar de aceite y de mesa. Las dos empresas



Figura 3. Fases del desarrollo del proyecto Innolivar.

Tabla 2. Incidencia, severidad y número de días necesarios para alcanzar una mortalidad del 50% (T_{50}) de la Verticilosis del olivo en plantones artificialmente inoculados con *Verticillium dahliae* y posteriormente tratadas con Bioten® y diferentes bacterias extremófilas.

Tratamiento	Incidencia (%)	Severidad (%)	T_{50} (días)
Bioten®	100	51,1	63
Testigo	100	50,7	60
T1: <i>Brevibacterium halotolerans</i>	100	46,8	65
T2: <i>Brevibacterium halotolerans</i>	100	50,7	60
T4: <i>Bacillus methylotrophicus</i> (Formulada)	42,9	9,7	>96
T5: <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	100	44,8	61
T6: <i>Bacillus mojavensis</i>	88,9	48,2	65

mencionadas anteriormente resultaron adjudicatarias tras un proceso de selección entre seis empresas, para desarrollar los objetivos propuestos dentro la Línea 8, titulada 'Formulados precomerciales de microorganismos antagonistas para el control de la Verticilosis del olivo'. El objeto de la contratación relativo a la línea en cuestión fue el diseño, desarrollo, prototipado y serie de pruebas que permitan usar microorganismos antagonistas o productos derivados de ellos para el control biológico, sostenible y eficaz de la VO. Así, el objetivo principal de esta línea es desarrollar dos formulados precomerciales de microorganismos eficaces contra la VO, uno basado en cepas bacterianas extremófilas y otro en una cepa no patogénica de *Fusarium oxysporum*.

Por un lado, la propuesta de Hero-gra Especiales se sustenta en la formulación de cepas bacterianas extremófilas, aisladas de áreas con condiciones de estrés hídrico y salinidad (Castro y col., 2020). Dichas cepas mostraron efecto inhibitorio sobre el crecimen-

to micelial de *V. dahliae* en condiciones *in vitro*, por lo que fueron postuladas como potenciales agentes de biocontrol de la VO. Posteriormente, se realizaron pruebas preliminares de dichas cepas sobre plantones de olivo del cv. Picual, que fueron artificialmente inoculados con el patógeno. En dicho ensayo, plantones no inoculados y plantones tratados con Bioten® fueron utilizados como testigos (Tabla 2).

Posteriormente, se realizó un ensayo adicional para conocer el efecto de algunas de estas cepas bacterianas y otras adicionales como la cepa de *Bacillus atrophaeus*, sobre la reducción de microesclerocios de *V. dahliae* en un suelo naturalmente infestado. Para este ensayo se probaron los extractos con o sin las bacterias con el fin de evaluar los modos de acción de dichas cepas y, a diferencia del ensayo anterior, en este caso ninguna de las cepas bacterianas fue formulada. No se encontraron diferencias significativas ($P>0.05$) en el crecimiento de propágulos del patógeno cuando los

extractos ensayados no contenían bacteria (Figura 4B), mientras que, en los extractos con la presencia de bacterias, sí se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$). El tratamiento 5 (*Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*) redujo significativamente en más de un 33% el número de microesclerocios en suelo respecto al testigo (Figura 4A). Sin embargo, el resto de los tratamientos no consiguieron una reducción significativa del mismo.

Por otro lado, UPL Iberia presentó su propuesta a partir de una de las cepas no patogénicas de *Fusarium oxysporum* evaluadas previamente por el grupo AGR-216 de la UCO mediante el proceso de selección descrito anteriormente. Tanto la procedencia de su aislamiento (corcho natural) como sus características fenotípicas y moleculares son similares a los de la cepa FO12, uno de los tratamientos más eficaces tanto en condiciones controladas como en campo frente a la VO, resultantes de dicho proceso de selección. Sin embargo, la elección de otra de las cepas no patogénicas de *F. oxysporum* para su desarrollo como prototipo precomercial en este proyecto se basa en una más abundante esporulación y formación de clamidosporas, lo que resulta esencial para la formulación de un producto estable para su uso en condiciones de campo.

Fase II. Prototipado y verificación

Como objetivos fundamentales para la fase de prototipado del proyecto, los formulados precomerciales basados en dichos microorganismos antagonistas deben ser aplicados al suelo a través del riego por goteo, o incorporados como enmiendas enriquecidas, en suelos infestados por *V. dahliae*. Por otro lado, como requisitos impuestos para la ejecución de dichos objetivos, los microorganismos deberán ser producidos en masa, con una viabilidad que se mantendrá superior al 80% durante un período mínimo de treinta días, deberán presentar protección frente a factores abióticos, ser solubles o emulsionables, aplicables por riego por goteo o de forma manual o mecanizada, carecer de fitotoxicidad a la dosis recomendada, ser eficaces para disminuir propágulos de *V. dahliae* o para reducir las infeccio-

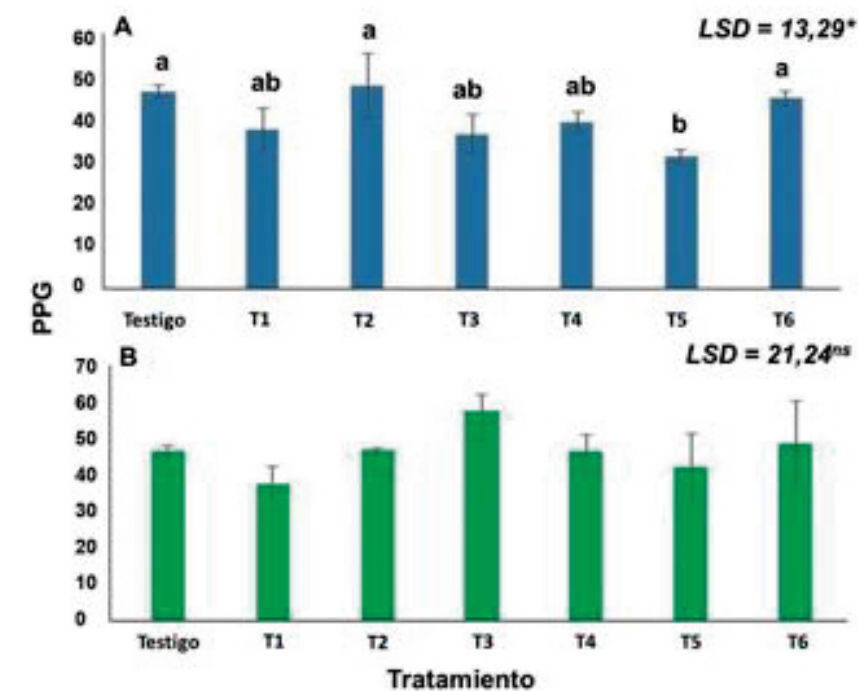


Figura 4. Número de propágulos por gramo de suelo (PPG) de *Verticillium dahliae* en suelo infestado y tratado con extractos bacterianos con presencia de las bacterias (A) o sin bacterias (B). Los tratamientos se correspondieron con cepas de las especies bacterianas *Brevibacterium halotolerans* (T1), *B. halotolerans* (T2), *Bacillus atrophaeus* (T3), *Bacillus methylotrophicus* (T4), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (T5) y *Bacillus mojavensis* (T6). Barras con diferente letra representan diferencias significativas en base al test de Fisher LSD ($P < 0,05$).

nes causadas por éste y seguros para su almacenamiento, transporte, manipulación y aplicación. Por todo ello, teniendo en cuenta todas las características y condicionantes para que el formulado desarrollado sea factible desde un punto de vista técnico, económico y reglamentario, investigadores del Departamento de I+D de ambas empresas han desarrollado y evaluado, como objeto de la licitación, formulados precomerciales de estos microorganismos antagonistas para optimizar tanto su modo de aplicación como su eficacia en condiciones de campo.

Durante esta fase, la empresa Herogra Especiales ha focalizado su actividad en el desarrollo y optimización del proceso de bioproducción de la cepa seleccionada (*Bacillus atrophaeus*) para el control de la VO, realizando ensayos experimentales para la estabilización de ésta, así como ensayos de fitotoxicidad en semillas y plantones de olivo. Para ello, haciendo uso de la información obtenida previamente para la producción de la cepa seleccionada, uno de los objetivos fue escalar el proceso hasta

un volumen de trabajo de 200 L, estudiando las condiciones de secado y microencapsulación por atomización para estabilizar dicho microorganismo antagonista. Por otro lado, se desarrollaron ensayos para la confirmación de la no fitotoxicidad de la cepa seleccionada, los cuales fueron realizados tanto a nivel de semilla como en plantones de olivo.

En cuanto a la empresa UPL Iberia, ésta ha centrado sus esfuerzos en la obtención del concentrado técnico y del producto formulado para obtener dos tipos de formulaciones distintas, una microgranulada, de la cual ya se dispone, y otra soluble en agua, actualmente en desarrollo. Para la obtención del concentrado técnico, se utilizaron metodologías de fermentación líquida y sólida.

Fase III. Serie de pruebas

Como perspectivas futuras, a partir del Punto 8 de la demanda tecnológica de Innolivar, se comenzará con la fase III del proyecto, o fase de pruebas, con el fin de evaluar tanto en condiciones controladas como de campo la viabilidad precomercial de los prototipos formulados para

transferencia tecnológica

| olivo |

dar por terminado el proyecto. Para ello, se han acordado por parte de investigadores de la UCO y de las empresas Herogra Especiales y UPL Iberia los diseños de los futuros ensayos que serán desarrollados para la evaluación de los prototipos. En estos experimentos se evaluarán diferentes dosis para cada una de las formulaciones obtenidas por las empresas, así como diferentes momentos de aplicación para poder evaluar el potencial real frente a la VO. En el caso de los experimentos de campo,

se han seleccionado dos nuevas fincas caracterizadas por presentar un alto nivel de inóculo de *V. dahliae* en suelo, lo que permitirá verificar, en su caso, la eficacia de los prototipos. Además de la validación en campo de los prototipos, se realizarán estudios paralelos para conocer sus efectos sobre el microbioma del suelo, así como la determinación del modo de acción del antagonista, los cuales estarán finalizados para finales de 2021, fecha de fin del proyecto.

Con los resultados obtenidos, una vez finalizado este proyecto, se pretende tanto una mejora en el servicio público gracias a las actividades derivadas de éste, como un avance significativo en el control de esta grave enfermedad del olivar, ofreciendo soluciones comerciales viables, las cuales podrían estar disponibles en un futuro próximo para su uso dentro del marco de una agricultura sostenible, libre de residuos y respetuoso con el medio ambiente.

Bibliografía



- Castro, D., Torres, M., Sampedro, I., Martínez-Checa, F., Torres, B., Béjar, V. 2020. Biological control of verticillium wilt on olive trees by the salt-tolerant strain *Bacillus velezensis* XT1. *Microorganisms* 8: 1080.
- López-Escudero, F.J., 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.
- Lozano-Tovar, M.D., Ortiz-Urquiza, A., Garrido-Jurado, I., Trapero-Casas, A., Quesada-Moraga, E. 2013. Assessment of entomopathogenic fungi and their extracts against a soil-dwelling pest and soil-borne pathogens of olive. *Biological Control* 67: 409-420.
- Montes-Osuna, N., Mercado-Blanco, J. 2020. Verticillium Wilt of Olive and its Control: What Did We Learn during the Last Decade?. *Plants* 9(6): 735.
- Mulero-Aparicio, A., Varo-Suárez, A., Agustí-Brisach, C., López-Escudero, F.J., Trapero, A. 2019. Biological control of Verticillium wilt of olive in the field. *Crop Protection* 128: 104993.
- Varo, A., Mulero-Aparicio, A., Adem, M., Roca L., Raya, M.C., López-Escudero, F.J., 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 M.C., Agustí-Brisach, C., García-Ortiz Civantos, C., Fernández-Hernández, A., Mulero-Aparicio, A., Trapero, A. 2018. Identifying potential organic amendments to suppress the Verticillium wilt disease of olive. *Plant Pathology* 67: 860-870.
- Varo, A., Raya, M.C., Trapero, A. 2016. Selection and evaluation of microorganisms for biocontrol of *Verticillium dahliae* in olive. *Journal of Applied Microbiology* 121: 767-777.