



**Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo, A.C.**

**ALTERACIONES EN EL PERFIL DE TERPENOIDES EN
OLIVO (*Olea europaea* L.) COMO RESPUESTA A LA
INOCULACIÓN CON *Verticillium dahliae***

Por:

Andrés Antonio Pacheco Jiménez

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

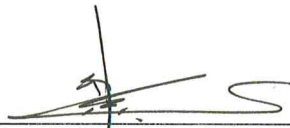
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Andrés Antonio Pacheco Jiménez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de maestría en ciencias.



Dra. Rosalba Troncoso Rojas
Director de Tesis



Dr. Martín Ernesto Tiznado Hernández
Asesor



M.C. Alberto Sánchez Estrada
Asesor



M.C. María del Refugio Robles Burgueño
Asesor



Dr. Adrián Hernández Mendoza
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca que me otorgó para poder realizar este posgrado, al CIAD por sus abrimme las puertas de sus instalaciones. Debo agradecer de manera especial y sincera a la Doctora Rosalba Troncoso Rojas por permitirme ser parte de su equipo y realizar este trabajo bajo su dirección. Su apoyo, confianza, paciencia, orientación y buen trato. Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento al M.C. Alberto Sánchez Estrada por su importante aporte y participación activa en este proyecto.

Al finalizar un trabajo lleno de esfuerzos, sacrificios y dificultades como lo es el desarrollo de una tesis, es inevitable concentrar la mayor parte del mérito en el aporte que has hecho. Sin embargo, el análisis objetivo te muestra inmediatamente que la magnitud de ese aporte hubiese sido imposible sin la participación de personas e instituciones que han facilitado la realización de este trabajo. Por ello, es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para ser justo y consecuente con esas personas.

DEDICATORIA

A mi madre por ser el pilar más importante en mi formación, por su cariño y apoyo incondicional. A mi abuela por participar en mi formación con buenos sentimientos, consejos y valores. A mi familia en general, por brindarme su apoyo incondicional y por compartir conmigo buenos y malos momentos.

A mi novia Isabel por su apoyo, su amor y comprensión, por estar conmigo en las buenas y en las malas, porque valió la pena tanto esfuerzo que juntos realizamos y se ve reflejado en alcanzar una meta más en nuestras vidas.

CONTENIDO

	Página
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Cuadros	x
Resumen.....	xi
Abstract.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Importancia Económica del Olivo	4
2.2 Principales Enfermedades del Olivo	7
2.3 Características de la Verticilosis del Olivo.....	10
2.3.1 Ciclo Infeccioso de <i>Verticillium dahliae</i>	11
2.3.2 Control de la Verticilosis en Olivo	13
2.4 Efecto de los Terpenoides en el Control de Fitopatógenos.....	16
2.5 Biosíntesis de Terpenoides en Plantas	17
2.6 Distribución de Terpenoides en Olivo.....	21
2.7 Síntesis de Terpenoides en Respuesta a la Interacción Planta-Patógeno.....	24
2.8 Mecanismo de Acción de los Terpenoides.....	25
III. HIPÓTESIS.....	26
IV. OBJETIVOS.....	27
4.1. Objetivo General	27
4.2. Objetivos Específicos	27
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
5.1 Material Vegetal.....	28
5.2 Aislamiento e Identificación de <i>Verticillium dahliae</i>	29
5.3 Preparación del Inóculo e Inoculación	30
5.4 Toma de Muestra	30
5.5 Análisis de Terpenoides	30
5.5.1 Cuantificación de Terpenoides Totales por Espectrofotometría.....	30
5.5.2 Determinación del Perfil de Terpenoides por HPLC	31
5.5.2.1 Extracción de Terpenoides.....	31
5.5.2.2 Condiciones Cromatográficas.....	31
5.6 Determinación de los Síntomas Causados por <i>Verticillium dahliae</i> en Plantas de Olivo	32
5.7 Determinación de la Colonización de <i>Verticillium dahliae</i> por Microscopía de Fluorescencia.....	33
5.8 Diseño de Experimentos	33

CONTENIDO (continuación)

	Página
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
6.1. Generación de Plantas de Olivo.....	34
6.2. Obtención de Cepas de <i>Verticillium dahliae</i>	34
6.3 Terpenoides Totales en Tallo de Olivo Testigo e Inoculado.....	37
6.4 Perfil de Terpenoides Pentacíclicos en Tallos de Olivo Sano.....	41
6.5 Cambios en el Perfil de Terpenoides en Tallos de Olivo Inoculados con <i>Verticillium dahliae</i>	45
6.6 Síntomas de la Verticilosis en Plantas de Olivo.....	48
6.7 Observación Microscópica de las Alteraciones Producidas por <i>V. dahliae</i> en Tallo de Olivo.....	49
VII. CONCLUSION	53
VIII. REFERENCIAS	54

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>		Página
1	Consumo de aceituna de mesa (kg/habitante) en los países miembros del Consejo Oleícola Internacional en 2013.....	6
2	Consumo de aceituna de mesa (kg/habitante) en los países que no son miembros del Consejo Oleícola Internacional en 2013.....	6
3	Ciclo infectivo de <i>Verticillium dahliae</i>	12
4	Principales rutas de la biosíntesis de terpenos y su relación con el metabolismo primario.....	18
5	Esquema de la biosíntesis de terpenos.....	20
6	Morfología de <i>Verticillium dahliae</i>	36
7	Contenido de terpenoides totales por día de muestreo en plantas testigo e inoculadas con <i>Verticillium dahliae</i>	38
8	Contenido de terpenoides totales por sección analizada en plantas testigo e inoculadas con <i>Verticillium dahliae</i>	39
9	Contenido de terpenoides totales en las diferentes secciones de plantas testigo e inoculadas con <i>V. dahliae</i>	40
10	Cromatograma representativo de estándares comerciales de terpenoides analizados por HPLC.....	41
11	Fórmula, peso y estructura molecular de los alcoholes triterpénicos Eritrodiol y Uvaol.....	42
12	Perfil de triterpenos pentacíclicos en plantas de olivo de 1 año y tres meses de edad, testigo e inoculadas con <i>Verticillium dahliae</i> , un día después de la inoculación.....	46
13	Hojas de plantas de olivo sanas (a) e inoculadas (b) con <i>Verticillium dahliae</i> al tercer día de inoculación.....	49

LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>		Página
14	Observación radial de tallo de olivo en microscopio de fluorescencia. a) Elementos de vasos del xilema secundario de 25 μm de diámetro. b) Médula de tallo de olivo. (Izquierda: campo claro; derecha: fluorescencia). Teñidos con azul de toluidina (20X).....	50
15	Corte histológico del tallo de olivo inoculado con <i>V. dahliae</i> . A) formación de tilosas, B) conidias.....	51

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Producción nacional de aceituna por Estado en el 2015.....	5
2	Principales enfermedades del olivo.....	8
3	Susceptibilidad de variedades de olivo a las principales enfermedades.....	9
4	Concentración de triterpenos pentacíclicos en diferentes tejidos y variedades de olivo.....	23
5	Terpenoides identificados en olivo sano y sus tiempos de retención.....	42
6	Concentración de triterpenos pentacíclicos en tallos de olivo sano.....	43
7	Concentración de triterpenos pentacíclicos ($\mu\text{g/g}$ de p.s.) en distintas secciones de tallos de olivo testigo e inoculados con <i>V. dahliae</i> un día post-inoculación.....	47

RESUMEN

La verticilosis es considerada como la patología más importante y devastadora del olivo. El agente causal de esta enfermedad es el hongo *Verticillium dahliae*, el cual provoca importantes pérdidas económicas a nivel mundial. Actualmente no existe un tratamiento efectivo y seguro para su control, por lo que es necesario evaluar tratamientos alternativos que garanticen el control de la enfermedad y que a su vez sean amigables con el medio ambiente y la salud del consumidor. Una posible alternativa son los terpenoides, metabolitos secundarios con actividad antifúngica que participan en el mecanismo de defensa natural de las plantas. Por lo que, el objetivo de este trabajo fue evaluar los cambios en el perfil de terpenoides en plantas de olivo variedad 'Manzanillo' en respuesta a la inoculación con *V. dahliae*. Se propagaron plantas de olivo a partir de estacas semileñosas; se aisló el hongo en medio selectivo a base de polipectato de sodio, y se inoculó en plantas jóvenes de olivo. Se realizaron 4 muestreos a distintos tiempos (0, 1, 3 y 5 días post-inoculación), se seccionó el tallo de cada planta en 4 secciones de 3 cm. A cada sección se le determinó el contenido de terpenoides totales por espectrofotometría, y se identificaron y cuantificaron por HPLC. Se observó por microscopia de fluorescencia las alteraciones causadas por el patógeno. Se aislaron colonias de *Verticillium* spp en medio selectivo, con características macro y microscópicas que coinciden con las reportadas en la literatura para *Verticillium dahliae*. Se obtuvieron 96 plantas de olivo enraizadas de 1 año de crecimiento con tallos de 1 cm de diámetro. La inoculación indujo un aumento en la concentración de terpenoides totales en tallo de olivo, presentándose la mayor concentración al día 1 en los 3 cm cercanos al punto de inoculación (78.84 µg/g peso seco). Se identificaron los ácidos triterpénicos pentacíclicos: oleanólico, maslínico, betulínico, ursólico, y los alcoholes triterpénicos eritrodíol y uvaol, de los cuales el ácido maslínico se incrementó 3.8 veces su concentración con respecto al testigo. En cortes histológicos de tallo inoculado se observó por microscopia de fluorescencia la formación de tilosas en el xilema en respuesta a la inoculación del patógeno. Se

concluye que la inoculación de plantas jóvenes de olivo variedad 'Manzanillo', con *Verticillium dahliae*, incrementa la concentración de triterpenos pentacíclicos, particularmente del ácido maslínico en respuesta a la infección, lo que implica su función en relación a la defensa contra la verticilosis.

Palabras clave: *Olea europaea* L., *Verticillium dahliae*, Triterpenos pentacíclicos, Olivo, Verticilosis.

ABSTRACT

Verticillium wilt is considered the most important and devastating pathology of the olive. The causal agent of this disease is the fungus *Verticillium dahliae*, which causes significant economic losses worldwide. Nowadays there is not effective treatment for its control, therefore it is necessary to evaluate alternative treatments that guarantee the disease control and at the same time are friendly to the environment and consumer health. A possible alternative are the terpenoids, secondary metabolites with antifungal activity involved in the natural defense mechanism of plants. The objective of this study was to evaluate the changes in the profile of terpenoids in olive var Manzanillo in response to inoculation with *V. dahliae*. Olive plants were propagated from semi-woods stakes; the fungus was isolated in potato dextrose agar and selective medium based sodium polypectate, and inoculated on olive plants. Four samples were taken at different times (0, 1, 3 and 5 days post inoculation), the stem of each plant was sectioned into four sections of 3 cm. Total terpene content was determined spectrophotometrically and subsequently were identified and quantified by HPLC. Alterations in xylem vessels caused by the pathogen were observed by fluorescence microscopy. *Verticillium* spp colonies were isolated in selective medium, which were identified as *Verticillium dahliae* according to their macro and microscopic characteristics. 96 olive plants of one year of growth with 1 cm stem diameter were obtained. The inoculation induced an increase in the concentration of total terpenoids in olive tree, showing the highest terpenoids concentration at one day in the first 3 cm near the inoculation point (78.84 µg / g dry weight). Pentacyclic triterpenic acids: oleanolic, maslinic, betulinic, ursolic, eritrodiol and uvaol were identified; of which maslinic acid increased 3.8 times its concentration with respect to the control. In histological sections of inoculated stem, the formation of tiloses in the xylem vessel were observed by fluorescence microscopy, in response to inoculation of the pathogen. It is concluded that the inoculation of young olive plants var Manzanillo with *Verticillium dahliae* increases the concentration of pentacyclic triterpenes, particularly of maslinic

acid in the area near the inoculation point, which implies its function in relation to the defense against verticilosis.

Key words: *Olea europaea* L., *Verticillium dahliae*, Pentacyclic triterpenes, Olive, Verticillium wilt.

I. INTRODUCCIÓN

El olivo (*Olea europaea* L.) es considerado uno de los árboles frutales más importantes a nivel mundial por su alto valor económico y nutricional (Domínguez-García *et al.*, 2012; García-Consuegra, 2014). Debido a su diversidad genética, se estima la existencia de más de 1,200 variedades (Bracci *et al.*, 2011). Posee un sistema radicular muy desarrollado que le permite vivir en suelos áridos y poco profundos (Barranco *et al.*, 2008). La mayor parte de la superficie cultivada se encuentra en el sur de Europa, específicamente en los países de la cuenca del mediterráneo (Barranco *et al.*, 2008; Belaj *et al.*, 2010). En 2015, México tuvo una producción de 13,048.66 ton de aceitunas principalmente en los estados de Sonora y Tamaulipas con un valor de \$96,224.83 millones de pesos. (SIAP, 2016). Por lo anterior, el olivo y sus productos son de suma importancia, tanto por su valor económico como por los beneficios que aporta a la salud, sin embargo, este cultivo se ve afectado por la verticilosis.

La verticilosis es una enfermedad causada por el hongo *Verticillium dahliae* y es considerada como la patología más importante y devastadora del olivo (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011; García-Consuegra, 2014). Esta enfermedad provoca el secado de ramas e incluso la muerte del árbol, originando importantes pérdidas económicas en los países productores de olivo, principalmente en plantaciones con sistemas de cultivo intensivo (Martos-Moreno *et al.*, 2005; García-Consuegra, 2014). Aunque esta enfermedad se ha detectado en árboles adultos, los ataques más graves se producen en olivos jóvenes de 4 a 10 años (Trapero *et al.*, 2011).

Debido a las pérdidas provocadas por la verticilosis, es necesario desarrollar tratamientos capaces de limitar el desarrollo de esta enfermedad o erradicarla por completo. Actualmente no existe un tratamiento que garantice el control de la verticilosis del olivo, no obstante, el conocimiento derivado de la investigación técnico-científico, indica que su control debe basarse en una estrategia integral (Jiménez Díaz *et al.*, 2009; Schiliro *et al.*, 2012). Es decir, considerar las medidas de carácter preventivo aplicadas tanto antes de la plantación como posteriores que permitan disminuir el progreso de la enfermedad (Jiménez-Díaz *et al.*, 2003). Dentro del manejo integrado se considera explorar las características intrínsecas que las plantas poseen a través del mecanismo de defensa de las mismas. Debido a que los métodos actuales para el “control” de la verticilosis son en su mayoría preventivos. Una alternativa podría ser el uso de agentes de control biológico o el uso de las propiedades antifúngicas de los terpenoides dado que la dispersión del patógeno en el agua de riego y el papel de las hojas infectadas como fuente de inóculo secundario cuestionan la eficiencia de un sistema de manejo basado solamente en las fuentes de inóculo primario (Rodríguez-Jurado y Bejarano-Alcázar, 2007; Jiménez-Díaz *et al.*, 2008; Navas-Cortes *et al.*, 2008).

La resistencia de un árbol a la verticilosis consiste en la restricción de la infección o colonización del patógeno en el sistema vascular de la planta (Martos-Moreno *et al.*, 2005). Los terpenoides son una posible alternativa para ayudar a combatir la enfermedad. Mahlo *et al.* (2013) observaron la actividad antifúngica de extractos de *Breonadia salicina* la cual contiene entre 20 y 250 µg/mL de ácido ursólico sobre *Aspergillus parasiticus*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium expansum*, *Penicillium janthinellum*, *Trichoderma harzianum* y *Fusarium oxysporum in vitro*. El ácido ursólico y otros triterpenos pentacíclicos también han sido aislados del olivo y otras especies de la familia *Oleaceae* y *Lamiaceae* (Kontogianni *et al.*, 2009).

Por otra parte, se ha observado una mayor acumulación de terpenoides en las células del xilema que rodean el punto de infección causado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* en variedades de algodón resistentes a este hongo en comparación con variedades susceptibles, en las cuales la concentración de terpenoides fue menor (Hall *et al.*, 2011). Lo anterior, sugiere que los terpenoides juegan un papel importante en la resistencia a dicha patología debido a sus propiedades antifúngicas, por lo que se podría proponer su uso como alternativa promisoría para el control de la verticilosis. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar los cambios en el perfil de terpenoides en olivo en respuesta a la inoculación con *Verticillium dahliae*.

II. ANTECEDENTES

2.1 Importancia Económica del Olivo

El olivo (*Olea europea* L.) es considerado uno de los árboles frutales más importantes a nivel mundial por su alto valor económico y nutricional (Domínguez-García *et al.*, 2012; García-Consuegra, 2014). Este cultivo es la única especie de la familia Oleaceae con fruto comestible y es uno de los árboles frutales más antiguos cultivados por su alto valor económico (Domínguez-García *et al.*, 2012). Su cultivo requiere zonas climáticas con veranos secos y calurosos e inviernos húmedos y templados (Barranco *et al.*, 2008). La mayor parte de la superficie cultivada se encuentra en el sur de Europa, específicamente en los países de la cuenca del mediterráneo (Cuadro 1) (Barranco *et al.*, 2008; Belaj *et al.*, 2010).

En el 2015, México tuvo una producción de 13,048.66 t de aceitunas con un valor de \$96,224.83 millones de pesos. El Estado con mayor producción fue Sonora con el 72.9%, seguido de Baja California con el 17.2% y Tamaulipas con el 7.6%. Concentrándose la producción de Sonora al Noroeste del Estado en los municipios de Caborca (99.3%), Pitiquito (0.63%) y Trincheras (0.07%); siendo Caborca el municipio con mayor producción de aceitunas a nivel nacional (SIAP, 2016). La mayor parte de la superficie cultivada en esa región la constituye la variedad Manzanillo, probablemente debido a que los frutos de esa variedad tienen mayor demanda en el mercado al ser destinados al consumo como “aceituna de mesa”.

Cuadro 1. Producción nacional de aceituna por Estado en el 2015.

Estado	Producción (t)	Rendimiento (t/Ha)	Precio/Medio (\$/t)	Valor (Miles de Pesos)
Aguascalientes	5.0	5.0	9,500.0	10.0
Baja California	988.15	1.4	4,756.02	57,068.87
B.C. Sur	12.8	1.6	16,120.0	392.0
Chihuahua	0.0	0.0	0.0	0.0
Coahuila	0.0	0.0	0.0	0.0
Distrito Federal	1.0	2.0	6,150.0	2.4
Guanajuato	12.0	3.0	9,000.0	2,095.2
Hidalgo	209.52	3.6	10,000.0	2,095.2
Jalisco	52.79	1.96	4,821.67	259.2
Sonora	9,517.4	5.99	7,212.84	109,647.76
Tamaulipas	2,250.0	4.5	8,960.0	7,350.0
Total	13,048.66	4.51	7,374.31	96,224.83

Fuente: SIAP (2016).

En los últimos 25 años, el consumo mundial de aceituna de mesa ha aumentado 169.4% (Figura 1), siendo Albania el mayor consumidor con 14.8 kg por habitante en 2013. En los países que no son miembros del Consejo Oleícola Internacional (Figura 2), el consumo anual de aceituna por habitante en 2013 varía de 0.1 a 1.9 kg (Consejo Oleícola, 2013). En cuanto al aceite de oliva, el consumo medio mundial es de 2,513,000 ton, siendo el principal consumidor la Unión Europea con el 71%, destacando Italia, España y Grecia (Rodríguez, 2006). Los principales importadores de este aceite son EE.UU. con el 36% y la Unión Europea con el 26%, mientras que la importación media mundial es de aproximadamente 496,000 ton (Rodríguez, 2006). La importancia del “oro líquido”, como se conoce al aceite de olivo, radica en sus efectos benéficos contra enfermedades cardiovasculares, cáncer y daños oxidativos, entre otros (De Victoria y Mañas, 2001). Además, el octanal, un componente del

aceite de oliva virgen, actúa de forma similar al ibuprofeno, protegiendo al consumidor de enfermedades como el Alzheimer (Beauchamp *et al.*, 2005).

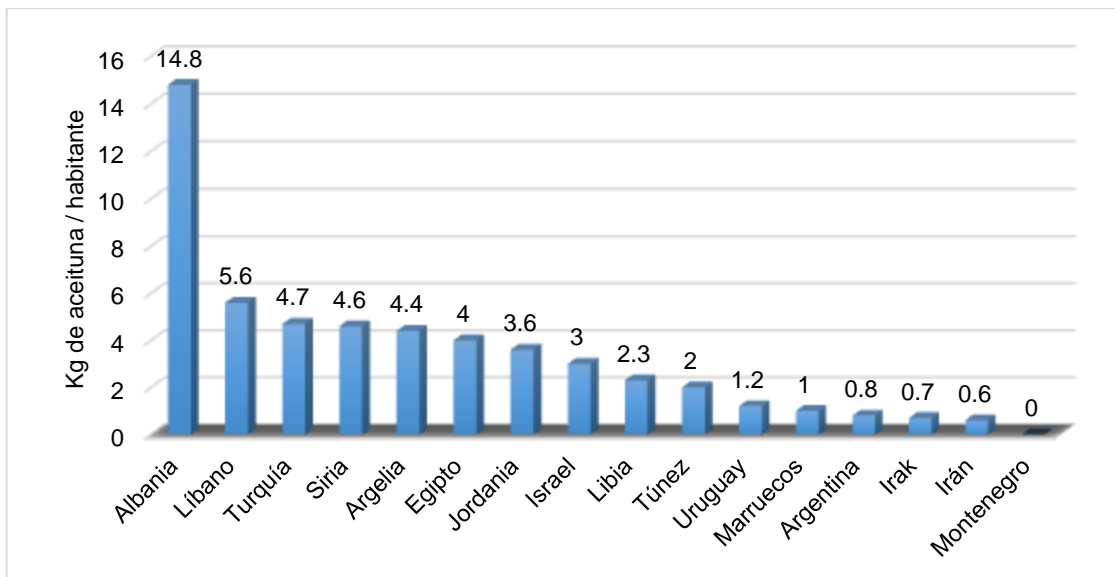


Figura 1. Consumo de aceituna de mesa en los países miembros del Consejo Oleícola Internacional en kg/habitante en 2013 (Consejo Oleícola, 2013).

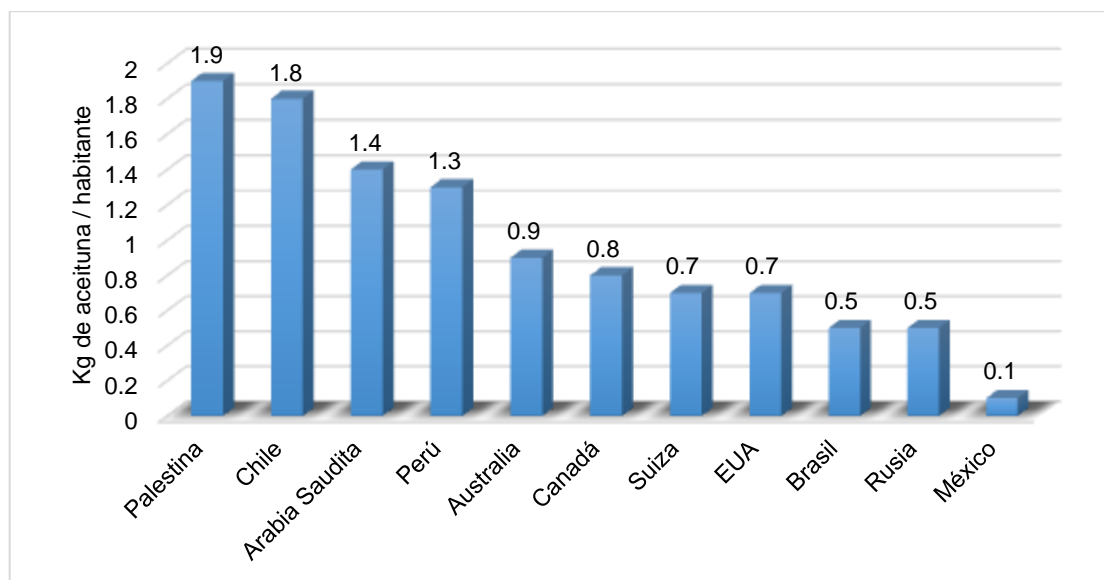


Figura 2. Consumo de aceituna de mesa en los países que no son miembros del Consejo Oleícola Internacional en kg/habitante en 2013 (Consejo Oleícola, 2013).

Por lo anterior, el olivo y la gran variedad de productos que se obtienen de él, desde aceitunas y aceite hasta suplementos alimenticios y biocombustible son de suma importancia, no solo por su valor económico sino también por los grandes beneficios que aportan a la salud del consumidor. Sin embargo, el rendimiento de este cultivo se ve limitado por diversas enfermedades, lo que se traduce en grandes pérdidas para el mercado oleícola.

2.2 Principales Enfermedades del Olivo

Debido a la importancia económica, social e histórica del olivo, existe una gran cantidad de información sobre las enfermedades que afectan a los cultivos de olivo, así como los principales agentes causales (Cuadro 2) que incluyen virus, hongos, bacterias, nemátodos, fanerógamas parásitas y agentes abióticos (Rodríguez, 2006). La susceptibilidad de los olivos depende del cultivar (Cuadro 3), por lo que solo algunas de estas enfermedades provocan importantes pérdidas económicas, entre ellas la tuberculosis, la aceituna jabonosa, el repilo y principalmente la verticilosis (Barranco *et al.*, 2008).

En términos generales, la tuberculosis es causada por la bacteria *Pseudomonas savastanoi*, el síntoma típico de esta enfermedad es la aparición de tumores en cualquier parte de la planta, principalmente en brotes y ramas jóvenes (Gutiérrez y Fernández, 2009).

La aceituna jabonosa, provocada por el hongo *Colletotrichum gloesporioides*, causa la podredumbre de aceitunas, pérdida de peso y caída prematura de las mismas, lo que origina mayor acidez del aceite de olivo y mal sabor (Gutiérrez y Fernández, 2009).

El repilo es la enfermedad más común del olivo y se caracteriza por formar manchas circulares en el haz de las hojas, el agente causal de esta enfermedad

es el hongo *Spilocaea oleagina*, favorecido por el exceso de humedad (Barranco *et al.*, 2008).

Cuadro 2. Principales enfermedades del olivo.

Enfermedad	Agente causal	Importancia*
<u>Micosis aéreas</u>		
Repilo	<i>Spilocaea oleagina</i>	MA
Aceituna jabonosa	<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	M
Negrilla	<i>Capnodium elaeophilum</i>	B
Escudete	<i>Camarosporium dalmaticum</i>	B
Emplomado	<i>Mycocentrospora cladosporioides</i>	B
Lepra	<i>Phlyctema vagabunda</i>	B
Otras micosis frutales	<i>Fusarium, Alternaria, Cladosporium</i>	B
Otras micosis foliares	<i>Stictis, Leveillula, Phyllactinia</i>	A
Chancros	<i>Eutypa lata, Phoma incopmta, Diplodia</i>	B
Caries del tronco	<i>Fomes, Phellinus, Poliborus, Stereum</i>	B
<u>Micosis radiculares</u>		
Verticilosis	<i>Verticillium dahliae</i>	MA
Podredumbres	<i>Armillaria, Rosellinia, Omphalotus</i>	B
<u>Bacteriosis</u>		
Tuberculosis	<i>Pseudomonas syringae</i>	M
<u>Virosis</u>		
Malformación foliar	Virus no identificado	A
Infecciones latentes	<i>Nepovirus, Cucumovirus</i>	A

Fuente: Adaptado de: Rodríguez (2006).

*MA = muy alta, A = alta, M = moderada, B = baja

Cuadro 3. Susceptibilidad de variedades de olivo a las principales enfermedades.

Cultivar	Verticilosis	Repilo	Tuberculosis	Aceitunas Jabonosas
Picual	E	S	R	R
Cornicabra	E	E-S	E	S
Hojiblanca	S	E-S	S	M-S
Lechín de Sevilla	-	R	S	R
Lechín de Granada	E	R	S	-
Verdial de Badajoz	S	M	E	-
Verdial de Huévar	-	E	R	R
Picudo	E	E	E	S
Empeltre	M-R	S	M	S
Arbequina	S	E	M-R	S
Manzanilla	S	E	E-M	S
Gordal Sevillana	-	M	M	E

Fuente: Adaptado de: Rodríguez (2006).

E = extremadamente susceptible, S = susceptible, M = moderadamente susceptible, R = resistente, - = sin datos

La verticilosis es una enfermedad vascular causada por el hongo *Verticillium dahliae* y es la más preocupante del olivo debido a su amplia distribución y a las grandes pérdidas económicas que provoca (Trapero *et al.*, 2011). Además, es considerada el problema sanitario más importante del olivo y su control eficiente en plantaciones establecidas continúa siendo un reto significativo para los fitopatólogos (Gutiérrez y Fernández, 2009). Esta enfermedad fue diagnosticada por primera vez en Italia en 1946, después en España en 1975 y posteriormente en todas las zonas olivareras del mundo, afectando en algunas regiones a más del 50% de los olivares (Trapero *et al.*, 2011).

2.3 Características de la Verticilosis del Olivo

La verticilosis del olivo es considerada por los olivicultores como la patología más importante y devastadora de dicho cultivo, afectando a todas las áreas cultivadas (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011; García-Consuegra, 2014). Esta enfermedad provoca el secado de ramas e incluso la muerte del árbol y ha sido reportada en los países en los que el olivo tiene una elevada importancia e incluso en los que su difusión está en auge (García-Consuegra, 2014). Dicha patología, no solo se encuentra muy difundida, sino que también provoca importantes pérdidas económicas a nivel mundial y su expansión ha sido asociada con los sistemas de cultivo intensivo (Martos-Moreno *et al.*, 2005; Dervis *et al.*, 2010; López-Escudero *et al.*, 2010). Los ataques más graves de este padecimiento se producen en olivos jóvenes de 4 a 10 años, causando una elevada mortalidad, aunque también se ha detectado en árboles adultos (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011; Trapero *et al.*, 2011; Jiménez-Díaz *et al.*, 2012).

El agente causal de esta enfermedad es el hongo *Verticillium dahliae*, el cual es capaz de sobrevivir en el suelo por largos periodos de tiempo debido a la formación de estructuras de resistencia llamadas microesclerocios (Trapero *et al.*, 2011). Éstos son de color negro con forma y tamaño variable siendo capaces de soportar condiciones ambientales y biológicas adversas por más de una década, esperando las condiciones adecuadas para su desarrollo (Jiménez Díaz *et al.*, 2009; Trapero *et al.*, 2011; García-Consuegra, 2014). La germinación de estas estructuras es estimulada por los exudados de las raíces del olivo y también de plantas resistentes a la infección, haciendo más difícil su erradicación y en consecuencia el control de la verticilosis (Trapero *et al.*, 2011). *V. dahliae* tiene un amplio rango de hospederos, afectando a más de 300 especies, incluyendo hortalizas, leguminosas, ornamentales, frutales, así como especies forestales y silvestres (Koike, 2008; Trapero *et al.*, 2011).

Algunas de las características de *V. dahliae* que dificultan su control son: la capacidad de sobrevivir por largos periodos en el suelo, infectar a un amplio rango de cultivos, a que posee patotipos de alta virulencia y al hecho de que la infección se desarrolla dentro del xilema, impidiendo que los fungicidas actúen sobre el patógeno (Jiménez-Díaz *et al.*, 2003). En olivo se han descrito dos patotipos de *V. dahliae*: el defoliante (D) y el no defoliante (ND), el D se caracteriza por ser más virulento que el ND, produciendo síntomas más graves y en menor tiempo (López-Escudero *et al.*, 2007; Trapero *et al.*, 2011). Los síntomas que presenta el patotipo D son: marchitamiento, clorosis, defoliación, reducción drástica de peso y altura, e incluso la muerte del árbol (López-Escudero y Blanco-López, 2001). En contraste, el patotipo ND causa los mismos síntomas pero los ataques son más leves o moderados, permitiendo una recuperación natural del árbol (Martos-Moreno *et al.*, 2006; López-Escudero *et al.*, 2007).

2.3.1 Ciclo Infeccioso de *Verticillium dahliae*

El ciclo vital de *V. dahliae* (Figura 3) comprende varias etapas: supervivencia, dispersión, germinación, penetración en la planta, colonización del sistema vascular, desarrollo de síntomas y producción de nuevo inóculo (Trapero *et al.*, 2011). Los responsables de la supervivencia y dispersión del patógeno son sus microesclerocios, ya que estas estructuras de resistencia son capaces de sobrevivir en el suelo por varios años, encontrándose principalmente en la capa arable (García-Consuegra, 2014). La fase de infección inicia con la germinación de los microesclerocios, la cual es estimulada por los exudados liberados por las raíces del olivo, así como por suelos húmedos y temperaturas entre 21-27 °C (Rodríguez, 2006; Trapero *et al.*, 2011). Después, estos penetran la corteza de las raíces hasta llegar al xilema, donde se establecen colonizando la planta por medio de la formación de conidias que son transportadas por el sistema vascular al resto del árbol (Rodríguez, 2006).

Cuando la colonización alcanza un punto en el que el hongo impide el flujo de agua y nutrientes a las partes superiores de la planta, aparecen los primeros síntomas y el hongo sale del xilema, infectando otros tejidos del huésped (Rodríguez, 2006). Finalmente, el resultado es la formación de nuevos microesclerocios, seguida de la muerte y descomposición de los tejidos de la planta infectada (Trapero *et al.*, 2013). Los nuevos microesclerocios son liberados en el suelo o permanecen en el interior de los restos de la planta, esperando las condiciones adecuadas para reiniciar el ciclo (Trapero *et al.*, 2011; García-Consuegra, 2014). La dispersión del patógeno a través del agua de riego y tejido vegetal infectado incrementan la densidad del inóculo en el suelo, dificultando aún más el control de la enfermedad (Rodríguez-Jurado y Bejarano-Alcázar, 2007; Jiménez-Díaz *et al.*, 2008; Navas-Cortes *et al.*, 2008).

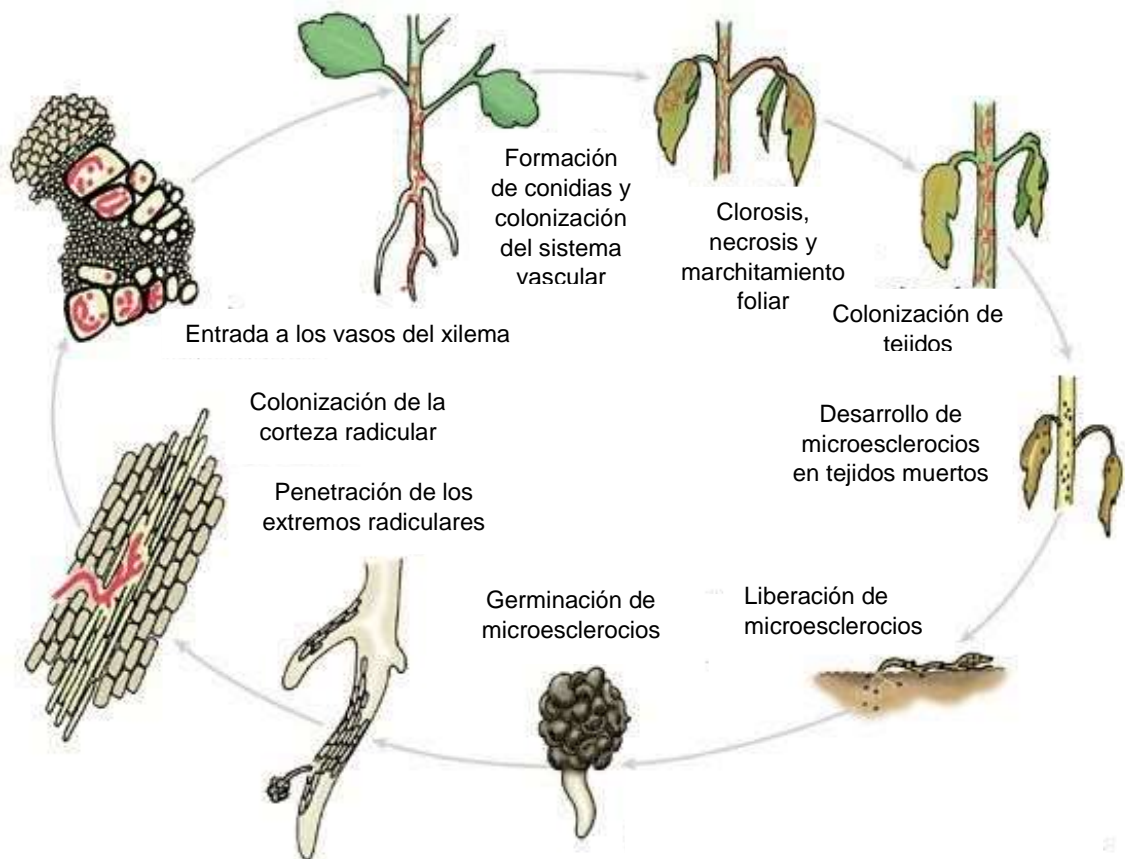


Figura 3. Ciclo infeccioso de *Verticillium dahliae*. Adaptado de: (http://www.apsnet.org/Education/lessonsPlantPath/Verticillium/di_scycle.htm).

Considerando lo anterior, los métodos de control deben enfocarse en la reducción de la densidad del inoculo en el suelo. Además, debe tenerse en cuenta que las condiciones que favorecen su desarrollo coinciden con las requeridas por el olivo.

2.3.2 Control de la Verticilosis en Olivo

Verticillium dahliae es un patógeno vascular que coloniza los vasos del xilema, esta característica dificulta considerablemente el control de la verticilosis, ya que impide el efecto de los fungicidas debido a la ubicación del patógeno (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011). La resistencia de algunas variedades de olivo a la Verticilosis consiste en la restricción de la colonización del sistema vascular del árbol por parte del patógeno (Martos-Moreno *et al.*, 2005).

Actualmente no existe un tratamiento que garantice el control de la verticilosis del olivo, no obstante, el conocimiento derivado de la investigación técnico-científico, indica que su control debe basarse en una estrategia de manejo integrada (Jiménez-Díaz *et al.*, 2003; Jiménez Díaz *et al.*, 2009; Schiliro *et al.*, 2012). Es decir, considerando medidas de carácter preventivo aplicadas antes de la plantación y medidas posteriores que disminuyan el progreso de la enfermedad (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011).

Los métodos más eficaces y económicos para el control de la verticilosis son los de carácter preventivo, dirigidos a evitar que el patógeno se establezca en el cultivo (Jiménez-Díaz *et al.*, 2003). Entre estas medidas se encuentran el análisis de suelo y posterior desinfestación mediante tratamientos físicos, químicos o biológicos antes de la plantación y el uso de plantas libres de *V. dahliae* o de variedades resistentes a este hongo (Jiménez-Díaz *et al.*, 2003). En cuanto a los tratamientos físicos, se ha reportado la eficacia de la

solarización del suelo, ya que su efecto hidrotérmico disminuye la densidad del inóculo (Koike, 2008; Grijalva-Contreras *et al.*, 2010). Esta medida ha resultado eficaz en la reducción de patógenos de suelo en general y en particular de *V. dahliae* en algodón y en viveros de olivo (Bejarano-Alcázar, 2004). Por otro lado, el control por solarización suele ser menos eficaz en plantas leñosas que en herbáceas (Rodríguez, 2006).

Los tratamientos químicos o fungicidas más efectivos son el format, metam sodio y, la mezcla de bromuro de metilo y cloropicrina; éstos últimos tienen un efecto sinérgico sobre un amplio espectro de patógenos de suelo (Subbarao, 2002; Rodríguez, 2006). Sin embargo, su uso está limitado por su alto costo, toxicidad, difícil aplicación y por los daños que provoca al medio ambiente y a la salud humana, lo que impulsa a la búsqueda de nuevas sustancias que lo sustituyan (Hutchinson *et al.*, 2000; Rodríguez, 2006). En la lucha química contra la verticilosis también se han utilizado inyecciones de algunos fungicidas en el tronco, los más usados son fosety-Al y benomilo que actúa una vez transformado en carbendazina (Mule *et al.*, 2000).

Otra medida eficaz para reducir la DI en el suelo es el uso de enmiendas orgánicas como crucíferas, estiércol, pasto de Sudán, entre otras, que actúan liberando sustancias tóxicas para el patógeno (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011; Trapero *et al.*, 2011). Esta práctica es muy exitosa para el control de patógenos de suelo como *V. dahliae* (Lazarovits, 2001). Por ejemplo, en la descomposición del pasto de Sudán la durrina al degradarse en el suelo produce ácido cianhídrico que afecta a nematodos fitopatógenos y a *V. dahliae* (Widmer y Abawi, 2000; Barranco *et al.*, 2008). Así mismo, se ha reportado que residuos de brócoli redujeron significativamente la DI de *V. dahliae* al igual que otras enmiendas, pero la eficacia de algunas varía de un tipo de suelo a otro (Koike y Subbarao, 2000; Trapero *et al.*, 2011).

Las raíces del olivo también pueden ser protegidas mediante el uso de agentes de control biológico (ACBs), como *Pseudomonas* spp. y *Trichoderma* spp., que han demostrado su eficacia en condiciones controladas (Mercado-Blanco *et al.*, 2004; Jiménez Díaz *et al.*, 2009; Schiliro *et al.*, 2012). Estas medidas incluyen el uso de hongos antagonistas, especialmente la especie *Talaromices flavus*, micorrizas y rizobacterias antagonistas (Karagiannidis *et al.*, 2002; Narisawa *et al.*, 2002; Berg *et al.*, 2005). Diversas cepas de *Pseudomonas* spp. han demostrado su efectividad frente a la verticilosis, siendo *P. fluorescens*, uno de los mejores ACBs (Schiliro *et al.*, 2012). El control de esta enfermedad por parte de *P. fluorescens*, parece requerir tanto de la colonización superficial de las raíces como de su establecimiento endófito; sin embargo, los mecanismos implicados aún se desconocen (Schiliro *et al.*, 2012). En 2004, Mercado-Blanco *et al.*, demostraron el antagonismo *in vitro* de *P. fluorescens* y *P. putida* contra *V. dahliae* en diferentes medios de cultivo.

Por otro lado, combinaciones de diferentes cepas de *Trichoderma* spp. han demostrado ser efectivas contra diversos hongos fitopatógenos, incluyendo a *V. dahliae* (Barroso-Albarracín *et al.*, 2012). Cepas de *Trichoderma harzianum*, han sido utilizadas como ACBs contra varios hongos, incluyendo especies del género *Verticillium* (Flamini, 2005). Algunas de estas cepas también tienen un efecto fertilizante sobre las plantas, estimulando su crecimiento y mecanismos de defensa (Barroso-Albarracín *et al.*, 2012). Jiménez Díaz *et al.* (2009), lograron reducir los síntomas de la verticilosis en olivo con un compuesto formulado a base de *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma gamsii*, con una densidad de inóculo de cada estirpe de 4.8×10^8 UFC/g.

Todos los métodos de “control” mencionados anteriormente, han probado ser efectivos en el control de la verticilosis antes del establecimiento del cultivo, otros han probado ser efectivos *in vitro*, pero no en campo y los tratamientos químicos eficaces en campo generan residuos tóxicos para el ser humano y el medio ambiente. Por lo anterior es necesario encontrar tratamientos alternativos

que garanticen el control de la verticilosis y que a su vez sean amigables con el medio ambiente. Sin olvidar la implementación de una estrategia de control, integrada por todas las medidas preventivas disponibles, ya que ninguna de ellas es suficientemente eficaz cuando se aplica individualmente.

2.4 Efecto de los Terpenoides en el Control de Fitopatógenos

Una posible alternativa para el control de la verticilosis son los terpenoides. Estos compuestos son la familia de productos naturales más amplia y diversa que se conoce. La mayoría de ellos son de origen vegetal y, además poseen propiedades antioxidantes, antifúngicas y antibacterianas (Closa *et al.*, 2010; López-Carreras *et al.*, 2012). Hall *et al.* (2011), observaron una mayor acumulación de terpenoides en las células que rodean el punto de infección, limitando significativamente el avance del patógeno en el xilema de una variedad de algodón resistente, inoculada con *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*. Además, se ha demostrado que extractos del xilema de plantas de algodón resistentes a la verticilosis con alto contenido de terpenoides, inhiben el crecimiento *in vitro* de *V. dahliae* y *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, lo que sugiere que también podría inhibir el crecimiento *in planta* (Zhang *et al.*, 1993).

También se ha comprobado la actividad antimicrobiana *in vitro* de la oleuropeína y el hidroxitirosol, componentes mayoritarios de las hojas y aceite de oliva (López-Carreras *et al.*, 2012). Concentraciones mínimas inhibitorias de hidroxitirosol, que van de 0.97 a 31.25 µg/mL han probado ser efectivas contra bacterias, incluso a menor concentración que la eritromicina y la ampicilina (De la Fuente *et al.*, 2004).

Es importante mencionar que el algodón es el segundo cultivo más susceptible a la verticilosis después del olivo y que *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* es un hongo vascular al igual que *V. dahliae*, por lo que comparten el mismo

ciclo infectivo. Lo anterior, nos permite suponer que los terpenoides cumplen una función importante en la tolerancia a la verticilosis debido a las propiedades antifúngicas que se han reportado (Zhang *et al.*, 1993; Closa *et al.*, 2010; López-Carreras *et al.*, 2012).

2.5 Biosíntesis de Terpenoides en Plantas

Uno de los rasgos distintivos de las células vegetales, es la presencia de compartimentos subcelulares semiautónomos conocidos como plástidos, dentro de ellos se llevan a cabo procesos metabólicos indispensables para la planta (León y Guevara-García, 2007) (Figura 4). Entre éstos se encuentran la fotosíntesis, la síntesis de aminoácidos, la síntesis de lípidos y la síntesis de gran cantidad de metabolitos conocidos como isoprenoides o terpenoides (León y Guevara-García, 2007). Los terpenoides desempeñan funciones variadas, muchas de ellas esenciales para el desarrollo y la diferenciación de todos los seres vivos incluyendo las plantas y también para la salud humana (Niki *et al.*, 1995). Entre las funciones que realizan los terpenoides en planta se incluyen funciones primarias como: componentes estructurales de membranas, reguladores de crecimiento (hormonas), y fotoprotectores (pigmentos) (Enfissi *et al.*, 2005). También participan como moléculas protectoras frente a patógenos, atrayentes, olores, sabores, etc. (Enfissi *et al.*, 2005).

Los terpenoides son un conjunto de sustancias que conforman uno de los grupos más amplio y diverso que se conoce, y aunque poseen estructuras químicas muy diferentes tienen un origen biosintético común (López-Carreras *et al.*, 2012). Las plantas superiores sintetizan una gran variedad de isoprenoides que requieren para su crecimiento y desarrollo, se conocen dos vías metabólicas para sintetizar isopentenildifosfato (IPP), el precursor de todos los terpenoides (Figura 5) (Closa *et al.*, 2010; Taiz y Zeiger, 2010). Estas vías son la del mevalonato (MVA) que produce IPP para sintetizar terpenoides citosólicos

y mitocondriales y la vía del metileritritol 4-fosfato (MEP) que suministra IPP para la síntesis de terpenoides en los plástidos (Phillips *et al.*, 2008a; Closa *et al.*, 2010). En la ruta del MVA, tres moléculas de acetil CoA se condensan para formar ácido mevalónico, este intermediario clave de seis carbonos posteriormente es pirofosforilado, descarboxilado y deshidratado para formar IPP (Taiz y Zeiger, 2010).

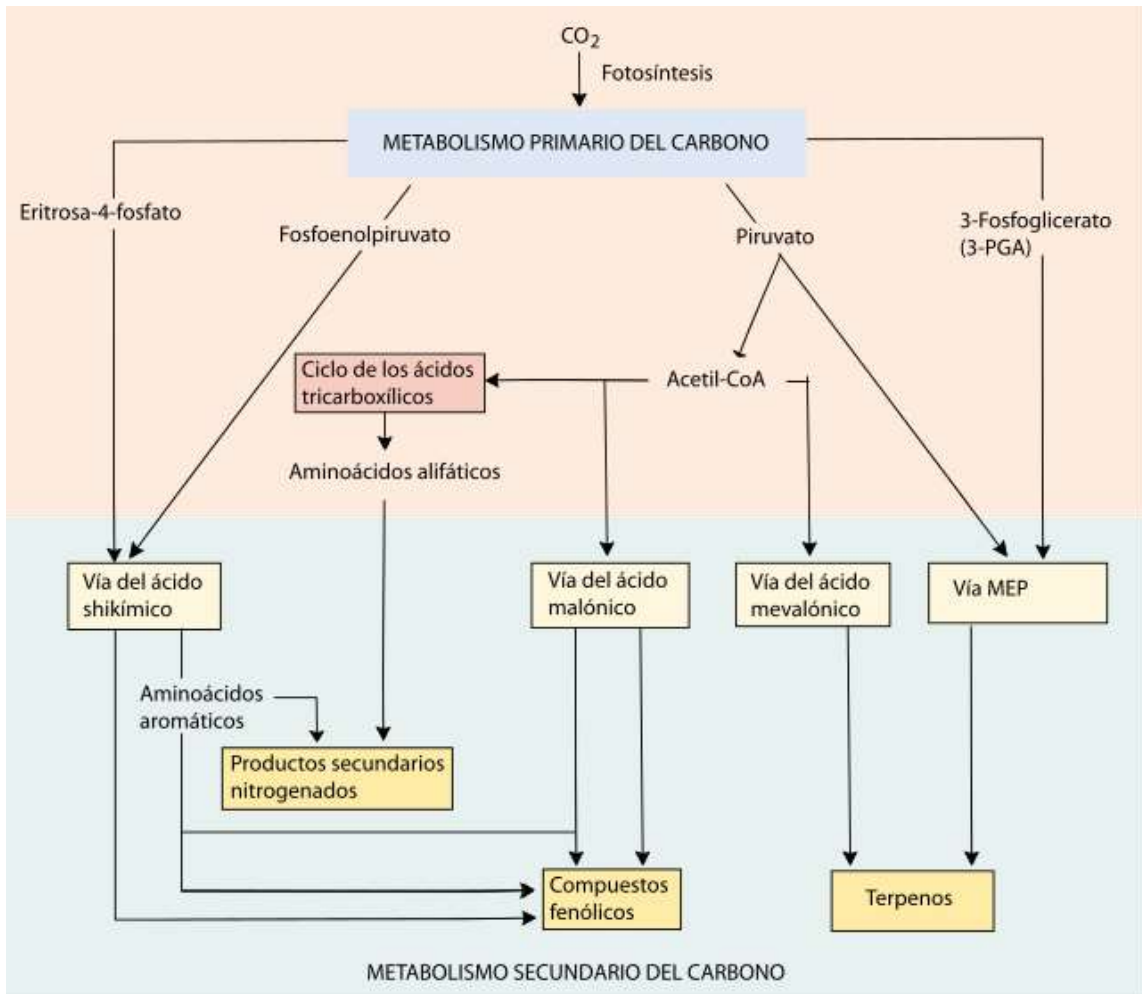


Figura 4. Principales rutas de la biosíntesis de terpenos y su relación con el metabolismo primario (Taiz y Zeiger, 2010).

La vía MEP, de reciente descubrimiento, es responsable de la síntesis de una variedad de terpenoides que incluyen fitohormonas, pigmentos fotosintéticos, acarreadores de electrones, antioxidantes y moléculas de defensa (León y Guevara-García, 2007). Debido al papel central que la vía MEP desempeña para el desarrollo de plantas y la salud humana, el estudio de los mecanismos que regulan a esta vía es de suma importancia (León y Guevara-García, 2007).

En la vía del MEP, no se han elucidado los detalles, pero se sugiere que el gliceraldehido-3-fosfato y un derivado de dos carbonos del piruvato se combinan para formar un intermediario que finalmente es convertido en IPP (Taiz y Zeiger, 2010). Posteriormente el IPP es convertido por la IPP isomerasa a dimetilalil difosfato (DMAPP), un isómero del IPP, los cuales, son los precursores de cinco carbonos que se combinan para formar moléculas mayores (Okada *et al.*, 2008; Phillips *et al.*, 2008b).

En los próximos pasos la prenil transferasa añade subunidades de IPP al DMAPP por condensación secuencial para formar farnesil difosfato (FPP, C15) y geranylgeranyl difosfato (GGPP, C20) (Wang y Ohnuma, 2000; Liang *et al.*, 2002). Finalmente, el FPP y el GGPP se pueden dimerizar para formar triterpenos (C30) y tetraterpenos (C40), respectivamente (Taiz y Zeiger, 2010). La enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa (HMGR) es considerada la principal enzima limitante que regula el flujo al inicio de la vía del MVA (Closa *et al.*, 2010).

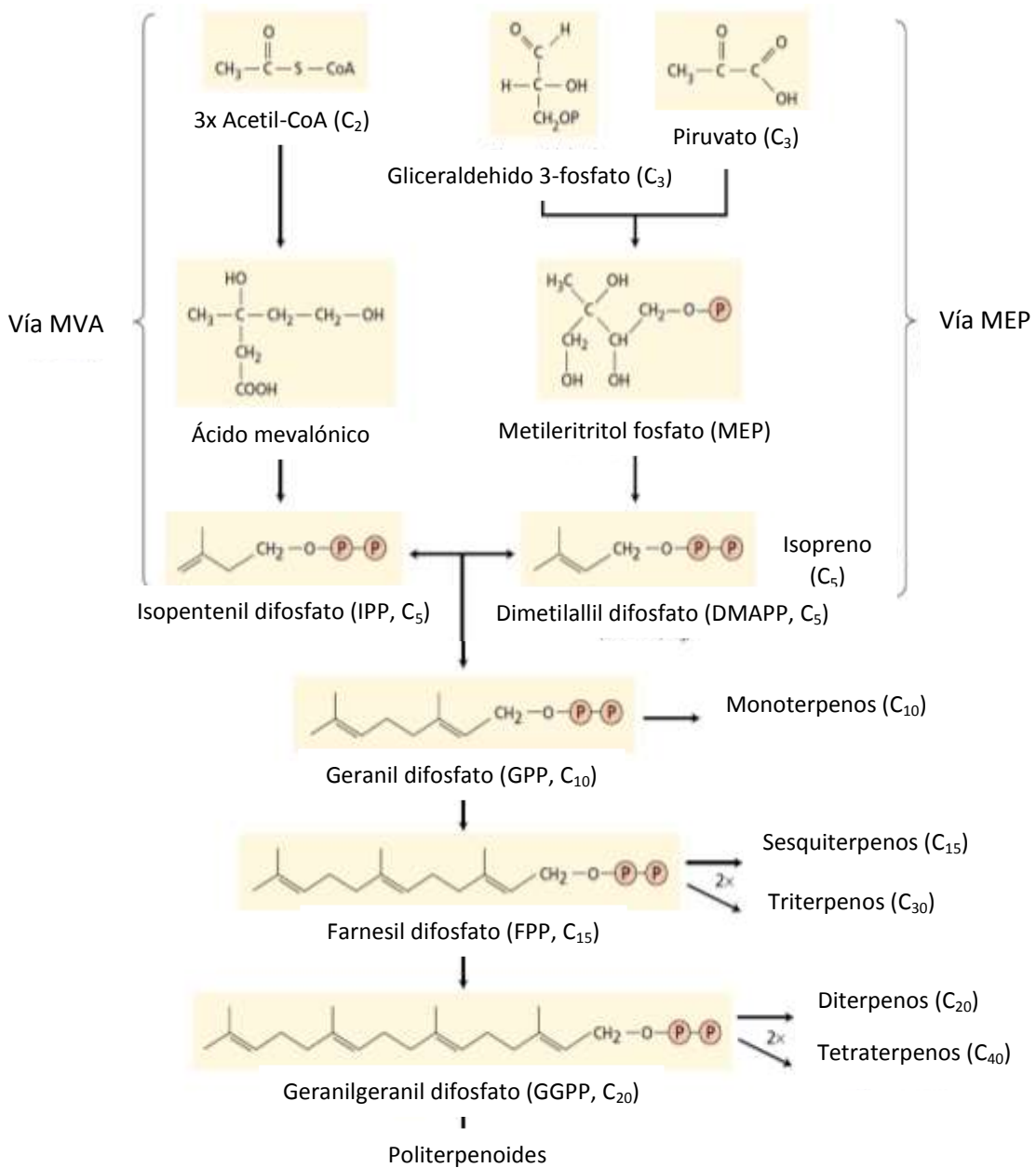


Figura 5. Esquema de la biosíntesis de terpenos. Las unidades básicas de terpenos de cinco carbonos son sintetizadas por dos vías diferentes. Los intermediarios fosforilados, IPP y DMAPP, se combinan para formar terpenos más grandes de 10 y 15 carbonos. Modificado de: (Taiz y Zeiger, 2010).

Considerando que los terpenoides llevan a cabo una gran variedad de funciones en las plantas, desde componentes estructurales de membrana hasta moléculas de defensa, es importante conocer los mecanismos que regulan su biosíntesis. Esto permitiría la manipulación de estas vías con el fin de mejorar la respuesta de defensa de las plantas, al incrementar el contenido de terpenoides en ellas. Por ejemplo, mediante la sobreexpresión de los genes que codifican para las enzimas clave que regulan la biosíntesis de estos compuestos.

2.6 Distribución de Terpenoides en Olivo

El contenido de terpenoides en olivo difiere de una variedad a otra, así como de la edad y parte del árbol analizada. Se ha reportado que durante la ontogenia del fruto, la concentración de algunos triterpenos pentacíclicos aumenta, la de otros disminuye y otros son sintetizados en las últimas etapas fenológicas del fruto (Stiti *et al.*, 2007; Guinda *et al.*, 2010). En un estudio similar se reportó que en frutos de la var. Picual el contenido de los ácidos triterpénicos maslínico y oleanólico incrementaron durante la maduración mientras que en frutos de la var. Cornezuelo se mantuvo sin presentar variaciones importantes. También se reportó que la concentración de los ácidos maslínico, oleanólico y ursólico, y de los dialcoholes triterpénicos uvaol y eritrodiol en las hojas de ambas variedades no presentaron cambios significativos durante los meses evaluados, siendo el ácido oleanólico el componente mayoritario en las dos variedades (Peragón, 2013).

Los mismos compuestos fueron identificados por Fiad y El-Hamidi (2015) en frutos maduros de la variedad Picual y por Guinda *et al.* (2015) en hojas de olivos adultos de más de 10 años de edad de las variedades Picual, Hojiblanca, Arbequina y Lechin, aunque en diferentes cantidades. Olmo-García *et al.* (2016) optimizaron el análisis e identificación de estos triterpenos pentacíclicos por HPLC reduciendo el tiempo de análisis de cada muestra a cinco minutos y

obteniendo una mejor separación de los compuestos, además de identificar un triterpeno más, el ácido betulínico. También se ha evaluado el contenido de triterpenos en aceites extraídos de cuarenta variedades de olivo, encontrándose en menor cantidad que en la pulpa del fruto (Allouche *et al.*, 2009). En todos los trabajos mencionados el contenido de triterpenos fue mayor en las hojas de olivo que en los frutos. En el Cuadro 4 se presenta el contenido de triterpenos pentacíclicos en diferentes tejidos y variedades de olivo.

Cuadro 4. Contenido de triterpenos pentacíclicos en diferentes tejidos y variedades de olivo.

Tejido/Variedad	Maslínico	Oleanólico	Ursólico	Eritrodiol	Uvaol
	Concentración (mg/g de peso seco)				
Fruto/Chemlali (Stiti y col., 2007)	0.83	1.257	0.006	0.401	0.245
Aceite/Lechin (Allouche y col., 2009)	0.032	0.078	0.001	0.066	0.018
Hoja/Arbequina (Guinda y col., 2010)	4.8*	29.2*	2.0*	1.5*	1.5*
Hoja/Cornezuelo (Peragón, 2013)	2.58	10.94	1.94	0.54	0.46
Hoja/Picual (Guinda y col., 2015)	1.07*	3.1*	0.41*	0.08*	0.07*
Fruto/Picual (Fiad y El-Hamidi, 2015)	45.05*	8.94*	8.57*	8.29*	9.27*

* Por ciento de peso seco

2.7 Síntesis de Terpenoides en Respuesta a la Interacción Planta-Patógeno

La producción de fitoalexinas o metabolitos secundarios como los terpenoides, es una de las respuestas de las plantas para defenderse ante el ataque de algún patógeno. En plantas de maíz, por ejemplo, los sesquiterpenos zealexinas y los diterpenos kauralexinas de la familia de las fitoalexinas han probado ser efectivos en el control de los hongos fitopatógenos *Fusarium graminearum*, *Aspergillus flavus* y *Rhizopus microsporus* (Huffaker *et al.*, 2011; Schmelz *et al.*, 2011; Pusztahelyi *et al.*, 2015).

En otro estudio, Mahlo *et al.* (2013) observaron la actividad antifúngica de extractos de *Breonadia salicina* que contenía entre 20 y 250 µg/mL de ácido ursólico, sobre *Aspergillus parasiticus*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium expansum*, *P. janthinellum*, *Trichoderma harzianum* y *Fusarium oxysporum*.

El ácido ursólico así como otros triterpenos pentacíclicos también han sido aislados del olivo y otras especies de la familia *Oleaceae* y *Lamiaceae* (Kontogianni *et al.*, 2009).

Por otra parte, se observó una mayor acumulación de terpenoides en las células del xilema que rodean el punto de infección causado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* en variedades de algodón resistentes a este hongo en comparación con variedades susceptibles (Hall *et al.*, 2011).

Lo anterior, permite suponer que los terpenoides juegan un papel importante en la resistencia a dicha patología debido a sus propiedades antifúngicas, por lo que puede sugerirse su uso como alternativa promisoriosa para el control de la verticilosis.

2.8 Mecanismo de Acción de los Terpenoides

Diversos estudios han demostrado que los principales compuestos responsables de la actividad antimicrobiana y antifúngica de los aceites esenciales son los terpenoides, siendo aquellos con mayor actividad los que contienen en su estructura grupos alcoholes, aldehídos y por último los que contienen grupos cetónicos. Sin embargo, se desconocen los detalles sobre el mecanismo de acción de estos compuestos (Maguna *et al.*, 2006).

Algunos estudios han reportado que las diferencias estructurales entre los terpenoides pueden influir en su actividad antifúngica al diferir en su permeabilidad en la membrana (Haque *et al.*, 2016). En el caso específico de los terpenos fenólicos, su naturaleza hidrofóbica asegura su partición en la membrana lipídica; sin embargo, su hidrofobicidad no garantiza su toxicidad, pues se han visto terpenos fenólicos como el p-cimeno con alto coeficiente de partición, que no tiene efectos tóxicos y otros como el carvacrol con bajo coeficiente de partición, pero con efectos tóxicos debido a la presencia de su grupo hidroxilo, crítico para su toxicidad (Rao *et al.*, 2010).

De manera general, uno de los principales mecanismos de acción propuestos para los terpenoides consiste en la unión de éstos al ergosterol presente en la membrana celular de los hongos creando canales que incrementan el flujo de iones hacia el exterior de la célula, afectando la estabilidad estructural de la membrana y desestabilizando del empaquetamiento de la bicapa lipídica provocando la muerte de las células del patógeno (Maguna *et al.*, 2006).

La importancia de este trabajo radica en comprobar si realmente el contenido de terpenoides en olivos de la variedad Manzanillo incrementa en respuesta a la infección causada por *Verticillium dahliae*.

III. HIPÓTESIS

El perfil de terpenoides en tallo de olivo se modifica en respuesta a la infección causada por *Verticillium dahliae*.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar los cambios en el perfil de terpenoides en tallo de olivo en respuesta a la inoculación con *Verticillium dahliae*.

4.2. Objetivos Específicos

- 🍷 Inocular con *Verticillium dahliae* plantas de olivo enraizadas a partir de estacas semileñosas de la variedad Manzanillo.
- 🍷 Determinar cualitativa y cuantitativamente por HPLC y espectrofotometría los terpenoides en plantas de olivo testigo e inoculadas con *V. dahliae*.
- 🍷 Determinar las alteraciones físicas y morfológicas en plantas de olivo y haces vasculares en respuesta a la infección causada por *V. dahliae*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material Vegetal

Para el desarrollo del experimento, se indujeron por organogénesis 96 plantas a partir de estacas semileñosas de olivos de 10 años de edad de la variedad 'Manzanillo' libres de *V. dahliae* originarios de Caborca, Sonora. Se tomaron estacas de ramas jóvenes (3-5 meses) de aproximadamente 1 cm de grosor de árboles de olivo sanos de la misma variedad, las cuales se colocaron en charolas con perlita y se mantuvieron en una cámara de crecimiento durante tres meses, a una temperatura de 24 °C, con un 90% de humedad relativa y un fotoperiodo de 14 horas de luz por día. Debajo de las charolas se colocó un tapete térmico a 27 °C para favorecer el enraizamiento de las estacas. Las estacas se regaron cada tercer día con 100 mL de Alga Root/Agua (1:100), un producto comercial que promueve la formación de raíces. Después de los tres meses en la cámara, se trasplantaron a macetas individuales con una mezcla de tierra (50%), arena (40%) y gravilla (10%), se colocaron en una casa sombra y se dejaron crecer otros doce meses para permitir el reforzamiento de las raíces. Durante ese periodo se regaron con agua cada dos días y se les aplicó 1 g del fertilizante Triple 17 cada dos meses, el cual es una mezcla de nitrógeno, fósforo y potasio para favorecer el desarrollo foliar.

5.2 Aislamiento e Identificación de *Verticillium dahliae*

De un huerto de olivo de 20 hectáreas ubicado en la región de Caborca, Sonora, se seleccionaron 15 árboles de la variedad 'Manzanillo' con los signos característicos de la verticilosis (clorosis, necrosis, marchitamiento, defoliación). De cada árbol se recolectaron muestras desuelo (2 kg aproximadamente) a una profundidad de 30 cm y a una distancia de 50 cm de la base del tronco, obteniéndose un total de 15 muestras.

Para el aislamiento del patógeno, las muestras se procesaron por el método del tamizado húmedo de López-Escudero y Mercado-Blanco (2011) con algunas modificaciones, con tres repeticiones de cada una. Las muestras se secaron a 50 °C durante 48 h y se tamizaron con una malla de 425 µm. Posteriormente se mezclaron 25 g de suelo con 100 mL de agua estéril y se agitaron en un agitador orbital a 270 rpm por 1 h. Después se filtró la mezcla en tamices de 125 y 45 µm y el suelo retenido en la malla más fina se resuspendió en 100 mL de agua estéril. Finalmente se tomaron alícuotas de 1 mL y se sembraron en placas con PDA Difco™ y un medio selectivo para *Verticillium dahliae* preparado a base de polipectato de sodio (APSM) según la técnica de López-Escudero y Mercado-Blanco (2011), ambos medios se incubaron en oscuridad a 24 °C. Se realizaron siembras por triplicado para cada muestra. Después de 14 días de incubación se hicieron tinciones con azul de algodón y se observaron en un microscopio compuesto marca Zeiss modelo Primo Star con los objetivos de 100x y 40x.

La identificación del hongo se realizó comparando la morfología de las colonias y las estructuras microscópicas con las reportadas por Smith (1965), Agrios (2005), Qin *et al.* (2008), Finatti y Aparecido (2009).

5.3 Preparación del Inóculo e Inoculación

Para la preparación del inóculo se utilizaron placas de *Verticillium dahliae* de cuatro semanas de crecimiento, se recuperaron las esporas mediante un raspado en la superficie de la colonia del hongo y 10 mL de agua estéril por placa. La solución final de esporas, se ajustó a una concentración de 3.8×10^7 conidias/mL. El inóculo se inyectó 1 cm debajo de la raíz principal de 12 plantas de olivo, inyectando 500 μ L de la suspensión de conidias. Se utilizó un lote testigo de 12 plantas a las cuales se les inyectó agua estéril (Davis *et al.*, 2006).

5.4 Toma de Muestra

Se realizaron muestreos a distintos tiempos: 0, 1, 3 y 5 días después de la inoculación. Para ello se cortó el tallo de cada una de las 24 plantas, tomando un segmento de 12 centímetros partiendo del punto de inoculación, y se dividió en cuatro secciones de 3 cm. A cada una de las 96 secciones se les retiró la corteza y se congelaron inmediatamente a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior liofilización. Después de liofilizar las muestras, se molieron en un mortero y se guardaron en frascos. Lo anterior se realizó por triplicado, tanto para las plantas inoculadas como para las plantas testigo, muestreando tres plantas por día y por tratamiento.

5.5 Análisis de Terpenoides

5.5.1 Cuantificación de Terpenoides Totales por Espectrofotometría

Para determinar el contenido de terpenoides totales en los tallos de olivo testigo e inoculados, se utilizó la técnica de Ghorai *et al.* (2014) con algunas modificaciones. Para cada una de las 96 secciones analizadas, se mezclaron

150 mg de tallo liofilizado con 1 mL de metanol al 95%; se incubó a temperatura ambiente (25 °C) durante 48 h en oscuridad. Posteriormente la mezcla se centrifugó a 4000 g por 15 min a temperatura ambiente; se mezclaron 200 µL del sobrenadante con 1.5 mL de cloroformo; se agitó la mezcla en un vortex y se dejó reposar 3 min. Inmediatamente después, la mezcla se colocó en hielo y se adicionaron 100 µL de ácido sulfúrico concentrado; se retiró del hielo y se mantuvo en oscuridad y completo reposo durante 2 h. Por último, se decantó el sobrenadante y el precipitado formado se disolvió en 1.5 mL de metanol al 95% y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro marca “HACH” modelo “DR 5000” a una longitud de onda de 538 nm. Para la cuantificación de los terpenos se realizó una curva estándar de ácido oleanólico a distintas concentraciones logrando una r^2 de 0.98. Los resultados se expresaron en µg de ácido oleanólico/g de peso seco (p.s.).

5.5.2 Determinación del Perfil de Terpenoides por HPLC

5.5.2.1 Extracción de Terpenoides. La extracción de los terpenoides se llevó a cabo utilizando el método de Peragón (2013) con algunas modificaciones. De cada una de las 96 muestras se pesó por separado, 125 mg del tejido liofilizado y se mezclaron con 1.5 mL del solvente de extracción preparado con metanol-etanol en una proporción 1:1 v/v, ambos grado HPLC. Después, la mezcla se agitó en un vortex por 1 min y se centrifugó a 7700 g a 4 °C durante 5 min (este paso se repitió seis veces cambiando el sobrenadante por el solvente de extracción). Posteriormente, se evaporaron los 9 mL del sobrenadante en un rotaevaporador “Buchi 011” con baño maría modelo “Buchi 461” y el residuo se disolvió en 1 mL de metanol. Por último, se filtró con membranas Millipore de nylon de 0.2 µm y se colocó en viales color ámbar para su posterior análisis por HPLC.

5.5.2.2 Condiciones Cromatográficas. El análisis se realizó en un cromatógrafo marca Varian, modelo ProStar 230 conformado con una bomba de gradiente ternario HPLC, acoplado a un detector UV-VIS ProStar 310 con arreglo de diodos. La separación fue llevada a cabo por elución isocrática por 30 min utilizando una columna C₁₈ ODS Bekman Coulter de 25 cm de largo, 4.6 mm de diámetro y un tamaño de partícula de 5 µm. Las condiciones cromatográficas que se utilizaron son las reportadas por Peragón (2013). La columna se mantuvo a 30°C, el volumen de inyección de muestra fue de 20 µL, la fase móvil consistió en una mezcla de acetonitrilo-agua 85:15 v/v acidificada con 0.05% de ácido fosfórico, a un flujo de 0.8 mL/min. Los compuestos fueron detectados a una longitud de onda de 204 nm.

Los terpenoides se identificaron comparando sus tiempos de retención con los obtenidos para los estándares comerciales: uvaol, eritrodiol, ácido ursólico, ácido oleanólico, ácido betulínico y ácido maslínico (SigmaAldrich). La cuantificación de cada uno de los terpenoides se realizó comparando sus áreas con una curva estándar a diferentes concentraciones (1, 5, 25, 50, 100 ppm).

5.6 Determinación de los Síntomas Causados por *Verticillium dahliae* en Plantas de Olivo

Las plantas de olivo se revisaron y observaron diariamente para registrar los síntomas causados por el patógeno. Los síntomas fueron evaluados en base al tamaño, desarrollo de clorosis, necrosis foliar, defoliación y muerte de las plantas (Martos-Moreno *et al.*, 2006).

5.7 Determinación de la Colonización de *Verticillium dahliae* por Microscopía de Fluorescencia

Con el propósito de localizar al hongo en los vasos del xilema del tallo de olivo, y determinar las posibles alteraciones en las células del xilema por la presencia del patógeno, se realizaron cortes histológicos para su observación microscópica. Para ello se sumergió una porción del tallo en una solución de azul de toluidina al 0.25% (w/v) durante tres minutos, y después se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de colorante. Posteriormente se colocaron en un molde de papel aluminio, en el cual fueron embebidas en parafina a 45 °C y se dejaron solidificar a temperatura ambiente. Después de este paso se retiró el exceso de parafina de la muestra y se realizaron cortes de 0.5 mm con ayuda de un Micrótopo marca Leica modelo 820, todo lo anterior de acuerdo al método reportado por Zelko *et al.* (2012). Finalmente, se tiñeron los cortes con berberina al 0.01% (w/v) durante 1 h y se enjuagaron con agua destilada y con una solución de 0.1 g de FeCl₃ por litro de glicerol al 50% (v/v), según la técnica de Brundrett *et al.* (1988). Posteriormente se observaron en un microscopio de fluorescencia marca Carl Zeiss modelo “Axio Scope A1” equipado con cámara “AxioCam ICm 1” bajo el objetivo 40x, utilizando el software “ZEN lite Digital Imaging para el análisis de la imagen.

5.8 Diseño de Experimentos

Los datos obtenidos se analizaron mediante un diseño completamente al azar con arreglo factorial A x B, donde el factor A fueron los tratamientos con dos niveles (inoculado y testigo), y el factor B los tiempos de muestreo con cuatro niveles (0, 1, 3 y 5 días). Se realizó un análisis de varianza al 95% de confianza y una prueba de comparación de medias por el método de Tukey. Las variables de respuesta fueron la concentración de terpenoides en mg/g de peso seco. Lo anterior se llevó a cabo utilizando el programa estadístico NCSS 2007.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Generación de Plantas de Olivo

Se obtuvieron 96 plantas sanas de olivo de 1 año y tres meses de edad, con una altura entre 78 y 91 cm, con un promedio de 162 hojas y con tallos de 0.9 a 1.1 cm de grosor. El índice de supervivencia en la propagación de las plantas de olivo fue del 77.5%. En general, la capacidad de enraizamiento es mayor en individuos jóvenes que en adultos. De acuerdo con lo encontrado en el presente trabajo, Husen y Pal (2006) reportaron un 77%, 53% y 38% de enraizamiento en estacas procedentes de individuos de 2 meses, 15 años y 30 años respectivamente.

6.2. Obtención de Cepas de *Verticillium dahliae*

El método del tamizado-húmedo y siembra en medio específico a base de polipectato de sodio (APSM) permitió el aislamiento del hongo *Verticillium* spp; mientras que al utilizar el medio PDA se observó el crecimiento de diversas bacterias y hongos que contaminaron el medio de cultivo, como *Rhizopus* spp., *Penicillium* spp. y *Fusarium* spp. las cuales no permitieron el aislamiento de *Verticillium* spp.

A partir del sexto día de incubación en el medio APSM se observaron pequeñas colonias de color blanco en el 20% de las muestras analizadas, tornándose de

color negro a los 13 días de incubación. En colonias con cuatro semanas de crecimiento, se observó bajo el microscopio la producción de conidióforos con fialides en forma de verticilo, la formación de microesclerocios de color negro considerados estructuras de resistencia, micelio hialino y septado, y conidias binucleadas de forma ovoide (Figura 6). Lo observado coincide con lo reportado por Qin *et al.* (2008), quienes a partir de dos cepas de *V. dahliae* aisladas de lechuga y alcachofa, observaron características morfológicas similares al presente estudio. Otro trabajo que coincide con los resultados obtenidos, es el de Finatti y Aparecido (2009), en el cual realizaron una caracterización fisiológica de *Verticillium dahliae* aislado de tomate, berenjena y cacahuate. En dicho estudio observaron microesclerocios de color negro a los 10 días de incubación, así como la presencia de micelio blanco en la superficie del centro de la placa.

En otro estudio, Smith (1965) comparó micro y macroscópicamente la morfología de *V. dahliae*, *V. alboatrum* y *V. tricorpus* sembrados en PDA. Las características que reporta para *V. alboatrum* son conidióforos largos con base ancha y oscura, conidias largas de 8 x 3 μm ocasionalmente septadas, hifas gruesas y oscuras, micelio raso de color negro y sin formación de microesclerocios. Esta especie usualmente forma conidióforos y conidias mucho más abundantes que *V. dahliae*, mientras que *V. tricorpus* produce conidióforos hialinos, conidias de hasta 15 x 4 μm , hifas gruesas y oscuras, y microesclerocios color negro. En cambio, las características para *V. dahliae* son: hifas hialinas y septadas de 2-4 μm de diámetro, conidióforos completamente hialinos, pequeñas conidias de 6 x 2 μm , microesclerocios abundantes de color negro de 30-60 μm de diámetro y micelio de color blanco; lo cual es similar a nuestros resultados.

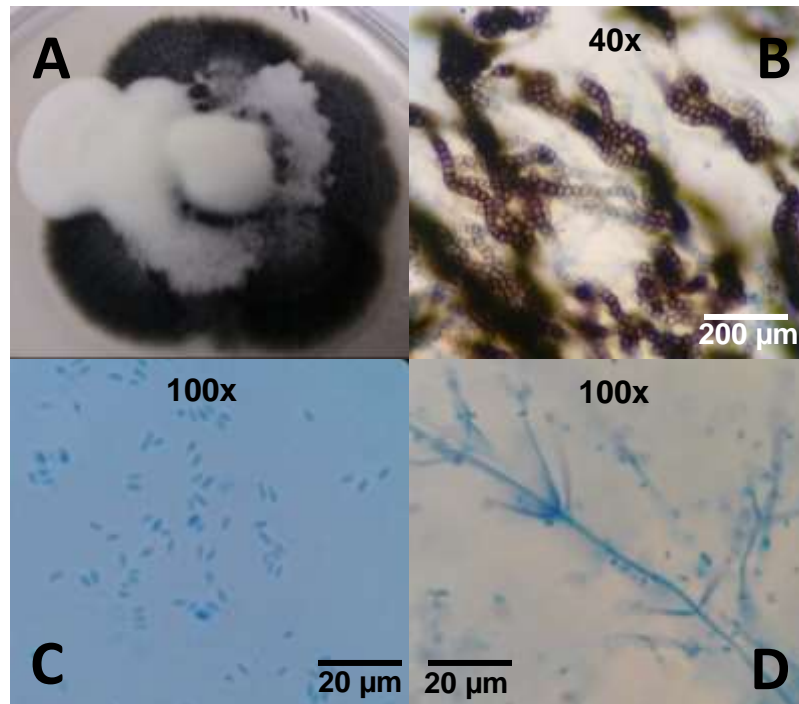


Figura 6. Morfología de *Verticillium dahliae*. A) Colonia de *V. dahliae* de 4 semanas de crecimiento; B) Microesclerocios; C) Conidias; D) Fialides con verticilos. B, observación al microscopio (40x), C y D (100x).

En general, las principales diferencias entre *Verticillium dahliae*, *V. alboatrum* y *V. tricorpus* son que en el caso de *V. dahliae* el crecimiento del micelio es abundante y de color blanco, mientras que en *V. alboatrum* es raso y de color negro y de color verde oscuro en *V. tricorpus*. Otra diferencia importante es el tamaño de las conidias, siendo mayor en *V. tricorpus* que en *V. dahliae* y *V. alboatrum*, en estas dos especies el tamaño de las conidias es similar, sin embargo, se diferencian en que *V. dahliae* produce abundantes microesclerocios, mientras que *V. alboatrum* no los produce.

Por lo anterior, las características morfológicas de la cepa obtenida en el presente estudio, corresponden a *Verticillium dahliae*; sin embargo, se requiere realizar análisis moleculares para confirmar la especie del patógeno (Smith, 1965; Qin *et al.*, 2008; Finatti y Aparecido, 2009; Inderbitzin y Subbarao, 2014).

6.3 Terpenoides Totales en Tallo de Olivo Testigo e Inoculado

La concentración de terpenoides totales en las plantas testigo al tiempo cero (Figura 7) fue de 60.77 ± 3.4 μg ác. oleanólico/g p.s., presentando diferencias significativas ($p < 0.05$) únicamente con el día 1, tiempo en el cual se registró la mayor concentración de los compuestos (65.54 ± 6.4 μg ác. oleanólico/g p.s.). En las plantas inoculadas el comportamiento de la concentración total de terpenoides fue similar, alcanzando 68.78 ± 7.1 μg ác. oleanólico/g p.s. en el día 1 y un valor de 60.2 ± 3.7 μg ác. oleanólico/g p.s. en el día cero, mostrando diferencias significativas las plantas del día 1 con respecto a las plantas de los días 0, 3 y 5 ($p < 0.05$). Un estudio similar reportó concentraciones de 2.7 mg/g p.s. en tallos de una variedad de algodón resistente tres días después de ser inoculada con *Fusarium oxysporum*, mientras que en la variedad susceptible que analizaron, la concentración fue de 0.9 mg/g p.s. (Hall *et al.*, 2011). Esto es similar a nuestros resultados, por lo menos en el día 1 después de la inoculación.

Este incremento en el día 1 en ambos tratamientos se debe a la respuesta hipersensible que ocurre en las primeras etapas de la infección y que forma parte del mecanismo de defensa natural de la planta. Una respuesta similar fue reportada por Araujo *et al.* (2016) quienes observaron un incremento en la concentración de metabolitos secundarios en tallos de mango inoculados con *Ceratocystis fimbriata* en los primeros estados de la infección. En otros estudios que coinciden con nuestros resultados, se detectaron altas concentraciones de metabolitos secundarios en tejidos de plantas de vid, algodón, cocoa y mango en los primeros estados de infecciones causadas por *X. fastidiosa*, *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *M. pernicioso* y *C. fimbriata* respectivamente (Scarpari *et al.*, 2005; Hall *et al.*, 2011; Wallis y Chen, 2012; Araujo *et al.*, 2016).

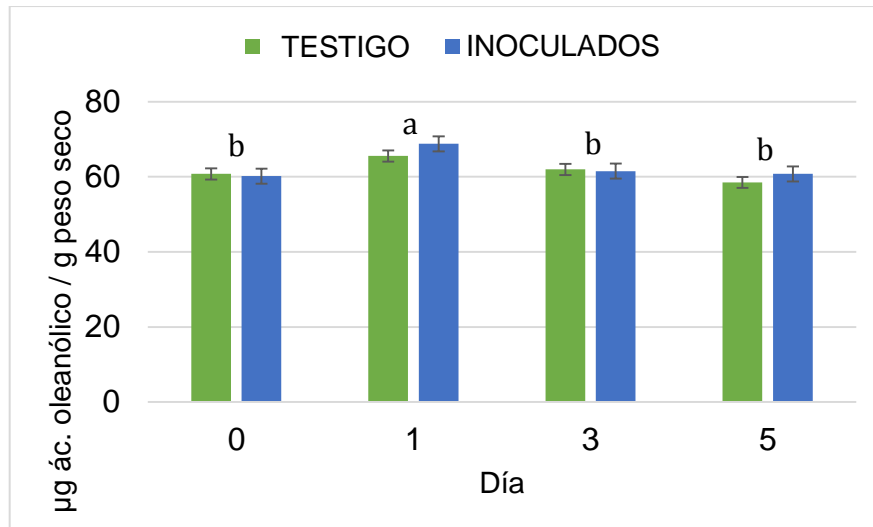


Figura 7. Contenido de terpenoides totales por día de muestreo en plantas testigo e inoculadas con *V. dahliae*. Diferentes literales indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Al analizar el contenido de terpenoides totales por secciones (Figura 8) no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, pero sí entre las secciones, siendo significativamente mayor ($p < 0.05$) el contenido total de terpenoides en la sección de 3 cm cercana al punto de inoculación, que en las secciones de 6, 9 y 12 cm. Hall *et al.* (2011) reportaron resultados similares, al observar un incremento significativo de monoterpenos en el área cercana al punto de infección de plantas de algodón inoculadas con *Fusarium oxysporum*.

En la Figura 9 se muestran los resultados de la concentración total de terpenoides en tallo de olivo testigo e inoculado en cada una de las secciones analizadas con respecto al tiempo posterior a la inoculación.

La concentración total de terpenoides en las muestras testigo se mantuvo en un rango de 58-72 µg de ácido oleanólico/g de p.s. mientras que en las plantas inoculadas fue de 58-79 µg/g de p.s., observándose en ambos tratamientos la concentración más alta de los terpenoides en los 3 cm cercanos al punto de inoculación en el día cero. Es importante destacar que se observó una mayor concentración de terpenoides únicamente en la sección de los primeros 3 cm de

las plantas inoculadas con respecto a las plantas testigo en el día 1 y 5, siendo mayor la concentración de terpenoides en la sección de las plantas inoculadas con 78.84 (día 1) y 65.65 $\mu\text{g/g}$ de p.s. (día 5), sin embargo, no hubo diferencias significativas ($p>0.05$). Cabe mencionar que no se encontraron estudios similares en la literatura que reporten en olivo el contenido de terpenoides totales por espectrofotometría, por lo que no fue posible comparar los resultados obtenidos (Figura 7).

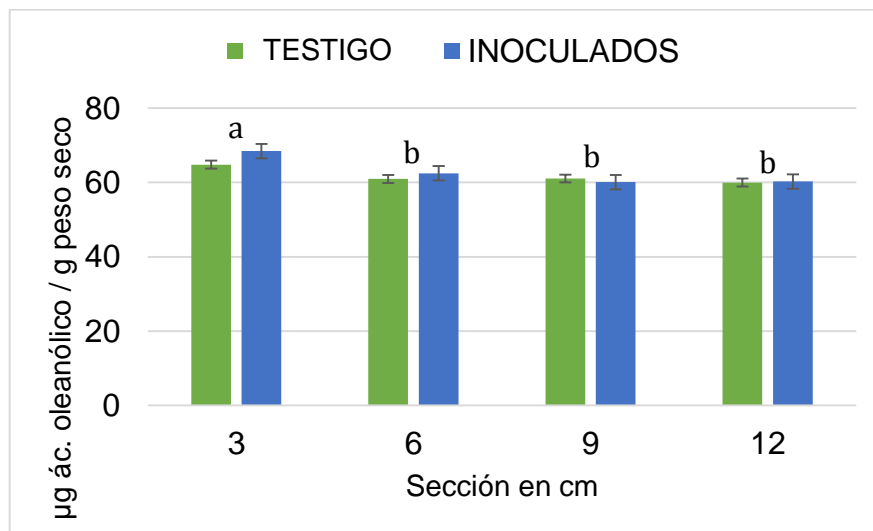


Figura 8. Contenido de terpenoides totales por sección analizada en plantas testigo e inoculadas con *V. dahliae*. Diferentes literales indican diferencias significativas ($p<0.05$).

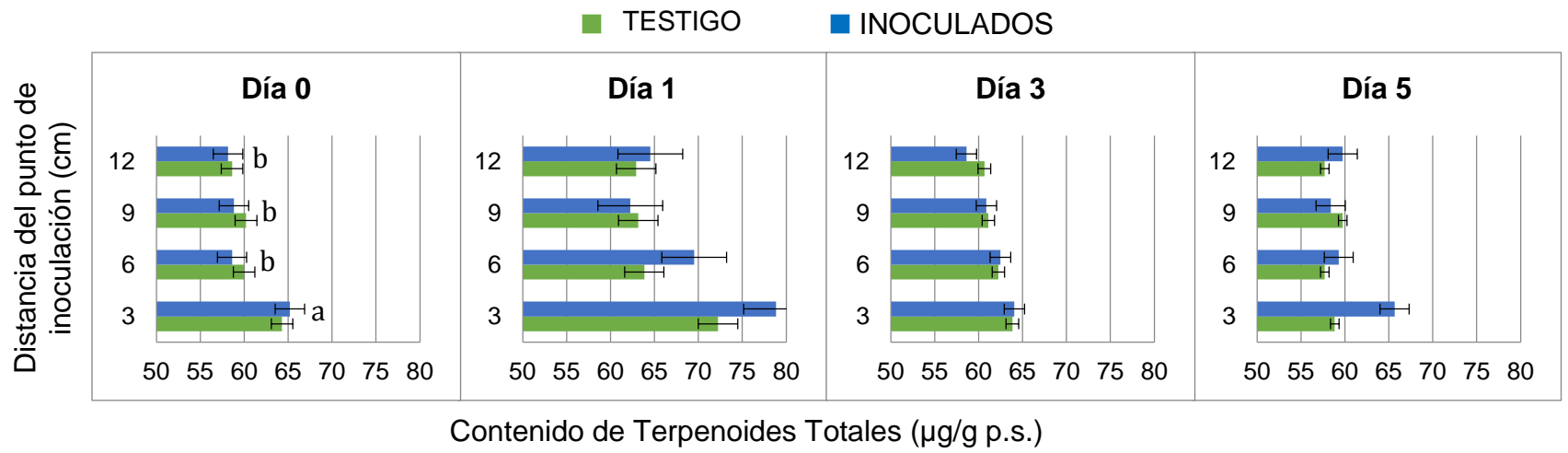


Figura 9. Contenido de terpenoides totales en las diferentes secciones de plantas testigo e inoculadas con *V. dahliae*. Diferentes literales indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

6.4 Perfil de Terpenos Pentacíclicos en Tallos de Olivo Sano

En la Figura 10 se presenta un cromatograma representativo a los estándares comerciales de terpenoides utilizados en el presente trabajo. Las condiciones cromatográficas utilizadas permitieron una apropiada separación de los estándares, particularmente de los ácidos maslínico (1), betulínico (2), oleanólico (3) y ursólico (4); mientras que los terpenoides eritrodíol (5) y uvaol (6) coeluyeron al tiempo de retención de 13 minutos. Esto puede ser debido a la alta similitud entre las estructuras químicas de ambos compuestos, a su polaridad y a la fase móvil utilizada, sin embargo, no se detectaron en las muestras sanas ni en las muestras testigo. Cabe mencionar que por lo general en las pruebas de control de calidad del aceite de olivo estos compuestos se analizan en conjunto debido a la dificultad que conlleva su separación. En la Figura 11 se puede apreciar la semejanza entre las estructuras del eritrodíol y uvaol.

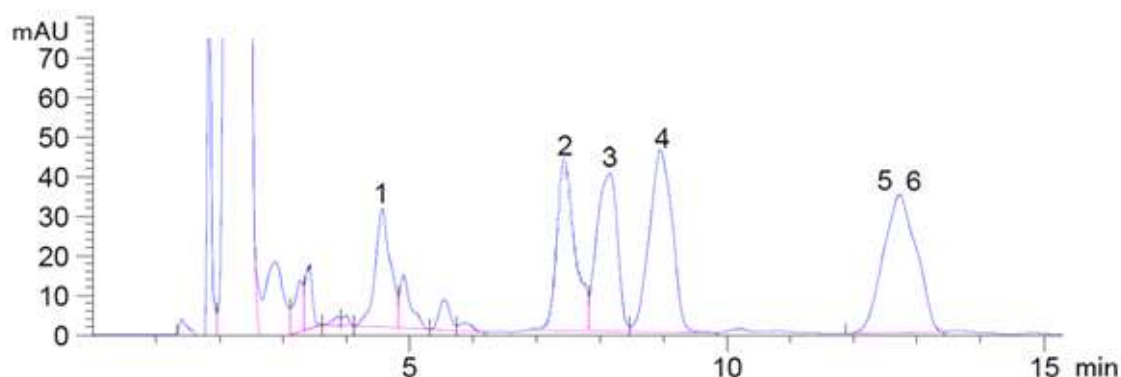


Figura 10. Cromatograma representativo de los estándares comerciales de terpenoides analizados por HPLC. Los números corresponden a los siguientes estándares: (1) Ácido Maslínico, (2) Ácido Betulínico, (3) Ácido Oleanólico, (4) Ácido Ursólico, (5) Eritrodíol, (6) Uvaol.

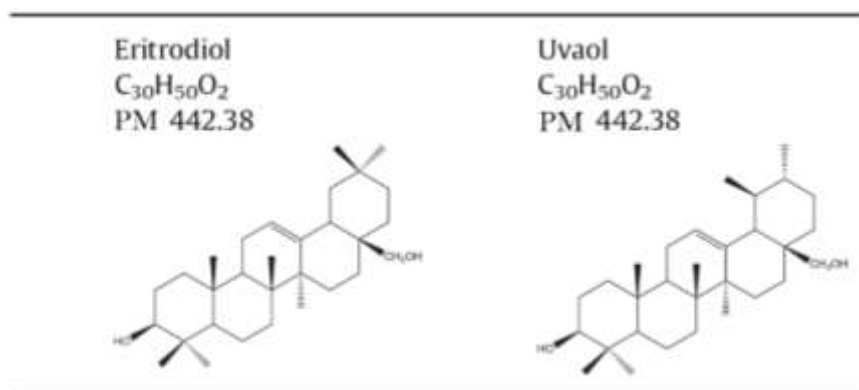


Figura 11. Fórmula, peso y estructura molecular de los alcoholes triterpénicos Eritrodiol y Uvaol.

El orden de elución de los terpenos (Cuadro 5) coincide con el obtenido por Peragón (2013), Guinda *et al.* (2015) y Olmo-García *et al.* (2016) quienes analizaron el contenido de triterpenos pentacíclicos en hojas de olivo de diferentes variedades. Los tiempos de retención obtenidos en el presente estudio fueron diferentes a los obtenidos por los autores ya mencionados debido a la columna utilizada, la temperatura de la misma, el eluyente empleado (fase móvil) y su gradiente de elución, así como a la velocidad de flujo del mismo.

Cuadro 5. Terpenoides identificados en olivo sano y sus tiempos de retención.

Terpenoides	Presente estudio	Peragón (2013)	Guinda <i>et al.</i> , (2015)	Olmo-García <i>et al.</i> , (2016)
Tiempos de retención (min)				
1- Ác. Maslínico	4.57	8.06	9.12	1.53
2- Ác. Betulínico	7.64	8.49	11.59	2.41
3- Ác. Oleanólico	8.16	11.72	14.28	2.81
4- Ác. Ursólico	8.95	12.19	16.33	3.15
5- Eritrodiol	12.72	13.51	17.66	4.89
6- Uvaol	12.72	14.13	18.15	5.17

Los análisis cromatográficos realizados en tallo de olivo sin tratamiento (testigo) revelaron la presencia de varios picos bien definidos a distintos tiempos de retención. Los principales compuestos triterpénicos pentacíclicos identificados con base en sus tiempos de retención fueron los ácidos: oleanólico, betulínico, maslínico y ursólico. En la Cuadro 6 se muestran los terpenoides identificados, así como sus concentraciones. El compuesto triterpénico identificado en mayor concentración fue el ácido oleanólico con 13.6 $\mu\text{g/g}$ de peso seco; mientras que los otros compuestos presentaron una concentración menor. El ácido maslínico presentó una concentración de 7.8 $\mu\text{g/g}$ p.s., el ácido betulínico 0.8 $\mu\text{g/g}$ p.s. y en menor concentración el ácido ursólico con 1.2 $\mu\text{g/g}$ p.s.; mientras que los triterpenos uvaol y eritrodiol no fueron detectados. Resultados similares en cuanto a proporción fueron reportados por Peragón (2013) en hojas de olivo de la variedad Picual y Cornezuelo. El autor reportó una mayor concentración de ácido oleanólico en un rango de 10.94 a 18.83 mg/g de peso seco, seguido del ácido maslínico con un rango de 2.58 a 6.30 mg/g p.s. y, en menor concentración los triterpenos uvaol (0.46-1.24 mg/g p.s.), eritrodiol (0.54-1.78 mg/g p.s.) y ácido ursólico (1.94-4.25 mg/g p.s.).

Cuadro 6. Concentración de triterpenos pentacíclicos en tallos de olivo sano.

Tejido/Variiedad	Maslínico	Betulínico	Oleanólico	Ursólico	Eritrodiol	Uvaol
	Concentración ($\mu\text{g/g}$ de peso seco)					
Tallo/Manzanillo (Presente estudio/Sano)	7.28	0.8	13.6	1.2	0.0	0.0
Tallo/Manzanillo (Presente estudio/Testigo)	12.78	22.72	7.74	9.52	0.0	0.0
Hoja/Arbequina (Guinda y col., 2010)	4.8 [*]	0.0	29.2 [*]	2.0 [*]	1.5 [*]	1.5 [*]
Hoja/Cornezuelo (Peragón, 2013)	2.58	0.0	10.94	1.94	0.54	0.46
Hoja/Picual (Guinda y col., 2015)	1.07 [*]	0.0	3.1 [*]	0.41 [*]	0.08 [*]	0.07 [*]

* Por ciento de peso seco

Estos resultados también coinciden con lo observado por Guinda *et al.* (2015), quienes reportaron una mayor concentración de ácido oleanólico (3.10% p.s.), seguido del ácido maslínico (1.07% p.s.), ácido ursólico (0.41% p.s.), eritrodíol (0.08% p.s.), y uvaol (0.07% p.s.) en hojas de olivo de la variedad Picual.

Otro estudio que coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio, es el de Guinda *et al.* (2010), quienes observaron que las concentraciones de triterpenos varían durante el proceso de ontogenia de las hojas de olivo de la variedad Arbequina. En dicho estudio detectaron que el eritrodíol y uvaol, no están presentes en las primeras etapas de desarrollo de la hoja (estadios 1 y 2), pero en estadios más tardíos alcanzan concentraciones de 1.5 y 2 mg/g de peso seco respectivamente. Por otra parte, señalan que el ácido oleanólico está presente en todos los estadios de la hoja y que su concentración aumenta con la ontogenia de 13.1 a 32.75 mg/g. Además, observaron que el ácido ursólico también está presente en todos los estados de desarrollo de la hoja, pero su contenido se mantiene durante las distintas etapas fenológicas. También observaron que las concentraciones de ácido maslínico (5 mg/g) son mayores en las primeras y últimas etapas de la hoja, pero que su contenido disminuye en etapas intermedias.

Las concentraciones de los triterpenos pentacíclicos identificados fueron menores a las reportadas por otros autores, esto se debe a la variedad, edad de la planta, al tejido analizado y a la interacción genotipo-ambiente; sin embargo, las proporciones fueron similares en cuanto al volumen de cada uno de ellos, siendo mayor el contenido de ácido oleanólico, seguido del ácido maslínico y ursólico.

6.5 Cambios en el Perfil de Terpenoides en Tallos de Olivo Inoculados con *Verticillium dahliae*

En la Figura 12 se muestra el perfil de los triterpenos pentacíclicos detectados por HPLC en tallo de olivo un día después de la inoculación. En las muestras testigo se detectaron los compuestos maslínico, betulínico, oleanólico, y ursólico; mientras que los compuestos eritrodiol y uvaol no fueron detectados, probablemente debido a que llevan a cabo otras funciones y no como parte de la defensa. Es claro observar que el ácido triterpénico betulínico se detectó en mayor concentración (22.72 $\mu\text{g/g}$ p.s. en promedio), en comparación con los otros compuestos detectados; mientras que eritrodiol y uvaol registraron las concentraciones más bajas. Al analizar el comportamiento de los triterpenos en los tallos testigo en relación a la distancia, se puede observar una mayor concentración de los compuestos a los 12 cm de distancia del punto de inoculación. Además, la proporción de los triterpenos fue diferente en cada una de las secciones del tallo analizadas.

El perfil de los triterpenos pentacíclicos en los tallos de olivo inoculados con el hongo *Verticillium dahliae*, es diferente con respecto al registrado en el testigo. En los tallos inoculados se detectaron los compuestos maslínico, betulínico, oleanólico, ursólico, eritrodiol y uvaol, aunque éstos dos últimos en pequeñas cantidades. En general, el contenido de los triterpenos en tallo inoculado fue mayor con respecto al testigo, observándose una mayor concentración del ácido triterpénico maslínico, particularmente en las distancias de 3 y 6 cm del punto de inoculación, lo que podría implicar que está más relacionado con la defensa de la planta que el resto de los terpenoides identificados.

Las concentraciones de ácido maslínico y ácido ursólico en la sección del tallo que se encuentra a los 3 cm del área de inoculación en las plantas inoculadas, fueron de 44 y 17.58 $\mu\text{g/g}$ p.s. respectivamente, mientras que en la misma sección correspondiente a las plantas testigo fue menor con 11.93 y 10.30 $\mu\text{g/g}$ p.s., respectivamente. En cuanto a la sección de los 6 cm, el contenido de

ambos terpenos también fue significativamente mayor en las plantas inoculadas, con 35.62 $\mu\text{g/g}$ p.s. de ácido maslínico y 14.39 $\mu\text{g/g}$ p.s. de ácido ursólico, y 13.98 y 8.65 $\mu\text{g/g}$ p.s. en las plantas testigo respectivamente. Por otra parte, se observó una mayor concentración de ácido betulínico en las cuatro secciones (3, 6, 9 y 12 cm) en las plantas testigo con un promedio de 22.72 $\mu\text{g/g}$ p.s., con respecto a las plantas inoculadas (14.94 $\mu\text{g/g}$ p.s.).

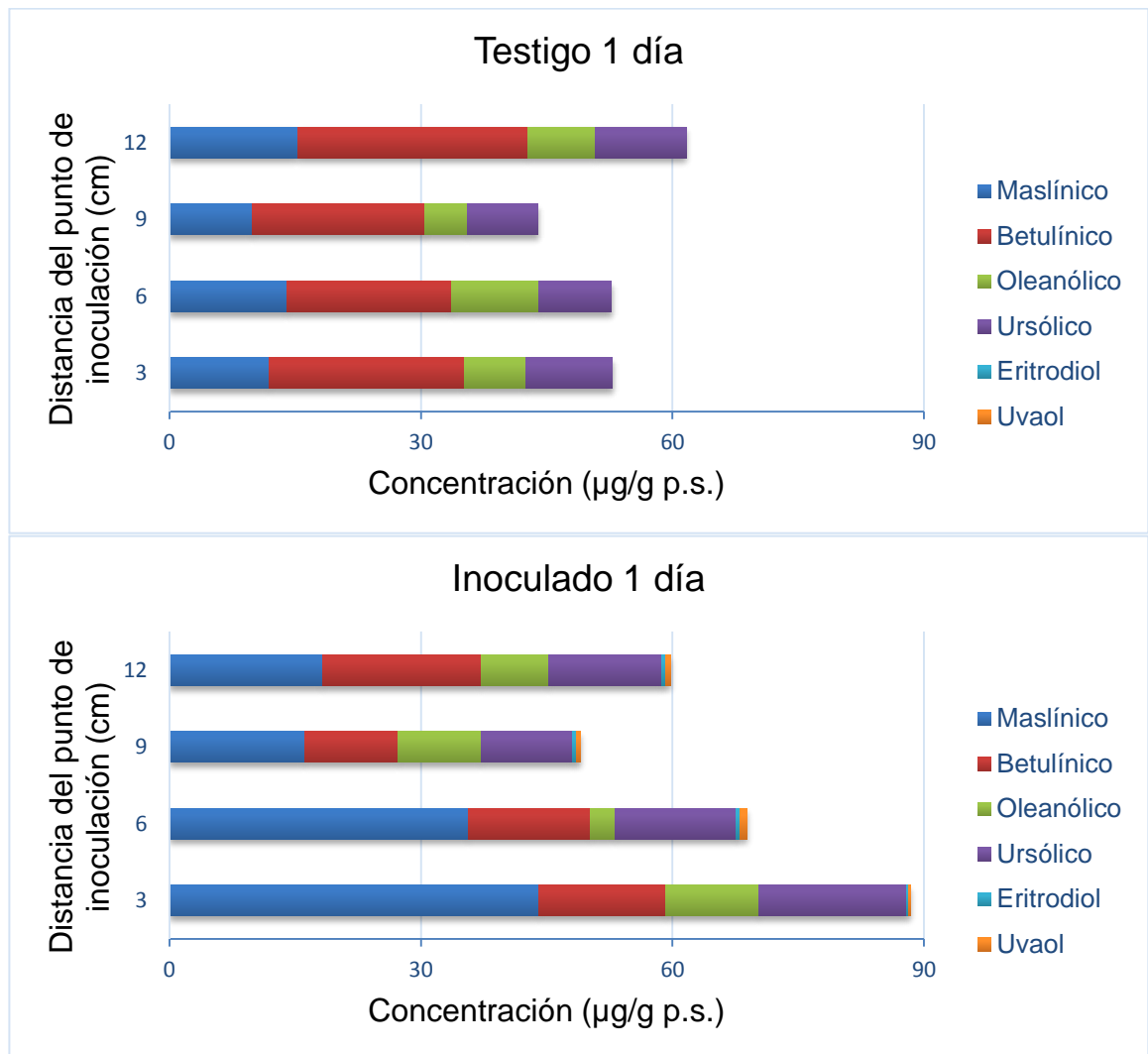


Figura 12. Perfil de triterpenos pentacíclicos en plantas de olivo de 1 año y tres meses de edad, testigo e inoculadas con *Verticillium dahliae*, un día después de la inoculación.

En el Cuadro 7 se muestran las concentraciones en $\mu\text{g/g}$ de peso seco de cada uno de los triterpenos presentes en las diferentes secciones de tallo analizadas tanto de las plantas testigo como de las inoculadas. Se puede observar que el contenido de ácido maslínico incrementó considerablemente en las cuatro secciones de las plantas inoculadas con respecto al testigo, alcanzando su mayor concentración en la sección que se encuentra a 3 cm del lugar de la inoculación con $44 \mu\text{g/g}$ de p.s., mientras que en la misma sección de las plantas testigo la concentración fue de $11.92 \mu\text{g/g}$ de p.s. En la sección de 6 cm también hubo una marcada diferencia con $35.6 \mu\text{g/g}$ de p.s. en las plantas inoculadas y $14 \mu\text{g/g}$ de p.s. en las plantas testigo.

El incremento de este terpeno en específico puede deberse a que es el único que contiene dos grupos hidroxilo en su estructura, los cuales según Rao *et al.* (2010) son críticos para la toxicidad de estos compuestos. Además, se sabe que las diferencias estructurales entre los terpenoides pueden influir en su actividad antifúngica al diferir en su permeabilidad en la membrana (Haque *et al.*, 2016). En cuanto a la concentración de ácido betulínico, se puede observar una ligera disminución en las plantas inoculadas, posiblemente debido al incremento de la concentración del ácido maslínico. Esto puede ser explicado debido a que ambos tienen como precursor al catión lupenil, por lo que la planta sintetiza uno u otro, dependiendo del tipo de estrés al que está sometida.

Cuadro 7. Concentración de triterpenos pentacíclicos ($\mu\text{g/g}$ de p.s.) en distintas secciones de tallos de olivo testigo e inoculados con *V. dahliae* un día post-inoculación.

Triterpeno	Testigo				Inoculado			
	Sección en cm							
	3	6	9	12	3	6	9	12
Ác. maslínico	11.92	14	9.92	15.28	44	35.6	16.16	18.24
Ác. betulínico	23.28	19.6	20.56	27.44	15.2	14.64	11.04	18.96
Ác. oleanólico	7.28	10.4	5.12	8.16	11.2	2.96	10	8.08
Ác. ursólico	10.32	8.64	8.32	10.8	17.6	14.4	10.8	13.44
Eritrodiol	0	0	0	0	0.24	0.56	0.48	0.48
Uvaol	0	0	0	0	0.24	0.8	0.56	0.56

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, es claro que la inoculación con el fitopatógeno provocó una respuesta de defensa con un aumento en el contenido de los triterpenos pentacíclicos en tallo de olivo, lo cual coincide con los estudios reportados por otros autores. Xu *et al.* (2004) reportaron en hojas de arroz una acumulación de terpenoides en respuesta a la inoculación con el hongo *Magnaporthe grisea*, o irradiación ultravioleta mostrando propiedades antimicrobianas.

En un estudio realizado por Hall *et al.* (2011), obtuvieron resultados similares al evaluar el contenido de monoterpenos simples en una variedad de algodón resistente y una susceptible, inoculadas con *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*. Los autores reportaron mayor concentración de terpenoides en las células cercanas al punto de inoculación de la variedad resistente con 2.7 mg/g de peso fresco, a diferencia de la variedad susceptible que presentó una concentración de 0.9 mg/g de peso fresco.

En el caso particular del olivo, no existen estudios publicados en la literatura que reporten la acumulación de terpenoides en respuesta a la infección por algún fitopatógeno, por lo que no es posible comparar nuestros resultados.

6.6 Síntomas de la Verticilosis en Plantas de Olivo

Una característica del daño provocado por el fitopatógeno es la coloración del tronco, ramas, hojas y raíces. En la Figura 13 se pueden observar los síntomas característicos de la marchitez en hojas del olivo, las cuales presentan en su zona apical una coloración marrón indicativa de necrosis. Además, en las plantas inoculadas se observó defoliación y hojas más pequeñas con respecto al testigo. Estos síntomas coinciden con los reportados por López-Escudero y Blanco-López (2001), quienes evaluaron durante dos años consecutivos, el efecto de la solarización para el control de la verticilosis en plantaciones de

olivo ya establecidas, observando los primeros síntomas de la enfermedad días después de la inoculación. Esto último coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio, en el cual los síntomas de la verticilosis se observaron desde los 3 días posteriores a la inoculación, lo cual indica la agresividad del fitopatógeno.



Figura 13. Hojas de plantas de olivo testigo (A) e inoculadas (B) con *Verticillium dahliae* al tercer día de inoculación.

6.7 Observación Microscópica de las Alteraciones Producidas por *V. dahliae* en Tallo de Olivo

En la Figura 14 se pueden observar cortes transversales de tallo de olivo sano observados en un microscopio de fluorescencia motorizado marca Carl Zeiss modelo "Axio Imager Z1" con cámara "AxioCam 105 color" y lámpara de halógeno. Se pueden distinguir los vasos del xilema secundario (a) con un diámetro de 25 μm y la médula del tallo (b); el colorante utilizado fue azul de toluidina y las técnicas de contraste fueron campo claro (izquierda) y fluorescencia (derecha).

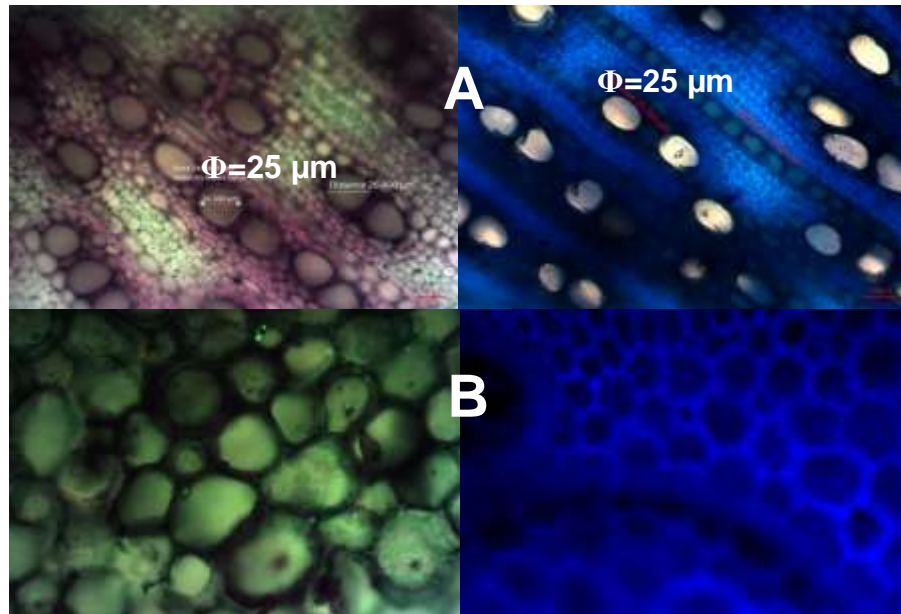


Figura 14. Observación radial de tallo de olivo en microscopio de fluorescencia. A) Elementos de vasos del xilema secundario de 25 μm de diámetro. B) Médula de tallo de olivo. (Izquierda: campo claro; derecha: fluorescencia). Teñidos con azul de toluidina (20X).

En la Figura 15 se muestra la micrografía de un corte histológico del tallo de olivo inoculado con *V. dahliae*, en la zona cercana al punto de inoculación (3 cm). Al observar los elementos del vaso del xilema se notó la formación de tilosas, las cuales son parte del mecanismo de defensa de la planta para ayudar a bloquear el paso de patógenos vasculares como *Verticillium dahliae*. Estas estructuras son protuberancias que se forman a partir de las células parenquimáticas adyacentes a los vasos del xilema, como se puede observar en la Figura 15, coincidiendo con lo observado por diversos autores en cultivos como *Quercus* (Beckman y Talboys, 1981), *Robinia pseudoacacia* (Saitoh *et al.*, 1993) y *Vitis vinífera* (Sun *et al.*, 2006) afectados por este tipo de patógenos.

Este proceso de formación de tilosas es provocado por la invasión de hongos en el xilema. Del Rio *et al.* (2002) analizaron el mecanismo de defensa en plantas de uva frente al patógeno *Phaeomonilla chlamydospora* causante de la enfermedad de Petri. Los autores observaron la formación de tilosas en los vasos xilemáticos del tallo de uva en respuesta a la infección provocada por el patógeno *P. chlamydospora*, lo cual coincide con lo observado en el presente estudio.

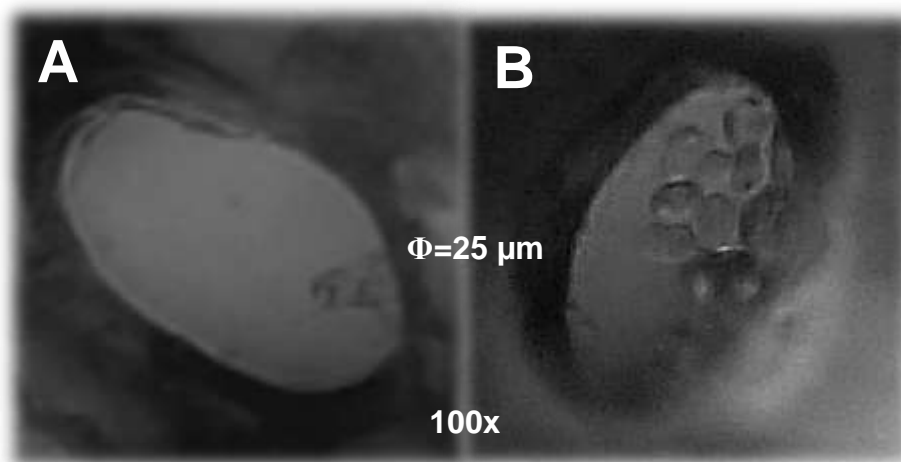


Figura 15. Corte histológico del tallo de olivo inoculado con *V. dahliae*. A) formación de tilosas, B) Presencia de conidias en el xilema. Objetivo 100x.

También se observó la presencia de conidias en algunos de los elementos de los vasos del xilema al tercer día de la inoculación en los 3 cm cercanos al área de inoculación, lo cual puede limitar el flujo de agua y nutrientes a las partes superiores de la planta ocasionando marchitez en las hojas.

En los cortes realizados en las secciones de 6, 9 y 12 cm a partir del punto de inoculación, no fue posible observar la presencia de conidias de *V. dahliae* en los vasos xilemáticos mediante la técnica de microscopía de fluorescencia. Es posible que las conidias ascendieran rápidamente a través de los haces

vasculares, debido a que las plantas de olivo se mantuvieron bajo estrés hídrico previo a la inoculación, motivo por el cual no fue posible su observación en esas secciones analizadas. Sin embargo, las hojas jóvenes presentaron marchitamiento al tercer día de la inoculación a diferencia de las hojas de las plantas testigo, lo cual indica el desarrollo de la enfermedad causada por *V. dahliae*.

VII. CONCLUSION

La inoculación de plantas de olivo jóvenes variedad 'Manzanillo' con cepas de *Verticillium dahliae*, incrementa la concentración de triterpenos pentacíclicos, particularmente del ácido maslínico en respuesta a la infección, lo que implica su función en relación a la defensa contra la verticilosis.

VIII. REFERENCIAS

- Agrios, G. N. 2005. Fitopatología. Elsevier. Missouri. 583-595.
- Allouche, Y., Jiménez, A., Uceda, M., Aguilera, M. P., Gaforio, J. J. and Beltrán, G. 2009. Triterpenic content and chemometric analysis of virgin olive oils from forty olive cultivars. *Journal of agricultural and food chemistry*. 57(9): 3604-3610.
- Araujo, L., Bispo, W. M. S., Rios, J. A., Fernandes, S. A. and Rodrigues, F. d. Á. 2016. Alkaloids and phenolics biosynthesis increases mango resistance to infection by *Ceratocystis fimbriata*. *Bragantia*. 75(2): 199-211.
- Barranco, D., Fernández, R. and Rallo, L. 2008. El cultivo del olivo. Mundi-Prensa Libros. Primer edición. Unión Europea. 124-127.
- Barroso-Albarracín, J. B., Carreras Egaña, A., Valderrama Rodríguez, R., Chaki, M., Begara Morales, J. C., Mercado Blanco, J., Pérez Artés, E., Rincón Romero, A. M., Carballo Codón, A., Benítez Fernández, T., Valverde Corredor, A., Guevara Pezoa, F., *et al.* 2012. Cepa de *Trichoderma* útil para el tratamiento y/o prevención de infecciones provocadas por hongos pertenecientes al género *verticillium*. Patente: 2 393 728.
- Beauchamp, G. K., Keast, R. S., Morel, D., Lin, J., Pika, J., Han, Q., Lee, C.-H., Smith, A. B. and Breslin, P. A. 2005. Phytochemistry: ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature*. 437(7055): 45-46.
- Beckman, C. and Talboys, P. 1981. Anatomy of resistance. Fungal wilt diseases of plants: 487-521.
- Bejarano-Alcázar, J. 2004. Eficacia de la solarización para la erradicación de *Verticillium dahliae* en viveros de olivo. XII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología: 284.
- Belaj, A., Muñoz-Diez, C., Baldoni, L., Satovic, Z. and Barranco, D. 2010. Genetic diversity and relationships of wild and cultivated olives at regional level in Spain. *Scientia Horticulturae*. 124(3): 323-330.

- Berg, G., Zachow, C., Lottmann, J., Götz, M., Costa, R. and Smalla, K. 2005. Impact of plant species and site on rhizosphere-associated fungi antagonistic to *Verticillium dahliae* kleb. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(8): 4203-4213.
- Bracci, T., Busconi, M., Fogher, C. and Sebastiani, L. 2011. Molecular studies in olive (*Olea europaea* L.): overview on DNA markers applications and recent advances in genome analysis. *Plant cell*. 30(4): 449-462.
- Brundrett, M. C., Enstone, D. E. and Peterson, C. A. 1988. A berberine-aniline blue fluorescent staining procedure for suberin, lignin, and callose in plant tissue. *Protoplasma*. 146(3): 133-142.
- Closa, M., Vranová, E., Bortolotti, C., Bigler, L., Arró, M., Ferrer, A. and Gruissem, W. 2010. The *Arabidopsis thaliana* FPP synthase isozyms have overlapping and specific functions in isoprenoid biosynthesis, and complete loss of FPP synthase activity causes early developmental arrest. *The Plant Journal*. 63(3): 512-525.
- Consejo Oleícola, I. 2013. Mercado mundial de aceituna de mesa y aceite de oliva. *Mercado Oleícola*. 92(1): 1-6.
- Davis, R., Colyer, P., Rothrock, C. and Kochman, J. 2006. *Fusarium* wilt of cotton: population diversity and implications for management. *Plant disease*. 90(6): 692-703.
- De la Fuente, P., Chamorro, P., Moreno, M. and Poza, M. A. 2004. Propiedades antioxidantes del hidroxitirosol procedente de la hoja de olivo (*Olea europaea* L.). *Fitoterapia*. 4(2): 139-147.
- De Victoria, E. M. n. and Mañas, M. 2001. El aceite de oliva en la dieta y la salud humana. *El cultivo del olivo*, MundiPrensa, Madrid: 663-684.
- Del Rio, J. A., GONZALEZ, A., FUSTER, M. D., BOTIA, J. M., GOMEZ, P., FRIAS, V. and ORTUÑO, A. 2002. Formación de tilosas y cambios en los compuestos fenólicos de raíces de viña infectadas con *Phaeoconiella chlamydospora* y *Phaeoacremonium* sp.
- Dervis, S., Mercado-Blanco, J., Erten, L., Valverde-Corredor, A. and Pérez-Artés, E. 2010. *Verticillium* wilt of olive in Turkey: a survey on disease importance, pathogen diversity and susceptibility of relevant olive cultivars. *European journal of plant pathology*. 127(2): 287-301.

- Domínguez-García, M. C., Belaj, A., De la Rosa, R., Satovic, Z., Heller-Uszynska, K., Kilian, A., Martín, A. and Atienza, S. G. 2012. Development of DArT markers in olive (*Olea europaea* L.) and usefulness in variability studies and genome mapping. *Scientia Horticulturae*. 136(2): 50-60.
- Enfissi, E., Fraser, P. D., Lois, L. M., Boronat, A., Schuch, W. and Bramley, P. M. 2005. Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. *Plant Biotechnology*. 3(1): 17-27.
- Fiad, S. and El-Hamidi, M. 2015. Six Pentacyclic Triterpenes in Mature Olive Fruits "Picual". *American Journal of Food Technology*. 10(1): 1-13.
- Finatti, D. and Aparecido, C. C. 2009. Caracterizacáo fisiológica e comparacáo de diferentes métodos na preservacáo em laboratorio de isolados do género *Verticillium*. *Sanidade Vegetal*. 76(4): 715-720.
- Flamini, E. 2005. Biocontrol of *Verticillium dahliae* isolated from olive trees by *Trichoderma* spp. *Plant Pathology*. 87(4): 267-309.
- García-Consuegra, A. 2014. Análisis transcriptómico mediante RNAseq en el olivo, Universidad de Jaén.
- Grijalva-Contreras, R. L., López Carbajal, A., Navarro Ainza, J. A. C. and Fimbres Fontes, A. 2010. El cultivo del olivo bajo condiciones desérticas del norte de Sonora. *INIFAP*: 65-68.
- Guinda, Á., Castellano, J. M., Santos-Lozano, J. M., Delgado-Hervás, T., Gutiérrez-Adánez, P. and Rada, M. 2015. Determination of major bioactive compounds from olive leaf. *LWT-Food Science and Technology*. 64(1): 431-438.
- Guinda, A. n., Rada, M., Delgado, T., Gutiérrez-Adánez, P. and Castellano, J. M. 2010. Pentacyclic triterpenoids from olive fruit and leaf. *Journal of agricultural and food chemistry*. 58(17): 9685-9691.
- Gutiérrez, P. F. and Fernández, H. A. 2009. Control de plagas y enfermedades del olivo. *Sanidad Vegetal*: 362-366.
- Hall, C., Heath, R. and Guest, D. I. 2011. Rapid and intense accumulation of terpenoid phytoalexins in infected xylem tissues of cotton (*Gossypium hirsutum*) resistant to *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 76(3-4): 182-188.

- Haque, M. A., Nagaoka, M., Hexig, B. and Akaike, T. 2016. Artificial extracellular matrix for embryonic stem cell cultures: a new frontier of nanobiomaterials. *Science and Technology of Advanced Materials*.
- Huffaker, A., Kaplan, F., Vaughan, M. M., Dafoe, N. J., Ni, X., Rocca, J. R., Alborn, H. T., Teal, P. E. and Schmelz, E. A. 2011. Novel acidic sesquiterpenoids constitute a dominant class of pathogen-induced phytoalexins in maize. *Plant physiology*. 156(4): 2082-2097.
- Husen, A. and Pal, M. 2006. Variation in shoot anatomy and rooting behaviour of stem cuttings in relation to age of donor plants in teak (*Tectona grandis* Linn. f.). *New Forests*. 31(1): 57-73.
- Hutchinson, C. M., McGiffen, M. E., Ohr, H. D., Sims, J. J. and Becker, J. O. 2000. Efficacy of methyl iodide and synergy with chloropicrin for control of fungi. *Pest management science*. 56(5): 413-418.
- Inderbitzin, P. and Subbarao, K. V. 2014. *Verticillium* systematics and evolution: how confusion impedes *Verticillium* wilt management and how to resolve it. *Phytopathology*. 104(6): 564-574.
- Jiménez-Díaz, R. M., Cirulli, M., Bubici, G., del Mar Jiménez-Gasco, M., Antoniou, P. P. and Tjamos, E. C. 2012. *Verticillium* wilt, a major threat to olive production: Current status and future prospects for its management. *Plant disease*. 96(3): 304-329.
- Jiménez-Díaz, R. M., Rodríguez-Jurado, D., Landa-del Castillo, B. B., Trapero-Casas, J. L. and Navas-Cortés, J. A. 2008. Dispersión de la verticilosis a través de las hojas de olivos infectados por el patotipo defoliante. *Vida Rural*: 40-44.
- Jiménez-Díaz, R. M., Rodríguez-Jurado, D., Navas-Cortés, J. A., Mercado-Blanco, J. and Trapero-Casas, J. L. 2003. Estrategias de control de la verticilosis del olivo. *Vida Rural*: 36-40.
- Jiménez Díaz, R., Trapero Casas, J., Boned, J., Landa, B. and Navas Cortés, J. 2009. Use of Bioten® for biological protection of olive planting stocks from *Verticillium* wilt caused by defoliating *Verticillium dahliae*. *Sanidad Vegetal*. 35(4): 595-615.
- Karagiannidis, N., Bletsos, F. and 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(1): 145-156.

- Koike, S. 2008. Marchitez por *Verticillium* *Verticillium dahliae* Klebahn. *Sanidad Vegetal*: 1-16.
- Koike, S. T. and Subbarao, K. V. 2000. Broccoli residues can control *Verticillium* wilt of cauliflower. *California Agriculture*. 54(3): 30-33.
- Kontogianni, V. G., Exarchou, V., Troganis, A. and Gerothanassis, I. P. 2009. Rapid and novel discrimination and quantification of oleanolic and ursolic acids in complex plant extracts using two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy—Comparison with HPLC methods. *Analytica chimica acta*. 635(2): 188-195.
- Lazarovits, G. 2001. Management of soil-borne plant pathogens with organic soil amendments: a disease control strategy salvaged from the past. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 23(1): 1-7.
- León, P. and Guevara-García, A. 2007. La síntesis de isoprenoides a través de la vía MEP; un nuevo blanco de manipulación para la salud y el beneficio humano. *Mensaje Bioquímico*. 331(2): 77-91.
- Liang, P. H., Ko, T. P. and Wang, A. H. J. 2002. Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *European Journal of Biochemistry*. 269(14): 3339-3354.
- López-Carreras, N., Miguel, M. and Aleixandre, A. 2012. Beneficial health properties of iridoids terpenes. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*. 33(3): 81-91.
- López-Escudero, F. and Blanco-López, M. 2001. Effect of a single or double soil solarization to control *Verticillium* wilt in established olive orchards in Spain. *Plant disease*. 85(5): 489-496.
- López-Escudero, F., Mercado-Blanco, J., Roca, J., Valverde-Corredor, A. and Blanco-López, M. 2010. *Verticillium* wilt of olive in the Guadalquivir Valley (southern Spain): relations with some agronomical factors and spread of *Verticillium dahliae*. *Fitopatología Mediterránea*. 49(3): 370-380.
- López-Escudero, F. J., Blanco-López, M. Á., Rincón, C. D. R. and Reig, J. M. C. 2007. Response of olive cultivars to stem puncture inoculation with a defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*. *Hort Science*. 42(2): 294-298.
- López-Escudero, F. J. and 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(1-2): 1-50.

- Maguna, F. P., Romero, A. M., Garro, O. A. and Okulik, N. B. 2006. Actividad Antimicrobiana de un grupo de Terpenoides. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas en Internet. Argentina: Facultad de Agroindustrias.
- Mahlo, S. M., McGaw, L. and Eloff, J. 2013. Antifungal activity and cytotoxicity of isolated compounds from leaves of *Breonadia salicina*. *Journal of ethnopharmacology*. 148(3): 909-913.
- Martos-Moreno, C., López-Escudero, F. J. and Blanco-López, M. Á. 2006. Resistance of olive cultivars to the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*. *Hort Science*. 41(5): 1313-1316.
- Martos-Moreno, C., Raya Ortega, M. d. C., Blanco López, M. Á. and López Escudero, F. J. 2005. Resistencia del olivo a la Verticilosis causada por *Verticillium dahliae*.
- Mercado-Blanco, J., Rodríguez-Jurado, D., Hervás, A. and Jiménez-Díaz, R. M. 2004. Suppression of *Verticillium* wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. *Biological Control*. 30(2): 474-486.
- Mule, R., Fodale, A. and Tucci, A. 2000. Control of olive *Verticillium* wilt by trunk injection with different doses of fosetyl-AI and benomyl. IV International Symposium on Olive Growing 586: 761-764.
- Narisawa, K., Kawamata, H., Currah, R. S. and Hashiba, T. 2002. Suppression of *Verticillium* wilt in eggplant by some fungal root endophytes. *European journal of plant pathology*. 108(2): 103-109.
- Navas-Cortés, J. A., Landa, B. B., Mercado-Blanco, J., Trapero-Casas, J. L., Rodríguez-Jurado, D. and Jiménez-Díaz, R. M. 2008. Spatiotemporal analysis of spread of infections by *Verticillium dahliae* pathotypes within a high tree density olive orchard in southern Spain. *Phytopathology*. 98(2): 167-180.
- Niki, E., Noguchi, N., Tsuchihashi, H. and Gotoh, N. 1995. Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene. *American Journal of Clinical Nutrition*. 62(6): 1322-1326.
- Okada, K., Kasahara, H., Yamaguchi, S., Kawaide, H., Kamiya, Y., Nojiri, H. and Yamane, H. 2008. Genetic evidence for the role of isopentenyl diphosphate isomerases in the mevalonate pathway and plant development in *Arabidopsis*. *Plant and cell physiology*. 49(4): 604-616.

- Olmo-García, L., Bajoub, A., Fernández-Gutiérrez, A. and Carrasco-Pancorbo, A. 2016. Evaluating the potential of LC coupled to three alternative detection systems (ESI-IT, APCI-TOF and DAD) for the targeted determination of triterpenic acids and dialcohols in olive tissues. *Talanta*. 150(3): 355-366.
- Peragón, J. 2013. Time course of pentacyclic triterpenoids from fruits and leaves of olive tree (*Olea europaea* L.) cv. Picual and cv. Cornezuelo during ripening. *Journal of agricultural and food chemistry*. 61(27): 6671-6678.
- Phillips, M. A., D'Auria, J. C., Gershenzon, J. and Pichersky, E. 2008b. The *Arabidopsis thaliana* type I isopentenyl diphosphate isomerases are targeted to multiple subcellular compartments and have overlapping functions in isoprenoid biosynthesis. *The Plant Cell Online*. 20(3): 677-696.
- Phillips, M. A., León, P., Boronat, A. and Rodríguez-Concepción, M. 2008a. The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. *Trends in plant science*. 13(12): 619-623.
- Pusztahelyi, T., Holb, I. J. and Pócsi, I. 2015. Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Frontiers in plant science*. 6.
- Qin, Q.-M., Vallad, G. E. and Subbarao, K. V. 2008. Characterization of *Verticillium dahliae* and *V. tricorpus* isolates from lettuce and artichoke. *Plant disease*. 92(1): 69-77.
- Rao, A., Zhang, Y., Muend, S. and Rao, R. 2010. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 54(12): 5062-5069.
- Rodríguez-Jurado, D. and Bejarano-Alcázar, J. 2007. Dispersión de *Verticillium dahliae* en el agua utilizada para riego de olivares en Andalucía. *Bol. San. Veg. Plagas*. 33(3): 547-562.
- Rodríguez, N. E. 2006. Estudio epidemiológico de la verticilosis del olivo (*Verticillium dahliae*) en la provincia de Granada. Tesis Doctoral: 33-52.
- Scarpari, L., Meinhardt, L., Mazzafera, P., Pomella, A., Schiavinato, M., Cascardo, J. and Pereira, G. 2005. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicioso*. *Journal of Experimental Botany*. 56(413): 865-877.

- Schiliro, E., Ferrara, M., Nigro, F. and Mercado-Blanco, J. 2012. Análisis transcriptómico de la interacción entre el endófito *Pseudomonas fluorescens* PICF7 y raíces de olivo.
- Schmelz, E. A., Kaplan, F., Huffaker, A., Dafoe, N. J., Vaughan, M. M., Ni, X., Rocca, J. R., Alborn, H. T. and Teal, P. E. 2011. Identity, regulation, and activity of inducible diterpenoid phytoalexins in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108(13): 5455-5460.
- SIAP. 2016. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.
- Smith, H. C. 1965. The morphology of *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae* and *V. tricorpus*. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 8(3): 450-478.
- Stiti, N., Triki, S. and Hartmann, M.-A. 2007. Formation of triterpenoids throughout *Olea europaea* fruit ontogeny. *Lipids*. 42(1): 55-67.
- Subbarao, K. V. 2002. Methyl bromide alternatives meeting the deadlines. *Phytopathology*. 92(12): 1334-1336.
- Sun, Q., Rost, T. L. and Matthews, M. A. 2006. Pruning-induced tylose development in stems of current-year shoots of *Vitis vinifera* (Vitaceae). *American Journal of Botany*. 93(11): 1567-1576.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 2010. *Plant Physiology*. Sinauer Associates. Quinta edición. Massachusetts. 285-290.
- Trapero, C., López-Escudero, F. J., Roca, L. F., Blanco-López, M. A. and Trapero, A. 2011. La verticilosis, un grave problema de la olivicultura actual. *Revista agropecuaria*. 937(2): 106-110.
- Trapero, C., Serrano, N., Arquero, O., Del Río, C., Trapero, A. and López-Escudero, F. 2013. Field resistance to *Verticillium* wilt in selected olive cultivars grown in two naturally infested soils. *Plant disease*. 97(5): 668-674.
- Wallis, C. M. and Chen, J. 2012. Grapevine phenolic compounds in xylem sap and tissues are significantly altered during infection by *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology*. 102(9): 816-826.
- Wang, K. C. and Ohnuma, S.-i. 2000. Isoprenyl diphosphate synthases. *Molecular and Cell Biology*. 1529(1): 33-48.

- Widmer, T. and Abawi, G. 2000. Mechanism of suppression of *Meloidogyne hapla* and its damage by a green manure of Sudan grass. *Plant disease*. 84(5): 562-568.
- Xu, M., Hillwig, M. L., Pristic, S., Coates, R. M. and Peters, R. J. 2004. Functional identification of rice syn-copalyl diphosphate synthase and its role in initiating biosynthesis of diterpenoid phytoalexin/allelopathic natural products. *The Plant Journal*. 39(3): 309-318.
- Zelko, I., Lux, A., Sterckeman, T., Martinka, M., Kollárová, K. and Lišková, D. 2012. An easy method for cutting and fluorescent staining of thin roots. *Annals of botany*. 110(2): 475-478.
- Zhang, J., Mace, M., Stipanovic, R. and Bell, A. 1993. Production and fungitoxicity of the terpenoid phytoalexins in cotton inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Journal of phytopathology*. 139(3): 247-252.