

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE ECOSISTEMAS
AGROFORESTALES



IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA VERTICILOSIS DEL PISTACHO EN BIAR (ALICANTE)

TRABAJO FIN DE MÁSTER
MÁSTER UNIVERSITARIO EN SANIDAD Y
PRODUCCIÓN VEGETAL

Alumno: D. Iván de la Flor Blanco

Tutor: Prof. D. Josep Armengol Fortí

Cotutor: Prof. Dña. Mónica Berbegal Martínez

Curso Académico: 2017-2018

VALENCIA, julio de 2018

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA VERTICILOSIS DEL PISTACHO EN BIAR (ALICANTE)

Resumen

En este trabajo se ha realizado un estudio de identificación y caracterización de la Verticilosis del pistacho en parcelas de este cultivo en Biar (Alicante). Para ello se realizaron visitas a las parcelas afectadas, se caracterizaron los síntomas mediante fotografías y se realizaron aislamientos fúngicos en medio de cultivo PDAS. Como resultado se obtuvieron consistentemente colonias del hongo *Verticillium dahliae* Kleb. que fueron identificadas y caracterizadas mediante técnicas morfológicas, estudios moleculares y un ensayo de patogenicidad sobre plantones de *Pistacia terebinthus* L.

Palabras clave: Enfermedad de los cultivos, Patogenicidad, *Pistacia vera*, *Verticillium dahliae*.

Alumno: D. Iván de la Flor Blanco

VALENCIA, julio 2018

Tutor: Prof. D. Josep Armengol Fortí

Cotutor: Prof. Dña. Mónica Berbegal Martínez

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF VERTICILLIUM WILT OF PISTACHIO IN BIAR (ALICANTE)

Abstract

In this work, a study for the identification and characterization of the Verticillium wilt of pistachio trees in Biar (Alicante province) was carried out. For this purpose, visits to the affected plots were conducted in order to characterize the symptoms of the disease by photographs. Fungal isolations were made in PDAS culture medium. *Verticillium dahliae* Kleb. fungal colonies were identified and characterized by morphological techniques, molecular studies, and a pathogenicity test on *Pistacia terebinthus* L. seedlings.

Keywords: Pathogenicity, Plant Pathology, *Pistacea vera*, *Verticillium dahliae*.

Student: Mr. Iván de la Flor Blanco

VALENCIA, July 2018

Tutor: Mr. Josep Armengol Fortí

Cotutor: Mrs. Mónica Berbegal Martínez

IDENTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE LA VERTICILOSI DEL PISTATXER A BIAR

Resum

En aquest treball s'ha realitzat un estudi d'identificació i caracterització de la Verticilosi del pistatxer en parcel·les d'aquest cultiu a Biar. Per això es van realitzar visites a les parcel·les afectades, es van caracteritzar els símptomes mitjançant fotografies i es van realitzar aïllaments fúngics a medi de cultiu PDA. Com a resultat es van obtenir consistentment colònies del fong *Verticillium dahliae* Kleb. que van ser identificades i caracteritzades mitjançant tècniques morfològiques, estudis moleculars i un assaig de patogenicitat sobre plançons de *Pistacia terebinthus* L.

Paraules clau: Malaltia dels cultius, Patogenicitat, *Pistacia vera*, *Verticillium dahliae*.

Alumne: D. Iván de la Flor Blanco

VALÈNCIA, juliol 2018

Tutor: Prof. D. Josep Armengol Fortí

Cotutor: Prof. Dña. Mónica Berbegal Martínez

AGRADECIMIENTOS

Después de un intenso período de un año desde que comencé este trabajo realizando las primeras fotografías de los síntomas, hoy es el día: escribo este apartado de agradecimientos para finalizar mi trabajo de fin de máster. Ha sido un período de aprendizaje intenso, no solo en el campo científico, sino también a nivel personal. Es por ello que me gustaría agradecer a todas aquellas personas que me han acompañado durante este tiempo su ayuda y apoyo.

Primero de todo, me gustaría agradecer al Grupo de Investigación de Hongos Fitopatógenos del Instituto Agroforestal Mediterráneo el haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo junto a ellos, agradecerles el buen trato que he recibido de su parte, todos los conocimientos que me han transmitido y la ayuda que me han brindado, siempre estando dispuestos a colaborar. En especial quisiera agradecerles a mis tutores Josep y Mónica las orientaciones, sugerencias y estímulos que me han dado y me han conducido durante estos meses con un talante abierto y generoso, guiándome y mostrando en cada momento una inmejorable disposición ante las dudas que durante la realización del mismo me surgieron.

También me gustaría agradecer a mis padres, a mi hermana y a toda mi familia, sus sabios consejos y su comprensión, gracias a quienes soy quien soy y hacia quienes sólo puedo expresar mi sincero agradecimiento por apoyarme durante la etapa académica que hoy culmina.

A mis amigos y amigas, que no solo habéis estado ahí para apoyarnos entre nosotros en los momentos difíciles, además también me habéis distraído de los estudios en los momentos necesarios, me habéis animado y enseñado a ser mejor persona.

Finalmente, a todas las personas que no he citado expresamente pero que me han ayudado a terminar este trabajo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Origen e historia.....	1
1.2. Situación taxonómica.....	2
1.3. Características botánicas	3
1.4. Situación económica actual del cultivo.....	6
1.4.1. El cultivo en el mundo.....	6
1.4.2. El cultivo en Europa.....	8
1.4.3. El cultivo en España.....	8
1.5. Portainjertos y variedades	10
1.5.1. Portainjertos.....	10
1.5.2. Variedades.....	13
1.6. Enfermedades	16
1.6.1. La Verticilosis causada por <i>Verticillium dahliae</i> Kleb.	16
1.6.1.1. Síntomas	16
1.6.1.2. Agente causal	18
1.6.1.3. Ciclo y Epidemiología de la Enfermedad	18
1.6.1.4. Control.....	19
2. OBJETIVOS.....	20
3. MATERIAL Y MÉTODOS	21
3.1. Parcelas estudiadas.....	21
3.2. Sintomatología de la enfermedad y toma de muestras	22
3.3. Aislamientos.....	24
3.3.1. Proceso de aislamiento fúngico	24
3.4. Caracterización del agente causal.....	24
3.4.1. Observación al microscopio	24
3.4.2. Caracterización molecular.....	25
3.5. Ensayo de patogenicidad: confirmación de los postulados de Koch-Pasteur	25
4. RESULTADOS	28
4.1. Seguimiento de parcelas y descripción de los síntomas.....	28
4.2. Aislamiento de <i>Verticillium dahliae</i>	30
4.3. Confirmación morfológica y molecular de la identificación de <i>V. dahliae</i>	32
4.4. Ensayo de patogenicidad	33
5. DISCUSIÓN	38
6. CONCLUSIÓN	42
7. BIBLIOGRAFÍA.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Encuadramiento taxonómico <i>Pistacia vera</i> L. Fuente: INPN, 2017.	2
Figura 2. Partes del fruto (pistacho) antes de iniciarse el desarrollo del grano y una vez maduro. Fuente: COUCEIRO-LÓPEZ et al., 2017.	5
Figura 3. Serie histórica de evolución de la producción. Fuente: FAOSTAT, 2017.	7
Figura 4. Situación y emplazamiento de las parcelas muestreadas. Fuente: Elaboración propia...	21
Figura 5. Historial de cultivos en las parcelas muestreadas. Fuente: Elaboración propia.....	22
Figura 6. Distribución de los distintos cultivares y portainjertos en las parcelas en junio del 2017. Fuente: Elaboración propia.	23
Figura 7. Síntomas en la parte aérea de <i>P. vera</i> y <i>P. terebinthus</i>	29
Figura 8. Cortes transversales y longitudinales del material vegetal.	30
Figura 9. Colonia de <i>V. dahliae</i> en placa de medio de cultivo PDA.	32
Figura 10. Curva de progresión de la enfermedad para cada aislado.	34
Figura 11. Comparación de las curvas de progresión de la enfermedad para los aislados y media de las mismas.	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición nutricional de la semilla de pistacho (parte comestible). Fuente: USDA , 2016. Datos obtenidos en noviembre del 2017.	6
Tabla 2. Distribución aproximada de la superficie de pistachero en el Mundo en hectáreas (ha) en el año 2014. Fuente: FAOSTAT, 2017.	7
Tabla 3. Distribución aproximada de la producción de pistacho en el Mundo en toneladas (t) en el año 2014. Fuente: FAOSTAT, 2017.	8
Tabla 4. Análisis provincial de superficie, rendimiento y producción de pistacho en España por comunidades autónomas y provincias. Fuente: ANUARIO, 2016. Datos consultados en noviembre del 2017.	9
Tabla 5. Resumen de la valoración de algunas características importantes en los portainjertos más comunes del pistachero ⁽¹⁾ . Fuente: COUCEIRO-LÓPEZ et al., 2017.	12
Tabla 6. Enfermedades producidas por hongos que afectan al pistachero en las zonas templadas. Fuente: TEVIOTDALE et al., 2002.	17
Tabla 7. Cultivares empleados en las parcelas muestreadas. Fuente: Elaboración propia.....	22
Tabla 8. Resultado del aislamiento de <i>Verticillium dahliae</i> en 13 muestras de la parcela de estudio. Fuente: Elaboración propia	31
Tabla 9. Evaluación media de la severidad de <i>V. dahliae</i> en las plantas inoculadas a lo largo del tiempo. Fuente: Elaboración propia.	33
Tabla 10. Valores de AUDPC obtenidos para las distintas muestras. Fuente: Elaboración propia	37

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Origen e historia

Los primeros fósiles del género *Pistacia* se encontraron en la isla de Madeira y datan de la era terciaria. Las diferentes especies de este género se difundieron por áreas muy diversas (LAVIN *et al.*, 2014). En el caso del pistachero se trata de un cultivo procedente de Oriente Medio, cuyo origen se remonta a miles de años atrás. El pistacho ha sido considerado un manjar en esta región, llegando a ser citado en la Biblia, y su consumo y propiedad signo de alto estatus social (VELASCO-MUÑOZ y AZNAR-SÁNCHEZ, 2016). Dichas áreas poseen clima riguroso, extremadamente seco, con altas temperaturas estivales y muy bajas en invierno, casi sin lluvias y con suelos alcalinos con pH sobre 8 (LAVIN *et al.*, 2014).

El pistacho era conocido por los asirios, por los persas, (las primeras referencias sobre este cultivo son del siglo VI a. de C. (LÓPEZ, 2006), y por los griegos (VELASCO-MUÑOZ y AZNAR-SÁNCHEZ, 2016). Su cultivo se desarrolló en Asia occidental, donde fue encontrado en el siglo III por Alejandro Magno. Fue importado desde Grecia a Roma en el año 30 a.C. y se difundió por distintas provincias romanas tales como Sicilia, Norte de África y, finalmente, es en los años 14-37 d. C. cuando llegó a la provincia imperial de Hispania de la mano de Pompeyo Craso (HERRADÓN *et al.*, 2011). Durante la ocupación árabe se convirtió en cultivo agrícola, extendiéndose por muchas regiones mediterráneas. En España, uno de los momentos de mayor importancia tiene lugar durante la Edad Media con la conquista de los musulmanes, que hicieron del pistacho un cultivo de gran trascendencia y valor (LÓPEZ, 2006), aunque posteriormente, con la reconquista cristiana el cultivo termina desapareciendo, debido no solo a motivos culturales sino también agronómicos y de rentabilidad (tal vez por la eliminación de árboles machos improductivos) (LACASTA *et al.*, 2004) y al auge de cultivos tradicionales como el olivo, o los cereales (LÓPEZ, 2006).

No fue hasta 1930 cuando los primeros frutos procedentes de Irán llegaron a Estados Unidos para establecer en California sus primeros cultivos. El Valle Central de California dispone de suelo fértil, clima cálido, seco y con inviernos moderadamente fríos, condiciones que resultan idóneas para el cultivo del pistacho (VELASCO-MUÑOZ y AZNAR-SÁNCHEZ, 2016). Pero la producción a nivel comercial no se inició hasta los años 70 del siglo XX. Esto se puede justificar mediante dos factores. El primero de ellos se asocia a que en el año 1957 se realizó la selección de un cultivar de alta calidad conocido con el nombre de “Kerman” (procedente de semillas de Irán). El otro posible motor del desarrollo se relaciona con la finalización (en la misma época) del sistema de acueductos de California; permitiendo con ello el riego en las zonas bajas del Valle de San Joaquín. Además, un factor determinante en la consolidación de la industria del Pistacho de los Estados Unidos fue la constitución, en el año 1976, de la “California Pistachio Association” (ANDRIEU *et al.*, 2013). Como resultado, cuarenta años después de la primera cosecha en 1976, California se ha situado como el primer productor mundial de pistacho y el segundo en volumen de exportación, sólo por detrás de Irán (VELASCO-MUÑOZ y AZNAR-SÁNCHEZ, 2016).

En cuanto al cultivo del pistacho en España, no ha sido hasta muy recientemente que se ha recobrado el interés en su cultivo en áreas continentales del secano español. Hoy asistimos a un claro resurgir de este cultivo basado en la extraordinaria calidad del pistacho español (HUESO-



MARTÍN y CUEVAS-GONZÁLEZ, 2014). En 1986 la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, a través de la Consejería de Agricultura y Medio Ambiente, inicia una línea de investigación sobre la búsqueda de nuevas alternativas para Castilla-La Mancha en función de sus características edafoclimáticas intrínsecas: poco agua y heladas primaverales tardías. Estos estudios identificaron el cultivo del pistacho como una buena alternativa para la zona (LACASTA *et al.*, 2004). En 1988, se importaron los primeros cultivares en Castilla-La Mancha a través del Centro de Investigación Agroambiental *El Chaparrillo* (CIAC) (Ciudad Real) desde donde se comienza su estudio en esta región (LÓPEZ, 2006). A finales de la década de los 90 el CIAC comienza a difundir el cultivo por la península principalmente por su mitad meridional, optando por el pie autóctono *Pistacia terebinthus* L. por su excelente comportamiento en los suelos más representativos de la región en relación a los demás portainjertos. Una de las razones fundamentales del aumento de superficie en España y, sobre todo, en Castilla-La Mancha, se debe al programa de reparto gratuito de yemas al agricultor llevado a cabo durante más de una década por el CIAC (COUCEIRO-LÓPEZ *et al.*, 2017).

1.2. Situación taxonómica

El pistacho pertenece a la familia de las Anacardiaceae, género *Pistacia*, con cuatro secciones: *Lentiscella* Zohary, *Eulentiscus* Zohary (especies perennifolias), *Butmela* Zohary y *Euterebinthus* Zohary (especies caducifolias). El género está constituido por 11 especies, con algunas variedades botánicas, siendo estas: *P. atlantica* Desf. (*Butmela* Zoh.); *P. terebinthus* L., *P. vera* L., *P. chinensis* Bge., *P. khinjuk* Stocks y *P. palaestina* Boiss (*Euterebinthus* Zoh.); *P. mexicana* HBK, *P. texana* Swingle (*Lentiscella* Zoh.); *P. lentiscus* L., *P. saporte* Burnat., *P. weinmannifolia* Poisson (*Eulentiscus* Zoh.) (ZOHARY, 1952). De todas ellas, la única especie con frutos económicamente importantes es *Pistacia vera* L. (*Euterebinthus* Zoh.). (LAVIN *et al.*, 2014).

A continuación, en la Figura 1 se muestra el encuadramiento taxonómico del pistachero (*Pistacia vera* L.):

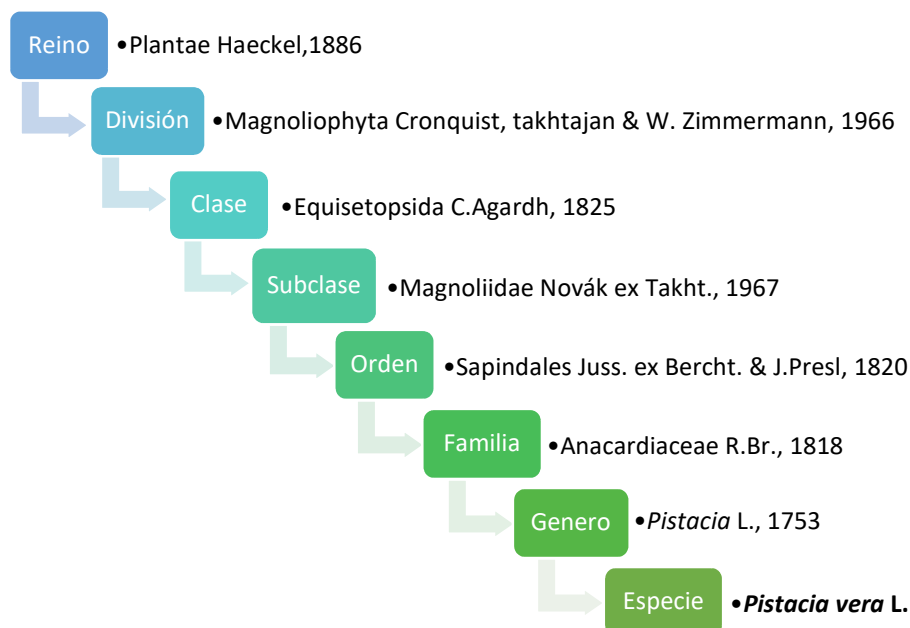


Figura 1. Encuadramiento taxonómico *Pistacia vera* L. Fuente: INPN, 2017.



1.3. Características botánicas

El pistachero es un árbol caducifolio dioico, de gran porte y ramificación abundante. Su desarrollo es lento, pero la planta es muy longeva: de 150 a 300 años según diferentes autores (SPINA, 1989).

- Porte

De 5-7-9 m. de altura, de hábito abierto, abundante ramificación y copa densa que tiende a inclinarse, por tanto, inicialmente puede requerir el empleo de tutores. El tronco suele ser corto y la corteza rugosa y su color varía del amarillo-rojizo en las ramas del año, pasando por el gris ceniza en las partes más jóvenes y gris oscuro en las menos jóvenes (LÓPEZ, 2006; SPINA, 1989).

- Sistema radicular

El sistema radical puede ser tanto penetrante como superficial, dependiendo de las condiciones del medio. Cuando se cultiva en suelo profundo y bajo riego, se desarrollan raíces profundas. En cambio, en suelos delgados, las raíces son superficiales (LÓPEZ, 2006; SUDZUKI, 1996).

En suelos profundos puede penetrar a gran profundidad buscando agua y sales nutritivas, dándole al árbol una gran tolerancia a la sequía, razón por la que puede tener éxito en suelos y climas donde otras especies no prosperan. Dicha tolerancia a la sequía lo hace a su vez susceptible a la falta de oxígeno en el suelo (LEMUS y NEGRÓN, 2001; LÓPEZ, 2006).

En suelos poco profundos o cuando se altera la arquitectura natural del sistema radical en los procesos de propagación y viveros, limitando con ello el desarrollo pivotante de las raíces, las raíces superficiales son numerosas, el árbol es más vigoroso y desarrolla bien su copa, dando una fructificación mayor y regular (LAVIN *et al.*, 2014; LÓPEZ, 2006).

- Yemas

La yema terminal del brote es vegetativa, mientras que las yemas axilares son vegetativas o reproductivas. Las yemas vegetativas son pequeñas y fácilmente diferenciadas de las florales que son de mayor tamaño y que no tienen primordio vegetativo (LAVIN *et al.*, 2014). Las yemas florales se encuentran en las axilas de las hojas de los brotes del año anterior y su diferenciación tiene lugar desde el verano anterior hasta la primavera siguiente, antes de iniciarse la floración (COUCEIRO-LÓPEZ *et al.*, 2017).

- Brotes

La brotación se produce en primavera previa a la floración. El primer flujo de crecimiento de los brotes finaliza en diciembre y, bajo condiciones ambientales favorables, pueden ocurrir un segundo y hasta un tercer flujo de crecimiento (LEMUS y NEGRÓN, 2001).

- Hojas

Caducas, alternas, compuestas trifoliadas imparipinnadas, con 3 o 5 folíolos ovales y redondeados en el ápice, siendo el terminal de mayor tamaño. De jóvenes son tormentosas y, en estado adulto, glabras y coriáceas con el peciolo redondeado, peludo y ligeramente alado. Su color es verde, más brillante en el haz que en el envés. Suelen ser de mayor tamaño en los cultivares masculinos (COUCEIRO-LÓPEZ *et al.*, 2017). El follaje se torna rojo-anaranjado antes de caer en otoño y resulta de gran interés ornamental (SPINA, 1989).



- Flores

Al ser una planta dioica, las flores masculinas y femeninas se encuentran en pies distintos. Éstas son pequeñas, apétalas, de color verde-parduzco y aparecen en racimos o panículas axilares. Las flores nacen sobre cortas ramas laterales ramificadas, antes de que broten las hojas, se desarrollan el año anterior, a partir de yemas situadas en la axila de las hojas de los tallos que están creciendo (LÓPEZ, 2006). Tienen polinización anemófila (SPINA, 1989).

La inflorescencia corresponde a una panoja, portando 100 o más flores estaminadas o pistiladas. Debido a lo anterior, los árboles con flores estaminadas o machos deben ser incluidos en plantaciones comerciales en una proporción de, al menos, uno por cada seis árboles productores o hembras. Los árboles machos producen gran cantidad de polen, generalmente antes que los pistilos de las flores hembras estén receptivos (LAVIN *et al.*, 2014). Los árboles, además de diferenciarse por el sexo de las flores, también presentan características morfológicas distintas en yemas, hojas y ramas (SUDZUKI, 1996).

Las flores femeninas son de mayor tamaño que las masculinas. Poseen 2 brácteas, cáliz con 2-5 lóbulos, 1 ovario súpero, ovoide, con un óvulo y estilo terminal, cortantemente trifido. Las inflorescencias femeninas presentan una morfología parecida a las inflorescencias masculinas, pero con mayor ramificación. Se componen de entre 150 a 260 flores dispuestas en racimos compuestos. La longitud media del racimo es de 75 mm (COUCEIRO-LÓPEZ *et al.*, 2017).

Las flores masculinas poseen también 2 brácteas, cáliz con 5 lóbulos y 2-8 estambres (5 de media) con filamentos cortos. Se componen de 450-500 flores agrupadas en racimos compuestos. La longitud media de estos racimos en pleno desarrollo es de 65 mm (COUCEIRO-LÓPEZ *et al.*, 2017).

Los granos de polen son esféricos verrugosos, ovoides y de color amarillo, presentando 4 poros germinativos. Poseen un tamaño medio de unas 20-30 μ (COUCEIRO-LÓPEZ *et al.*, 2017).

Debido a lo extenso y variable de la floración, el período de apertura de las flores femeninas debe ser cubierto por más de una variedad polinizante. Una producción óptima de fruta se obtiene cuando el polen es trasladado a las flores femeninas en los dos primeros días desde la antesis, por lo tanto, se debe disponer de polen incluso antes que comience la apertura de las flores femeninas para obtener una cuaja comercial (LAVIN *et al.*, 2014).

- Fruto

El fruto es una drupa monosperma de 0,2-2,5 cm de longitud, ovoide y semiseca. El pellejo, piel o parte externa que rodea la cascara, se compone de epicarpio y mesocarpio que recubre el endocarpio o cáscara dura que, a su vez, encierra la semilla. En los frutos inmaduros este pellejo es de color amarillo, tornándose rosado cuando alcanza la madurez y separándose fácilmente de su endocarpio (COUCEIRO-LÓPEZ *et al.*, 2017). La semilla es la parte comestible que presenta dos cotiledones voluminosos de coloración verde o verde amarillenta con tegumento rojizo (MARTÍNEZ-MILLÁN y CEVALLOS-FERRIZ, 2005). La Figura 2 muestra las partes, tanto internas como externas del fruto.



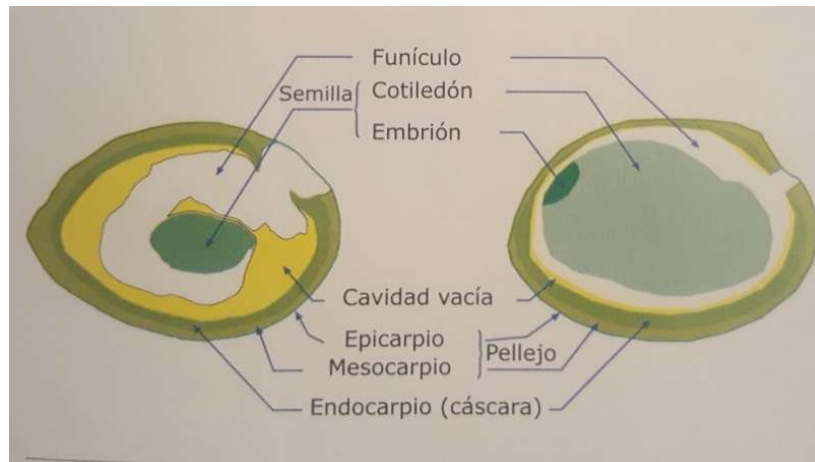


Figura 2. Partes del fruto(pistacho) antes de iniciarse el desarrollo del grano y una vez maduro. Fuente: COUCEIRO-LÓPEZ *et al.*, 2017.

Su peso es aproximadamente de 1,40 g. Además, este fruto seco es uno de los que contiene más proteínas (18,8 a 23,8% de su peso) Posee un alto grado en fibra y es rico en ácido oleico (50 a 60% de su peso es aceite), lo que ayuda a reducir el nivel de colesterol motivo por el cual se le puede calificar como fruto seco “cardiosaludable” y tiene un contenido calórico de 67 kcal (HERRADÓN *et al.*, 2011; SPINA, 1984). En la

Tabla 1 se incluyen datos sobre la composición nutricional del fruto de pistacho.

El fruto presenta una curva de crecimiento sigmoidea, similar a las drupáceas. Después de la floración y polinización, los frutos comienzan a crecer alcanzando su tamaño final en pocas semanas. Posteriormente, el embrión comienza a expandirse y a llenar las cáscaras vacías. La caída de flores puede llegar hasta un 90 a 98% y la de los frutos se produce dos semanas después de cuajados (SUDZUKI, 1996). Cuando el fruto madura, la cubierta carnosa (piel o pellejo) se suaviza y se separa parcialmente de la cáscara. Ésta toma un color blanquecino opaco y se abre desde su ápice en dos valvas, dejando expuesta la cubierta roja y purpúrea de la semilla (MAGGS, 1975). Esta característica, llamada dehiscencia, es deseable en los frutos de esta especie, exigiéndose a las variedades comerciales un promedio mínimo de 70% de apertura (LAVIN *et al.*, 2014).

La floración se inicia 4 o 5 años después de la plantación, pero a los 7 u 8 años comienzan las producciones económicamente significativas (LAVIN *et al.*, 2014). La madurez fisiológica de los frutos está determinada por la apertura de la piel. La calidad comercial de los pistachos está muy influenciada por la época de cosecha, ya que una vez que la piel madura, por traspaso de taninos desde ella, las valvas, que deben ser de un color blanco mármol, se tiñen de color rojizo en su extremo, perdiendo condiciones de presentación. Esta tinción aumenta mientras más tiempo permanece el fruto con piel maduro en el árbol. Además, se ha comprobado que el peso máximo de la semilla o nuez se alcanza justo cuando la piel se pone opaca y se suelta. Posteriormente, la semilla se arruga y pierde peso por deshidratación (CRANE, 1978).

Durante la cosecha, se debe tener la precaución de no cosecharlos ni almacenarlos húmedos, ya que pueden desarrollarse hongos como *Aspergillus flavus* o *Aspergillus parasiticus*, productores de Aflatoxina, una toxina que también es un potente cancerígeno. Mientras más se atrase la cosecha hay mayores probabilidades de desarrollo de estos hongos, los que también pueden prosperar en almendras, nueces y granos para ganado (LAVIN *et al.*, 2014).

Tabla 1. Composición nutricional de la semilla de pistacho (parte comestible). Fuente: USDA , 2016. Datos obtenidos en noviembre del 2017.

Nutriente	Unidades	Valor por 100 g	Nutriente	Unidades	Valor por 100 g
General			Minerales		
Energía	kcal	560	Calcio, Ca	mg	105
Proteínas	g	20.16	Hierro, Fe	mg	3.92
Grasas totales	g	45.32	Magnesio, Mg	mg	121
Carbohidratos	g	27.17	Fosforo, P	mg	490
Fibra total dieta	g	10.6	Potasio, K	mg	1025
Azúcar total	g	7.66	Sodio, Na	mg	1
Vitaminas			Zinc, Zn	mg	2.20
Vitamina C, ácido ascórbico total	mg	5.6	Lípidos		
Tiamina	mg	0.870	Ácidos Grasos, saturados totales	g	5907
Riboflavina	mg	0.160	Ácidos grasos, monoinsaturados totales	g	23257
Niacina	mg	1300	Ácidos grasos, poliinsaturados totales	g	14380
Vitamina B-6	mg	1700	Ácidos Grasos, trans totales	g	0.000
Folatos, DFE	µg	51	Colesterol	mg	0
Vitamina B-12	µg	0.00	Otros		
Vitamina A, RAE	µg	26	Cafeína	mg	0
Vitamina A, IU	IU	516			
Vitamina E (alpha-tocopherol)	mg	2.86			
Vitamina D (D2 + D3)	µg	0.0			
Vitamina D	IU	0			

1.4. Situación económica actual del cultivo

1.4.1. El cultivo en el mundo

La superficie total a nivel mundial es de más de 800.000 ha. Irán es el país que mayor número de hectáreas dedica a este cultivo, contabilizándose más de 316.780 ha. Le siguen Turquía con 282.334 ha, de las que solo unas 40.000 se encuentran en cultivo regular, EEUU (89.436 ha) y Siria con 59.893 ha, de las que únicamente 40.000 ha están dirigidas hacia un cultivo más intensivo. Después se encuentran Túnez y China con superficies similares que rondan las 26.000 ha. El resto de países tienen superficies mucho menores siendo España el siguiente con una superficie de 6.092 ha (HUESO-MARTÍN y CUEVAS-GONZÁLEZ, 2014; FAOSTAT, 2017) (Tabla 2).



Tabla 2. Distribución aproximada de la superficie de pistachero en el Mundo en hectáreas (ha) en el año 2014.
Fuente: FAOSTAT, 2017.

PAIS	ÁREA COSECHADA (ha)
TOTAL, MUNDO	826.523
Irán	316.780
Turquía	282.334
Estados Unidos de América	89.436
República Árabe Siria	59.893
Túnez	26.700
China Continental	26.280
España	6.092
Madagascar	4.608
Grecia	4.090
Italia	3.546

Si se observa la serie histórica de evolución de la producción mundial presentada en el Figura 3, se puede ver que es durante los años ochenta cuando el cultivo registra un crecimiento explosivo de más del 200% (1989/1980). Durante la década de los noventa y la primera década del siglo XXI se evidenció una tendencia positiva en la evolución de la producción mundial, aunque con tasas inferiores (70% para cada período). Las causas deben adjudicarse tanto al incremento en la superficie cultivada, así como también a los avances en el manejo del cultivo (principalmente riego) (ANDRIEU *et al.*, 2013). Desde el 2008 hasta la actualidad la producción se ha mantenido con altibajos más o menos estable (entre 850.000 y 950.000 toneladas aproximadamente).

En cuanto a producción, el primer lo ocupa actualmente Irán (más de 415.000 t. en 2014), por delante de Estados Unidos (233.000 t.). A estos dos países le siguen Turquía (80.000 t.) y China (76.900 t.). España se encuentra en el décimo puesto en cuanto a producción de pistachos con 2.468 t. (Tabla 3).

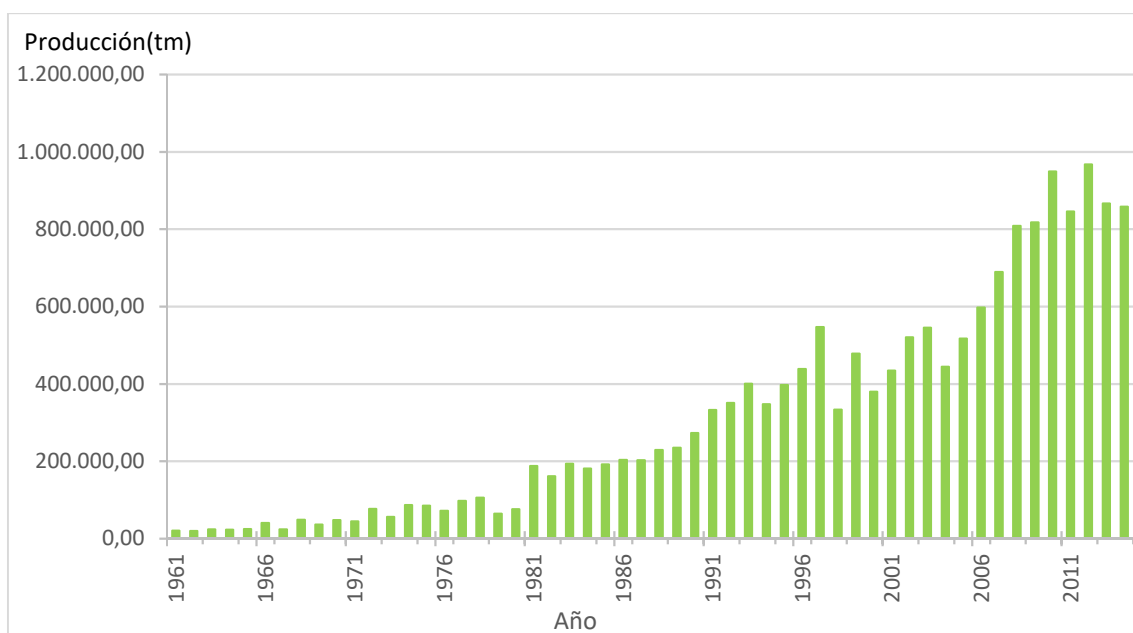


Figura 3. Serie histórica de evolución de la producción. Fuente: FAOSTAT, 2017.



Tabla 3. Distribución aproximada de la producción de pistacho en el Mundo en toneladas (t) en el año 2014. Fuente: FAOSTAT, 2017

PAIS	Producción (t)
TOTAL, MUNDO	857.878
Irán	415.531
Estados Unidos de América	233.146
Turquía	80.000
China Continental	76.943
República Árabe Siria	28.786
Grecia	5.700
Italia	3.555
Afganistán	2.761
Túnez	2.500
España	2.468

1.4.2. El cultivo en Europa

Aunque la superficie de cultivo disperso es elevada en Europa, sobre todo en Grecia e Italia (Sicilia), la dedicada a un cultivo más regular se aproxima a las 13.878 ha: España (6.092 ha), Grecia (4.090 ha), Italia (3.546 ha) y Chipre (150 ha). La producción en Europa es de 11.742 t. y está liderada por Grecia (5.700 t.), seguida de Italia (3.555 t.), España (2.468 t.) y Chipre (20 t.) (FAOSTAT, 2017; HUESO-MARTÍN y CUEVAS-GONZÁLEZ, 2014).

A pesar de ser España el país con mayor superficie cultivada en Europa es el tercero de cuatro países en cuanto a producción. El rendimiento de España es bajo (0.4 t/ha) en comparación al resto de países europeos Grecia (1,3 t/ha), Italia (1 t/ha). El motivo por el cual sucede esto es debido a que se trata de explotaciones de reciente implantación por lo que son en gran parte plantaciones jóvenes aún no productivas.

1.4.3. El cultivo en España

La mayor parte de la producción española (60-70 %) se exporta a los países de la UE, mientras que entre el 30-40 % se vende en los mercados nacionales. El fruto corresponde, en su mayoría (95 %), al cultivar Kerman, elegido para las plantaciones en función de su mayor demanda en los mercados internacionales por su mayor calibre y blancura de cáscara (HUESO-MARTÍN y CUEVAS-GONZÁLEZ, 2014). La superficie cultivada, rendimiento y producción en España se distribuye aproximadamente de la forma que se indica en la Tabla 4.

El área de cultivo se extiende principalmente por las comunidades de Castilla la Mancha con 7553 ha y Andalucía con 1423 ha seguidas de Extremadura con mucha menos superficie (501 ha). De todas ellas destacan las provincias de Ciudad Real, Toledo y Albacete siendo, de mayor a menor, las que tienen más superficie respectivamente. En cuanto a producción de nuevo Castilla-La Mancha es la comunidad con mayor producción (3130 t) seguida de Andalucía con 822 t. A pesar de ello, éstas no son las comunidades con mayor rendimiento ya que sus rendimientos (1282 kg/ha y 1748 kg/ha respectivamente) son menores que los de otras comunidades como Castilla y León (2077 kg/ha) y Extremadura (1751 kg/ha). Destaca en cuanto a rendimiento la provincia de Zamora con un rendimiento muy superior de 3000 kg/ha.



Tabla 4. Análisis provincial de superficie, rendimiento y producción de pistacho en España por comunidades autónomas y provincias. Fuente: ANUARIO, 2016. Datos consultados en noviembre del 2017.

Provincias y Comunidades Autónomas C49:G73s	Superficie en plantación regular (hectáreas)	Rendimiento(kg/ha)		Producción (toneladas)
		Secano	Regadío	
NAVARRA	8	–	950	8
CATALUÑA	339	682	1742	311
Lleida	335	682	1.771	307
Tarragona	4	–	1000	4
Segovia	17	–	–	–
Avila	34	–	–	–
Burgos	3	–	–	–
León	2	–	–	–
Palencia	38	400	–	15
Salamanca	4	–	–	–
CASTILLA Y LEÓN	388	805	2.077	115
Valladolid	185	–	–	–
Zamora	105	1200	3.000	100
MADRID	68	500	800	22
CASTILLA-LA MANCHA	7553	634	1.282	3.130
Albacete	1499	450	1400	502
Ciudad Real	3210	750	1400	1.406
Cuenca	654	600	1.400	421
Toledo	2190	550	1.000	801
C. VALENCIANA	58	365	975	6
Alicante	5	–	–	–
Castellón	3	450	975	2
Valencia	50	350	–	4
R. DE MURCIA	191	650	1400	131
EXTREMADURA	501	–	1.751	219
Badajoz	399	–	2.125	193
Cáceres	102	–	750	26
ANDALUCÍA	1423	1268	1748	822
Almería	18	778	–	7
Cádiz	35	8000	–	208
Córdoba	332	550	1650	34
Granada	494	999	1810	311
Huelva	18	–	–	–
Jaén	295	600	1750	197
Málaga	141	650	1200	61
Sevilla	90	125	450	4
ESPAÑA	10529	695	1446	4.764



1.5. Portainjertos y variedades

1.5.1. Portainjertos

El portainjerto más empleado en España es *Pistacia terebinthus*, conocido vulgarmente como “cornicabra”. El vigor de este pie no es tan elevado como el de otras especies, pero se considera el más adecuado para las características de los suelos donde esta especie se desarrolla óptimamente. En las últimas dos décadas se ha constatado su excelente respuesta productiva en condiciones de suelos franco-arenosos de escasa profundidad, ya sean estos de secano o de regadío. Se considera el portainjerto de mayor eficiencia nutricional en condiciones desfavorables. En suelos profundos de regadío y con texturas más finas, además de *P. terebinthus*, también podremos optar por *Pistacia atlantica*. En el caso de presencia en los suelos del hongo *Verticillium dahliae* Kleb. se aconseja el empleo de *Pistacia integerrima* o el híbrido americano UCB1, siendo más adecuado el híbrido UCB1 en zonas frías (HUESO-MARTÍN y CUEVAS-GONZÁLEZ, 2014). En algunos países, como Irán, se usa mayoritariamente *Pistacia vera* como portainjertos, lo que simplifica el injerto ya que el prendimiento de los injertos es muy superior al logrado con otro de diferente especie (LAVIN *et al.*, 2014).

A continuación, se numeran y explican las características generales de algunos de los principales portainjertos empleados en el mundo. Adicionalmente, se aporta un resumen de la valoración de las características más importantes de los principales portainjertos en la Tabla 5.

- ***P. atlantica.***

Originario de las montañas de Afganistán o de las antiguas repúblicas rusas. Se comporta bien con suficiente frío. El prendimiento de los injertos es difícil y tiene un desarrollo poco uniforme entre individuos. Posee una muy buena resistencia a la salinidad y buena a la caliza, mala resistencia a armillaria y muy buena a *Phytophthora* y es muy susceptible a *Verticillium* (COUCEIRO-LÓPEZ *et al.*, 2017), pero tolerante a nemátodos. Muy vigoroso, induce cosechas moderadas y con tendencia al vecerio. Se sospecha incompatibilidad con Kerman en EE. UU., no así en Australia.

- ***P. palaestina.***

Originario del sur de Turquía, Siria y Jordania, crece en climas templados.

- ***P. terebinthus.***

En nuestro país se encuentra muy repartido espontáneamente en la totalidad de las regiones. Entre sus características más importantes se puede señalar su rusticidad y excelente adaptación a suelos pobres, rocosos y calizos. En general, es poco vigoroso y posee buena afinidad con la mayor parte de las variedades. Cuando se utiliza como pie o portainjerto suele aparecer un engrosamiento en la zona de unión debido a la diferencia de vigor con el cultivar (CATALAN-CAMBRONERO, 2016). Susceptible a *Verticillium*, pero resistente a *Phytophthora*, y nemátodos. Induce producciones moderadas, pero parejas. Muy buena tolerancia al frío, muy eficiente nutricionalmente y excelente compatibilidad con las variedades de *P. vera*.



- ***P. khinjuk.***

Es originario de Anatolia, en Turquía, donde es usado como portainjertos y de algunas regiones de Irán, donde no se usa como portainjerto. Es de lento crecimiento en altura y diámetro, y difícil de injertar por bajo prendimiento de los injertos. Crece hasta 10 metros y tiene buena tolerancia a bajas temperaturas.

- ***P. intergerrima o Pioneer Gold.***

Muy vigoroso y de crecimiento parejo. Baja resistencia a la salinidad y buena a los suelos calizos, resistencia baja a armilaria y *Phytophthora* pero buena tolerancia a *Verticillium* y alta precocidad en la entrada en producción e incluso a los nemátodos. Induce producción precoz y alta con algo de vecería. Moderada resistencia al frío y compatible con Kerman (LAVIN *et al.*, 2014).

- ***P. vera.***

Es el que posee mejor afinidad con las variedades comerciales. Tiene un vigor bajo, baja precocidad en la entrada en producción, elevada resistencia al frío, resistencia a la salinidad media pero buena a la caliza, baja resistencia a nematodos, media a *Armillaria mellea* y mala a *Phytophthora* y susceptible al ataque de *Verticillium*, lo que en suelos con exceso de humedad es un problema (COUCEIRO-LÓPEZ *et al.*, 2017). Es el portainjerto más usado en Irán.

- **Pioneer Gold 2.**

Es un híbrido interespecífico entre *P. intergerrima* x *P. atlantica*, aunque de polinización abierta. Prácticamente de uso exclusivo en California, muy por debajo de *P. interregima* o del UCB1 (COUCEIRO-LÓPEZ *et al.*, 2017). Es de moderadamente susceptible a susceptible a *Verticillium* (ANDRIEU *et al.*, 2013). Posee características similares a *P. intergerrima*.

- **UCB1.**

Híbrido entre *P. intergerrima* x *P. atlantica*, mediante polinización cerrada y originado en la Universidad de California. Buenas producciones en terrenos de secano profundos de textura media, siempre que la pluviometría anual supere los 400mm, y sustancialmente mejores, en regadío de suelos profundos. De vigor elevado, con buena resistencia a la caliza, resistente a *Armillaria* y tolerante a *Verticillium*. Es más tolerante al frío, tiene una entrada en producción más lenta y es menos tolerante a *Verticillium* que *P. intergerrima*. Sensible a nemátodos.

- **Pisteh 1.**

Corresponde a *P. vera*. Originario de Irán. Muy resistente al frío (-18°C) y muy tolerante a falta de agua en el suelo. Su crecimiento es lento, muy rústico, fácil de injertar, poco tolerante a *Verticillium*.

- **Pisteh 2.**

También corresponde a *P. vera*. Es muy resistente al frío y tolerante a falta de agua. Es algo susceptible a *Alternaria*.



Tabla 5. Resumen de la valoración de algunas características importantes en los portainjertos más comunes del pistachero⁽¹⁾. Fuente: COUCEIRO-LÓPEZ *et al.*, 2017.

CARACTERÍSTICA	PORTAINJERTOS				
	<i>P. integerrima</i>	<i>P. terebinthus</i>	<i>P. atlantica</i>	<i>P. vera</i>	Híbridos
Producción*	Baja	Media	Media	Media	SD
Producción**	Media Alta	Baja	Baja	SD	UCB1 elevada, PGII Media Baja
Vigor	Alto	Moderado	Moderado-Alto	Bajo ⁽²⁾	Alto (UCB1 y PGII)
Precocidad en la entrada en producción	Alta	Baja	Baja	Baja	Alta en PGII y Muy alta en UCB1
Afinidad en el injerto	Buena	Buena	Buena	Buena	Alguna incompatibilidad
Longevidad	SD	Elevada	Elevada	Elevada	SD
Resistencia al frío	Muy sensible	Muy elevada	Elevada	Elevada	UCB1 más resistente que <i>P. integerrima</i> pero menos que <i>P. atlantica</i> , PGII menos resistente que UCB1
Resistencia a las bajas temperaturas del suelo (2-0°C) ⁽³⁾	Muy sensible	Elevada	Media	Elevada	SD
Resistencia a la salinidad ⁽⁴⁾	Baja	SD	Buena	SD	Buena en UCB1
Resistencia a la caliza	Buena	Buena	Buena	Buena	Buena
Rusticidad	Baja	Elevada	Buena	Buena	UCB1 más rústico que <i>P. integerrima</i>
PLAGAS Y ENFERMEDADES					
Resistencia a nematodos	SD	Buena	SD	Baja	SD
Resistencia a amillaria ⁽⁵⁾	Regular	Buena	Mala	Regular	Buena en UCB1, regular en PGII
Resistencia a Phytophthora ⁽⁵⁾	Regular	Buena	Muy buena	Mala	SD
Resistencia a <i>Verticillium dhaliae</i> Kleb. ⁽⁵⁾	Más resistencia que UCB1 pero menos producción que los UCB1 infectados.	Susceptible	Susceptible	Susceptible	UCB1 Moderada tolerancia pero los árboles reducen su vigor y son más pequeños con la infección; PGII Susceptible
EFICIENCIA NUTRICIONAL**					
Absorción de cobre	Baja	Elevada	Media	SD	PGII Elevada y UCB1 Baja
Absorción de zinc	Elevada	Media Alta	Media Baja	SD	PGII Media Alta y UCB1 Baja
Absorción de boro	Menos que <i>P. atlantica</i> .	Media	Buena	SD	PGII Media y UCB1 Baja
Absorción de cloro	Elevada	SD	Media Alta	SD	UCB1 Media Baja
Absorción de sodio	Elevada	SD	Media Alta	SD	UCB1 Baja

(1) La valoración procede tanto de estudios californianos como del CIAC en España.
 (2) Inicialmente elevado por las grandes reservas de la semilla, posteriormente es el que presenta menor vigor.
 (3) En plantas jóvenes.
 (4) Con agua de riego de 16 dS/m de salinidad.
 (5) Puede haber diferencias de resistencia entre diferentes cepas de la enfermedad y entre individuos de poblaciones diferentes del género *Pistacia*.
 * En las condiciones de los suelos de secano de gran parte de Castilla-La Mancha.
 **En las condiciones de suelo y dotación hídrica del valle de San Joaquín (california-EE.UU.).
 SD: Sin datos.



1.5.2. Variedades

Las variedades de pistacho se evalúan agrónomicamente sobre la base de su productividad y de la tendencia a producir frutos llenos. Esto exige que tenga que asegurarse la fecundación de las flores con un número apropiado de polinizantes (SPINA, 1984).

En los distintos países y regiones donde se cultiva el pistacho, existen diferentes variedades que se diferencian, principalmente, por el color y tamaño de la semilla, época de cosecha, y sus cualidades para distintos usos. Todas corresponden a *P. vera* y la mayoría son originarias de Irán. Algunas son denominadas con otros nombres, como por ejemplo Fandoghi bautizada como Kerman en EEUU; Badami llevada a Australia y llamada Sirora; y una tercera llevada a Italia y llamada Italiano.

A continuación, se explican los principales cultivares empleados en el mundo y que han sido introducidos y caracterizados en España por parte del Centro de Investigación Agroambiental El Chaparrillo (CIAC):

○ **Variedades Femeninas:**

● **'Kerman' (Fandoghi)**

Una selección realizada en la Estación Experimental Chico del USDA9, California, en 1957, a partir de semillas llevadas desde Irán (FERGUSON *et al.*, 1995). Cultivo muy apreciado en todo el mundo y el más extendido en California por su gran tamaño y calidad de sus frutos, superior a otros, debido a un mayor porcentaje de azúcares, menor amargor y mayor consistencia del fruto. Es semivigoroso y productivo, de tendencia muy acusada a la vecería respecto a otros cultivares, con un porcentaje de frutos abiertos entre el 40 y el 80 % y con un 15-25 % de frutos vacíos. Tiene unas amplias necesidades de frío (> 1000 HF) (COUCEIRO-LÓPEZ *et al.*, 2017).

La drupa es de un tamaño superior a la media, de forma redondeada y grosera, con la parte apical redondeada y la base puntiaguda. El rendimiento en semilla es elevado y el grano es muy claro (de amarillo pajizo a amarillo verduzco claro) (LAVIN *et al.*, 2014).

La floración es tardía. En Castilla La Mancha, sus frutos maduran en la primera quincena de septiembre (LÓPEZ, 2006). La maduración de los frutos en Italia tiene lugar a mediados de septiembre (SPINA, 1984).

● **'Sirora' (Badami)**

Tuvo su origen a partir de una semilla obtenida desde un árbol de Kerman polinizado al azar, en el CSIRO de Australia (FERGUSON *et al.*, 1995). En Irán existe una variedad similar, Badami, por lo que algunos sostienen que se llevó desde allá. Esta variedad se caracteriza por una mayor precocidad y vigor que Kerman (NAVARRETE, 1991). Los frutos son atractivos visualmente (cáscara blanca) y de buen sabor, pero ligeramente más pequeños si se comparan con los de la mayoría de cultivares que se destinan a aperitivo. Posee alternancia en la producción, aunque menos intensa que Kerman. De mayor vigor que Kerman, florece unos 10 días antes, madurando a finales del mes de agosto. El peso del grano es de 1 g frente a los 1,3 g de Kerman, con un porcentaje de frutos abiertos muy superior (93%) e inferior de vacíos (COUCEIRO-LÓPEZ *et al.*, 2017). Esta variedad puede ser alternativa de futuro a Kerman en numerosas áreas de la España meridional (GUERRERO-VILLASEÑOR *et al.*, 2004).



- **Larnaka**

Originaria de Chipre (FERGUSON *et al.*, 1995). Fruto mediano, aunque algo más alargado que el que produce el cv. Mateur. Su buen vigor, elevada producción, excelente sabor, vecería moderada, elevada dehiscencia de sus frutos, baja cantidad de frutos vacíos y precocidad en su entrada en producción, son algunas de las características que definen a este excelente cultivar (COUCEIRO-LÓPEZ *et al.*, 2017).

- **Mateur**

Cultivar seleccionado en 1974 en el INRAT, de porte ramificado y globoso, de gran vigor. Florece desde finales del mes de marzo hasta primeros del mes de abril. El fruto lo tiene de forma alargada y su peso seco en grano es de 1 g. Buen porcentaje de frutos abiertos (70%-90%) y bajo porcentaje de frutos vacíos (5-15%) según condiciones ambientales de cultivo (COUCEIRO-LÓPEZ *et al.*, 2017). Cultivar adaptado a inviernos suaves, sin riesgo de heladas a finales de marzo (400 HF). En Castilla-La Mancha, la maduración se produce a finales del mes de agosto (LÓPEZ, 2006).

- **Aegina**

Su origen se sitúa en Grecia, en la cuenca del Mediterráneo (FERGUSON *et al.*, 1995). De vigor medio, con frutos de tamaño mediano y alargados. Con tendencia baja a la apertura de sus frutos, lo que supone una ventaja a la hora de conseguir frutos más sanos. Es bastante precoz en su entrada en producción. Su porcentaje de producción está cercano al 90%. El peso medio de su fruto seco es de 1 gramo y su grano verdoso posee un excelente sabor. Se considera un cultivar muy productivo con una tendencia a la vecería moderada (COUCEIRO-LÓPEZ *et al.*, 2017).

- **Ashoury o Red Aleppo**

Principal cv. de Siria. De buenas producciones, posee un excelente sabor, moderada vecería, y lenta entrada en producción. El período de floración es de unos 11 días y se inicia a primeros del mes de abril. La recolección tiene lugar a finales del mes de septiembre. La dehiscencia de sus frutos puede llegar al 99%, considerándose el mejor cultivar de Siria en ese aspecto concreto. El porcentaje de vacíos suele estar alrededor del 8%. El peso de fruto seco es de 1,03 g (COUCEIRO-LÓPEZ *et al.*, 2017).

- **Avdat**

Variedad con excelentes cualidades organolépticas y de buen comportamiento productivo en el secado. Sus aromáticos pistachos de tamaño medio podrían ser empleados como materia prima en la elaboración de numerosos productos (GUERRERO-VILLASEÑOR *et al.*, 2004).

- **Napoletana**

Su principal área de producción se centra en Sicilia. De vigor medio y floración tardía, su fruto posee forma alargada, con un tamaño que va desde pequeño a mediano, con un bajo porcentaje de frutos abiertos (<25%) y un 5% de vacíos. El inicio de producción se retrasa considerablemente. El peso seco del grano es de unos 0,48 g. La recolección tiene lugar entre la última semana de agosto y primera de septiembre (COUCEIRO-LÓPEZ *et al.*, 2017).



- **Sfax**

Procede de Túnez. Es un árbol pequeño, con fruto de tamaño pequeño, es poco exigente en horas frío, tiene un vigor medio y una entrada en producción bastante precoz (LÓPEZ, 2006).

- **Variedades masculinas:**

Las variedades masculinas principalmente empleadas y más importantes son Peters y C-especial, aunque existes otras variedades también empleadas con menor impacto.

- **'Peters'**

Polinizante universal. Algunos estudios indican que provendría de una zona cercana a Armenia (FERGUSON *et al.*, 1995). Su floración coincide tanto para las variedades de floración temprana, como Red Aleppo, como para las de floración más tardía como Kerman. Peters es un prolífico productor de polen (LEMUS y NEGRÓN, 2001).

Entre sus características destacan su elevado vigor, buena producción de polen (viable durante tres semanas) y alta precocidad de su producción (COUCEIRO-LÓPEZ *et al.*, 2017). Su antesis suele solapar una parte muy importante del periodo de floración de la variedad Kerman, Napolitana, Sfax, Kastel, etc. (LÓPEZ, 2006).

- **C-especial**

Es una variedad de pistachero de origen griego con precocidad media y vigorosa, muy apreciada por su floración temprana y su gran producción de polen. Es una variedad muy interesante si se desea realizar polinización artificial, ya que su polen puede ser recolectado. Puede ser utilizado como polinizador para las variedades femeninas Larnaka y Mateur.

- **M-38**

Variedad masculina de floración intermedia que ofrece buenos resultados en zonas litorales.

- **Egino**

Polinizador tradicional de la variedad femenina Aegina. De gran vigor.

- **Chaparrillo**

Floración tardía. Adecuado para polinizar variedades con bajas necesidades de horas frío.

- **Guerrero**

De floración muy tardía. Tiene altas necesidades de horas de frío. Adecuado para ampliar el periodo de solape con variedades femeninas tardías.

- **Mateur M.**

Polinizador de la variedad femenina del mismo nombre.



1.6. Enfermedades

Uno de los factores importantes para el desarrollo del cultivo del pistacho son las enfermedades que le afectan, así como su manejo y control. Esto es debido a las mermas en producción y aumento de costes que pueden producir, lo que se traduce en una menor rentabilidad del cultivo. Por este motivo es necesario conocer bien que enfermedades afectan al pistacho y cómo manejarlas a fin de evitar los problemas mencionados.

De todas las enfermedades que afectan al pistacho destacan las causadas por hongos dado que son las más comunes y de mayor importancia. Las principales enfermedades fúngicas que afectan a este cultivo se detallan en la Tabla 6.

De las enfermedades causadas por hongos a continuación se explica más detalladamente la Verticilosis del pistacho, causada por el hongo *Verticillium dahliae* Kleb. Se le confiere mayor importancia en la introducción de este trabajo por ser el agente patógeno identificado y caracterizado, así como por la gravedad que llega a tener esta enfermedad en portainjertos sensibles, ya que es capaz de causar desde un secado parcial hasta un secado total de estos y además, por tratarse de una de las enfermedades más difíciles de controlar (COUCEIRO-LÓPEZ, *et al.*, 2017).

1.6.1. La Verticilosis causada por *Verticillium dahliae* Kleb.

El marchitamiento del pistacho producido por *Verticillium dahliae* Kleb. se distribuye ampliamente en las regiones templadas del mundo y ataca a una amplia variedad de otras especies de plantas, como almendros y nogales. Esta enfermedad es común y a menudo severa en las plantaciones de pistacho con portainjertos susceptibles (TEVIOTDALE *et al.*, 2002).

1.6.1.1. Síntomas

Los síntomas más severos afectan a una o algunas ramas de uno de los lados del árbol, que se marchitan repentinamente al final de la primavera o en el verano y luego mueren. Las hojas en las ramas afectadas pueden caerse o secarse y permanecer en el árbol. Los árboles pueden morir en 1-3 años (TEVIOTDALE *et al.*, 2002).

Los síntomas de decaimiento crónicos en los pistachos son: presencia de hojas de color oscuro, crecimiento pobre de los brotes terminales y copa escasa. Los síntomas a veces incluyen la producción de retoños. Los árboles mueren después de varios años.

En árboles con síntomas de decaimiento, una sección transversal o longitudinal de la madera de una rama afectada generalmente muestra un anillo o segmentos de xilema negro o marrón (TEVIOTDALE *et al.*, 2002).



Tabla 6. Enfermedades producidas por hongos que afectan al pistachero en las zonas templadas. Fuente: TEVIOTDALE *et al.*, 2002.

Enfermedad	Agente/s que la causa/n	Órgano Afectado
Alternaria, Alternariosis	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.:Fr.) Keissl.	Hojas
Armillaria, Podredumbre blanca de raíz	<i>Armillaria mellea</i> (Vahl:Fr.) Kumm.	Raíces Cuello del tronco
Aspergillus	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.; Otras especies de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	Fruto
Botrytis	<i>Botrytis cinerea</i> (Pers.:Fr.); <i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel. (telemorfo)	Flores Brotos
Chancro del Pistachero	<i>Cytospora terebinthi</i> Bres.	Árboles o ramas lesionadas, débiles o estresadas
Chancro del tronco	<i>Botryosphaeria obtusa</i> (Schwein.) Shoemaker.	Tejido vascular del tronco
Decaimiento de la semilla de Pistacho	<i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Eurotium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Trichothecium</i> y <i>Ulocadium</i>	Fruto
Esclerotinia	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary.	Brotos tiernos y hojas
Pudrición del grano	<i>Nematospora coryli</i> Peglion.; <i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary) G. Arnaud	Fruto
Pudrición del cuello o de la raíz	<i>Phytophthora capsici</i> Leonian; <i>Phytophthora citricola</i> Sawada; <i>Phytophthora cryptogea</i> Pethybr. & Laff.; <i>Phytophthora nicotianae</i> Breda de Haan var. <i>parasitica</i> (Dastur) G.M. Waterhouse	Raíz Hojas Ramas
Marchitez de brotes o racimos	<i>Botryosphaeria dothidea</i> (Moug.:Fr.)Ces. & De Not. (syn. <i>B. ribis</i> Gross. & Duggar)	Brotos Racimos
Eutypa	<i>Eutypa lata</i> (Pers.:Fr.) Tul & C. Tul. (<i>Libertella</i> <i>blepharis</i> A. L. Smith, anamorfo)	Tronco y ramas (madera)
Oidio	<i>Oidium</i> spp.; <i>Phyllactinia angulata</i> (E. S. Salmon) S. Blumer <i>Phyllactinia guttata</i> (Wallr.:Fr.) Lev.	Frutos Hojas
Podredumbre de raíz algodonosa	<i>Phymatotrichopsis omnívora</i> (Duggar) Hennebert	Raíz
Phomopsis	<i>Phomopsis</i> sp.	Flores, fruto, brotes y hojas
Rhizoctonia	<i>Rhizoctonia solani</i> Kühn	Hojas, Brotos Plántulas
Podredumbre blanca de raíz	<i>Dematophora necatrix</i> R. Hartig (<i>Rosellinia necatrix</i> Prill. (anamorfo))	Raíz
Roya	<i>Pileolaria terebinthi</i> Castagne (syn. <i>Uromyces terebinthi</i> (DC.) G. Winter)	Hojas, Flores y Frutos
Mancha foliar	<i>Septoria pistacina</i> Allescher (<i>Mycosphaerella</i> <i>pistacina</i> Chitzanidis (anamorfo)); <i>Septoria pistaciarum</i> Caracciolo (<i>Mycosphaerella</i> <i>pistaciarum</i> Chitzanidis (anamorfo)); <i>Septoria pistaciae</i> Desmaz	Hojas Raramente frutos
Verticilosis	<i>Verticillium dahliae</i> Kleb.	Xilema
Pudrición/descomposición de la madera	Filo Basidiomycota, clase Hymenomycetes	Tejido vascular



1.6.1.2. Agente causal

Verticillium dahliae produce conidióforos verticiladamente ramificados y unas estructuras de resistencia denominadas microesclerocios, en cultivo de agar y en el tejido infectado. Los conidióforos tienen tres o cuatro fiálidas en cada locus. Los conidios son hialinos, unicelulares (2-14 x 2-11 μm) y surgen individualmente o en grupos en cada ápice de las fiálidas. Los microesclerocios, que consisten en múltiples células melanizadas agrupadas, de 5-10 μm de diámetro, son de color marrón oscuro a negro y varían en longitud (15 a 100 μm) y forma (alargadas a esféricamente irregulares) (TEVIOTDALE *et al.*, 2002).

La temperatura óptima para el crecimiento del hongo es de 20-22 °C, y se forman microesclerocios a 5-30 °C. El aislamiento del patógeno en árboles expuestos a temperaturas superiores a 30 °C puede ser difícil, ya que el calor con frecuencia dificulta el desarrollo del hongo en la parte aérea del árbol.

1.6.1.3. Ciclo y epidemiología de la enfermedad

Verticillium dahliae está presente, generalmente a bajas concentraciones, en casi todos los suelos en las regiones templadas y subtropicales del mundo. Se desarrolla un nivel de inóculo elevado del patógeno en suelos donde se han plantado cultivos susceptibles, como algodón, tomate, patata, cucurbitáceas, menta y fresa. Una vez enterrados en el suelo, los microesclerocios persisten durante años, liberándose a partir de los restos afectados del cultivo. Los exudados de las raíces de las plantas estimulan la germinación de los microesclerocios cercanos. El hongo penetra a través de las raíces e infecta las células corticales. Las infecciones corticales en las plantas no huéspedes pueden dar como resultado la producción de nuevos microesclerocios, rejuveneciendo así la población residente de *Verticillium*. En un pequeño porcentaje de plantas infectadas, la infección cortical conduce a la invasión del sistema vascular del año en curso, donde *V. dahliae* produce conidios, que son transportados a través de los vasos del xilema hacia el tronco del árbol. La presencia de *V. dahliae* en el xilema interrumpe la conducción de agua y nutrientes. Muchos microesclerocios nuevos se producen en raíces y brotes senescentes infectados (TEVIOTDALE *et al.*, 2002).

El número y la ubicación de los microesclerocios en el suelo de cultivo son factores importantes en la incidencia y severidad de la enfermedad. El marchitamiento por *Verticillium* puede darse de forma significativa en los pistachos sembrados en lugares con un nivel de inóculo en suelo tan bajo como 1 microesclerocio por gramo de suelo. Si el inóculo se limita al perfil superior del suelo, las raíces recién formadas en las profundidades del suelo no se infectarán. Después de un año de cultivo susceptible, puede incrementarse el nivel de inóculo a 60 microesclerocios adicionales por gramo de suelo (peso aire-seco), principalmente en los 15-30 cm superiores. Los microesclerocios sobreviven más tiempo en suelos a 5-15 °C y con capacidades de retención de humedad del 50-75%. El número de microesclerocios disminuye rápidamente cuando la temperatura del suelo supera los 25 °C y en suelos inundados, pero pueden aparecer concentraciones detectables después de varios meses a 30 °C (TEVIOTDALE *et al.*, 2002).

El clima primaveral frío favorece el crecimiento del hongo por todo el xilema. La enfermedad puede desarrollarse a temperaturas de hasta 30 °C y puede ser grave a 28 °C. Las altas temperaturas en verano pueden matar al patógeno en los troncos de pistacho, pero puede sobrevivir en las raíces más frías y ser capaz de reinfectar la planta al año siguiente. Por lo tanto, la infección por *Verticillium* puede ser crónica en los árboles de pistacho.



1.6.1.4. Control

Los cultivos se deben plantar en el suelo con niveles de inóculo muy bajos o nulos. La concentración de *V. dahliae* en el suelo puede determinarse mediante análisis en laboratorios especializados. Si *V. dahliae* está presente, las raíces viejas deben eliminarse y el nivel de inóculo debe reducirse antes de realizar la plantación del cultivo. La solarización del suelo junto con acolchados de plástico aplicados durante varias semanas en verano resulta efectiva. Cuando se reemplaza un árbol muerto en un cultivo establecido, el lugar de plantación puede tratarse primero con solarización (TEVIOTDALE *et al.*, 2002).

Existen bacterias antagonistas capaces de reducir el crecimiento de *V. dahliae* en cultivo in vitro (BERG, G. y BALLIN, G., 1994). Además de bacterias, también existen hongos antagonistas que reducen el crecimiento de *V. dahliae*, destacando entre ellos el de *Trichoderma spp.* Este hongo antagonista es capaz de reducir la severidad de la verticilosis en olivo en campo al emplearlo en combinación con la solarización. Con esta aplicación combinada de *Trichoderma spp.* y solarización se consigue una mayor reducción de la severidad de la enfermedad que si se aplicara tan solo la solarización o la solarización combinada con biofumigación (OTERO, M.L. *et al.*, 2014).

Los portainjertos resistentes controlan con éxito la enfermedad en los cultivos de pistacho. *Pistacia integerrima* cv. Pioneer Gold es resistente a *Verticillium*. UCB-1 (*P. atlantica* x *P. integerrima*), que es tolerante al frío, es ligeramente menos resistente que Pioneer Gold. *P. atlantica* y *P. terebinthus* son susceptibles a la marchitez producida por *Verticillium*.

Verticillium dahliae se reproduce en las raíces de la mayoría de las plantas dicotiledóneas, por lo que el control de las malas hierbas puede ser una práctica cultural importante, particularmente el control de plantas solanáceas. Hay que evitar mover la tierra infestada con los arados y otros equipos que puede causar la contaminación del suelo más profundo.

La marchitez por *Verticillium* es más grave en los árboles de pistacho con deficiencia de potasio (0.5-0.8% de potasio en las hojas en pleno verano) y en los años cuando la carga del cultivo es alta (TEVIOTDALE *et al.*, 2002).



2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es realizar el diagnóstico de muestras de plantas de pistacho procedentes de Biar (Alicante) que presentaban síntomas tanto de marchitez como de decaimiento progresivo y en las que se sospechaba la posible infección por el hongo del suelo *Verticillium dahliae*.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Parcelas estudiadas

Las parcelas en las que se detectaron los síntomas de Verticilosis se encuentran en la localidad de Biar, al noroeste de la provincia de Alicante. Concretamente en el Polígono 12, Parcelas 154 y 216, EL PLA. En la Figura 4 se muestra la localización de estas parcelas.

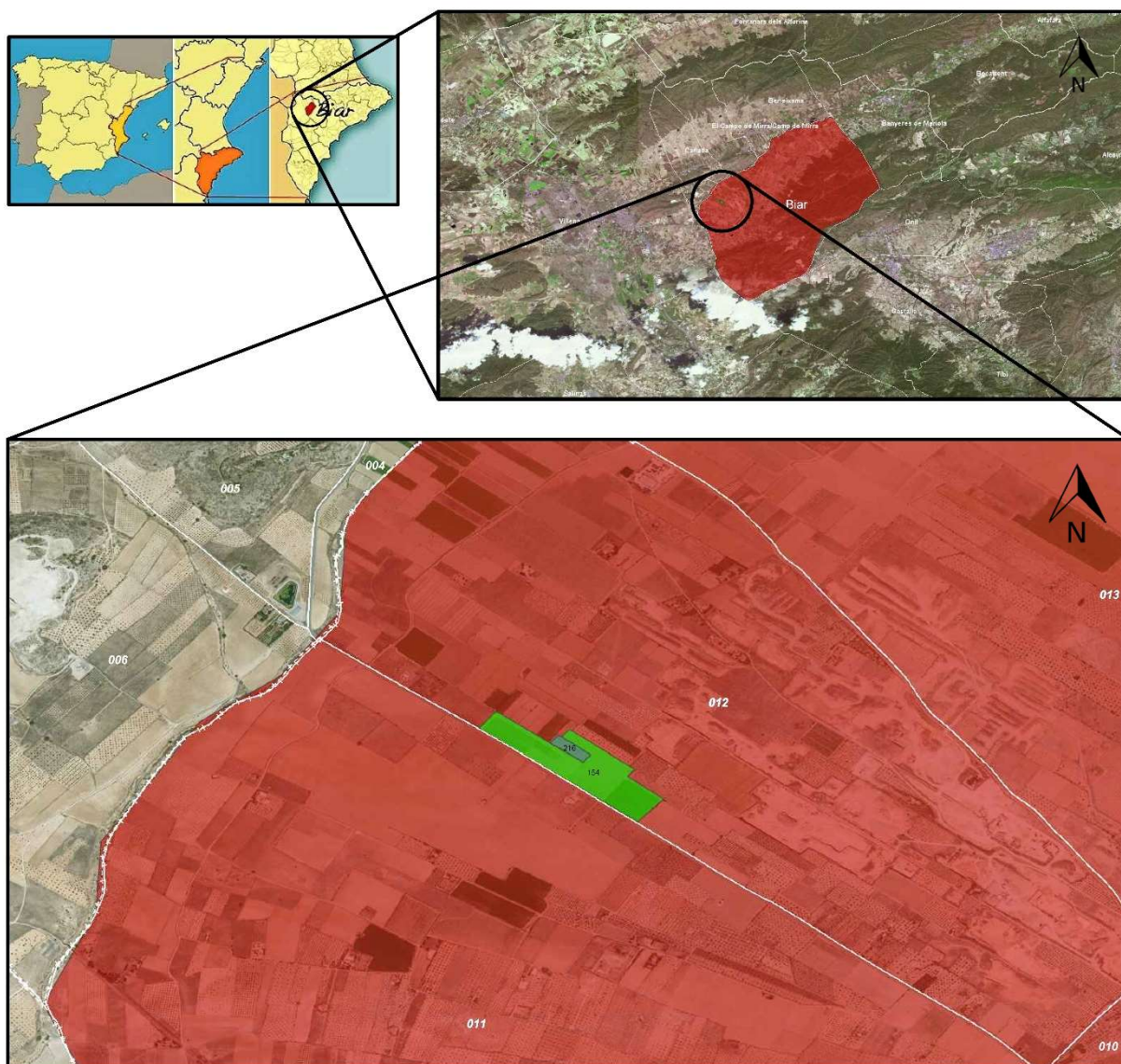


Figura 4. Situación y emplazamiento de las parcelas muestreadas. Fuente: Elaboración propia.

Se trata de dos parcelas de regadío, cultivadas conjuntamente como una sola y en las que se habían realizado plantaciones de cultivos hortícolas tales como cardo, patata, apio, etc. durante los últimos 15 años (Figura 5), hasta que en el año 2015 se llevó a cabo la plantación del cultivo de pistachos. Anteriormente estas parcelas también habían estado en barbecho en períodos de tiempo entre cultivos.

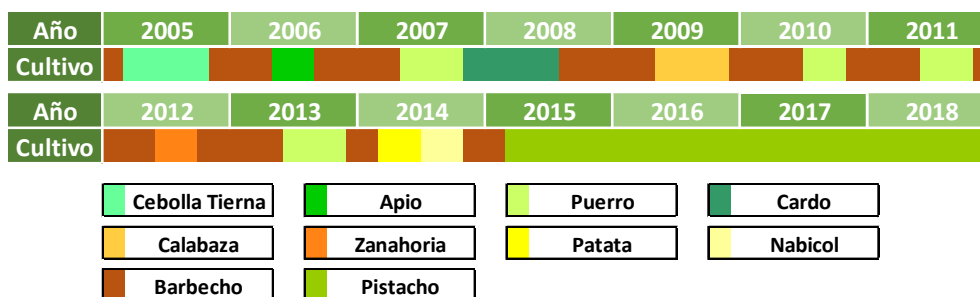


Figura 5. Historial de cultivos en las parcelas muestreadas. Fuente: Elaboración propia

Respecto al caso concreto del cultivo del pistacho, en marzo del año 2015 se trasplantaron los patrones del cultivo a las parcelas, que eran *Pistacia terebinthus* sin estar injertados. Puesto que el trasplante de los árboles se realizó con patrones sin injertar, en los meses de julio y agosto de los años posteriores se realizaron los injertos en campo de las distintas variedades de *Pistacia vera* (Tabla 7), hasta la actualidad.

Tabla 7. Cultivares empleados en las parcelas muestreadas. Fuente: Elaboración propia.

Variedades Hembra	<i>P. vera</i> cv. Sirora	<i>P. vera</i> cv. Larnaka	<i>P. vera</i> cv. Kerman
Variedades Macho	<i>P. vera</i> cv. C-especial		<i>P. vera</i> cv. Peters
Portainjertos	<i>P. terebinthus</i>		

3.2. Sintomatología de la enfermedad y toma de muestras

En el año 2015 no se realizaron los injertos de las variedades, ya que sirvió para el establecimiento de los patrones en campo, pero ya en el mes de junio se observaron pequeños síntomas iniciales de enfermedad de forma puntual en algunas plantas.

Al observar estos síntomas de enfermedad se decidió realizar un seguimiento de las parcelas con el objetivo de conocer si los mismos continuaban apareciendo, si se detectaban en nuevos árboles y en qué momento, además de estimar visualmente con qué nivel de severidad se daban.

Para ello, se optó por visitar las parcelas semanalmente a excepción de los meses de invierno, en los que el cultivo no tiene hojas, puesto que la enfermedad a priori solo mostraba síntomas que afectaban a la parte aérea. En cada visita se realizaba una inspección visual de forma general por las parcelas en la que se tenía en cuenta cualquier anomalía que se apreciara en el crecimiento, coloración o desarrollo de las plantas. Así como, crecimiento pobre de brotes terminales, marchitamiento o secado repentino de ramas y brotes, deformación o enrollamiento de hojas, oscurecimiento y necrosis en hojas, defoliación y/o disecado de las mismas, muerte repentina del árbol y crecimiento de retoños.

El seguimiento visual de las parcelas se realizó durante los años 2015, 2016 y 2017. Durante los meses de verano de todos los años se observaron síntomas de enfermedad siendo cada vez más acentuados. Por ello, en junio de 2017 se decidió determinar el agente causal de la enfermedad, puesto que ésta empezaba a suponer un riesgo para el desarrollo del cultivo y su rentabilidad.

Para ello, en primer lugar se realizó una recopilación documentada de los síntomas observados en campo el día 21 de junio de este año mediante la realización de fotografías de los mismos.



Una vez fotografiados todos los síntomas, el día 11 del mes julio se tomaron muestras representativas de material vegetal de árboles sintomáticos tanto en ejemplares que solo constaban de portainjertos como en árboles ya injertados con el cultivar en desarrollo. En la toma de muestras se recogieron ramas, brotes, troncos y arboles enteros, puesto que no eran de gran tamaño, siempre tratando que la muestra constara de material vegetal sintomático y parte del material vegetal contiguo asintomático. Las muestras fueron guardadas en bolsas de plástico, etiquetadas y llevadas a laboratorio donde se conservaron en el frigorífico para su posterior análisis. En el etiquetado de las muestras en campo se le asignó un número de referencia a cada muestra que permite conocer su ubicación en campo y con ello identificar a qué árbol pertenece, si es una muestra de *P. terebinthus* o si es de *P. vera* y a qué cultivar pertenece.

La dificultad que presenta este cultivo a la hora de ser injertado, ya que cada año tan solo un 30% aproximadamente de los arboles era injertado con éxito, es el motivo por el cual han sido necesarios varios años para realizar el injerto de la plantación. Además, este bajo porcentaje de éxito en el injerto también explica la situación de la parcela en el momento de la toma de muestras, con un 33% de árboles injertados con éxito y un 67% de árboles todavía solo con el patrón distribuidos de forma irregular por la misma, véase Figura 6, ya que las plantas solo habían sido injertadas en el año 2016.



Figura 6. Distribución de los distintos cultivares y portainjertos en las parcelas en junio del 2017.
Fuente: Elaboración propia.

3.3. Aislamientos

Para el estudio de las muestras de material vegetal (ramas) en laboratorio, en primer lugar, se realizó una inspección visual de las mismas. Con ella se realizaba una primera selección, más general, de las zonas de las ramas que eran de interés, descartando las zonas más afectadas o secas de las ramas y se seleccionaban las contiguas a éstas, ya que en ellas el hongo está más activo. Después, con la ayuda de unas tijeras de podar se realizaron cortes transversales en las ramas desde las partes más sanas hacia la zona seleccionada, buscando zonas necrosadas en el tejido vascular. Además, si se observaba oscurecimiento también se realizaban cortes longitudinales a fin de observar mejor en qué partes de la rama se encontraba éste. Después, se cortaron trozos de 1 a 2 cm de grosor y unos 5 cm de longitud que se utilizaron para el proceso de aislamiento fúngico. Una vez seleccionado el material vegetal más adecuado se realizaron fotografías, y se le asignaba un número de muestra de laboratorio, se anotaba el código de origen, hospedante, el lugar de procedencia, la fecha de recepción, síntomas y la especie a la que pertenecía dentro del género *Pistacia*.

3.3.1. Proceso de aislamiento fúngico

El siguiente paso fue la desinfección externa de los trozos seleccionados mediante la técnica de flameado. Para ello en la cámara de flujo laminar y tras la desinfección de las manos y utensilios con alcohol al 70% los fragmentos seleccionados de cada muestra se sumergían en una bandeja con alcohol. Una vez que estaban bien empapados se sacaban de la bandeja con la ayuda de unas pinzas y se flameaban hasta que se consumía el alcohol y se depositaban en papel estéril.

A continuación, el material previamente desinfectado se cortaba longitudinalmente en láminas finas y se seleccionaban las zonas del tejido vascular que estaban necrosadas, de 1 a 2 mm² aproximadamente y se sembraban en placas de medio patata dextrosa agar (PDA) (Biokar-Diagnostics, Zac de Ther, France) (39 g de polvo de patata-dextrosa-agar; 1 L de agua destilada) al que se añadía 0,5 g de sulfato de estreptomycin (PDAS). Por cada muestra se hacían tres repeticiones sembrando 3 placas con 7 fragmentos equidistantes en cada una que posteriormente se introducían en la estufa a 20 °C en oscuridad durante 10 días. Más tarde las placas se revisaban regularmente hasta que se apreciara crecimiento fúngico.

Las diferentes colonias resultantes de la siembra se repicaban a medio PDA y se incubaban de nuevo a 20 °C durante al menos 15 días para su posterior identificación morfológica y/o molecular.

3.4. Caracterización del agente causal

3.4.1. Observación al microscopio

Las colonias de *V. dahliae* fueron identificadas a través de la observación del aspecto de las colonias en las placas de medio de cultivo PDA y mediante preparaciones microscópicas para la observación de las estructuras vegetativas y reproductivas producidas en el medio de cultivo.

Para la observación en microscopio, se colocaron fragmentos de micelio en portaobjetos de cristal con una gota de agua destilada y se cubría con un cubreobjetos.



3.4.2. Caracterización molecular

Para llevar a cabo la extracción de ADN de los aislados seleccionados se utilizó el kit E.Z.N.A Plant Miniprep Kit (Omega Bio-Tek, Norcross, GA). En primer lugar, se tomaron fragmentos de micelio crecido sobre medio de cultivo PDA mediante raspado con una espátula y se introdujeron en tubos de 2 ml. En cada tubo se añadieron 6 bolas de acero de 2,38 mm de diámetro y 650 µl de tampón P1. A continuación, las muestras en los tubos se homogeneizaron en un equipo FastPrep-24TM5G (MP Biomedicals, California, USA) a una velocidad de 6 m/s durante 40 s, con el objetivo de facilitar la rotura de los tejidos. Se continuó con el protocolo de extracción a partir del producto obtenido de la homogeneización siguiendo las instrucciones del fabricante del kit. Finalmente, el producto de la extracción se cuantificó mediante el uso de un espectrofotómetro (ND-1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).

Los aislados seleccionados se caracterizaron mediante PCR utilizando los cebadores DB19/DB22 que amplifican una secuencia polimórfica específica de *V. dahliae* de 539-523 pb (Mercado-Blanco *et al.*, 2003). Como controles positivos se utilizaron dos aislados de *V. dahliae* (VD17 y VD52) previamente caracterizados y conservados en la colección del Grupo de Investigación en Hongos Fitopatógenos (Instituto Agroforestal Mediterráneo-UPV). Las mezclas de reacción de amplificación fueron (25 µl de volumen total): 20 ng de ADN fúngico, 100 nM de cada cebador, 200 nM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂, 2,5 µl de tampón de reacción 10x y 0,75 U de Taq polimerasa. Las condiciones de amplificación fueron: 94°C 3 min, 30 ciclos de 94°C 1 min, 64°C 1 min y 72°C 1 min, y un paso de extensión final de 6 min a 72°C. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Peltier Thermal Cycler-200 (MJ Research, Waltham, MA).

Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis (PS 304 Minipac II, Apelex) en geles de agarosa al 1,5% (agarose D-1 Low EEO; Conda, Madrid, España), que se tiñeron con REALSAFE (REALSAFE nucleic acid staining solution 20.000x, REAL) y fueron visualizados bajo luz UV en un transiluminador. Como marcador de pesos molecular de referencia se utilizó el Gene-ruler 100-bp DNA ladder plus (0,5 µg/µl) (Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania).

3.5. Ensayo de patogenicidad: confirmación de los postulados de Koch-Pasteur

Con el fin de confirmar la patogenicidad de los aislados de *V. dahliae* obtenidos, se procedió a la inoculación de una selección en plántulas de *P. terebinthus*.

Para la obtención de las plántulas de *P. terebinthus* se sembraron semillas certificadas. Para ello, en primer lugar, las semillas se desinfectaron superficialmente con hipoclorito sódico (1,5% de cloro activo) durante 1 minuto, dando posteriormente dos lavados en agua esterilizada para eliminar los restos de hipoclorito.

Dado que las semillas de *P. terebinthus* tienen latencia exógena física, se procedió a realizar un escarificado de las mismas mediante el lijado de la cubierta con la ayuda de una lima previamente desinfectada con alcohol al 70%. Tras este proceso las semillas se pusieron en una gasa humedecida con agua estéril manteniéndolas de este modo hasta el inicio de la germinación.

Cuando las semillas comenzaron la germinación, se sembraron individualmente en macetas con turba. Estas macetas se llevaron a invernadero y se regaron periódicamente.



Cuando las plantas tuvieron al menos 4 hojas verdaderas se procedió a la inoculación de las mismas, utilizándose 10 plantas para cada aislado y para el control.

El ensayo se realizó con cuatro aislados de *V. dahliae* procedentes de distintas muestras. Tres de los aislados eran procedentes de muestras de la parcela de pistachos de este estudio, concretamente de las muestras 3298, 3300 y 3301, siendo las dos primeras muestras de *P. terebinthus* y la última de *P. vera*. El cuarto aislado, que se utilizó a efectos de comparación, se obtuvo de la colección de hongos del Grupo de Investigación en Hongos Fitopatógenos del Instituto Agroforestal Mediterráneo de la UPV, y procedía de árboles de almendro (*Prunus dulcis*) en la provincia de Tarragona. La inoculación se realizó mediante una suspensión de conidios. Para ello se hizo crecer cada uno de los aislados de *V. dahliae* en placas Petri en medio nutritivo PDA y en las mismas condiciones señaladas para la identificación, hasta que el hongo ocupara toda la placa y esporulara.

Posteriormente, en una cámara de flujo laminar se añadió agua estéril a las placas Petri correspondientes a cada aislado y se rasparon superficialmente para que se soltaran todos los conidios. Una vez obtenida la suspensión, se procedía al conteo de los conidios con cámara Thoma, ajustando la suspensión a 10^6 conidios/ml.

Para la inoculación de las plantas se utilizaron 10 ml de la suspensión de conidios previamente preparada, que se aportaron directamente a la turba de la maceta alrededor del cuello de la planta con una pipeta. Los controles se regaron con 10 ml de agua estéril, sin la presencia del hongo. Las plantas se dejaron crecer en cámara de cultivo a 20-25 °C con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad durante 135 días.

Tras la inoculación, se efectuó un seguimiento secuencial de las plantas para detectar los posibles síntomas causados por el patógeno durante los meses de cultivo en cámara. Para ello, se evaluaron quincenalmente todas las plantas durante 135 días.

Esta evaluación de la severidad de los síntomas se realizó con cada una de las plantas y consistió en la valoración de los mismos mediante el uso de la siguiente escala del 0 al 4:

0- Plántula sana / Síntomas no presentes.

1- Síntomas muy iniciales de marchitez / Hojas permanecen unidas a planta / Ligeramente pérdida de turgencia en las hojas.

2- Síntomas intermedios de marchitez / Algunas hojas están secas / Síntomas prominentes de pérdida de turgencia en la mayoría de las hojas / Algunas hojas se han caído.

3- Caída abundante de hojas / Toda la plántula se está marchitando.

4- La plántula ha muerto / todas las hojas se han secado y/o se han caído.

Además de la valoración de cada una de las plantas con la escala mencionada se anotaban, en caso de ser necesario, datos o comentarios relevantes acerca de su estado y se completaba la documentación de la situación de las mismas mediante la realización de fotografías.

Una vez las plantas inoculadas presentaban claros síntomas de haber desarrollado la enfermedad en comparación con el estado de las plantas control, se arrancaron con cuidado.



Las plantas arrancadas se lavaron con agua a fin de eliminar la tierra que tenían pegada y con cuidado de no romper las raíces. Cuando estaban limpias se procedió a la desinfección externa de las mismas, para ello se introdujeron en un baño con hipoclorito sódico (1,5 % de cloro activo) durante 1 minuto, seguido de dos baños en agua estéril.

Tras la desinfección, se procedió al reislamiento del hongo siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente. Las diferentes colonias resultantes de la siembra se repicaban a medio PDA y se incubaban de nuevo a 20 °C durante al menos 15 días para su posterior identificación morfológica y/o molecular. De este modo se comprobó el cumplimiento de los Postulados de Koch-Pasteur.

Trascurridos los 5 meses de cultivo en cámara de las plantas inoculadas, con los datos obtenidos durante el seguimiento y con objeto de determinar cómo fue la evolución de la enfermedad y cuál fue su severidad, se construyó la curva de progresión de la enfermedad y se calculó el Área bajo la Curva de Progresión de la Enfermedad (AUDPC).

Para elaborar la curva de progresión de la enfermedad, en primer lugar, fue necesario calcular para cada fecha de toma de datos el valor medio de la evaluación realizada a las 10 plantas inoculadas de cada uno de los cuatro aislados utilizados en la inoculación. Después, se realizó una representación gráfica a lo largo del tiempo de cada uno de los valores medios de severidad obtenidos para cada uno de los aislados, obteniendo así la curva de progresión de la enfermedad para cada aislado.

Finalmente se calculó el Área bajo la Curva de Progresión de la Enfermedad (AUDPC). El AUDPC se calculó para todos los valores medios obtenidos en la evaluación de cada aislado de acuerdo con la siguiente función (SHANER, G. y FINNEY, R.E., 1977):

$$A. U. D. P. C. = \sum_i^{n-1} \left[\left\{ \frac{Y_i + Y_{(i+1)}}{2} \right\} x (t_{(i+1)} - t_i) \right]$$

Donde: Y_i = severidad de la enfermedad en la fecha i ; t_i = día i ; n = número de fechas en las que se evaluaron los síntomas en las plantas inoculadas con *V. dahliae*.



4. RESULTADOS

4.1. Seguimiento de parcelas y descripción de los síntomas

Los síntomas observados en campo en las primeras visitas del seguimiento de las parcelas fueron similares a los observados en las visitas posteriores, aunque claramente en progresión, puesto que cada vez eran más severos (afectaban a un número mayor de árboles y en ellos a un mayor número de ramas).

Los primeros síntomas en campo fueron detectados en junio del año 2015. Éstos fueron iguales a los observados en los meses posteriores de ese mismo año y consistían en deformación o enrollamiento de hojas, oscurecimiento y necrosis en algunas hojas aisladas y pequeños brotes con necrosis y/o desecación total o parcial repentinos. En este caso, el número de plantas afectadas en las parcelas era muy bajo y la superficie foliar sintomática en cada una de ellas era muy pequeña. Por ello, y puesto que en septiembre cesó la aparición de los síntomas no se le dio mucha importancia y se decidió no realizar ninguna acción sobre los mismos, salvo continuar con el seguimiento de las parcelas a modo de vigilancia. Con la caída de las hojas se dejó de realizar el seguimiento temporalmente.

En la primavera del año 2016 se retomó el seguimiento al comenzar la brotación de los árboles. Éstos brotaron y crecieron con normalidad hasta que en el mes de junio se volvieron a detectar los síntomas del año anterior tanto en las plantas que ya habían sido afectadas como en otras nuevas, siendo esta vez más graves. En esta ocasión se observó de nuevo deformación o enrollamiento de hojas, oscurecimiento y necrosis en hojas y pequeños brotes con necrosis y/o desecación total o parcial repentinos. Los síntomas este año afectaban a una mayor superficie foliar de las plantas, llegando incluso a afectar a ramas enteras, marchitándolas y secándolas de forma repentina. Conforme avanzaban los meses de verano aumentaba el número de ejemplares afectados y la gravedad de los síntomas, llegando a finales del mes de julio y principio del de agosto (época más calurosa del año en la zona) a secarse tres árboles enteros de forma repentina. De nuevo en el mes de septiembre cesó la aparición de síntomas, a pesar de que el número de plantas afectadas en las parcelas era mayor que en el año anterior, al igual que la superficie foliar afectada en cada planta sintomática. A pesar de que los síntomas afectaban en mayor medida al cultivo no llegaban a comprometer la rentabilidad del mismo, por lo que se decidió continuar con el seguimiento de la parcela. Con la caída de las hojas se dejó de realizar el seguimiento temporalmente.

En el año 2017 se retomó el seguimiento de las parcelas al comenzar la brotación de los árboles en la primavera. En este momento se observó que algunos de los árboles que habían muerto anteriormente rebrotaron por la parte basal del tronco. Llegado el mes de junio se observó nuevamente deformación o enrollamiento de hojas; oscurecimiento y necrosis en hojas; brotes y ramas que se marchitaban y necrosaban de forma total o parcial repentinamente y muertes de árboles. A diferencia de los años anteriores, en el año 2017 los síntomas estaban mucho más extendidos por la parcela afectando a un gran número de ejemplares diseminados por la explotación. También se daban los síntomas de forma más severa, produciendo ya en el mes de junio muerte de árboles y secándose gran cantidad de ramas enteras, por lo que todos los ejemplares sintomáticos resultaban estar afectados en mayor gravedad que años anteriores.

En la Figura 7 se pueden ver fotografías representativas de los diferentes tipos de síntomas observados en el año 2017.



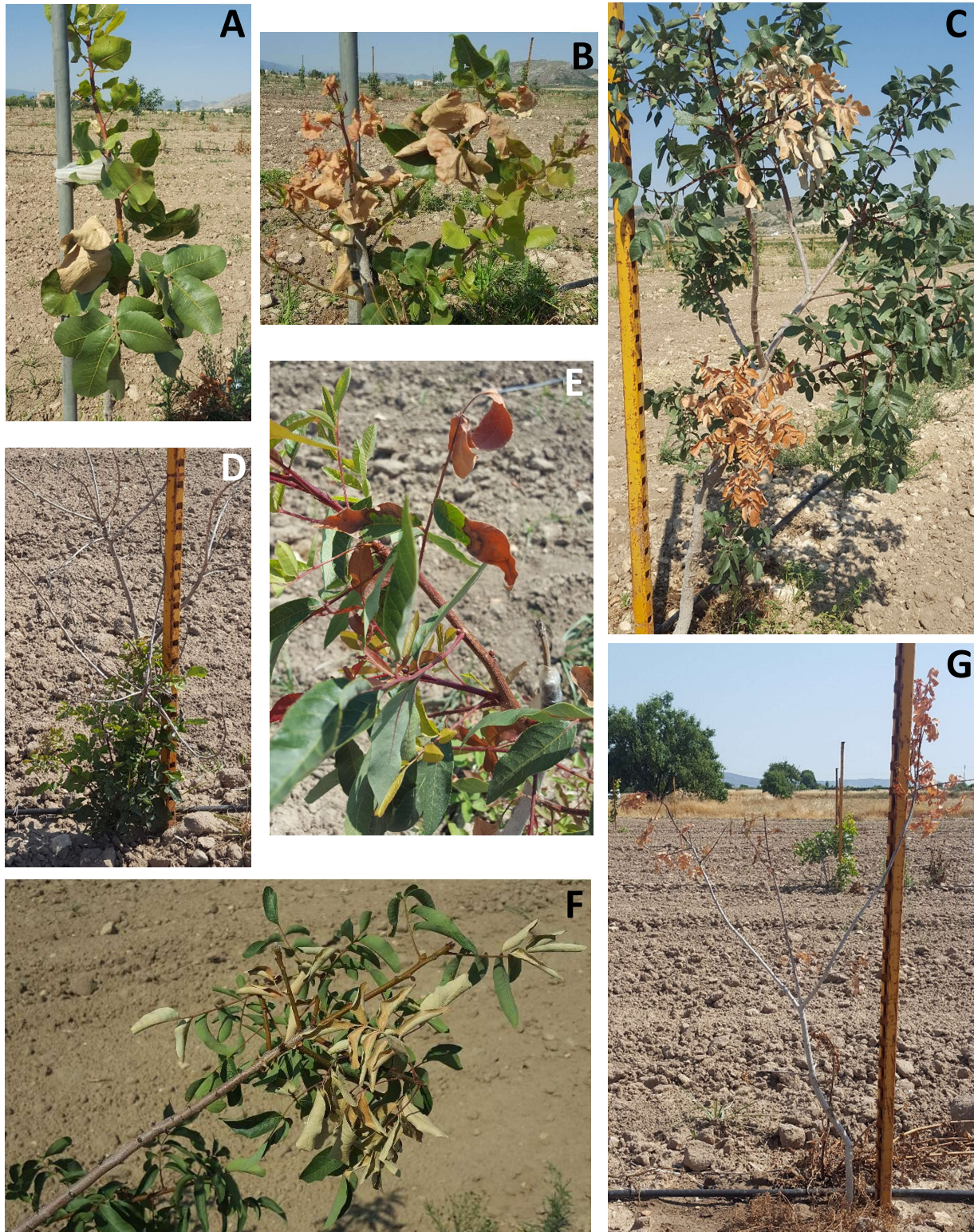


Figura 7. Síntomas en la parte aérea de *P. vera* y *P. terebinthus*.

A: Hojas necrosadas y desecadas de forma aislada con enrollamiento y deformación en *Pistacia vera*. **B:** Brote de *P. vera* desecado de forma repentina con hojas necrosadas y deformadas. **C:** Brote y rama de *P. terebinthus* desecados de forma repentina y aislada. **D:** Planta de *P. terebinthus* muerta el año anterior y rebrotada por la zona basal del tronco. **E:** Hojas de *P. terebinthus* con necrosis, oscurecimiento y enrollamiento. **F:** Marchitamiento inicial de rama con necrosis, deformación y enrollamiento de hojas en *P. terebinthus*. **G:** Árbol de *P. terebinthus* muerto de forma repentina con hojas completamente secas.

4.2. Aislamiento de *Verticillium dahliae*

En total se tomaron 13 muestras representativas de material vegetal de árboles sintomáticos, siendo 9 de ellas de ejemplares que solo constaban del portainjertos *P. terebinthus* y 4 de ellas de árboles injertados con el cultivar de *P. vera* en desarrollo. Para su estudio, y procediendo del modo indicado en el apartado aislamientos de Materiales y Métodos, se realizaron tanto cortes transversales como longitudinales a las ramas de las muestras.

Al realizar los cortes transversales se observó el interior de las ramas, pudiendo distinguir en ellas el tejido vascular (xilema) parcialmente oscurecido tanto en forma de puntos aislados como en forma de líneas curvas concéntricas. Igualmente, en los cortes longitudinales también se observó necrosis parcial interna. Esta vez se observó que la zona oscurecida se disponía tanto en pequeños puntos como en grandes zonas lineales que se extendían principalmente a lo largo del interior de la rama.

Asimismo, se observó que en los casos en los que al realizar los cortes transversales se veían zonas oscurecidas, al efectuar en la misma parte de la rama un corte longitudinal la zona afectada era mucho mayor, no sucediendo al contrario. Es decir, la superficie necrosada se extendía principalmente de forma longitudinal y no tanto transversal.

Por tanto, se observó que las muestras presentaban necrosis interna del haz vascular en forma de oscurecimiento, que comenzaba en pequeños puntos y se extendía principalmente a lo largo de la rama a través del tejido vascular. En la Figura 8 se muestran imágenes de tejido vascular necrosado observado mediante los cortes realizados a las muestras.



Figura 8. Cortes transversales y longitudinales del material vegetal.

H: Necrosis de tejido vascular observada en corte longitudinal poco profundo y dispuesta de forma lineal a lo largo de la rama. **I:** Corte transversal con necrosis parcial del xilema. El oscurecimiento de la necrosis se observa principalmente en forma de líneas curvas concéntricas, aunque también en forma de puntos. **J:** Corte longitudinal, realizado por la mitad de una rama, con tejido vascular parcialmente necrosado. El oscurecimiento del tejido debido a la necrosis se dispone en forma de líneas a lo largo de la rama.

Tras este primer estudio visual de las muestras, y procediendo tal y como se describe en el apartado de aislamientos en Material y Métodos, se seleccionaron fragmentos del material vegetal más adecuado de las zonas necrosadas con cada una de las muestras y con estos se llevó a cabo el aislamiento fúngico. Del aislamiento fúngico realizado a todas las muestras se obtuvieron colonias de *V. dahliae*. A continuación, se muestra el resultado del aislamiento en la Tabla 8 para las 13 muestras analizadas.

Tabla 8. Resultado del aislamiento de *Verticillium dahliae* en 13 muestras de la parcela de estudio. Fuente: Elaboración propia

Código Muestra	Hospedante	Aislamiento <i>V. dahliae</i>	% Aislamiento*			
			R. 1	R. 2	R. 3	Total
3296	<i>Pistacea vera</i>	-	0/7	0/7	0/7	0/21
3297	<i>P. terebinthus</i>	+	2/7	4/7	6/7	12/21
3298	<i>P. terebinthus</i>	+	7/7	7/7	7/7	21/21
3299	<i>P. terebinthus</i>	-	0/7	0/7	0/7	0/21
3300	<i>P. terebinthus</i>	+	2/7	3/7	1/7	6/21
3301	<i>P. vera</i>	+	4/7	6/7	3/7	13/21
3302	<i>P. terebinthus</i>	+	3/7	2/7	2/7	7/21
3303	<i>P. vera</i>	+	5/7	1/7	4/7	10/21
3304	<i>P. terebinthus</i>	+	4/7	5/7	5/7	14/21
3305	<i>P. terebinthus</i>	+	0/7	0/7	1/7	1/21
3306	<i>P. vera</i>	+	0/7	5/7	4/7	9/21
3307	<i>P. terebinthus</i>	+	0/7	1/7	0/7	1/21
3308	<i>P. terebinthus</i>	+	1/7	1/7	1/7	3/21

* N° de puntos de aislamiento positivo/N° total de puntos de aislamiento
R.: Repetición de la muestra

Del total de 13 muestras, 11 fueron positivas y 2 negativas para el aislamiento de *V. dahliae*. De las dos negativas la muestra 3296 pertenece a *P. vera* y la 3299 a *P. terebinthus*. Cabe destacar que la muestra 3298 es la que presentó un mayor número de puntos de aislamientos positivos con 21 puntos positivos de 21 puntos de aislamiento seguida de la muestra 3304 con 14 puntos positivos de 21 puntos de aislamiento. Ambas muestras eran de *P. terebinthus*. A continuación, se encuentra la muestra 3301 destacando por ser la muestra proveniente de un ejemplar de *P. vera* con mayor número de puntos de aislamiento positivos (13 de un total de 21). La siguiente muestra con más puntos de aislamiento positivos fue la 3297 de *P. terebinthus* con 12 puntos positivos de 21. Después se encuentran dos muestras de *P. vera*, la 3303 y la 3306, con 10 y 9 puntos de aislamiento positivos, respectivamente. El resto de muestras eran de *P. terebinthus* y tienen desde los 7 y 6 puntos positivos de aislamiento de las muestras 3302 y 3300 respectivamente, pasando por los 3 puntos de la muestra 3308, hasta tan solo 1 punto de aislamiento positivo en las muestras 3305 y 3307.



4.3. Confirmación morfológica y molecular de la identificación de *V. dahliae*.

La identificación morfológica de las colonias como *V. dahliae* se realizó tanto con la observación del aspecto de las colonias en las placas de medio de cultivo PDA, como a través de preparaciones microscópicas.

En la observación del aspecto de las colonias en las placas de medio de cultivo PDA, se confirmó la identificación de las colonias de *V. dahliae*. Esto es debido a que, al observar las colonias, se vieron las características típicas del cultivo puro de *V. dahliae* como son: el crecimiento de micelio algodonoso blanco al principio de su desarrollo y posteriormente el oscurecimiento de la colonia, debido a la aparición de microesclerocios oscuros como se puede ver en la Figura 9.



Figura 9. Colonia de *V. dahliae* en placa de medio de cultivo PDA.

También se confirmó la identificación de las colonias como aislados de *V. dahliae* mediante preparaciones microscópicas de las mismas. En ellas se observaron las características de las estructuras vegetativas y reproductivas producidas que identifican a *V. dahliae* en medio de cultivo puro.

Dichas características identificativas de *V. dahliae* observadas que confirmaron la identificación de las colonias son: la producción de conidióforos ramificados con disposición verticilada y la presencia de abundantes microesclerocios pigmentados. Los conidios eran hialinos, unicelulares (2-14 x 2-11 μm) y se producían individualmente o en grupos en cada ápice de las fiálidas. Los microesclerocios se mostraban como agrupaciones de células esféricas, de 5-10 μm de diámetro, de color marrón oscuro a negro y cuya longitud (de 15 a 100 μm) y con forma variable.

Además, en la caracterización molecular todos los aislados amplificaron el tamaño de banda esperado de 539-523 pb confirmando así su identidad como *V. dahliae*.

4.4. Ensayo de patogenicidad

Los resultados obtenidos del seguimiento de la progresión de la enfermedad en los plantones inoculados con *V. dahliae* se muestran en la Tabla 9. En dicha tabla, se puede ver el valor medio de severidad de la enfermedad causada por cada uno de los aislados inoculados en cada una de las evaluaciones realizadas y a los 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 y 135 días después de la inoculación de las plantas. El valor medio de severidad de la enfermedad para cada aislado y fecha de lectura corresponde a la media de las 10 repeticiones (plantas inoculadas). Además, también se recoge en la tabla el valor medio de las 4 muestras en cada evaluación. Para la evaluación se empleó la escala con valores comprendidos entre el 0 y el 4 explicada en el apartado de Material y Métodos.

Tabla 9. Evaluación media de la severidad de *V. dahliae* en las plantas inoculadas a lo largo del tiempo. Fuente: Elaboración propia

AISLADO	Días después de la inoculación									
	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135
3298 (<i>P. terebinthus</i>)	0,0	0,1	0,5	1,2	1,5	1,7	2,0	2,2	2,7	2,8
3198 (Almendro)	0,0	0,0	0,5	1,2	1,7	1,9	2,0	2,5	2,9	3,0
3301 (<i>P. vera</i>)	0,0	0,0	0,5	1,4	2,1	2,5	2,7	2,8	3,1	3,2
3300 (<i>P. terebinthus</i>)	0,0	0,0	0,5	1,6	2,0	2,3	2,5	2,7	2,7	2,9
\bar{X}	0,0	0,0	0,5	1,4	1,8	2,1	2,3	2,6	2,9	3,0

El aislado que causó una mayor severidad de enfermedad al finalizar el periodo de seguimiento de las plantas inoculadas fue el 3301 con un valor medio de 3,2. Este fue seguido del aislado 3198, con un valor medio de severidad de 3,0 en ese mismo momento. A continuación, se encontró el aislado 3300 con una severidad final de 2,9 y, por último, con un valor de 2,8 el aislado 3298. Todos los aislados mostraron valores similares para cada día de evaluación, siendo estos mayores cuantos más días transcurrían tras la inoculación y alcanzando en el último día de evaluación en todos los casos valores cercanos a 3.

Mediante la representación de los valores medios de severidad para cada aislado frente al tiempo transcurrido desde la inoculación se obtuvo la curva de progresión de la enfermedad como se puede ver en la Figura 10. Además, se elaboró la Figura 11, en la que se representan conjuntamente las 4 curvas de progresión de la enfermedad obtenidas para los aislados y la media de las mismas.

Para el aislado 3198 perteneciente una muestra de almendro no aparecieron síntomas en los primeros 15 días. Los primeros síntomas aparecieron 30 días después de la inoculación con un valor medio de severidad de 0,5. A partir de este momento la enfermedad evolucionó en las plantas inoculadas, apareciendo progresivamente más síntomas hasta que finalmente en la última evaluación realizada a los 135 días después de la inoculación adquirieron un valor de 3.



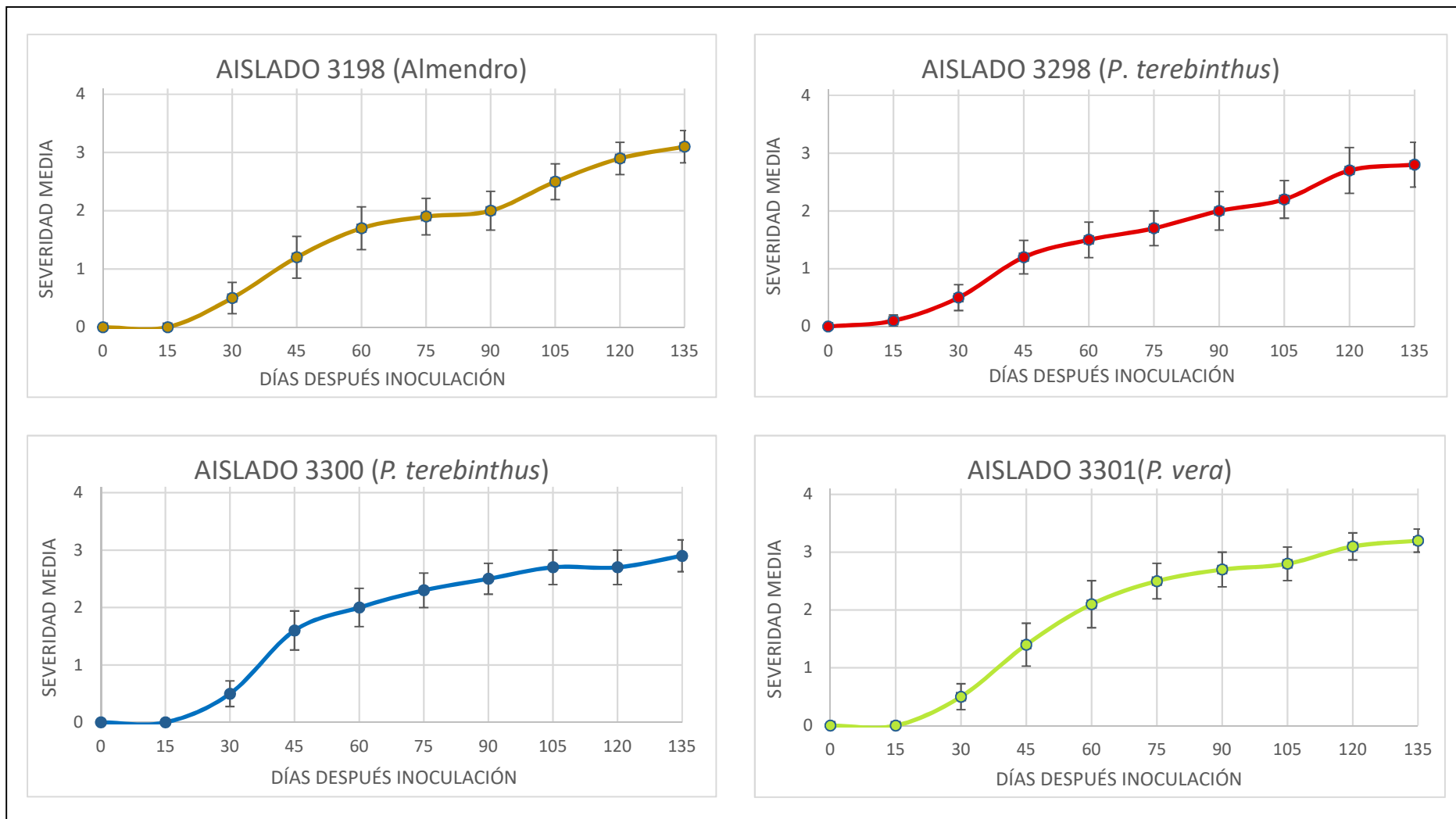


Figura 10. Curva de progresión de la enfermedad para cada aislado.



En lo que respecta al aislado 3298, obtenido de *P. terebinthus*, Los síntomas comenzaron a aparecer 15 días después de realizar la inoculación de las plantas con un valor medio de severidad de 0,1 puntos. A partir de este momento comenzó a aumentar la severidad de la enfermedad, teniendo un valor de 0,5 en la siguiente evaluación realizada, transcurridos 30 días desde la inoculación. Tras esta evaluación, la enfermedad fue progresando a medida que pasaba el tiempo, aumentando el valor de la severidad con que actuaba la misma hasta alcanzar a los 135 días tras la inoculación un valor de 2,8.

En el aislado 3300 sucede igual que en el aislado 3198. En la primera evaluación realizada a los 15 días después de la inoculación no aparecieron síntomas. No fue hasta después de 30 días tras la inoculación que comenzaron a aparecer síntomas estando éstos valorados con 0,5 de severidad media. Tras este momento comenzó una progresión positiva de la enfermedad de forma continua hasta el final del seguimiento de las plantas. Finalmente, la enfermedad alcanzó un valor de 2,9 de severidad media a los 135 días.

Al igual que en los aislados anteriormente comentados, en el aislado 3301 no se vieron síntomas de la enfermedad durante las primeras semanas del seguimiento tras la inoculación de *V. dahliae*. Pasados 30 días desde la inoculación comenzaron a aparecer los primeros síntomas con un valor medio de severidad de 0,5. También en este caso una vez comenzaron los síntomas se dio una evolución progresiva de los mismos hasta el final del seguimiento, siendo cada vez mayor la severidad de la enfermedad. En ese momento, pasados 135 días desde la inoculación, la severidad media de la enfermedad para el aislado 3301 fue de 3,2.

En general las curvas de progresión de los diferentes aislados fueron parecidas en todo el periodo. Sobre todo, en los primeros 30 días, en los que tenían los mismos valores de severidad a excepción del aislado 3298, que en la valoración realizada a los 15 días de la inoculación tenía 0,1 y el resto de aislados 0. No es hasta a partir del día 45 después de la inoculación, cuando comienzan a aparecer ciertas características que diferencian a unos aislados de otros.

Pasados 45 días de la inoculación, el aislado 3300 destacó sobre los demás por tener un valor superior de severidad con 1,6. Éste fue seguido por el aislado 3301 con una severidad igual a la media de los cuatro aislados con 1,4. Para esta evaluación los aislados 3198 y 3298 se encontraron por debajo de la media de los cuatro aislados, ambos con 1,2.

En la siguiente evaluación, pasados 60 días de la inoculación, la severidad de la enfermedad en el aislado 3301, con 2,1, superó a la del aislado 3300, que tenía 2. Siendo el aislado 3301 el de mayor severidad de la enfermedad para ese momento al superar en valor al resto de aislados, hecho que se mantuvo hasta el final del seguimiento de los plantones.

En cambio, el aislado 3300, que para esta evaluación a los 60 días de la inoculación había pasado a ser el segundo en severidad, continuó de este modo casi hasta el final del seguimiento. Ya que, a los 120 días, tenía 2,7 y se vio superado por el aislado 3198 que tenía 2,9 e igualándose para esta evaluación con el aislado 3298, que se encuentra durante la casi totalidad del seguimiento con la menor severidad de los 4 aislados. Finalmente, la severidad de la enfermedad aumentó para el aislado 3300 más que la del aislado 3298. Siendo para la última evaluación, el tercer aislado en severidad de la enfermedad por debajo de la media y los aislados 3301 y 3198 y por encima del aislado 3298.



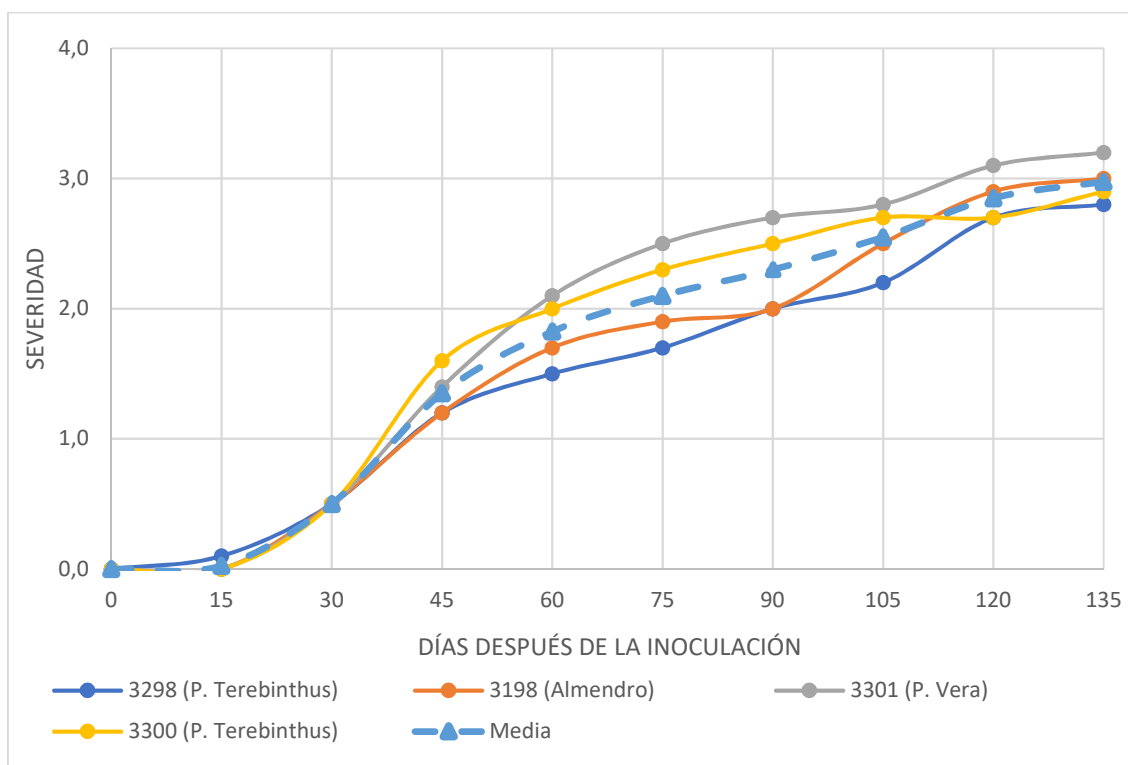


Figura 11. Comparación de las curvas de progresión de la enfermedad para los aislados y media de las mismas.

El aislado 3198 se encontró a partir del día 45 con una severidad inferior a la media y superior a la del aislado 3298 que desde dicho día fue el aislado con menor severidad hasta el final. En cambio, la situación del aislado 3198 no fue siempre igual desde este momento. Puesto que, como se ha mencionado anteriormente, a los 120 después de la inoculación superó al aislado 3300 e igualó a la media con 2,9 y se mantuvo como el segundo aislado con mayor severidad de la enfermedad hasta el final.

Destacar que el aislado 3298 fue desde el día 45 después de la inoculación hasta el final el aislado con menor severidad de la enfermedad, a excepción de la evaluación transcurridos 90 días desde la inoculación en la que se igualó con el aislado 3198 con 2 y la de 120 días en la que se igualó con el aislado 3300 con 2,7.

Para la última evaluación, transcurridos 135 días desde la inoculación, el aislado con mayor severidad de la enfermedad fue el 3301 con 3,2 seguido por el aislado 3198 con 3. El tercer aislado con mayor severidad fue el 3300 con 2,9 y el aislado con menor severidad de la enfermedad fue el 3298 con 2,8. La media de los cuatro aislados para esta última evaluación fue de 3.

Tal como se ha comentado en el apartado de material y métodos a partir de las curvas de progresión de la enfermedad se calculó el área debajo de la curva de progresión de la enfermedad (AUDPC).

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para el AUDPC en la Tabla 10. Valores de AUDPC obtenidos para las distintas muestras.



Tabla 10. Valores de AUDPC obtenidos para las distintas muestras. Fuente: Elaboración propia

AISLADO	VALOR DEL ÁREA EN PERÍODO QUINCENAL									ÁREA TOTAL
	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª	9ª	
3298 (<i>P. terebinthus</i>)	0,8	4,5	12,8	20,3	24,0	27,8	31,5	36,8	41,3	199,5
3198 (Almendro)	0,0	3,8	12,8	21,8	27,0	29,3	33,8	40,5	44,3	213,0
3301 (<i>P. vera</i>)	0,0	3,8	14,3	26,3	34,5	39,0	41,3	44,3	47,3	250,5
3300 (<i>P. terebinthus</i>)	0,0	3,8	15,8	27,0	32,3	36,0	39,0	40,5	42,0	236,3

De los tres aislados el que mostró un mayor AUDPC fue el aislado 3301 con un AUDPC de 250,5, coincidiendo así con los resultados de la curva de la progresión de la enfermedad donde también fue el aislado con el valor más alto al finalizar el seguimiento.

En cambio, para el siguiente aislado con un mayor AUDPC, el aislado 3300 con un AUDPC de 236,3, no se dio esta correspondencia con el valor del mismo en la curva de progresión de la enfermedad. Esto es debido a que se encuentra en tercer lugar en cuanto al valor final de la curva de progresión de la enfermedad y en segundo lugar en valor del AUDPC.

Tras el aislado 3300 se encuentra el aislado 3198 con un AUDPC de 213. En este caso sucedió lo contrario que con el aislado 3300. El aislado 3198 se encuentra en tercer lugar en lo que respecta al valor de AUDPC pero finaliza la curva de progresión de la enfermedad siendo el segundo aislado con mayor valor de severidad.

En cuanto al aislado de la muestra 3298, éste es el que menor AUDPC obtuvo, con un valor de 199,5. En este caso, la posición del AUDPC de dicha muestra respecto a las demás muestras se corresponde con la posición del mismo en lo que respecta al valor final de la curva de progresión siendo en ambos casos la muestra con un menor valor.



5. DISCUSIÓN

En este trabajo se ha identificado y caracterizado el hongo *Verticillium dahliae* como agente causal de la enfermedad que afectaba al cultivo de pistacho situado en las parcelas 154 y 216 del polígono 12 de la localidad de Biar (Alicante). Para ello se utilizaron técnicas de aislamiento fúngico a partir de muestras seleccionadas, técnicas de caracterización morfológica y molecular de hongos y un ensayo de patogenicidad. En conjunto los resultados obtenidos han confirmado que se trataba de la enfermedad conocida como Verticilosis del pistacho, causada por *V. dahliae* que se distribuye ampliamente en las regiones templadas de todo el mundo y ataca a una amplia variedad de otras especies de plantas. Esta enfermedad es común y a menudo severa en los cultivos de pistacho, especialmente cuando los árboles se plantan sobre portainjertos susceptibles (TEVIOTDALE *et al.*, 2002).

En el caso de España, la verticilosis del pistacho causada por *V. dahliae* fue citada por primera vez en la Comunidad Autónoma de Andalucía en el año 2010 (MORAL *et al.*, 2010). Dicha descripción se realizó tras observar síntomas de la enfermedad en árboles de este cultivo durante la década anterior en esta región, en la que el pistacho se cultiva cerca de plantaciones de olivo, cultivo que se ve frecuentemente afectado de forma muy severa por *V. dahliae* (JIMÉNEZ-DÍAZ *et al.*, 2012). En cuanto a su descripción en la Comunidad Valenciana, que nosotros sabemos, éste es el primer trabajo que confirma la presencia de la verticilosis del pistacho causada por *V. dahliae* en esta Comunidad Autónoma.

Los síntomas observados tanto en campo durante el seguimiento de las parcelas, como en laboratorio al analizar visualmente el material vegetal muestreado, coinciden con los síntomas característicos de la Verticilosis del pistacho descritas en otros países, como por ejemplo en Estados Unidos (TEVIOTDALE *et al.*, 2002). Siendo estos síntomas: presencia de hojas de color oscuro, crecimiento pobre de los brotes terminales y copa escasa. A veces se incluyen entre los síntomas la proliferación de retoños. Los síntomas más severos afectan a una o algunas ramas de uno de los lados del árbol, que se marchitan repentinamente al final de la primavera o en el verano y luego mueren. Las hojas en las ramas afectadas pueden caerse o desecarse y permanecer en el árbol. Los árboles afectados pueden morir en 1-3 años. Además, secciones transversales o longitudinales de la madera de una rama afectada generalmente muestran un anillo o segmentos de xilema negro o marrón (TEVIOTDALE *et al.*, 2002; OLSEN y YOUNG, 2011). Tan solo cabe mencionar que entre los síntomas observados en las parcelas de Biar no se detectó el crecimiento escaso de los brotes terminales. Además, todos los síntomas comentados anteriormente fueron observados por igual tanto en los ejemplares de *P. terebinthus* como en las distintas variedades de *P. vera*.

El agente patógeno identificado como el causante de la enfermedad, *V. dahliae*, resulta ser un hongo fitopatógeno que causa enfermedades de marchitez vascular en una gran variedad de cultivos, causando así graves pérdidas económicas en todo el mundo. Son susceptibles a él muchas plantas dicotiledóneas. En cambio las monocotiledóneas leñosas y gimnospermas no se ven afectadas. Entre los árboles comúnmente más afectados se encuentran los arces, especies de Catalpa y muchos otros cultivos, incluyendo almendro, albaricoque, aguacate, cerezo, olivo, melocotón, y ciruelo. Los géneros de árboles que no se ven afectados normalmente incluyen *Alnus*, *Betula*, *Platanus*, *Populus*, *Quercus* y *Salix*. También destacan el manzano (*Malus*) y peral (*Pyrus*) por no verse afectados por este hongo (HIEMSTRA y HARRIS, 1998). Además, se ven afectadas también plantas arbustivas y herbáceas, como es el caso del café, los rosales, sésamo,



algodón y vegetales como lechuga, fresas, alcachofas, cucurbitáceas y solanáceas (PUHALLA y HUMMEL, 1983).

Verticillium dahliae es un hongo del que existen diferentes cepas que varían en su virulencia (COUCEIRO-LÓPEZ *et al.*, 2017). Además cada especie o cultivar tiene una susceptibilidad diferente al hongo y en cada caso hay unas condiciones ambientales distintas para la interacción planta/patógeno. Teniendo en cuenta estos aspectos, de forma general *V. dahliae* es considerado un hongo capaz de afectar a una rama o una parte de la planta pudiendo llegar a morir las partes afectadas en un ciclo de cultivo. Además, puede llegar a morir la planta entera de forma repentina en pocas semanas o poco a poco en un periodo de unos pocos años (OLSEN y YOUNG, 2011). Por tanto, se trata de un patógeno de gran importancia por el impacto económico que puede llegar a tener. Un ejemplo de esto en el caso concreto de la Verticilosis del pistacho lo encontramos en las primeras plantaciones californianas injertadas sobre *Pistacia atlantica*, patrón susceptible a *V. dahliae*, que fueron devastadas por esta enfermedad causada por *V. dahliae* (COUCEIRO-LÓPEZ *et al.*, 2017).

En este trabajo también se ha podido comprobar la importancia de la enfermedad en el pistacho. Tanto en el seguimiento realizado en campo, como en el ensayo de patogenicidad, se confirma que se trata de una enfermedad que puede llegar a ser letal para los árboles de la explotación de pistacho estudiada y además que afecta tanto al patrón, que en este caso es *P. terebinthus*, como a los distintos cultivares injertados en él con virulencia similar. En el seguimiento en campo se pudieron observar los síntomas ya indicados, afectando a un número considerable de árboles, por igual en patrón y cultivares y produciendo síntomas tanto en hojas y ramas como a los árboles enteros que se llegaron a secar. Además, con el ensayo de patogenicidad se pudo confirmar lo que en un primer momento se observó en campo. Se observó que tanto el hongo aislado del patrón *P. terebinthus*, como el aislado de los cultivares, afecta por igual al portainjertos empleado en la explotación de Biar, siendo éste muy susceptible a *V. dahliae*. Además, se verificó que el hongo es capaz de afectar en gran medida al portainjertos, con una evolución similar para cada aislado del hongo y alcanzando valores cercanos a 3 en una escala de 0 a 4 de severidad de la enfermedad, llegando a causar la muerte de algunos ejemplares de *P. terebinthus* en el tiempo de duración del ensayo de patogenicidad. Por todo ello, se confirmó que tanto los cultivares como el portainjertos *P. terebinthus* empleados en la explotación son susceptibles a *V. dahliae* como ya advierten COUCEIRO-LÓPEZ *et al.* (2017) al recomendar no usar este portainjertos en zonas con presencia de *V. dahliae*.

Puesto que se ha determinado que los árboles de la explotación sufren la Verticilosis del pistacho, y los portainjertos de los mismos, *P. terebinthus*, son susceptibles a esta enfermedad (LAVIN *et al.*, 2014), no es recomendable que se continúe el cultivo de pistacho con este portainjertos por diversos motivos. Como se ha comprobado en este trabajo, la gravedad que puede alcanzar esta enfermedad con dichos portainjertos puede hacer inviable económicamente la explotación dado que el alcance de los daños puede ir desde un secado parcial a un secado total de los árboles. Además de por su gravedad, tampoco es recomendable el cultivo del pistacho con portainjertos sensibles a *V. dahliae* por causar este agente patógeno una de las enfermedades más difíciles de controlar debido a factores como el largo periodo de tiempo en el que el patógeno llega sobrevivir en el suelo, la falta de eficacia en la aplicación de fungicidas cuando el hongo se encuentra en el interior del xilema y la cantidad de huéspedes sobre los que puede permanecer y llegar a desarrollarse, dificultando la posibilidad de realizar rotaciones de cultivos (COUCEIRO-LÓPEZ *et al.*, 2017).



Por ello la primera medida que se recomienda realizar es a llevar a cabo la eliminación de todos los árboles susceptibles o, al menos, de aquellos ya afectados por la Verticilosis, a fin de evitar aumentar el inóculo de *V. dahliae* en la parcela.

Teniendo en cuenta la primera recomendación y los inconvenientes anteriormente mencionados que conlleva la enfermedad, es recomendable para este caso en el que los árboles aún son jóvenes y se ha confirmado la presencia de *V. dahliae* en las parcelas, dejar de cultivar pistachos con el patrón *P. terebinthus*. En este caso, en las parcelas se debería plantar cultivos que sean resistentes o tolerantes a *V. dahliae* (OLSEN & YOUNG, 2011), evitando así generar mayores pérdidas económicas producidas por la enfermedad. En cualquier caso, se ha de evitar utilizar cultivos susceptibles a esta enfermedad puesto que su control es difícil y costoso de realizar (OLSEN y YOUNG, 2011; COUCEIRO-LÓPEZ *et al.*, 2017).

Si a pesar de tener la certeza de la presencia de *V. dahliae* en el suelo se opta por continuar el cultivo de pistachos será inevitable utilizar métodos de desinfestación de suelos además de emplear portainjertos tolerantes (COUCEIRO-LÓPEZ *et al.*, 2017).

En tal caso se recomienda realizar una conversión de portainjertos por otros tolerantes como *P. interregima* y UCB1. El híbrido UCB1 crece y tiene un rendimiento similar a *P. interregima* al ser cultivados en un suelo infestado por *V. dahliae* (EPSTEIN *et al.*, 2004). En ensayos realizados por MORGAN *et al.* (1992) se demostró que PGII es excesivamente susceptible mientras que UCB1 fue de moderadamente resistente a resistente cuando se compararon con los árboles control *P. interregima* (tolerante) y *P. atlantica* (sensible). Dado que el híbrido UCB1 es tolerante a *V. dahliae* al igual que *P. interregima* pero no es sensible al frío y tiene una mayor rusticidad (HUESO-MARTÍN y CUEVAS-GONZÁLEZ, 2014; COUCEIRO-LÓPEZ *et al.*, 2017), se recomienda su uso en este caso en particular.

Además de cambiar el patrón empleado, es recomendable combinar esta acción con otras a fin de minimizar el posible efecto que pueda tener la presencia de *V. dahliae* en la parcela. Entre ellas se pueden realizar acciones que busquen disminuir la cantidad de inóculo de *V. dahliae* en las parcelas ya que con ello disminuyen las posibilidades de que se desarrolle la enfermedad que este produce (TEVIOTDALE *et al.*, 2002).

Como acción principal para disminuir el inóculo en el suelo de *V. dahliae* destaca realizar una desinfestación del suelo bien sea con métodos químicos o con métodos físicos a fin de disminuir el inóculo suelo antes de plantar los nuevos árboles con patrón tolerante. De entre ellos, se recomienda utilizar métodos físicos por ser más respetuosos con el medioambiente y respetar en mayor medida a los microorganismos beneficiosos del suelo, siendo la metodología más apropiada para combatir la Verticilosis la biofumigación o la biofumigación combinada con solarización (BELLO *et al.*, 2000).

BERBEGAL *et al.* (2008) indica que la solarización del suelo es altamente efectiva en la reducción de la densidad de inóculo de *V. dahliae*, por ejemplo consiguiendo un control satisfactorio de la verticilosis de la alcachofa. Además, la solarización es compatible con las prácticas agronómicas que normalmente se realizan, pudiéndose realizar en combinación con la incorporación de residuos de Crucíferas para el control de la verticilosis.

También el hongo antagonista *Trichoderma spp.* es capaz de reducir la severidad de la verticilosis en campo al emplearlo en combinación con la solarización. En cultivo de olivo se ha observado que la aplicación combinada de *Trichoderma spp.* y solarización consigue una mayor reducción



de la severidad de la enfermedad producida por verticilosis que si se aplicara tan solo la solarización o la solarización combinada con biofumigación (OTERO, M.L. *et al.*, 2014).

Por tanto, a fin de reducir el inóculo del suelo, es recomendable el uso de métodos físicos como la solarización combinados tanto con la biofumigación, realizada a base de residuos de crucíferas, como con el uso del hongo antagonista *Trichoderma spp.*

Puesto que *V. dahliae* se reproduce en las raíces de la mayoría de las plantas dicotiledóneas, se recomienda el control de las malas hierbas, particularmente el control de plantas solanáceas, ya que éstas pueden ser hospedantes y fuente de inóculo de la enfermedad. Tanto para la eliminación de las hierbas adventicias como para cualquier otra acción se recomienda evitar mover la tierra infestada con los arados y otros equipos ya que con ellos se puede diseminar el inóculo por la parcela, siendo recomendable para el control de las hierbas adventicias el uso de herbicidas (TEVIOTDALE *et al.*, 2002).

La marchitez por *Verticillium* es más grave en los árboles de pistacho con deficiencia de potasio (0.5-0.8% de potasio en las hojas en pleno verano) y en los años cuando la carga del cultivo es alta (TEVIOTDALE *et al.*, 2002). Tanto en plantaciones californianas como iraníes pudo establecerse una correlación entre la deficiencia de potasio y fósforo y una mayor susceptibilidad a la enfermedad en terrenos de baja densidad de inóculo, comprobándose, a la vez, que una nutrición equilibrada hace disminuir su incidencia. Es por ello que se recomienda llevar un control exhaustivo de la fertilización de las parcelas, manteniendo una nutrición equilibrada del cultivo y vigilando especialmente que no se produzcan deficiencias en fósforo y potasio.

Tanto la falta de agua, llegando a niveles que ocasionen estrés en la planta, así como el exceso de la misma, elevan la probabilidad de infección (COUCEIRO-LÓPEZ *et al.*, 2017). Por ello es recomendable controlar los aportes de agua a fin de mantener el bulbo húmedo de la planta en condiciones óptimas para disminuir las probabilidades de infección.

Como resumen, se recomienda por tanto eliminar los árboles susceptibles a *V. dahliae* y realizar una desinfestación de las parcelas mediante biofumigación combinada con solarización. Tras esta desinfestación realizada con métodos físicos se recomienda utilizar el portainjertos UCB1 por su tolerancia a la Verticilosis del pistacho y por su resistencia al frío y buenas capacidades productivas. Además, se deberían llevar a cabo medidas culturales que complementen estas acciones como son el control de malas hierbas evitando realizar acciones de laboreo, así como realizar una fertirrigación equilibrada.



6. CONCLUSIÓN

El aislamiento fúngico a partir de muestras de pistacho procedentes de Biar (Alicante), que mostraban síntomas de marchitez y decaimiento progresivo, y la caracterización de las colonias obtenidas mediante técnicas morfológicas, moleculares y un ensayo de patogenicidad, han confirmado la presencia del hongo *Verticillium dahliae* como agente causal de la verticilosis del pistacho.



7. BIBLIOGRAFÍA

ANDRIEU, J.; LÉMOLE, G.; NOVELLO, R., 2013. *Perspectiva del Cultivo del Pistachero en la Provincia de San Juan*. INTA. San Juan.

ANUARIO, 2016. Anuario de estadística del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (datos de los años 2015 y 2016). <http://www.mapama.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/2016/default.aspx>. Consultado en noviembre de 2017.

BELLO, A; LÓPEZ-PÉREZ, J.A.; DÍAZ-VIRULICHE, L., 2000. Biofumigación y Solarización como Alternativas al Bromuro de Metilo. *Memorias Del Simposio Internacional de La Fresa*. Zamora, México. 24–50.

BERBEGAL, M.; GRACÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J., 2008. Effect of Couliflower Residue Amendments and Soil Solarization on Verticillium Wilt Control in Artichoke. *Plant Disease*, 92 (4): 595-600.

BERG, G. y BALLIN, G., 1994. Bacterial Antagonists to *Verticillium dahliae* Kleb. *Journal Of Phytopathology* 141(1): 99-110.

CATALAN-CAMBRONERO, L., 2016. *Optimización del Proceso de Extracción de Aceite de Pistacho Virgen y Aprovechamiento Agrícola de las Harinas Generadas en el Mismo*. Tesis Doctoral. Universidad de Castilla-La Mancha.

COUCEIRO-LÓPEZ, J.F.; GUERRERO-VILLASEÑOR, J.; GIJÓN-LÓPEZ, M.C.; MORIANA-ELVIRA, A.; PÉREZ-LÓPEZ, D.; RODRÍGUEZ-DE-FRANCISCO, M., 2017. *El Cultivo del Pistacho*. Ed. Ediciones Mundi-Prensa. Llanera, Asturias.

CRANE, J.C., 1978. Quality of Pistachio Nuts is Affected by Time of Harvest. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 103 (3): 332-333.

EPSTEIN, L., BEEDE, R.; KAUR, S.; FERGUSON, L., 2004. Roostock Effects on Pistachio Trees Grown in *Verticillium dahliae*-Infested Soil. *Phytopathology*, 94 (4): 388-395.

FAOSTAT, 2017. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/es/#data>. Consultado el 23 de noviembre de 2017.

FERGUSON, L.; KAPER, A.; THOMPSON, J., 1995. *Pistachio Production*. Ed. L. Ferguson (USA).

GUERRERO-VILLASEÑOR, J.; MORIANA-ELVIRA, A.; COUCEIRO-LÓPEZ, F.; RIBAS-ELCOROBARRUITA, F.; CABELLO-CABELLO, M.J.; PÉREZ-LÓPEZ, D., 2004. El Pistacho Ecológico de Castilla-La Mancha. *Agricultura: Revista Agropecuaria*, 863: 482-487.

HERRADÓN, E; NÚÑEZ, J.P.; MENDIOL, M.A.; BAUTISTA-MARTÍNEZ, J., 2011. El Pistachero: Interesante Alternativa de Cultivo en España. *IV Congreso de Estudiantes Universitarios de Ciencia, Tecnología e Ingeniería Agronómica*. Madrid.

HIEMSTRA, J.A.; HARRIS, D.C., 1998. *A Compendium of Verticillium Wilt in Tree Species*. Ed. Ponsen & Looijen. Wageningen, The Netherlands.

HUESO-MARTÍN, J.J.; CUEVAS-GONZÁLEZ, J., 2014. *La Fruticultura del Siglo XXI en España*. Ed. Cajamar Caja Rural. España.



- INPN, 2017. Inventaire National du Patrimoine Naturel. <https://inpn.mnhn.fr/accueil/recherche-de-donnees/especes/>. Consultado el 22 de noviembre de 2017.
- JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.; CITULLI, M.; BUBICI, G.; JIMÉNEZ-GASCO, M.M.; ANTONIOU, P.P.; 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.
- LACASTA, C.; VADILLO, J.R.; GÓMEZ, G.; COUCEIRO, J.F., 2004. El Pistachero I: Estudio de Variedades en Secano y en Manejo Ecológico. *VI Congreso SEAE*. Almería 2004
- LAVIN, A.; REYES, M.; ALMARZA, P., 2014. *Frutales de Nuez. Cinco Alternativas No Tradicionales para el Secano Interior del Maude*. Ed. INIA, Ministerio de Agricultura. Boletín INIA Nº 301. Chillán (Chile).
- LEMUS, G.; NEGRÓN, C., 2001. *Frutales de Nuez No Tradicionales: Macadamia, Pistacho, Pecano, Avellano Europeo*. Ed. Gamalier Lemus S. INIA CRI La Platina.
- LÓPEZ, J.L., 2006. *Formas Alternativas de Ocupación y Formación Continua en Agricultura*. Ed. ASAJA-Cuenca. Madrid.
- MAGGS, D.H., 1975. *Prospects for Pistachio Nutgrowing in Australia*. Ed. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (C.S.I.R.O.). Australia (I): 47-63.
- MARTÍNEZ-MILLÁN, M.; CEVALLOS-FERRIZ, S.R.S., 2005. Taxonomía y Sistemática. Arquitectura Foliar de Anacardiaceae. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 76 (2): 137-190.
- MERCADO-BLANCO, J.; RODRÍGUEZ-JURADO, D.; PARRILLA-ARAUJO, S.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. 2003. Simultaneous Detection of the Defoliating and Nondefoliating *Verticillium dahliae* Pathotypes in Infected Olive Plants by Duplex, Nested Polymerase Chain Reaction. *Plant Disease* 87: 1487-1494.
- MORAL, J.; LÓPEZ-ESCUADERO, F.J.; ROCA, L.F.; BLANCO-LÓPEZ, M.A.; TRAPERO, A., 2010. First Report of Verticillium Wilt of Pistachio Caused by *Verticillium dahliae* in Spain. *American Phytopathological Society*, 94 (3):382.
- MORGAN, D.P.; EPSTEIN, L.; FERGUSON, L., 1992. Verticillium Wilt Resistance in Pistachio Rootstock Cultivars. Assays and an Assessment of Two Interespecific Hybrids. *Plant Disease*, 76 (3): 310-313.
- NAVARRETE, R., 1991. El Cultivo del Pistacho. *El campesino*, 122: 35-51.
- OLSEN, M.W.; YOUNG, D., 2011. Verticillium Wilt. *University of Arizona Cooperative Extension*, 1034: 1-11.
- OTERO, M.L.; ROCA, M.; ZAPATA, R.; LADUX, J.L.; ORTIZ, J.; ZANELLI, M.; MATÍAS, A.C.; PÉREZ, B.A., 2014. Effect Of Solarization, Organic Matter, And Trichoderma On The Severity Of Verticillium Wilt In Olive Trees (*Olea Europaea* L.) And Soil Inoculum Density. *Acta Hort.* 1057, 121-126
- M.L. Otero, M. Roca, R. Zapata, J.L. Ladux, J. Ortiz, M. Zanelli, A.C. Matías, B.A. Pérez
- PUHALLA, J.E.; HUMMEL, M., 1983. Vegetative Compatibility Groups Within *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, 73 (9): 1305-1308.



SHANER, G. y FINNEY, R.E.,1977. The Effect of Nitrogen Fertilization on the Expression of Slow-Mildewing Resistance in Knox Wheat. *Phytopathology*, 67:1051-1056.

SPINA, P., 1984. *El Pistacho*. Ed. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

SPINA, P., 1989. *El Pistacho*. Ed. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

SUDZUKI, F., 1996. *Frutales Subtropicales para Chile*. Ed. Editorial Universitaria. Santiago, Chile.

TEVIOTDALE, B.L.; MICHAILIDES, T.J.; PSCHIEDT, J.W., 2002. *Compendium of Nut Crop Diseases in Temperate Zones*. Ed. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota.

USDA, 2016. National Nutrient Database for Standard Reference, Release 28 (revisada mayo de 2016). <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>. Consultado en noviembre del 2017.

VELASCO-MUÑOZ, J.F.; AZNAR-SÁNCHEZ, J.A., 2016. El Mercado Mundial y Norteamericano. *Revistas ICE*, Boletín Económico de ICE 3082: 51-61.

ZOHARY, M., 1952. A Monographical Study of the Genus Pistacia. *Palestine Journal of Botany Jerusalem*, 5: 187-228.

