

Bases para el control preventivo de la tuberculosis del olivo

Detección molecular, dinámica de las poblaciones, efecto de los tratamientos químicos y evolución de variedades

La tuberculosis del olivo debida a la bacteria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* causa en España importantes pérdidas de cosecha, siendo difícil su control y erradicación. Por este motivo se han puesto a punto métodos moleculares sensibles y de gran fiabilidad para su diagnóstico, y se han estudiado aspectos epidemiológicos de la tuberculosis en el olivar español, así como la eficacia de varios productos químicos en la reducción de las poblaciones epífitas de la bacteria y en la incidencia de tumores causados por esta enfermedad. Por último, se ha evaluado la sensibilidad de 28 variedades de olivo.

José M. Quesada, Ramón Peñalver, Amparo García, Edson Bertolini, Carmina I. Salcedo, Jaime Piquer y María M. López. Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Valencia.

La tuberculosis del olivo está causada por la bacteria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss). Los síntomas típicos de esta enfermedad son la formación de tumores, también denominados verrugas o excrescencias. Tienen forma redondeada, son relativamente esponjosos en sus etapas iniciales y su tamaño es variable, entre pocos mm y varios cm de diámetro. Los tumores se forman en tronco, ramas, tallos y brotes y con mucha menor frecuencia en hojas, frutos y raíces (Smith, 1920). Los brotes y ramas jóvenes suelen ser las partes del olivo más afectadas por esta enfermedad. La formación de estos tumores es debida a la producción de las fitohormonas ácido 3-indolacético y de citoquininas por la bacteria (Smidt y Kosuge, 1978). Aunque la enfermedad está distribuida por la mayoría de las áreas de cultivo del olivo del mundo, no existe una estimación precisa de las pérdidas que ocasiona. En España, en algunas zonas está considerada como la tercera enfermedad en importancia tras el repilo y la lepra, debido a su amplia distribución por los olivares españoles y a las pérdidas que causa en variedades sensibles, que fueron estimadas en el 1,3% de la producción total anual (De Andrés, 1991). Además, hay casos de pérdidas locales de casi la totalidad de la cosecha, por la combinación de condiciones meteorológicas favorables para la entrada y multiplicación de la bacteria, como ocurre con el granizo primaveral.

El ciclo poblacional de la bacteria es de tipo epífito-patógeno. La bacteria presenta primero una fase en la que se multiplica en la superficie de los tallos y las hojas, sin producir síntomas en el olivo (Ercolani, 1978). Tanto a partir de estas bacterias epífitas, como a partir de tumores, puede haber dispersión de Pss a larga

distancia por introducción y plantación de material infectado, con o sin síntomas. A cortas distancias las nuevas transmisiones se ven favorecidas por prácticas culturales inadecuadas, lavado por la lluvia, o formación de aerosoles por el viento, que pueden contaminar nuevos órganos o plantas (Wilson, 1935). En determinadas circunstancias, como cuando se producen heridas por



Síntomas típicos de la tuberculosis del olivo causada por *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* en tallo (arriba) y tronco (foto inferior).

prácticas culturales, bajas temperaturas, granizo o simplemente por las vías naturales de entrada (estomas, cicatrices foliares, etc.) la bacteria puede superar la barrera epidérmica del olivo y comienza la fase patógena. Al producirse la interacción compatible Pss-olivo, tiene lugar la invasión, infección y multiplicación que desencadena la hipertrofia e hiperplasia de los tejidos con la posterior formación del tumor. La bacteria puede moverse en el interior de los espacios intercelulares e incluso por los vasos del xilema y producir nuevos tumores en nuevas heridas (Penyalver *et al.*, 2006). En los tumores, la bacteria puede mantenerse de una estación a otra y cuando la humedad es lo suficientemente alta, se producen exudados con alta concentración de bacteria, que puede sobrevivir en la superficie de tallos, hojas y frutos.

El control de la tuberculosis del olivo debe ser esencialmente preventivo, ya que una vez la enfermedad se ha establecido, su erradicación es compleja por la escasa eficacia de los métodos curativos y es conveniente una estrategia de lucha integrada contra esta enfermedad. También es necesario un estricto control del material vegetal, debido al incremento en el número de plantaciones, el cambio notable en las tecnologías de producción y el creciente intercambio de material vegetal de olivo en los últimos años.

► Detección molecular de Pss y su aplicación a programas de certificación de plantas de olivo

Se requieren métodos de detección sensibles, específicos y de fácil realización para un control rápido de las posibles infecciones latentes bacterianas, es decir, antes de la aparición de síntomas. Por ello, las técnicas moleculares han tenido un protagonismo muy importante en la detección de bacterias fitopatógenas. En nuestro laboratorio se han puesto a punto métodos de PCR para la detección simultánea y sensible en una única reacción, de la bacteria Pss y de los cuatro virus del olivo contemplados en el Real Decreto 1678/1999 que regula la producción de plantas certificadas de olivo en España (Bertolini *et al.*, 2003). Esta metodología de análisis es la recomendada oficialmente por el Ministerio de Agricultura para la detección de Pss y virus en plantas madre de material vegetal de olivo propagado en España. Con estas técnicas se realizó un análisis de 405 olivos de diversas regiones españolas, la mayoría de ellos utilizados como plantas madre de viveros. Pss se detectó en un 27% de las plantas analizadas. Estos resultados demuestran que el estado sanitario del material multiplicado en España es aceptable, comparado con el de otros países. Según el reglamento técnico de control y certificación de plantas de olivo vigente en España, las plantas madre del material inicial serán inspeccionadas oficialmente para comprobar que se encuentran libres de los siguientes patógenos: *Verticillium dahliae*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* y los virus del mosaico del pepino (CMV), del mosaico del arabis (ArMV), del enrollado de la hoja del cerezo (CLRV) y el virus latente de las manchas de la fresa (SLRSV). El análisis del estado sanitario de las plantas madre se repetirá anualmente, utilizando técnicas apropiadas y aprobadas por el organismo oficial responsable (Anónimo, 1999). Basados en los resultados obtenidos, se propone utilizar la metodología desarrollada para el análisis simultáneo de virus y bacterias en el material a certificar.

La utilización de estos métodos de detección moleculares en

CUADRO I. AISLAMIENTO, DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS POBLACIONES DE *PSEUDOMONAS SAVASTANOI* PV. *SAVASTANOI* EN TALLOS Y HOJAS ASINTOMÁTICAS DE OLIVOS NATURALMENTE INFECTADOS EN 5 PARCELAS DE ANDALUCÍA Y DE LA COMUNIDAD VALENCIANA

Tipo de material vegetal	Aislamiento de Pss (a)	Detección molecular de Pss (b)	Media del tamaño de las poblaciones de Pss en muestras positivas (log UFC/g) (c)
Tallos	47 (179)	47 (179)	3.96 ± 1.08(d)
Hojas	42 (159)	55 (159)	3.52 ± 0.98
Total	89 (338)	102 (338)	-

- (a) Número de muestras en las que se aisló Pss en tallos u hojas (muestras analizadas).
 (b) Número de muestras en las que se detectó Pss en tallos u hojas por enriquecimiento y nested-PCR (muestras analizadas).
 (c) Media del tamaño de las poblaciones de Pss en las muestras analizadas en las que el aislamiento de la bacteria fue positivo.
 (d) Desviación típica de la media.

programas de certificación de material vegetal, contribuirán a hacer posible la multiplicación exclusiva y uso de cultivares de olivo libres de Pss y de virus. También son muy útiles estos métodos para los controles realizados en la comercialización y transporte de material vegetal de un país a otro, en la adopción de medidas de control y en estudios epidemiológicos.

ELETTROBRUCAOLIVE™

PORTÁTIL PATENTADO

PARA EL DERRIBO MECÁNICO DE ACEITUNAS

NO DAÑA LAS ACEITUNAS
 NO PRODUCE ROTURA EN EL FRUTO Y EVITA LA PÉRDIDA DE ACEITE EN EL PROCESO DE LAVADO

MÁS RÁPIDO QUE TRES PERSONAS

LIGERO

ECOLÓGICO

PARA UN TRABAJO RÁPIDO Y SEGURO



ARPI®
MECCANICA DAUNIA

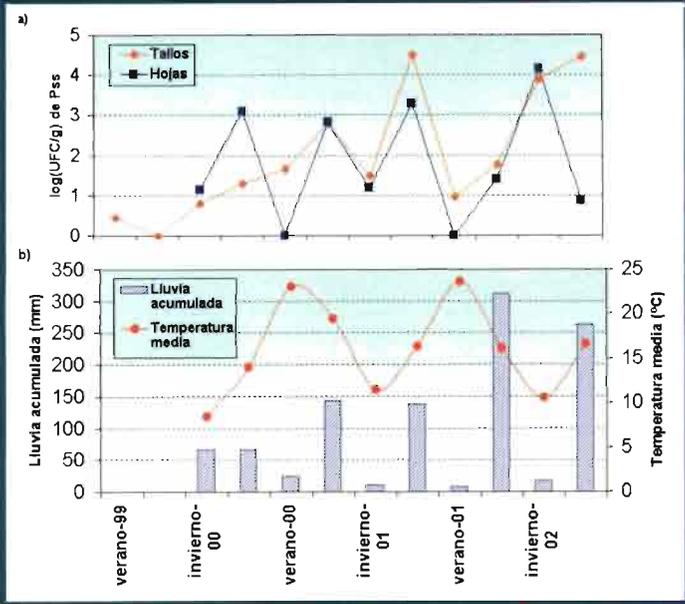
Foggia - Italy

Villaggio Artigiani - Via di Salsola, 151
 Cas. Post. n. 236 - 71100 Foggia - Italy
 Tel. +39.0881.707387 / fax +39.0881.728259
 www.arpimeccanicaaunia.com
 E-mail: info@arpimeccanicaaunia.com

ENFERMEDADES

FIGURA 1.

Poblaciones medias de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss) en la superficie de tallos y hojas de ramas asintomáticos de olivos naturalmente infectados de una parcela de la Comunidad Valenciana (a). Lluvia acumulada y promedio de la temperatura media registradas entre muestreos consecutivos durante los tres años de estudio (b).



Dinámica de las poblaciones epifitas de Pss

La escasa información sobre la variación de las poblaciones de Pss en la superficie de hojas de olivo en distintas épocas procede de Italia (Ercolani, 1978), no habiéndose realizado ningún estudio en España hasta la fecha. Sin embargo, esta información es necesaria, tanto por su aplicación a los métodos de detección, como para la mejora de las estrategias preventivas de control, que son las más efectivas en la lucha contra esta enfermedad. La variación de las poblaciones de Pss en la parte aérea del olivo fue estudiada en cinco parcelas comerciales, con olivos de más de veinte años de edad, de dos zonas olivereras de España entre los años 1999 y 2002. No se obtuvieron diferencias significativas entre los recuentos de Pss en las superficies de hojas y tallos de olivo analizadas, respecto al número de muestras donde se aisló o detectó la bacteria. Tampoco hubo diferencias significativas entre los tamaños medios de las poblaciones de Pss entre tallos y hojas (**cuadro I**). Independientemente de la estación, es muy probable que Pss colonice de forma similar las superficies de tallos y hojas de olivo y que además lo haga a bajos niveles, porque de un total de 338 muestras analizadas solamente se aisló Pss en 89 muestras y se detectó en 102 (**cuadro I**). La frecuencia del aislamiento de Pss y el tamaño medio de sus poblaciones fue muy variable entre las cinco parcelas. En una parcela de la Comunidad Valenciana, que fue donde la bacteria se aisló más regularmente durante los tres años, la frecuencia de aislamiento de la bacteria en verano fue significativamente más baja que en otoño y primavera. También en verano, las poblaciones medias de Pss, fueron significativamente más bajas que en el resto de estaciones. La fluctuación estacional de las

poblaciones medias de Pss parece seguir un patrón con valores más altos en los meses templados y lluviosos (principalmente primavera) y más bajos en los meses cálidos y secos (verano) (**figura 1**). Se concluye en nuestro estudio, que se deben realizar los muestreos tanto de tallo como de hoja en primavera, evitando los muestreos en verano.

Efecto de tratamientos químicos sobre las poblaciones de Pss y la enfermedad

El control de las tuberculosis del olivo mediante agentes químicos ha sido poco estudiado en España, tanto a nivel de prospección y evaluación de campo, como a nivel de ensayos expe-

FIGURA 2.

Efecto de tratamientos con oxiclóruo de cobre 50% (PM) o sulfato cuprocálcico 20% con mancozeb 8% (PM), sobre el tamaño de las poblaciones medias de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* en la superficie de tallos y hojas de ramas asintomáticos de olivos de la variedad 'Picudo', inoculados con la bacteria. Las barras verticales representan el error estándar de la media y las flechas de color rojo indican el momento de aplicación de los tratamientos.

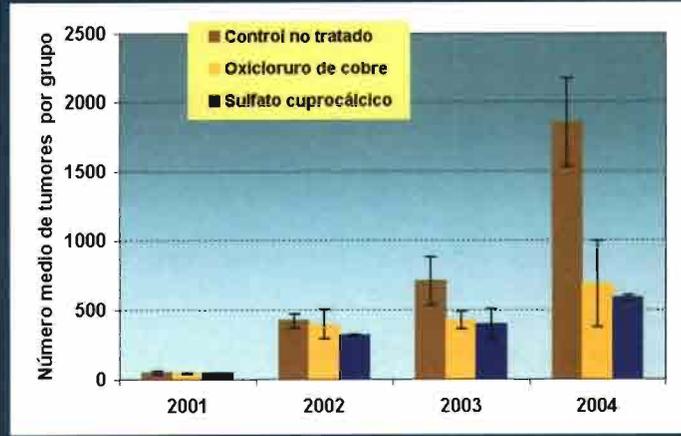
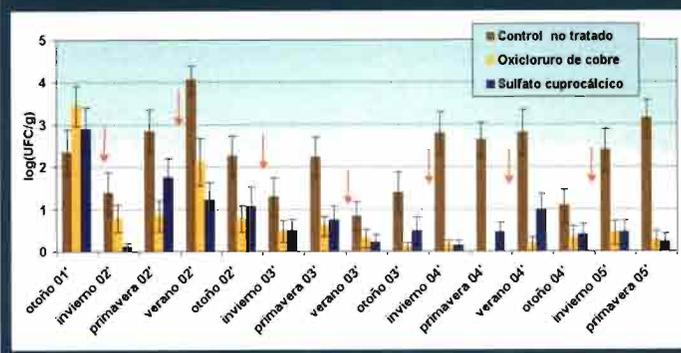


FIGURA 3.

Efecto de tratamientos con oxiclóruo de cobre 50% (PM) o sulfato cuprocálcico 20% con mancozeb 8% (PM), sobre la incidencia de la tuberculosis del olivo, mediante el recuento de tumores en olivos de la variedad 'Picudo' inoculados con *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Las barras verticales representan la desviación típica de la media.



OLIVAR dossier

rimentales en condiciones controladas. Tampoco se conoce el efecto de los tratamientos químicos de control contra la amenaza que representa el inóculo epífita de la bacteria. Por este motivo, se diseñó un ensayo experimental en campo, controlando tanto la cantidad de inóculo, como el momento de aplicación de los tratamientos. Se estableció una plantación de olivo

semi-intensiva de 1600 m² con 200 olivos de las variedades Arbequina y Picudo sensibles a la tuberculosis, con tratamientos asignados según un diseño en grupos al azar con dos repeticiones y 10 árboles por combinación tratamiento/repetición. Antes de la primera aplicación de tratamientos, los olivos fueron inoculados con una cepa española de Pss. Los tratamientos fueron aplicados una vez en primavera y otra en otoño durante tres



Pseudomonas savastanoi
pv. *savastanoi* en hoja.

años. Se evaluó el efecto de dos derivados cúpricos, el oxiclórico de cobre 50% (PM) y el sulfato cuprocálcico 20% con mancozeb 8% (PM), sobre la dinámica de las poblaciones de Pss. Para ello se analizaron muestras asintomáticas de tallos y hojas en cada estación, durante los cuatro años que duró el ensayo. También se evaluó el efecto de los tratamientos cúpricos sobre la incidencia de la tuberculosis, comparando el número de tumores totales cada año de plantas no tratadas, frente a los de las tratadas.

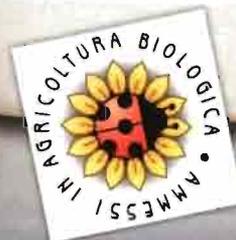
Independientemente del material vegetal analizado, las poblaciones medias de la bacteria en olivos de Picudo tratados, desde la primera aplicación de tratamientos hasta el final del estudio, oscilaron entre 0 y 10² UFC/ml. Sin embargo, en olivos de Picudo no tratados, las poblaciones de Pss alcanzaron 10⁴ UFC/ml (**figura 2**). Los dos productos cúpricos redujeron tanto la proporción de muestras en las que se aisló Pss, como el tamaño de las poblaciones epífitas de Pss respecto a las plantas no tratadas. Este efecto fue más pronunciado en Picudo que en Arbequina.

En las plantas de Picudo tratadas con los compuestos cúpricos, el número medio de tumores en la última campaña de 2004, osciló entre 500 y 1000 tumores por tratamiento, que fue significativamente inferior al de las plantas no tratadas, que alcanzó la cifra de 1.800 tumores (**figura 3**). En Arbequina el número medio de tumores por tratamiento también fue significativamente menor en las plantas tratadas que en el control, pero se formaron menos tumores que en Picudo.

En este ensayo de campo se demostró que tanto el oxiclórico de cobre 50% como el sulfato cuprocálcico 20% con mancozeb 8% fueron eficaces, tanto para reducir la incidencia de los tumores, como la fuente de inóculo representada por las poblaciones epífitas de Pss. De manera que si estos productos son aplicados en el momento óptimo (meses templados y lluviosos), podría realizarse un control efectivo de la enfermedad, antes de que se inicie la infección de los tejidos sensibles. Estos tratamientos deberían ser complementados con los de protección de heridas después de la recolección y de granizo, heladas, etc., con dichos productos.

Cuproflow

El **cobre pasta**,
persistente, eficaz y
selectivo, de máxima
acción fungicida y
bactericida.



ISAGRO ESPAÑA

Maldonado, 63, C 2º 28006 Madrid
Tel. 91 402 30 40 - Fax. 91 401 30 59



Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi* en pedúnculo.

► Evaluación de la susceptibilidad varietal a la tuberculosis del olivo

La información disponible sobre la sensibilidad de las variedades de olivo a la tuberculosis era escasa y se basaba principalmente en prospecciones y evaluaciones de campo, en las que no se partía de la misma cantidad de inóculo natural y el nivel de los factores favorables para la infección era distinto. Por ello, se ha analizado la influencia de distintos factores en la sensibilidad y se concluye que para evaluarla debe utilizarse material vegetal genéticamente homogéneo, de al menos 2-3 años de edad, e inocular en primavera o principios de verano, realizando heridas con bisturí en forma de lengüeta. Se recomienda la utilización como mínimo de dos cepas de Pss, que muestren alta agresividad. Éstas serán inoculadas a dosis de inóculo baja, para establecer diferencias entre las distintas variedades y también a dosis alta para identificar las variedades más tolerantes. Es conveniente utilizar diez plantas de olivo por cepa bacteriana y dosis. Posteriormente, se arrancan y pesan los tumores de cada planta. Además, es conveniente hacer

nuevas heridas en condiciones asépticas para evaluar la frecuencia de aparición de tumores secundarios, causados por las bacterias procedentes de los tumores iniciales (Penyalver *et al.*, 2006).

La clasificación de variedades de olivo en grupos de sensibilidad no resulta sencilla. La metodología que se ha desarrollado en el IVIA, ha permitido evaluar 28 variedades, la mayoría procedentes del Banco de Germoplasma Mundial del CIFA "Alameda del Obispo" de Córdoba. El número de tumores aparecidos en las heridas inoculadas, el peso y el número de tumores secundarios aparecidos en las distintas combinaciones dosis/cepa, se analizaron estadísticamente y este análisis permitió clasificar las variedades en muy sensibles, moderadamente sensibles y poco sensibles. En el **cuadro II** se recogen los resultados de evaluación de susceptibilidad a la tuberculosis del olivo. Como muy sensibles se han clasificado las variedades Arbequina, Arróniz, Nevadillo Blanco de Jaén, Pajarero, Picudo y Vallesa. Las variedades que se mostraron poco sensibles fueron Azapa, Cerezuela, Chemlali, Dulzal de Carmona, Frantoio, FS-17, Gordal de Archidona, Gordal de Hellín, Lechín de Granada, Manzanilla Cacereña, Manzanilla de Sevilla, Nevadillo Negro y Villalonga. El resto de variedades fueron moderadamente sensibles. Entre todas las variedades evaluadas, no se encontró ninguna variedad resistente a la tuberculosis del olivo. ■

Las variedades que se mostraron poco sensibles fueron Azapa, Cerezuela, Chemlali, Dulzal de Carmona, Frantoio, FS-17, Gordal de Archidona, Gordal de Hellín, Lechín de Granada, Manzanilla Cacereña, Manzanilla de Sevilla, Nevadillo Negro y Villalonga. El resto de variedades fueron moderadamente sensibles. Entre todas las variedades evaluadas, no se encontró ninguna variedad resistente a la tuberculosis del olivo. ■

Agradecimientos

Se agradece la financiación de los proyectos CICYT OLI96-2127 y CA000-007, así como la colaboración de José Manuel Caballero, Carmen del Río y Jorge Pinochet en el suministro de material vegetal y de Francisco Climent y Eusebio Quesada en la recogida de las muestras de campo.

Bibliografía

Anónimo. (1999). Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Real Decreto 1678/1999 de 29 de octubre de 1999. BOE 276, 18 de noviembre de 1999. 40077-40079.

Bertolini, E., Olmos, A., López, M.M., Cambra, M. (2003). Multiplex nested reverse transcription polymerase chain reaction in a single tube for sensitive and simultaneous detection of four RNA viruses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive trees. *Phytopathology* 93, 286-292.

De Andrés, F. (1991). *Enfermedades y plagas del olivo*. 2nd ed. Riquelme y Vargas Ediciones, Jaén. 646 pp.

Ercolani, G.L. (1978). *Pseudomonas savastanoi* and other bacteria colonizing the surface of olive leaves in the field. *Journal of General Microbiology* 109, 245-247.

Penyalver, R., García, A., Ferrer, A., Bertolini, E., Quesada, J. M., Salcedo, C. I., Piquer, J., Pérez-Panadés, J., Carbonell, E. A., del Río, C., Caballero, J. M. and López, M. M. (2006). Factors affecting *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* plant inoculations and its use for evaluation of olive cultivar susceptibility. *Phytopathology* 96, 313-319.

Smidt, M., Kosuge, T. (1978). The role of indole-3-acetic acid accumulation by alpha-methyl tryptophan-resistant mutants of *Pseudomonas savastanoi* in gall formation in oleander. *Physiology and Plant Pathology* 13, 203-214.

Smith, C.O. (1920). Pathogenicity of the olive knot organism on hosts related to the olive. *Phytopathology* 12, 271-278.

Wilson, E.E. (1935). The olive knot disease: its inception, development, and control. *Hilgardia* 4, 233-264.

CUADRO II. CLASIFICACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LAS VARIEDADES DE OLIVO EVALUADAS FRENTE A LA TUBERCULOSIS EN ENSAYOS COMPARATIVOS DE INOCULACIÓN EN ESPAÑA.

Muy sensibles	Moderadamente sensibles	Poco sensibles
Arbequina	Ascolana tenera	Azapa
Arróniz	Changlot Real	Cerezuela
Nevadillo Blanco de Jaén	Gordal Sevillana	Chemlali
Pajarero	Koroneiki	Dulzal de Carmona
Picudo	Lechín de Sevilla	Frantoio
Vallesa	Mollar de Cieza	FS-17
	Morisca	Gordal de Archidona
	Picual	Gordal de Hellín
	Royal de Cazorla	Lechín de Granada
		Manzanilla Cacereña
		Manzanilla de Sevilla
		Nevadillo negro
		Villalonga