

TRABAJOS DE REVISION

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA

CATEDRA DE MICROBIOLOGIA

PROF. DR. VICENTE CALLAO

Ars Pharm. VIII, 1-2 (1967)

SOBRE LA TUBERCULOSIS DEL OLIVO

por

P. Romero

INTRODUCCION

La tuberculosis del olivo es producida por el *Pseudomonas savastanoi* (E. F. SMITH) STEVENS 1913, bacteria perteneciente al orden Pseudomonadales, familia Pseudomonadaceae de la clasificación de Bergey. (1).

A esta bacteria también se le han asignado los siguientes nombres:

Bacterium oleae, ARCANGELI 1886; *Bacillus oleae tuberculosis*, SAVASTANO 1889; *Bacillus oleae*, ARCANGELI 1889; *Bacillus priliensianus*, TREVISAN 1889; *Bacterium savastanoi* (E. F. SMITH, STEVENS, 1913) (3).

Sobre la identidad del agente causal de la tuberculosis del olivo se han realizado estudios por E. F. SMITH (2) y por L. PETRÉ (1907) los cuales han demostrado de manera evidente que las bacterias aisladas y estudiadas por diversos autores no son idénticas.

La forma descrita por SAVASTANO corresponde en gran parte al *Ascobacterium luteum* de Babés que no es el organismo productor de la hiperplasia del olivo pero que se encuentra con frecuencia asociado a la verdadera bacteria patógena a la cual se debe la producción de las alteraciones de cultivos de bacterias por él observadas, cultivos que evidentemente eran impuros.

Las características culturales del *Ascobacterium luteum* en agar común son: producir colonias blancas que posteriormente se vuelven amarillas; licuar la gelatina tardamente y no formar esporas; el germen es móvil por medio de flagelos peritricos. Dicha bacteria ha sido también encontrada por PEGLIÓN en Italia (3) en la tuberculosis de las adelfas sin que se considere como agente causal ya que el productor de la enfermedad en estas plantas es *Pseudomonas savastanoi* var. *nerii* (C. O. SMITH 1928).

Las diferencias encontradas entre

miento bioquímico frente a la hidrólisis del almidón y formación del indol.

Tampoco el *Bacillus oleae*, descrito por SCHIFF (3) se puede considerar el verdadero agente patógeno. Produce colonias con los lóbulos recortados, funde la gelatina y es esporulado.

La verdadera especie productora de tumores es según PETRÉ la aislada por E. SMITH (4): bacilos móviles con varios flagelos no reunidos en un haz y que no funde la gelatina ni produce esporas.

PETRÉ, experimentando con estas bacterias que aisló cuidadosamente, sólo pudo obtener la producción de la enfermedad al inocular la forma SMITH, siendo este último autor quien designó a la bacteria patógena con el nombre de *Bacterium savastanoi*.

A continuación damos los caracteres descritos en el "Manual de Bacterias Patógenas de Plantas" (CHARLOTTE ELLIOT) (5): "Manual de Bacteriología de BERGEY (1); Tesis Doctoral BETRÁ R. (3) ya que lo consideramos de interés para hacer un estudio comparativo de todas las características descritas sobre este germen.

ELLIOT CH. (5)

Características morfológicas y fisiológicas:

Bacilos de 0'4-0'5 por 1'2-1'5 micras, agrupados en parejas o cadenas cortas, móviles por 1-4 flagelos polares. Gram negativos, no acidorresistentes.

Colonias en agar carne: pequeñas, planas, brillantes, borde entero.

Características bioquímicas:

Ácidos pero no gases de: glucosa, galactosa, sacarosa.

No ácidos de: lactosa, maltosa ni salicina.

Hidrólisis del almidón positiva.

Aceite de algodón no descompuesto.

Leche no coagulada ni acidificada.

Gelatina no licuada; formación de ácido sulfhídrico y reducción de los nitratos a nitritos: negativos.

Ligera producción de indol.

máxima: 35° C.

Temperaturas óptima: 25-26°C.

mínima: 12° C.

Punto térmico mortal: 43-46°.

BERGEY. (1)

Características morfológicas y fisiológicas:

Bacilos de 0'4-0'8 por 1'2-3'3 micras, móviles por 1-4 flagelos polares.

Gram negativos. Aerobios.

Colonias en agar carne: blancas, lisas, planas, brillantes de borde entero o erosionado.

Crecimiento en caldo: turbidez al segundo día.

Pigmentos: verde fluorescente.

Características bioquímicas:

Ácidos no gases de: glucosa, galactosa, sacarosa.

Hidrólisis del almidón positiva.

Leche con el tiempo alcalina.

Formación de nitritos y de ácido sulfhídrico negativos.

máxima: 32° C.

Temperaturas: mínima: 1° C.

óptima: 23-24° C.

máximo: 8'5.

pH: óptimo: 6'8-7.

Mínimo: 5'6.

Del trabajo de BELTRÁ R. (3) tomamos las siguientes características:

El *Ps. savastanoi* es una bacteria Gram negativa, aerobia de forma de bastón, siendo su tamaño de 0'4-0'5 por 1'2-1'5 micras. Móvil por 2 flagelos polares rarisimas veces, según algunos autores, en preparación teñidas, pueden verse flagelos en ambos polos, como si fueran organismos lofotricos pero que en casos de los *Pseudomonas* indican que la célula hija está próxima a dividirse y así cada célula hija estaría provista de uno o más flagelos polares procedentes de la célula madre antes de la separación.

En diversos medios de cultivo (agar caldo y agar caldo glucosado) producen en cantidad variable un pigmento fluorescente, el cual se difunde por el medio de cultivo para producir ligera fluorescencia amarilla-verdosa. Se extrae con cloroformo como pigmento verde amarillento, que se decolora con los ácidos y que recobra el color al neutralizar dicho ácido. (6).

En agar común produce colonias blancas, redondeadas, lisas, planas, brillantes y de borde entero.

En gelatina produce colonias con borde lobulado-ondulado e inciso. En caldo ordinario forma velo al segundo día y película incompleta.

En el medio de patata da coloración parda que a menudo es oscura.

En el suero coagulado no hay liofloculación.

En la solución de Cohn tiene buen desarrollo sin fluorescencia y en la

solución de Uschinsky produce ligero velo y no produce fluorescencia.

Hidrosis del almidón positiva.

Acidos pero no gases de glucosa, galactosa y sacarosa.

Acidos de manosa, xilosa y glicerina.

No fermentan lactosa, maltosa, ni salicina.

Leche tornasolada fuertemente alcalinizada; sobre la leche sola aclaramiento sin coagulación.

No reduce los nitratos; ácidos sulfhídricos negativo y escasa producción de indol.

Aceite de algodón no descompuestos: no lipolítica.

máxima: 34-35° C.

Temperaturas: óptima: 25-26° C.

mínima: 12° C.

mortal: 43-46° C.

Como se observará, existen algunas diferencias entre las tres descripciones, por lo que nosotros daremos los caracteres más constantes que servirán para su identificación más rápida y segura. (Esto será objeto de una publicación posterior).

Por último, indicaremos que a la enfermedad se la conoce por las siguientes denominaciones: Tuberculosis del olivo verruga, roña, y en el extranjero se la conoce por: Rognagale, tuberculosi, maladie de la loupe, krebsknoten, bakteriennoten des Oelbaumes, etc.

El *Pseudomonas savastanoi* puede ser hiesped de los siguientes árboles: *Olea chrysophila*, *O. europaeae* var. *oleaster*, *O. europaeae* var. *sativa*, *Chionantus virginica*, *Forestiera acuminata*, *F. neomexicana*, *Forsythia viridisima*, *F. intermedia*, *Fra-*

el *Ps. savastanoi* aislado de la adelfa y del olivo radican en su comportamiento *floribunda*, *F. velutina*, *F. angustifolia*, *Omanthus aquifolium*, *O. americanus*, etc.

CARACTERISTICAS DE LA INFECCION

La enfermedad ha sido estudiada en América por ERWIN SMITH (1920) y en Portugal por D'OLIVEIRA (7) aparte de otros investigadores.

En general, los microorganismos causan sus efectos patógenos por medio de las toxinas que producen. En el campo de la Medicina han sido estudiadas dichas toxinas, pero en el campo de la Patología Vegetal sólo hace poco tiempo que empiezan a estudiarse.

A continuación exponemos una de las recientes teorías de la formación de tumores vegetales: (8).

Los parásitos productores de toxinas se pueden clasificar en dos grupos:

- a) parásitos toxigénicos con acción de poco alcance.
- b) parásitos toxigénicos con acción de largo alcance.

A nosotros nos interesa solo el primer grupo, ya que las toxinas incluidas en él actúan directamente sobre los tejidos que circundan el foco de la infección y en los que el lugar de la enfermedad coincide con el de la infección de manera análoga a lo que sucede en la formación de los tumores en el olivo por el *Pseudomonas savastanoi*.

La formación de agallas o tumores bien podría ser debido a la acción conjunta de diferentes toxinas segregadas por la bacteria infectante. Se sabe en el caso del *Agrobacterium*

tumefaciens (agente productor de agallas en diferentes plantas) que la formación de tumores se lleva a cabo de dos formas: una fase alterativa y un período de formación neoplásica.

Durante la fase alterativa las células del huésped atacadas por el factor irritante rompen las conexiones interiores y se convierten en células tumorales en potencia, las cuales son incapaces por sí solas de desarrollarse y dar las verdaderas células tumorales. Esta segunda fase no tiene lugar hasta que aumenta debidamente la concentración de sustancias promotoras del crecimiento.

El parásito no aumenta por sí mismo la cantidad promotora de crecimiento, sino lo que hace es excitar al huésped a la producción de ella.

En este caso concreto intervienen dos toxinas durante la formación de los tumores por el *Agrobacterium tumefaciens*: una toxina alterativa que obliga a las células vegetales normales a convertirse en células tumorales en potencia, y una toxina estimulante del factor del crecimiento, que induce en la huésped la formación normal de dicho factor y en consecuencia la formación neoplásica.

Hasta ahora no han sido identificadas estas toxinas pero en el caso del *Pseudomonas tabaci* productor en el tabaco de un sarpujido, que algunos países llaman "rayo del tabaco", han aislado una sustancia tóxica llamada "tab-toxinina" que la produce el parásito en el lugar central de la infección y de donde se difunde a todos los tejidos de alrededor.

En la formación de tumores según

diversos autores también intervienen las hormonas vegetales. Entre ellas tienen especial interés las auxinas descubiertas por F. W. WENT en 1928 y cuya composición química según KÖGL y HAAGEN-SMITH (1936) corresponden con el ácido beta indol-acético.

Entre las numerosas actividades fisiológicas de las auxinas están las que ejercen sobre los meristemos, habiéndose comprobado que concentraciones elevadas de IAA (indolacético ácido), en forma de pasta aplicada sobre diversos tallos vegetales cortados, provocan la aparición de hinchazones no son solamente el resultado del alargamiento de las células preexistentes, sino de la formación de células nuevas, existiendo el resultado normal de diferenciación.

Si una parte de estas callosidades que no tengan microorganismos se traslada asépticamente a un medio nutritivo estéril con azúcares, sales minerales, etc., la callosidad sigue creciendo con tal que se la suministre auxina, y la velocidad y naturaleza del crecimiento producido depende de la concentración de auxina suministrada.

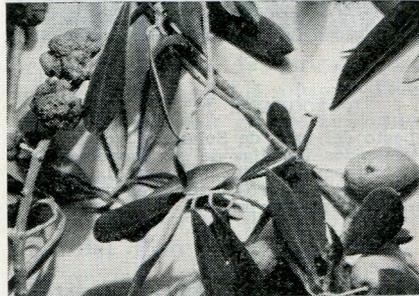
En la Naturaleza los tumores que se producen por la acción de diversos microorganismos tienen un metabolismo en sus tejidos diferentes al de las callosidades antes mencionados. Por ejemplo, si una porción de tumor de origen bacteriano (aunque no contenga bacterias) se traslada a un medio de cultivo que contenga azúcares y sales minerales, su crecimiento continúa aún en ausencia de las bacterias y sin añadir auxina alguna.

Por el contrario, el tejido calloso necesita la adición de auxina para

poder continuar creciendo, habiéndose demostrado mediante análisis que los tejidos de las agallas son capaces de producir auxina por sí mismos y aún de transferirla a un cultivo in vitro.

De aquí parece deducirse una diferencia entre las células de los tumores malignos y de las callosidades es la posibilidad o no de producir auxina.

Por no necesitar los tumores auxina ni otros factores de crecimiento procedentes de la planta huésped se les puede considerar como relativamente autónomos y separados del control hormonal que integra el crecimiento y así pueden crecer tan rá-



(R-1-67)

FOTOGRAFIA N.º 1

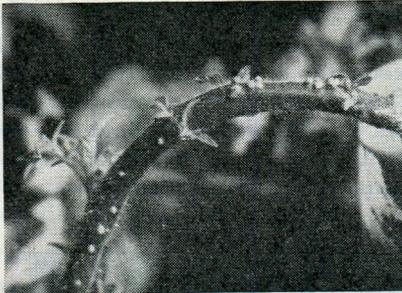
Aspecto de unas ramas de olivo (*Olea europaeae*) con tuberculosis. Obsérvese las aceitunas picadas por la mosca del olivo. (*Dacus oleae*).

pidamente como les permita la sustancia de que disponen. El agente fisiológico relativamente autónomo de los tumores puede repartirse por toda la planta produciendo nuevos centros de actividad tumorigénica.

La morfología que presentan las plantas infectadas es característica (fotografías n.º 1 y 2). Al principio

se originan unos pequeños abultamientos que en el transcurso de dos o tres meses engrosan de tamaño y su aspecto que en principio era verdoso se torna rojizo y de consistencia de leño.

En la judía verde, *Phaseolus vulgaris* (Fotografía 3), se observa una necrosis progresiva en el punto de



(R-2-67)

FOTOGRAFIA N.º 2

Aspecto del tallo de *Solanum lycopersicum* a los 130 días de ser inoculado por una cepa de *Ps. savastanoi*. Obsérvese los numerosos tumores de pequeño tamaño formados.

inoculación y una coloración castaño oscura en toda la zona próxima del tallo.

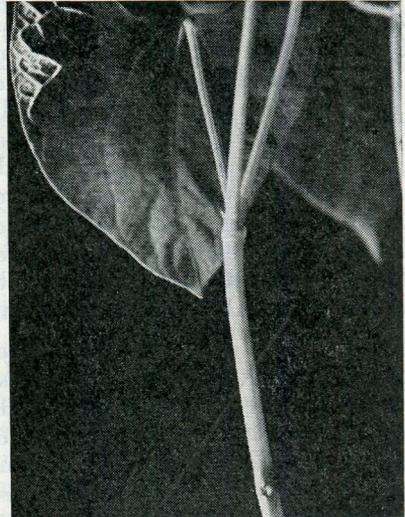
También se observa un abarquillamiento y formación de arrugas en las hojas de la planta infectada y sobre todo en las correspondientes a la zona de la inoculación.

Los autores clasifican los tumores en primarios y secundarios, formándose estos últimos por emigración vascular del germen que penetró por las heridas.

Las bacterias al llegar al parénquima cortical, producen una hiperplasia y luego una destrucción de los te-

jidos dando lugar a las cavidades que presentan los tumores y en cuyo interior se encuentran los gérmenes.

La enfermedad recibe distintos nombres según la situación en el olivo y así tenemos la tuberculosis cortical, libero leñosa, etc.



(R-3-67)

FOTOGRAFIA N.º 3

Aspecto del Punto de inoculación de una planta de *Phaseolus vulgaris* inoculada con *Ps. savastanoi*. Obsérvese la coloración castaño oscura en las proximidades de dicho punto.

D'OLIVEIRA (7), encuentra que la intervención de los hongos como agentes secundarios puede hasta cierto punto modificar la sintomatología general de la enfermedad y también por estudios que ha realizado, dice que este parásito del olivo fuera del huesped y en el huesped natural lleva consigo el poder de imprimir a cualquier planta que infecte el tipo de lesiones que le es peculiar.

SITUACION DE LOS MICROORGANISMOS EN LOS TUMORES

Las bacterias causantes de la tuberculosis del olivo se encuentran uniformemente distribuidas en el agua de imbibición de los tumores que producen, de ahí que de estos se puede aislar dicho germen. También se observa en raíces la formación de tumores y en otras partes de la planta que seguramente son consecuencia de la emigración vascular del germen.

D'OLIVEIRA (7), al observar los tumores de la tuberculosis del olivo mediante la preparación de cortes histológicos, indicaba que la infección no acarrea la muerte de las células, sino por el contrario ocasiona un efecto estimulante sobre la división celular, pero de un modo desordenado que la lleva a la producción de la hiperplasia.

Los tumores continúan creciendo de un año para otro y a no ser en las lesiones muy viejas en que posiblemente intervienen agentes secundarios no se encuentran tejidos necrosados o destruidos. Lo más frecuente es que intervengan insectos que atacan los tejidos tiernos o esponjosos de los tubérculos y a la vez hongos que actúan como parásitos o que se instalan como saprofitos.

Algunos autores, tales como EDWIN J. BUTLER y S. G. JONES (1949) dicen que hay bacterias que producen enzimas que disuelven los polisacáridos de la pared celular de los vegetales en donde se alojan, después de haber penetrado por una herida, o bien atacan el almidón penetrando en el interior de las plantas produciendo cavidades o cavernas. Tal vez podrá ser éste el origen de las ca-

vernas de los tumores producidos por el *Pseudomonas savastanoi*.

EXTENSION DE LA INFECCION

La penetración de los gérmenes en el olivo se realiza sólo a través de soluciones de continuidad de cualquier tipo: heridas de poda, vaeo, erosiones por insectos, lesiones debidas al frío, granizo, viento, etc. En el punto de penetración se origina a los 60-100 días de la contaminación las primeras hiperplasias tumorales.

De estos centros iniciales la bacteria emigra por vía vascular y se localiza en otros puntos de la planta produciendo en ellos manifestaciones tumorales. En las ramas jóvenes, esta difusión por metástasis lleva a la formación de vistosos tubérculos (Fotografía n.º 1) aislados o dispuestos según el eje de las mismas ramas, mientras que en las adultas se agrupan o confluyen en formaciones tumorales de una longitud de decenas de centímetros.

Se ha descrito un modo de infección del olivo por penetración a través de las pequeñas heridas que se producen en las ramas y tallos jóvenes por la mosca del olivo (*Dacus oleae* Rossi) que lleva el germen en simbiosis en las glándulas anales y salivares. Aquello parece haber sido demostrado por PETRI en Italia en 1910 y citado por LEACH, 1940.

También es mencionado por MELLIS A. (9) en 1948, que junto a la deposición del huevo mediante el oviducto de la mosca ocurre la infección de la herida por el *Ps. savastanoi* evitando este el cierre de la misma (ya que hay necrosis del tejido), con lo que la larva puede vivir en su interior.

El mecanismo exacto de la infección, si es por vía anal o por el llamado "beso de la aceituna (glándulas salivares)" no se sabe con seguridad, pero una vez la larva en el interior de la aceituna origina un canal que es infectado por los gérmenes, recibiendo así el nuevo *Dacus*, el germen. De ahí la importancia que la mosca puede tener en la epidemiología de esta enfermedad.

Otras denominaciones de la mosca del olivo son: gusano de la aceituna, chichi, etc.

Respecto a la receptividad de los olivos a esta enfermedad existen marcadas diferencias; así por ejemplo la variedad denominada redondillo o carrasqueño no es propenso a presentar tumoraciones mientras que la denominada *L e c h i n*, *Olea ovalis* Clem, es atacada con facilidad.

De igual modo se comporta la variedad Cornezuelo (*Olea europea* cetratarca de Clemente; *O. odorata* de Ros) que cultiva muy bien en el centro de España.

Respecto a la distribución geográfica de la enfermedad ésta se encuentra extendida por: España —en toda su extensión—, Portugal, Italia, Francia, Norte de Africa, Asia Menor, California (América), Méjico y Argentina. En este último país se ha transmitido por los viveros de olivos ya que al principio se desconocía la enfermedad tanto en los viveros como por los agricultores. Como observamos por su situación geográfica las zonas en donde se encuentra la tuberculosis del olivo son de clima seco y en especial en la zona Mediterránea.

MEDIOS DE LUCHA EMPLEADOS

Los medios utilizados actualmente, como veremos a continuación, no son totalmente satisfactorios, pues su ejecución lleva consigo mucho material y mano de obra y por otra parte son de escaso valor. Actualmente se sabe que cuando en un olivar entra la tuberculosis muy poco se puede hacer para eliminarla.

Las prácticas más utilizadas consisten:

1.º Cortar los tumores; pero si se encuentran en ramas jóvenes se elimina toda ésta con el consiguiente perjuicio en el rendimiento de aceitunas.

2.º Desinfectar las heridas producidas bien con solución de sublimado corrosivo al uno por mil y después cubrirlas con caldo bordelés o ácido fénico al 5-6 por ciento.

3.º Desinfectar las heridas, aperió empleados al pasar de un olivo a otro con objeto de eliminar el contagio a otros árboles.

Como medidas preventivas se aconseja la recogida de la aceituna por la técnica del ordeño, eliminando en todos los casos la recogida por "vareo" que lleva consigo el destrozo de los brotes nuevos, así como la producción de numerosas heridas que son puerta de entrada para el germen.

También se aconseja que después de tormentas, granizadas, viento, etcétera, se pulverice con caldo bordelés con objeto de desinfectar las heridas que se produzcan; igual tratamiento se aconseja realizar en las distintas estaciones del año a fin de eliminar al máximo toda infección.

BIBLIOGRAFIA

- (1.º).—BREED R. S., MURRAY E. G. D. and colab. (1957). "Bergey's Manual of determinative bacteriology". Seventh Edition. The Williams - Wilkins Company.
- (2.º).—SMITH E. F. (1905). "Some observations on the biology of the olive tubercle organism. Centrabl Bakt. 15, 198-200.
- (3.º).—BELTRA R. (1954). "Método selectivo para la identificación de bacterias fitopatógicas y en especial del *Ps. savastanoi*". Tesis doctoral, Madrid.
- (4.º).—SMITH E. F. (1908). "Recent studies of the olive tubercle organism. U. S. Dep. Agric. Bull. 131, IV, 37.
- (5.º).—ELLIOT CH. (1951). "Manual of Bacterial Plant Pathogens". 2.ª edition. págs. 84-85.
- (6.º).—TOBIE W. C. (1945). "A proposed biochemical basis for the genus *Pseudomonas*". J. Bacteriol. págs. 49-50.
- (7.º).—D'OLIVEIRA M.ª Lourdes. (1939). "Inoculacoes experimentais como bacterium *savastanoi* var. *fraxinii* N. A. Brown". Agronomia Lusitana. Vol. I.
- (8.º).—GAUMANN E. (1954). "Toxinas y enfermedades de las plantas". 12, 52, 198.
- (9.º).—MELIS A. (1948). "La lotta razionale contro gli insetti nocivi all' agricoltura". 50, 208. Ramo Editoriale Degli Agricoltori. Roma.

Granada (España), Enero 1967