

Virosis del olivo detectadas en España. Nuevos métodos de diagnóstico

■ BERTOLINI, E.¹, FADDA, Z.¹, GARCIA, F.², CELADA, B.², OLMOS, A.¹, GORRIS, M.T.¹, DEL RIO, C.³, CABALLERO, J.³, DURAN-VILA, N.¹, CAMBRA, M.¹

Se han puesto a punto métodos de detección y se ha iniciado el estudio de los virus y viroides presentes en olivo en España, ante el desconocimiento existente sobre su estado sanitario. La prospección se ha comenzado con los cultivares del Banco Mundial de Germoplasma de Olivo de Córdoba y con diversas selecciones y muestras de campo de Cataluña y la Comunidad Valenciana. Únicamente se ha podido confirmar la presencia de CMV, aunque serológicamente se han obtenido algunos positivos para SLRV o CLRV.

Estos resultados parecen sugerir una escasa importancia de los virus en olivo en nuestro país y muestran la problemática que plantean algunas técnicas de detección.

España es el primer productor mundial de aceite y aceituna de mesa. El 26,7% de la superficie mundial (9 millones de Ha) se cultiva en nuestro país (aproximadamente 2,4 millones de Ha). Existe un interés creciente en dicho cultivo en las C.C.A.A. de Andalucía, Cataluña, Aragón, Castilla-La Mancha y Comunidad Valenciana, de manera que su superficie se incrementa anualmente. El interés en la producción de aceite de oliva hace que el aumento en el cultivo de esta especie no se produzca únicamente en las zonas típicas del Mediterráneo, sino que también se dé en zonas nuevas de cultivo, fundamentalmente en América del Sur (Argentina, Chile y Colombia) y en Australia. Todo ello, implica la acuciante necesidad de material vegetal de calidad para cubrir la demanda de un mercado en expansión, pero cada vez más exigente.

En Italia e Israel se han iniciado programas de certificación de material vegetal de olivo, que aseguren su autenticidad varietal y un correcto estado sanitario, y se pretende comenzarlos en un futuro próximo en Portugal y otros países, entre los que se encuentra el nuestro.

En España radica la colección de olivo más completa del mundo (Banco Mundial de Germoplasma de Olivo) patrocinada por la FAO e instituciones nacionales (mantenimiento INIA). Además, se han iniciado colecciones y ensayos varietales en Andalucía, Cataluña, Comunidad Valenciana (CV) y algunas otras Comunidades Autónomas.

En los aspectos sanitarios, se ha detectado que la problemática más grave del cultivo en España parecen plantearla hongos y bacterias. No se han detectado viroides ni fitoplasmas y los virus descritos (posiblemente introducidos accidentalmente en olivo por causas naturales) no parecen ser causa limitante del cultivo. No obstante, y para evitar problemas en el futuro, sería aconsejable multiplicar solamente material libre de virus. Por estas causas y ante esta problemática general, laboratorios especializados en virus y viroides se han coordinado con los responsables del Banco Mundial de Germoplasma de Olivo de Córdoba y con los responsables de colecciones y ensayos varietales de la Comunidad Valenciana y Cataluña para abordar el objetivo final de proporcionar métodos para la certificación sanitaria del olivo.

La importancia económica y el impacto agronómico de los virus del olivo no han sido claramente demostrados (ESTEVE DA CLARA, 1996) aunque recientemente se ha afirmado que el porcentaje de enraizamiento de estaquillas procedentes de olivos virosados es mucho menor que el de estaquillas de árboles no infectados (SERRANO *et al.*, 1995). Únicamente el virus del Strawberry latent ringspot (SLRV) (MARTE *et al.*, 1986, SAVINO *et al.*, 1979, HENRIQUES *et al.*, 1992) ha sido asociado con deformaciones graves del fruto. No obstante, la presencia de virus en plantas madre de material vegetal para multiplicación, debería evitarse, por razones obvias, especialmente si se desea certificar las plantas.

Los virus hasta ahora descritos en olivo son, en general, virus muy polífagos que probablemente se enfeudaron accidentalmente en dicha especie. Así: SLRV, Cherry leaf roll virus (CLRV), Arabis mosaic virus (ArMV) y Cucumber mosaic virus (CMV). Además, otros virus que han sido encontrados específicamente en olivo no inducen síntomas comportándose el huésped como tolerante ("virus latentes"). Es el caso del nepovirus Olive latent ringspot (OLRV) y los necrovirus olive latent virus 1 (OLV-1) y olive latent virus 2 (OLV-2), (SAVINO *et al.*, 1979, 1981, 1983; MARTE *et al.*, 1986; REI *et al.*, 1993).

La diseminación de estos virus no parece ocurrir por vectores naturales (ESTEVE DA CLARA, 1996). Se ha descrito la presencia de partículas virales en los granos de polen (PACCINI y CRESTI, 1977), pero se desconoce el papel real del mismo en la diseminación de los virus. Lo más probable es que el hombre, con el tráfico incontrolado de material vegetal para propagación, sea el causante de diseminar material vegetal asintomático pero infectado.

Los métodos de diagnóstico hasta ahora empleados se han limitado a inoculaciones mecánicas en plantas indicadoras herbáceas (fundamentalmente chenopodiáceas) y al uso de la técnica ELISA-DASI (HENRIQUES *et al.*, 1993; HENRIQUES, 1994). La detección de ácido ribonucleico de doble cadena (ds-RNA) también ha sido utilizada por Rei (1995), pero se trata de una técnica no específica y poco sensible que precisa de gran cantidad de material vegetal y de un complejo método de extracción no utilizable en rutina.

CEN



FERTILIZANTE CIENTÍFICO

Berlin Export, a la cabeza de la alta tecnología con sus abonos **CEN**, conocidos internacionalmente por sus excelentes resultados; nutrición equilibrada, uniformidad y peso específico. Así como una óptima calidad según las exigencias de los mercados internacionales, consiguiendo aumentar considerablemente las vitaminas A y C en frutos y hortalizas y el Licopeno (Anticancerígeno) en tomate. Los análisis comparativos demuestran:
Aumento de vitamina A del 10 al 100%;
Aumento de vitamina C del 10 al 25% y
Aumento del licopeno en tomate hasta el 80%.



CEN es un fertilizante inteligente programado para que la planta tome en cada momento justo lo que necesita. Su acción en cultivos marca importantes diferencias respecto de los productos químicos tradicionales.

CEN se comporta como un fertilizante químico biológico que, aprovechando la maquinaria celular de las plantas, se automultiplica transmitiendo a éstas sus nutrientes, favoreciendo así el desarrollo y equilibrio nutricional de las plantas.

Más ventajas para sus cultivos

- Hasta un 20% de aumento en la producción.
- Mayor cuajado de flor.
- Mayor calidad y mejor conservación de los frutos.
- Color más intenso y mayor contenido de azúcar.
- Mayor resistencia al frío, sequía y enfermedades.
- Mejora del suelo en N.P.K. y M.O.
- Mayor uniformidad de frutos y calidad constante de exportación.

BERLIN EXPORT INTERNATIONAL, S.L.

C/. Berlín, 5 – P.O. Box 248

22006 HUESCA (España)

Tel. 974 22 76 44

Fax: 974 24 52 07

INTERNET: [http:// www.berlinex.com](http://www.berlinex.com)

Así pues los métodos de diagnóstico y detección de virus en material vegetal hasta ahora utilizados en olivo, son manifiestamente mejorables. No se han empleado técnicas como PCR que pueden ser utilizables en determinadas condiciones, especialmente con el nuevo método print capture-PCR o PC-PCR (OLMOS *et al.*, 1996).

No han sido señalados viroides en el olivo pero tampoco se han efectuado prospecciones en este sentido. En Israel se han realizado algunos experimentos pero no se ha detectado ningún viroide (M. BAR-JOSEPH, comunicación personal, 1995). Sin embargo estudios recientes indican que los viroides se encuentran mucho más difundidos de lo que inicialmente se había sospechado, desconociéndose su efecto.

Se han descrito desde hace años distintas afecciones y síndromes en el olivo, que han sido transmitidos por injerto a otros huéspedes y de los que se sospecha etiología viral. Los descritos hasta ahora se denominan "Sickle leaf" (CIFERRI *et al.*, 1953), "Partial paralysis" (NICOLI Y TRAVERSI, 1950), "Leaf deformation" (CORTE *et al.*, 1961) e "Infectious yellowing" (RIBALDI, 1959). Más recientemente se han descrito otros síndromes como los denominados "Sherosis" (LAVEE Y TANNE, 1984), "Olive leaf yellowing" y "Olive yellow mottling and decline" (SAVINO *et al.*, 1996). Los dos últimos podrían estar asociados al OLV-1 y a un potencial nuevo virus, respectivamente. Estos síndromes han sido descritos, en todo caso, en forma muy localizada en ciertos árboles, pero parecen no tener importancia económica ya que, siendo tan aparentes no se utilizan los árboles afectados para propagación.

Así pues, en vista de los antecedentes quedaría justificada la conveniencia de realizar prospecciones de virus del olivo en España y al menos, conocer el estado sanitario de las colecciones. También parece evidente que deberían ponerse a punto nuevos métodos de diagnóstico de elevada sensibilidad que ayudaran a conocer el estado sanitario del olivo en España.

Con la finalidad de conocer dicho estado sanitario y de mejorar las técnicas de detección disponibles, se han puesto a punto y utilizado técnicas ELISA-DAS para detección de todos los virus de olivo descritos. Estos se han aplicado a plantas de olivo en diferentes períodos vegetativos y a distintos órganos y tejidos. También se han diseñado iniciadores específicos para ser utilizados en diferentes variantes especiales de PCR (entre ellas PC-PCR) y se han puesto a punto métodos de análisis de viroides y de ácidos nucleicos de doble hebra (ds-RNA) en material de olivo.

Las técnicas de detección se han utilizado para realizar prospecciones en olivos centenarios de la Comunidad Valenciana y Cataluña, en selecciones de material vegetal y en árboles del Banco Mundial de Germoplasma de Olivo de Córdoba. También se han analizado plantas de vivero de la Comunidad Valenciana y Cataluña. En total se han analizado 66 plantas de 15 variedades.

Se han obtenido reacciones positivas mediante ELISA-DAS, utilizando anticuerpos policlonales comerciales de los virus CMV, SLRV y CLRV. Los árboles que habían proporcionado altos valores de densidad óptica en la técnica ELISA para los tres virus mencionados, han sido muestreados durante los diferentes períodos vegetativos utilizando corteza de madera adulta, ramilletes, brotes jóvenes, flores o frutos (según el período). La toma de muestras se realizó de ramas marcadas de forma que en todos los períodos vegetativos se analizó la misma rama del árbol. El material vegetal en el que se han obtenido más valores positivos y de mayor densidad óptica mediante ELISA han sido los ramilletes, los brotes jóvenes y las flores. No obstante, únicamente en un caso los resultados ELISA positivos obtenidos,

se han confirmado mediante ds-RNA y PCR. Ello ha ocurrido para CMV en un árbol de la variedad Serrana de Espadán.

Las plantas se han analizado para determinar la presencia de agentes tipo viroide mediante análisis de ácidos nucleicos en electroforesis secuencial (sPAGE). En la fracción sobrenadante de la partición con LiCl 2M se ha identificado una banda con una movilidad electroforética característica de RNAs circulares. Esta banda alcanzaba títulos importantes en al menos tres de los cultivares analizados, con los cuales se proseguirá su caracterización molecular.

No se han obtenido reacciones ELISA positivas en plantas procedentes de viveros de Cataluña y Comunidad Valenciana, ni tampoco reacciones que hicieran pensar en la presencia de viroides.

Conclusiones

Se han puesto a punto nuevos métodos de detección de virus en olivo y se han comparado con los obtenidos mediante ELISA.

Los extractos de material vegetal de olivo presentan una problemática especial. En muchos casos inhiben reacciones de PCR y en otros inducen falsas reacciones que hacen difícil el uso de alternativas como la inmunopresión-ELISA o incluso técnicas convencionales ELISA.

Los resultados obtenidos hasta la fecha indican una buena sanidad del material de olivo multiplicado en España y ponen en tela de juicio resultados obtenidos mediante técnicas ELISA utilizadas con antisueros. Las reacciones positivas deberán ser controladas con otros métodos para concluir que un material está realmente infectado.

BIBLIOGRAFÍA

- CIFERRI, R., BALDINI, E., RUI, D., SCARAMUZZI, G., FOGLIANI, G., ROSTIROLA, G., 1953. *Anomalie fogliari dell'olivo ligure e gardesano*. Ann. Sper. Agr., NS7: 1957-1976.
- CORTE, A., CIFERRI, R., RUI, D., 1961. *Infezione su ligustro da malformazione fogliari dell'olivo*. Riv. Pat. Veg., Pavia S.III, 1: 251-260.
- ESTEVE DA CLARA, M., 1996. *Viruses and their importance on clonal and sanitary selection of Olea europea L. cultivares in Portugal*. Master en Olivicultura y Elaiotecnica, ETSIAM, Universidad de Córdoba 12 pp.
- HENRIQUES, M. I. C., 1994. *Virus diseases of olive: an overlook*. Acta Hortic., 356:379-385.
- HENRIQUES, M. I. C., REI, F. T., LEITAO, F. 1993. *Aplicação da técnica ELISA para detecção do nepovirus "Strawberry Latent Ringspot" e do cucumovirus "Cucumber Mosaic" em cultivares de Olea europaea L.* II Congresso Iberico de Ciências Hortícolas. Actas de Horticultura 9: 215-220.
- HENRIQUES, M. I. C., REI, F. T., LEITAO, F. A., SERRANO, J. F. AND POTES, M. F. 1992. *Virus diseases in Olea europaea L. cultivars. I. Immunodiagnosis of Strawberry latent ringspot nepovirus*. Phytopath. Medit., 31: 127-132.
- LAVEE, S., TANNE, E. 1984. *Spherosis - A virus disease of the olive (Olea europaea L.)*. I Symptoms, growth, tree development and production. Olea (June):71-75.
- MARTE, M., GADANI, F., SAVINO, V., RUGGINI, E. 1986. *Strawberry latent ringspot virus associated with a new disease of olive in Central Italy*. Plant Dis. Repr., 70:171-172.
- NICOLINI, J. C., TRAVERSI, B. A. 1950. *Observaciones sobre una nueva enfermedad del olivo en la Argentina*, Inf. Direc. In-

vest. Agric., Buenos Aires, 3: 1-6.

- OLMOS, A., DASI, M.A., CANDRESSE, T., CAMBRA M., 1996. *Print-capture PCR: a simple and highly sensitive method for the detection of Plum pox virus (PPV) in plant tissues*. Nucleic Acids Research, 24: 2192-2194.
- PACINI, E., CRESTI, M., 1977. *Viral particles in development pollen grains of Olea europaea*. Planta 137-1-4.
- REI, F. T. 1995. *Aplicação do método de isolamento de cadeias duplas de RNA (doublestranded RNA) no diagnóstico de infeções virais em Olea europaea L.* Tese de Mestrado, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, 95 pp.
- REI, F. T., HENRIQUES, M. I. C., LEITAO, F., SERRANO, J. F., POTES, M. F. 1993. *Immunodiagnosis of cucumber mosaic cucumovirus in different olive cultivars*. EPPO Bulletin, 23: 501-504.
- RIBALDI, M. 1959. *Observazioni preliminari sopra un giallume infettivo dell'olivo (Olea europaea L. var. sativa Hoff. et Lk.)*. Not. Mal. Piante 47-48 (N S 26-27): 178-181.
- SAVINO, V., BARBA, M., GALLITELLI, D., MARTELLI, G. P. 1979. *Two nepoviruses isolated from olive in Italy*. Phytopath. medit. 18: 135-142.
- SAVINO, V., GALLITELLI, G. 1981. *Cherry leaf roll virus in olive*. Phytopath. medit. 20: 202-203.
- SAVINO, V., GALLITELLI, D., BARBA, M., 1983. *Olive latent ringspot virus, a newly recognised virus infecting olive in Italy*. Ann. Appl. Biol. 103: 243-249.
- SAVINO, V., SABANADZOVIC, S., SCARIBO, G., LAVIOLA C., MARTELLI, G. P. 1996. *Due giallumi dell'olivo di possibile origine virale in Sicilia*. Informatore fitopatologico 5: 55-59.
- SERRANO, J. L. F., LEITAO, F., POTES, M. F., CLARA, M. I. C., REI, F. T., AMARAL, L. 1995. *Studies on rooting ability of virus - infected vegetative material of Olea europaea L. cultivars*. Olea 23: 37-38.

¹Dep. de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Moncada. Valencia.

²Unitat de Sanitat Vegetal. Dep. d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de Catalunya. Barcelona.

³Centro de Investigación y Formación Agraria "Alameda del Obispo". Córdoba.