

**AGALLA DE CORONA EN PLANTAS DE OLIVO (*Olea europea* L.) CAUSADA  
POR *Agrobacterium tumefaciens* (SMITH Y THOWNSEND) CONN. EN LA  
PROVINCIA DE LA RIOJA.**

*Seleme, Felisa; González Vera, Carlos; Di Barbaro, Gabriela; Pernasetti, Susana y Batallán, Silvana*

Cátedra de Fitopatología. Cátedra de Microbiología Agrícola. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Catamarca. Avda. Belgrano y Maestro Quiroga. (4700), Catamarca. E-mail: fitopal@yahoo.com.ar, micro\_fca@yahoo.com.ar.

**CROWN GALLS IN PLANTS OF OLIVE TREE (*Olea europea* L.) CAUSED BY  
*Agrobacterium tumefaciens* (SMITH AND THOWNSEND) CONN. IN THE  
PROVINCE OF LA RIOJA.**

**SUMMARY**

On plants of Olive tree (*Olea europea* L.), coming from lots located in Catinzaco, Province of La Rioja, an illness that involved the stems of plants of seven years of age of the varieties Frantoio and Leccino was detected in November of 2004. It was characterized for presenting cracked bark in the neck and formation of galls with dead cortical tissue. In other plants, besides these symptoms, galls were observed in form of dispersed warts in the stems up to their bifurcation, where the bark opened up and galls appeared. It was also observed a great proliferation of roots, normal foliage and a good flowering. The objective of the present work was to identify the causal agent of the symptoms observed in plants of Olive tree. Isolations were carried out starting from gall tissues in Potato Agar Glucose (PAG), Nutritious Agar (NA) and in the culture medium recommended for *Agrobacterium* (PYGA). They were incubated in stove at 25°C. After a period of 72 hs., convex and mucoides of flat borders white-beige bacterial colonies were developed. Colorations of Gram-Nicolle and of spores (Shaeffer and Fulton) and the biochemical tests of glucose and ureasa were carried out. The results indicated that the etiologic agent is *Agrobacterium tumefaciens*. For the patogenicity tests, tomato coming from seedlings was used, in which the symptoms from the illness

at 25 days of its inoculation were reproduced. Together with the reisolation, they confirm the identification of *Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Thwnsend) Conn.

**KEY WORDS:** *Agrobacterium tumefaciens*, *Olea europea*, olive, crown galls

## **RESUMEN**

Sobre plantas de Olivo (*Olea europea* L.), provenientes de lotes en producción localizados en Catinzaco, Provincia de La Rioja, se detectó en noviembre de 2004, una enfermedad que involucraba el tallo de plantas de siete años de edad de las variedades Frantoio y Leccino. Esta se caracterizó por presentar corteza agrietada en el cuello y formación de agallas con tejido cortical muerto. Además de estos síntomas, en otras plantas se observaron agallas en forma de verrugas dispersas en el tallo hasta su bifurcación, en donde la corteza se abría y aparecían agallas irrupentes. También se observó gran proliferación de raíces, follaje normal y buena floración. El objetivo del presente trabajo fue identificar el agente causal de los síntomas observados en plantas de Olivo. Se realizaron aislamientos a partir de tejidos de agallas en Agar Papa Glucosado (AGP), Agar Nutritivo (AN) y en el medio de cultivo recomendado para *Agrobacterium* (PYGA), se incubaron en estufa a 25°C. A las 72 hs. se desarrollaron colonias bacterianas blanco-beige, convexas y mucoides de bordes lisos. Se realizaron coloraciones de Gram-Nicolle y de esporas (Shaeffer y Fulton) y las pruebas bioquímicas de glucosa y ureasa. Los resultados obtenidos indicaron que el agente etiológico es *Agrobacterium tumefaciens*. Para las pruebas de patogenicidad se usaron plantines de tomate provenientes de almácigo, en los cuales se reprodujeron los síntomas de la enfermedad a los 25 días de su inoculación. Junto con los reaislamientos confirman la identificación de *Agrobacterium tumefaciens* (Smith y Thwnsend) Conn.

**PALABRAS CLAVES:** *Agrobacterium tumefaciens*, *Olea europea*, Olivo, agallas de corona

## **INTRODUCCIÓN**

La agalla de corona es una enfermedad que afecta a un gran número de plantas y es causada por la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (Smith y Thownsend) Conn. Esta enfermedad causa importantes pérdidas económicas en las producciones locales.

El nombre de esta enfermedad se debe a las agallas de aspecto tumoroso que aparecen en la corona de la planta, zona del cuello justo por encima del nivel del suelo. La formación de agallas se debe a que la bacteria transfiere parte de su ADN a la planta, el cual se integra al genoma de la planta, causando la formación de tumores por la proliferación de las células vegetales y cambios asociados con el metabolismo de las plantas. Las hormonas de la planta alteran el balance normal del crecimiento de la célula, la que lleva a la producción de agallas y un ambiente rico en nutrientes para la bacteria.

En 1974, los investigadores Jeff Schell y Marc Van Montagu aislaron los genes inductores de tumores de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* y descubrieron que se transportaban a través de un plásmido. Los microbiólogos Eugene Nester, Milton Gordon y Mary – Dell Chilton, de la Universidad de WASHINGTON en 1977, demostraron que los genes de este plásmido bacteriano se transferían a los cromosomas de las células vegetales, cuando la bacteria infectaba a las plantas donde inducían a que estos se dividieran en forma continua hasta desarrollar las agallas ([www.7.nationalacademies.org/spanishbeyonddiscovery](http://www.7.nationalacademies.org/spanishbeyonddiscovery)). Los genes inductores de tumores de *A. tumefaciens* se encuentran en plásmido, denominado plásmido Ti y no en el cromosoma bacteriano. El plásmido Ti o inductor de tumores, está constituido por un ADN circular independiente del contenido nuclear de la célula bacteriana. El plásmido posee una región en la que se encuentran los genes VIR que le confieren la virulencia o poder infectivo a la bacteria. Además tiene una región T que es transferida a la célula de la planta en donde están los genes que codifican la síntesis de auxinas y citoquininas, y también la síntesis de opinas y agropinas que son utilizadas por la bacteria.

*Agrobacterium tumefaciens* es una bacteria aerobia facultativa, Gram negativa, de forma bacilar y no producen esporas (Deacom et al.,?; Linardelli, 1999; <http://www.ica.gov.co/plagas/aster/asterendemica/aster12.htm>). Forman colonias circulares, en forma de cúpula de color crema (blanca o beige) y altamente mucosa en medios ricos en hidratos de carbono. Se encuentran comúnmente en la rizósfera de la planta y sólo infectan los tejidos al ingresar por heridas. Estas son causadas por las podas o por diferentes labores culturales, pero también se producen por la emergencia natural de las raíces y por la acción de nemátodos e insectos. Siendo los nemátodos los principales vectores de esta bacteria.

El patógeno coloniza las heridas e infecta la planta al transmitir una porción de su plásmido. Se multiplica en los espacios intercelulares y sólo las células en contacto con la bacteria se transforman en cancerígenas, multiplicándose normalmente y culminando con la formación de tumores característicos (Linardelli, 1999). La expresión de los genes en la transmisión del ADN ocasiona una producción excesiva de hormonas resultando en el ensanchamiento y desarrollo de agallas por una activa división celular. Las plantas infectadas desarrollan agallas en las raíces y tallos, y una excesiva producción de pelos radicales y raíces. Las agallas también ocurren en raíces laterales y por encima de los tallos. Luego, las plantas afectadas frenan su crecimiento y presentan poco desarrollo de raíces y tallos, ocasionando una planta más susceptible a las condiciones ambientales. Las agallas de corona son tumores bulbosos que al desarrollarse sobresalen del tallo de las plantas infectadas, provocando que crezcan mal e importantes pérdidas en la cosecha. (Sawada, and Ieki, 1992).

*Agrobacterium tumefaciens* es una bacteria habitante normal del suelo que se encuentra en la mayoría de los suelos agrícolas, que puede vivir sin causar daños adherida a raíces de plantas, incluso en plantas no huéspedes, aumentando la cantidad de sustancias que liberan las raíces en la rizósfera. Puede diseminarse por medio de la lluvia, el agua de riego, herramientas, vientos, insectos y por la propagación agámica de plantas enfermas. La bacteria se disemina a partir de las agallas en el suelo o en el agua, o por vectores. También puede sobrevivir saprofiticamente en tejidos vasculares de algunas plantas y en los suelos por uno o dos años en estado libre.

En investigaciones realizadas por Linardelli en la región de Cuyo, se ha detectado esta enfermedad en plantines de Olivo (*Olea europea*) y la presencia de la bacteria en sustratos utilizados en algunos viveros. A pesar que no observaron síntomas macroscópicos que indicaran la presencia de *A. tumefaciens* en los plantines y en las plantas analizadas, se determinó su presencia mediante tests biológicos, demostrándose que todos los cultivares de Olivo analizados son sensibles a la enfermedad. En estos estudios también se detectó la bacteria en agua de riego y en suelo sin cultivar. (Linardelli, 1999)

En noviembre de 2004, en lotes de producción de aceituna para aceite localizados en Catizaco, Provincia de La Rioja, se observó en plantas de Olivo (*Olea europea*), tallos con corteza agrietada en el cuello y agallas con tejido cortical muerto. Por lo cual el objetivo del presente trabajo fue identificar el agente causal de los síntomas observados en estas plantas.

## **MATERIAL Y MÉTODO**

### **Aislamiento del agente causal**

Se extrajeron del cuello de plantas de Olivo, de siete años de edad, agallas con tejido cortical, las cuales fueron desinfectadas superficialmente con Hg Cl<sub>2</sub> al 1% y posteriormente lavadas con agua corriente estéril para eliminar el Hg Cl<sub>2</sub> remanente. Se sembraron los tejidos de agallas en los medios de cultivo Agar Papa Glucosado (AGP), Agar Nutritivo (AN) y en el medio de cultivo recomendado para *Agrobacterium* (PYGA), las siembras se incubaron en estufa, en oscuridad y a 25°C durante 72 hs. (López, 1991).

### **Identificación de la bacteria**

Se tomó con ansa una colonia típica y se sembró por estrías en superficie en medio PYGA, en el estriado se desarrollaron colonias con el aspecto general típico de las colonias de *Agrobacterium*. Se realizaron coloraciones de Gram-Nicolle y de esporas (Shaeffer y Fulton) y las pruebas bioquímicas de la glucosa y de la ureasa, (López, 1991).

### **Cultivo de mantenimiento**

Los aislamientos se repicaron en tubos con medio CN y con medio PYGA en pico de flauta, se incubaron a 25°C y posteriormente se conservaron a 2°C.

### **Patogenicidad en otras plantas**

Después de aislar la bacteria se realizó la prueba de patogenicidad. Se usaron plantines de tomate (*Lycopersicum esculentum*) provenientes de almácigos preparados especialmente para la realización de este test de patogenicidad. Los plantines fueron inoculados con la cepa aislada mediante un pinchazo con aguja en la zona del cuello y posteriormente se colocaron en invernáculo.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Las plantas mostraban en la zona del cuello la corteza agrietada y agallas con tejido cortical muerto. También se encontraron agallas en forma de verrugas dispersas hasta su bifurcación. En el inicio de la ramificación se observó la corteza levantada en forma de labios con formación de agallas irrupentes. Al descalzar la planta se observó la gran proliferación de raíces que nacen directamente del cuello, sin la presencia de agallas y con buena sanidad. El follaje de aspecto normal y con buena floración.



**FOTOS N° 1 y 2:** Planta de olivo con corteza agrietada y agallas en la región del cuello.



**FOTO N° 3:** Planta de olivo con agalla en la región del cuello.



**FOTOS N° 4 y 5:** Planta de olivo con agallas en forma de verrugas.

Al realizar observaciones con microscopio de cortes de tejidos de agallas jóvenes se constató la presencia de bacterias en tejidos de aspecto esponjoso, de color blanco y con exudado de gotitas brillantes.

Entre las 42 y 72hs. de incubación se desarrollaron colonias bacterianas blanco-beige, convexas y mucoides de bordes lisos; que según a la bibliografía responden al aspecto general típico de las colonias de *Agrobacterium*. En la foto N° 6, se observa la uniformidad de las colonias típicas de *Agrobacterium* en el estriado.



**FOTO N° 6:** Colonias típicas de *Agrobacterium* en medio de cultivo PYGA.

En los preparados coloreados se observaron bacilos Gram (-), no esporulados. Sumado a las pruebas bioquímicas de la glucosa y la ureasa determinaron que el agente etiológico es *Agrobacterium tumefaciens*.

Las pruebas de patogenicidad reprodujeron los síntomas de la enfermedad. A los 15 días de realizada la inoculación con la cepa aislada, comenzó a observarse la formación de agallas y alrededor de los 25 días ya estaban formadas, también se observó sobre la superficie de la misma una consistencia leñosa. Después de los 30 días las plantas de tomate comenzaron a morir. Los reaislamientos confirman la identificación de *Agrobacterium tumefaciens* (Smith y Thwnsend) Conn.



**FOTOS N° 7 y 8:** Plantines de tomate (*Lycopersicum esculentum*) inoculados con la cepa aislada, a los 15 días de la inoculación se observan síntomas de la enfermedad.



**FOTOS N° 9, 10 y 11:** Plantines de tomate a los 25 días de la inoculación con agallas de aspecto leñoso. Después de los 30 días las plantas de tomate comenzaron a morir.

Sin embargo, cuando se aísla *Agrobacterium* de la superficie de la raíz de las plantas, la mayoría de los aislamientos (el 90% o más) resultan ser no-patogénicos, aún cuando se realizó el aislamiento a partir de plantas enfermas. Esas cepas no-patogénicas son llamadas *Agrobacterium radiobacter*, por esto, *Agrobacterium* que es esencialmente un habitante de la rizósfera de las plantas, sólo una pequeña proporción son cepas patogénicas, es decir que contienen el plásmido Ti. (Deacom et al., ?)



## **CONCLUSIÓN**

Los resultados obtenidos indican que el agente etiológico de las agallas de corona en plantas de Olivo (*Olea europea* L.), que se encuentran en la localidad de Catinzaco en la Provincia de La Rioja, es *Agrobacterium tumefaciens* (Smith y Thwnsend) Conn.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- DEACOM JIN, ALINE ROBERTSON, ALAN ISBISTER (?) Biología y control de Agalla de Corona (*Agrobacterium tumefaciens*). Universidad de Edimburgo. : 15p.
- Control de la Agalla de Corona. Beyond Discovery. (<http://www.7.nationalacademies.org/spanishbeyonddiscovery/bio-007519-03.html>). Fecha de Consulta: 18/10/2005. : 4p.
- *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend) Conn. (1942). (<http://www.ica.gov.co/plagas/aster/asterendemica/aster12.htm>). : 5p.
- LINARDELLI, C.E. (1999). Bacteriosis del Olivo. Sanidad del Olivo: Jornadas de actualización. Mendoza, Argentina. :17-20.
- LÓPEZ MA. M. (1991). Género *Agrobacterium*. Manual de Laboratorio. Diagnóstico de hongos, bacterias y nematodos fitopatógenos. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria. I.S.B.N.84-7479-907-4. Madrid. España. Capítulo 11. :149-168.
- SAWADA, H. and IEKI, A. (1992). Crown Gall of Kiwi Caused by *Agrobacterium tumefaciens* in Japan. Plant Disease. Volume 76, Number 2. :212.