

### Summary

*A survey of grapevines (Vitis vinifera L.) was done in four farms of the State of Zulia, Venezuela.*

*Four types of samples of grapevine leaves, including petioles, were collected, with typical symptoms, of Pierce Disease (PD), symptomless, salinity and chlorosis symptoms. The samples were processed and testing by means of ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) to detect the presence of PD bacterium*

*Positive reaction for PD were obtained resulting over 2-5 times the highest absorbance values (405 nm), for disease plants, as referred to an absolute check of buffer solution of phosphate salts (PBS). Eight samples collected with PD symptom were positive by ELISA and 3 of 4 samples with salinity symptom positive. At least one sample of each farm showed absorbance figures greater than the mean of 30 samples of healthy plants plus the double of its standard deviation.*

### Introducción

**E**l Mal de Pierce (MP) fue reconocido por primera vez en 1982 en *Vitis vinifera* en California (15) y actualmente es el factor que mayor limita el cultivo de la vid europea en Florida (2), Mississippi, Georgia, Alabama (7) y Texas (16). También se le ha encontrado en Costa Rica (5) y México (17).

Recientemente se aisló en medio artificial un bacilo Gramnegativo, catalasa positiva, de plantas de vid que mostraban síntomas del MP (3, 13). La misma bacteria causa también la quemadura de la hoja en el almendro (2, 12) y el enanismo en la alfalfa (4, 6).

El diagnóstico del MP, con base en los síntomas de la enfermedad, resulta incierto, debido a que frecuentemente estos se confunden con otras enfermedades o con problemas nutricionales.

En 1980 Nomé *et al.* (14), introdujeron la técnica ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) en el diagnóstico del MP de la vid, técnica que resulta más segura y ventajosa que otras utilizadas anteriormente (14, 19).

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la presencia del MP en cuatro fincas del Estado de Zulia, Venezuela mediante la técnica ELISA.

### Materiales y métodos

#### Recolección de la muestra

Se recolectaron 15 muestras de hojas incluyendo pecíolos, de plantas de vid, en el mes de diciembre de 1982, en cuatro fincas del Estado de Zulia, Venezuela. Las muestras fueron trasladadas a la Universidad de Costa Rica, en donde se realizó el análisis.

1 Recibido para publicación el 3 de noviembre de 1984. El autor agradece la colaboración del señor Albert Ingalls III, A la señora Cristina Visona del ICRMT y a la señora Carmen Rivera del CIBCM de la Universidad de Costa Rica, por la ayuda prestada.

\* Profesor, Escuela de Fitotecnia, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica. Dirección Actual: Asociación Bananera Nacional, ASBANA, Apdo 6504-1000, San José, Costa Rica.

### Aislamientos

Para la preparación de los sueros inmunes se usaron tres aislamientos de la bacteria, dos de Montezuma, Costa Rica y uno del Valle de Napa, California. Los aislamientos se mantuvieron a 27°C con subcultivos semanales en medio JD-3 (3).

Para comprobar la especificidad del método utilizado, las bacterias del MP se compararon (inmunológicamente) con 6 cultivos de bacterias, a saber: *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Erwinia* sp y *Escherichia coli*, los cuales se obtuvieron en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica.

### Producción de antisuero

El suero antibacteria del MP se produjo en conejos de las razas Nueva Zelandia y California. El antisuero se preparó a partir de cultivos en plato, resuspendidos en un amortiguador de sales de fosfato (PBS)<sup>1</sup> 0.1 M, pH 7. (NaCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, KCl y NaN<sub>3</sub>). Se centrifugó 15 minutos a 20 000 G y se lavó 5 veces en PBS. El concentrado fue resuspendido en PBS, a una concentración de 10<sup>9</sup> bacterias por mililitro, y sonificado durante 20 segundos (sonicador Modelo WI40 System Ultrasonic) para romper las células.

Los conejos fueron inmunizados inoculándose en forma intravenosa con dosis crecientes de 1 ml, 1.5 ml, 2.0 ml, 2.5 ml, 3.0 ml y 3.5 ml a intervalos de tres días por un período de tres semanas, al cabo de las cuales se le inyectaron intramuscularmente dosis de 4 y 4.5 ml del antígeno emulsificado con adyuvante incompleto de Freud<sup>2</sup> con un intervalo de tres días entre cada dosis. Los conejos fueron desangrados una semana después de aplicada la última dosis.

Los antisueros preparados mostraron una especificidad serológica idéntica independientemente de la cepa utilizada en la inmunización.

### Preparación de las muestras

Las muestras de la planta se prepararon a partir de hojas y peciolo (1 a 2 g) en solución amortiguadora de extracción (PBS + 2% PVP)<sup>3</sup>, se maceró y filtró a través de gasa, se centrifugó (15 000 G/15 minutos), en una ultracentrífuga Hitachi 19 PR-3, se decantó y redisolvió en PBST<sup>4</sup> + 2% PVP y por último se sonicó por 15 minutos.

1 Phosphate-Buffered Saline

2 DII-CO (Catálogo No. 0638-60)

3 PVP = polivinilpirrolidone (Sigma)

4 (PBS + 0.5 ml/l tween 20).

La muestra de bacterias fueron preparadas a partir de cultivos con suficiente crecimiento y resuspendiéndose en PST + 2% de PVP hasta lograr una concentración de 10<sup>9</sup> bacterias/ml y se sonicaron por 15 segundos con el fin de romper las células; posteriormente se hicieron diluciones seriadas hasta una concentración final equivalente 10<sup>4</sup> bacterias/ml, con el fin de determinar la sensibilidad de la técnica.

### Pruebas de ELISA

La técnica usada fue similar a la descrita por Clark y Adams (1) con algunas modificaciones (8).

La globulina fue purificada a partir del antisuero contra la bacteria del MP por precipitación con sulfato de amonio y filtrado a través de una columna de celulosa DEAE-Sephacel (1-6505 Sigma Chemical Co.) preequilibrada con PBS. La fracción no absorbida se colectó y se estandarizó a una concentración de 1 mg/ml (densidad óptica de 1.4 a 280 nm). Una porción de globulina se conjugó con fosfatasa alcalina tipo VII (No. 5521 Sigma) usando glutaraldehído a una concentración final de 0.1% y se almacenó a 4°C con albúmina de suero de bovino (A-7888 Sigma) al 1% y azida de sodio al 0.02%.

La prueba se realizó en placas de micro ELISA (Dynatech Laboratories Cat. No. 1-223-29) colocando para efecto de cobertura una alícuota de 200 µl/celda de gama globulina inmune 1:200 en solución amortiguadora de bicarbonato 0.1 M, pH 9.6 (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>) incubándola por 4 a 6 h a 37°C. Las placas se lavaron con PBST. Se colocó una alícuota de 200 µl/celda de muestra y se incubó durante toda la noche a 6°C; se lavó con PBST y se colocó el conjugado diluido 1:200 en PBST + 2% PVP (PVP-40T, Sigma) y ovalbúmina (Sigma) al 0.2%. Las placas se lavaron con PBST y se le agregó el sustrato de la enzima (p-nitrofenilfosfato Sigma) a una concentración de 1 mg/ml en solución amortiguadora para sustrato pH 9.8 (dietanolamina al 12% en H<sub>2</sub>O). La reacción se detuvo con NaOH 3 M a razón de 50 µl/celda al cabo de 3 h de incubación a 37°C en la oscuridad. Los resultados se obtuvieron en un espectrofotómetro de microelisa (Micro ELISA Auto Reader MR-580, Dynatech) a 405 nm.

### Resultados

La técnica ELISA resultó ser segura para el diagnóstico del MP. El suero antibacterial del MP resultó ser altamente específico para la bacteria del MP, pues no se logró obtener reacción de ELISA positiva con ninguno de los cultivos de *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Erwinia* sp y *Escherichia coli*. Como se observa en el Cuadro 1 se

Cuadro 1. Valores de ELISA para la bacteria del MP de 15 muestras de 4 fincas de Venezuela.

Finca	Síntomas	Valores de absorbancia (405 nm)	Resultado
El Patrón	MP	0.68	+
El Patrón	MP	0.95	+
El Patrón	MP	0.95	+
El Patrón	S	0.48	+
Los Pachos	MP	0.51	+
Los Pachos	MP	0.49	+
Los Pachos	MP	0.57	+
Los Pachos	S	0.37	-
Los Pachos	S	0.65	+
Maribelo	MP	0.64	+
Maribelo	S	0.68	+
Tocuyo	MP	0.56	+
Tocuyo	OS	0.36	-
Tocuyo	OS	0.44	-
Tocuyo	SS	0.37	-
Testigo Sano	SS	0.36	-

MP : Mal de Pierce                    OS : Otros síntomas  
 SS : Sin síntomas                    S : Salinidad

obtuvieron valores hasta 2.5 veces más altos para plantas enfermas con respecto a un testigo de plantas sanas

Las ocho muestras recolectadas con síntomas del MP resultaron ser positivas mediante ELISA a la presencia de la bacteria del MP (Cuadro 1). Los síntomas de estas plantas consistieron en:

- a) Quemadura de la hoja del borde hacia el centro en forma repentina (Figura 1)
- b) La zona que separa el tejido necrótico del tejido normal va desde un color amarillo hasta un rojo púrpura
- c) Las nervaduras permanecen verdes aún cuando el tejido que los rodea haya muerto
- d) Lignificación irregular del tallo
- e) Fácil desprendimiento de las hojas con síntomas en la inserción de la lámina con el pecíolo (Figura 2)

En tres de cuatro muestras recolectadas, con síntomas considerados como salinidad, se obtuvieron resul-



Fig 1 Síntomas típicos del mal de Pierce en vid en la hoja - Maracaibo, Venezuela



Fig 2 Síntomas del mal de Pierce en vid, obsérvese los pecíolos adheridos al tallo sin la lámina foliar

tados positivos a la presencia de la bacteria del MP. Los síntomas de salinidad se caracterizaron por una escaldadura de la hoja, la cual estaba presente solamente en algunas hojas de la planta

Tanto una muestra colectada de una planta aparentemente sana, como dos muestras que presentaban síntomas de clorosis no asociada al Mal de Pierce, resultaron negativas a la presencia de la bacteria

### Discusión

El estudio de la presencia del MP en Venezuela, mediante la técnica ELISA, método que ha resultado ser más ventajoso y seguro que otros probados anteriormente (9, 10 y 14) confirma las observaciones de algunos productores de vid del Estado de Zulia, en el sentido de que algunos síntomas foliares de quemadura de la hoja podrían deberse al MP.

El MP originalmente fue observado solamente en los Estados Unidos pero también ocurre en Costa Rica (5, 9 y 10) y México (17) y es muy probable que la enfermedad, que es endémica desde el Sur de los Estados Unidos (11, 18) hasta Costa Rica, lo sea también al menos en una área de Suramérica como Venezuela y Colombia donde también se cultiva la vid europea o *Vitis vinifera* L.

Sin embargo, a pesar de que es común observar síntomas del MP en los viñedos de Maracaibo cercanos al lago del mismo nombre, la enfermedad no parece ser muy severa, como sí lo es en el Sur de los Estados Unidos y en Costa Rica, en donde limita la producción comercial de *Vitis vinifera*.

Lo anterior se debe principalmente a que las condiciones de Venezuela son muy diferentes a las de Costa Rica. En el Estado de Zulia la temperatura alcanza 40°C o más en el día, y en la noche es de 5 ó 10°C más baja; la vegetación silvestre es escasa y es difícil encontrar insectos en las plantaciones de vid o en las malezas, lo cual ayuda a disminuir la incidencia y severidad de la enfermedad; además el riego abundante que se suministra a las plantaciones evita la tensión que predispone la planta a la enfermedad.

### Resumen

A cuatro viñedos de Maracaibo, Estado de Zulia, se les realizó un muestreo foliar, incluyendo peciolo, de plantas con síntomas típicos del Mal de Pierce (MP), con síntomas de salinidad, con clorosis y sin síntomas. Las muestras se procesaron por medio de la técnica ELISA, de conjugados enzimáticos, para determinar la ausencia o presencia de la bacteria del MP.

Se obtuvieron valores de absorbancia (405 nm) para plantas enfermas de hasta 2.5 veces más altos con respecto a un testigo absoluto de una solución amortiguadora de sales de fosfato (PBS).

Las ocho muestras colectadas con síntomas típicos del MP y 3 de 4 muestras con síntomas de salinidad resultaron positivas mediante ELISA y al menos una

muestra de cada finca mostró valores de absorbancia mayores que el promedio de 30 muestras de plantas sanas más el doble de su desviación estándar.

### Literatura citada

- 1 CLARK, M. F. y ADAMS, A. N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant injuries. *Journal of General Virology* 34:475-483. 1977.
- 2 CRALL, J. M. y STOVER, L. H. The significance of Pierce's disease in the decline of bunch grapes in Florida. *Phytopathology* 47:518. 1957.
- 3 DAVIS, M. T., PURCELL, A. H. y THOMPSON, S. V. Pierce's disease of grapevine: Isolation of the causal bacterium. *Science* 199:75-77. 1978.
- 4 GOHEEN, A. C., NYLAND, G. y LOWE, S. K. Association of a rickettsia-like organism with Pierce's disease of grapevines and alfalfa dwarf and heat therapy of the disease in grapevines. *Phytopathology* 63:341-345. 1973.
- 5 GOHEEN, A. C., LOWE, S. K. y NYLAND, G. Pierce's disease of grapevine in Central America. *Plant Disease Reporter* 63:788-792. 1979.
- 6 HEWITT, W. B., HOUSTON, B. R., FRAZIER, N. W. y FREITAG, J. H. Leafhopper transmission of the virus causing Pierce's disease of grape and dwarf of alfalfa. *Phytopathology* 36:117-118. 1946.
- 7 HEWITT, W. B., HOUSTON, B. R., FRAZIER, N. W. y FREITAG, J. H. The probable home of Pierce's disease virus. *Plant Disease Reporter* 42:211-215. 1958.
- 8 JIMENEZ, J. M. Determinación de los hospedantes alternos del Mal de Pierce's de la vid mediante técnicas inmunológicas de adsorción con conjugados enzimáticos. Tesis, Escuela de Fitotecnia - Universidad de Costa Rica. 1982. 114 p.
- 9 JIMENEZ, A. L. G., MORALES-BANCE, F. y FERNANDEZ, B. Estudio preliminar de la distribución del Mal de Pierce de la Vid en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 5(1/2):127-130. 1981.

10. JIMENEZ, A. L. G. y MORALES-BANCE, F. Determinación del Mal de Pierce de la Vid en Costa Rica, determinada mediante ELISA. *Agronomía Costarricense* 9(1) 1985, in prensa
11. LOOMIS, N. H. Performance of *Vitis* species in the South as an indication of the relative resistance to Pierce's disease. *Plant Disease Reporter* 42:833-836 1957
12. MIRCETICH, S. M., LOWE, S. K., MOLLER, W. J. y NYLAND, G. Etiology of almond leaf scorch disease and transmission of the causal agent. *Phytopathology* 66:17-24 1976.
13. MOLLENHAUER, H. H. y HOPKINS, D. L. Ultrastructural study of Pierce's disease bacterium in grape xylem tissue. *Journal of Bacteriology* 119:612-618 1974
14. NOME, S. F., RAJU, C. U., GOHEEN, B. y NYLAND, G. Enzymelinked immunosorbent assay for Pierce's disease bacteria in plant tissue. *Phytopathology* 70:746-749 1980
15. PIERCE, N. B. The California vine disease. USDA. Division of vegetable pathology. Washington, Government Printing Office Boletín No. 2 1982, 222 p
16. PERRY, R. L. y MOLLENHAUER, H. H. Electron photomicroscopy verification of Pierce's disease in grape plants from Texas. *Plant Disease Reporter* 58:780-782 1974
17. RAJU, B. C., GOHEEN, A. C., TELIZ, D. y NYLAND, G. Pierce's disease of grapevine in Mexico. *Plant Disease* 64:280-282 1980
18. RAJU, C. B., GOHEEN, A., TELIZ, D. y NYLAND, G. Alternative host of Pierce's disease of grapevine that occur adjacent to grape growing areas in California. *American Journal of Enology and Viticulture* 31:144-148 1980
19. VOLLER, A. The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of General Virology* 33:165-167 1976.

## Reseña de libros

CARVAJAL, J. F. Cafeto-Cultivo y Fertilización  
Segunda Edición Instituto Internacional de la Po-  
tasa Berna, Suiza 1984 254 p

Al igual que la primera edición, este pequeño libro viene a enriquecer la literatura cafetalera moderna, acopiando en una obra la revisión de muchas de las publicaciones técnicas más notables de los últimos años.

La segunda edición se publica a los 12 años de haberse publicado la primera. Consta de los mismos seis capítulos, aunque el cuarto se ha subdividido en tres secciones.

Cada uno de los capítulos ha sido ampliado y actualizado. El primero de ellos, por ejemplo, tiene cerca de 40 nuevas citas bibliográficas y desde luego incluye ideas y trabajos como los de M. G. R. Cannell, L. Fournier, M. Maestri, R. S. Barros y otros. Hay más detalles sobre el efecto del ambiente (luz, temperatura, agua, nutrimentos, suelo, etc.) sobre el crecimiento y producción del café.

Otro capítulo bastante ampliado es el de las prácticas culturales, en el que se ha incluido una detallada

descripción de las podas de formación y producción. También se dedica más atención al establecimiento de las plantaciones, citando los interesantes trabajos de Kenya sobre espaciamientos. Las enfermedades y plagas han recibido un tratamiento más prolijo.

En esta edición continúa siendo el "plato fuerte" la nutrición y la fertilización científica del café, con una cobertura muy completa sobre los métodos de diagnóstico de deficiencias en los que el autor es un experto. Es ésta la sección más sustanciosa y rica del libro.

En general, esta nueva edición ha sido mejorada y actualizada considerablemente. La impresión y preparación del libro es tan nítida y cuidadosa como la de la edición anterior. Esta vez se usó un tipo de letra más grande, lo que aumenta significativamente la comodidad de su lectura.

Mantiene esta segunda edición el lenguaje simple, pero científico de la anterior. También se conserva esa sensación de que ha sido escrito para gente que conoce los preliminares del cultivo. En otras palabras, no es un manual en el sentido tradicional de la palabra. Podría pensarse que eso limita un tanto su uso y definitivamente es así. El aprovechamiento de este libro requiere conocimientos básicos cafetaleros, proporcionando información más profunda y al día.

CARLOS ENRIQUE FERNANDEZ  
HCA, AREA CENTRAL