

## DISTRIBUCION DEL MAL DE PIERCE DE LA VID EN COSTA RICA DETERMINADA MEDIANTE LA TECNICA ELISA<sup>1/\*</sup>

Luis G. Jiménez\*\*  
Fernando Morales-Bance\*\*\*

### ABSTRACT

Distribution of Pierce's disease of grapevine in Costa Rica. A survey of disease of grapevine (*Vitis vinifera* L.) was done during the months of February 1981 and March 1982, including seven farms distributed in four provinces of Costa Rica.

Samples of grape vine leaves, including petioles, were processed and tested by means of the ELISA techniques (enzyme linked immunosorbent assay) to detect the presence of the Pierce's disease bacteria (PD).

Positive reactions resulted over 3.5 times the highest absorbance values at the A 405 nm, for diseased plants, as referred to an absolute check of buffer solution of phosphate salts (PBS). At least one sample from each farm showed absorbance figures greater than the mean of 30 samples of healthy plants, plus the double of this standard deviation. Tucurrique farm in the province of Cartago showed the highest percentage (70%) of positive samples.

### INTRODUCCION

El Mal de Pierce (MP) es el principal factor limitante en el cultivo de la vid en el Sureste de los Estados Unidos (2, 7, 14) y recientemente se ha informado de su presencia en México (15) y Costa Rica (5).

Loomis (10) en Florida ha señalado que solamente las especies *Vitis sp.* nativas de esta área han logrado sobrevivir 15 o más años y en este mismo sentido Hewitt (7) sugiere que el MP es originario de la llanura costera del Golfo de México en donde las especies silvestres son resistentes al MP. El agente causal del MP es un bacilo gram-negativo, catalasa positivo (3) y es el mismo agente etiológico

que causa la quemadura de la hoja del almendro (11) y el enanismo de la alfalfa (4, 6).

El estudio de su distribución y de otros factores epidemiológicos ha resultado difícil debido a que los síntomas de la enfermedad no se presentan frecuentemente y a veces se confunden con otras enfermedades o problemas nutricionales.

El diagnóstico de la enfermedad se ha realizado con el uso de técnicas tales como el aislamiento de la bacteria del MP (3) y el uso de la microscopía electrónica (12).

En 1980 Normé *et al.* (13) introdujeron la técnica ELISA (Enzymelinked immunosorbent assay) en el diagnóstico de esta enfermedad de la vid, técnica que resulta ventajosa y más segura con respecto a las anteriores. ELISA se ha venido usando desde 1976 en la determinación de fitopatógenos, principalmente en virus (17) y bacterias de difícil aislamiento como es este caso (13).

En un estudio anterior no fue posible confirmar la presencia de la bacteria del MP en los distintos viñedos del país, debido a la dificultad para aislarla (9).

1/ Recibido para su publicación el 26 de julio de 1984

\* Escuela de Fitotecnia. Facultad de Agronomía. Universidad de Costa Rica.

Direcciones actuales:

\*\* Asociación Bananera Nacional - Depto. de Investigaciones.

\*\*\* Apdo. 66766 Caracas 1061. Venezuela.

En el presente trabajo se determinó la distribución del Mal de Pierce de la vid en Costa Rica mediante el uso de ELISA.

## MATERIALES Y METODOS

### Recolección de la muestra

Se recolectaron 56 muestras de plantas de vid con y sin síntomas del MP, en los meses comprendidos entre febrero de 1981 y marzo de 1982, en las siguientes fincas: Coopesardinal R.L., Finca Loma B y Finca Maunaloa en Sardinal de Carrillo, Guanacaste; Finca Montezuma y Florida en Cóbano de Puntarenas y Estación Experimental Fabio Baudrit Moreno, Universidad de Costa Rica.

### Aislamiento

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<sub>3</sub> (3).

Para comprobar la especificidad del método utilizado, las bacterias del MP se compararon inmunológicamente con 6 cultivos de bacteria a saber: *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Erwinia* sp. y *Escherichia coli*, los cuales se obtuvieron en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Costa Rica. Cada uno de los aislamientos fue procesado por ELISA para determinar especificidad del suero.

### Producción de antisuero

El suero anti-bacteria del MP se produjo en conejos de las razas Nueva Zelandia y California. La bacteria se recolectó de cultivos en platos y se resuspendió en un amortiguador de sales de fosfato (PBS) 0,1 M, pH 7, (NaCl, KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> 12H<sub>2</sub>O, KCl y NaN<sub>3</sub> 0,2 g/l). Se centrifugó 15 minutos a 20.000 G a 4 C 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 sometido a ultrasonido (sonicado) durante 20 minutos (sonicador Modelo W140 System Ultrasonic) para romper las células.

Los conejos fueron inmunizados inoculándose el antígeno en forma intravenosa con dosis creciente de 1 ml, 1,5 ml, 2,0 ml, 2,5 ml, 3,0 ml y 3,5 ml, a intervalos de 3 días por un período de 3

semanas, al cabo de las cuales se le inyectaron intramuscularmente dosis de 4 y 4,5 ml. del antígeno emulsificado con adyuvante incompleto de Freund <sup>1/</sup> con un intervalo de 3 días entre cada dosis: los conejos fueron desangrados una semana después de aplicada la última dosis.

### 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 (PBST + 2 % PVP) <sup>2/</sup>, macerando y filtrando a través de gasa, se centrifugó (15.000 G/15 minutos), en una ultracentrífuga Hitachi 18 PR-3, se decantó, se redisolvió en PBST (PBS + 0,5 ml/l Tween 20) + 2% PVP y se sonicó por 15 segundos.

Las muestras de bacterias fueron preparadas resuspendiendo cultivo bacteriano en PBST + 2 % de PVP hasta lograr una concentración de 10<sup>9</sup> bacterias/ml, sonicando luego por 15 segundos con el fin de romper las células; posteriormente se hicieron diluciones seriadas hasta lograr una concentración de 10<sup>4</sup> bacterias/ml con el fin de determinar la sensibilidad de la técnica.

### ELISA

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

La globulina fue purificada a partir de anti-suero 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 (#5521 Sigma Chemical co.) 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 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 de 4 a 6 h a 37

<sup>1</sup> Bacto Cat No. 0638-60

<sup>2</sup> Polivinil pirrolidina (sigma)

C. Las placas se lavaron con PBST. Se colocó una alícuota de 200  $\mu$ l/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% de PVP y ovalbúmina (Sigma) al 0,2%, las placas se incubaron nuevamente 6 h a 37 C. Finalmente se lavaron las placas con PBST y se le agregó el sustrato de la enzima, P-nitrofenilfosfato, 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 3M a razón de 50  $\mu$ l/celda al cabo de 3 h de incubación a 37 C en la oscuridad.

Los resultados se leyeron en un espectrofotómetro de microelisa (Micro ELISA Auto Reader MR-580, Dynatech).

## RESULTADOS

La técnica ELISA resultó ser altamente específica para la bacteria del MP, obteniéndose valores hasta de 3 veces más altos para muestras de plantas enfermas con respecto al PBS o a muestras de vid sanas. Así también la prueba ELISA, resultó ser específica para la bacteria del MP cuando se probó la reacción con otras bacterias (Cuadro 1).

La finca donde se observó con mayor frecuencia la presencia de la bacteria fue en la finca Tucurrique (70 %), viñedo ya prácticamente extinto a causa del MP; siguió la finca Montezuma (64%), siendo en ésta donde los síntomas de la enfermedad se manifiestan más claramente en la época seca. En algunas fincas tales como Loma B y Coopesardinal no se observaron síntomas de la enfermedad, sin embargo algunas muestras dieron reacción positiva (Cuadro 2).

La totalidad de seis muestras de agrá (*Vitis tiliifolia*) recolectadas en Montezuma y Tucurrique dieron reacción negativa en todos los casos probados y ninguna de estas plantas mostró síntomas del MP.

## DISCUSION

A través de este estudio se confirmó que la técnica ELISA ha resultado ser un método preciso y rápido para el diagnóstico del MP y el estudio de su epidemiología; en este caso ha funcionado adecuadamente en el diagnóstico de la enfermedad, incluso en plantas que no muestran síntomas del MP como es el caso de las fincas Loma B y Sardi-

CUADRO 1. Valores de absorbancia (A 405 nm) de la prueba ELISA para diferentes bacterias incluyendo la del Mal de Pierce.

Bacteria	Valores de A 405 nm	Reacción
Bacteria del MP	1,302	+
<i>Bacillus megaterium</i>	0,025	-
<i>Staphylococcus epidermis</i>	0,013	-
<i>Erwinia</i> sp.	0,037	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,030	-
<i>Escherichia coli</i>	0,021	-
PBS	0,020	-

CUADRO 2. Número y porcentaje de muestras con resultados positivos a la presencia de la bacteria versus el total de muestras procesadas por finca.

Finca	Positivas/total	%
Coopesardinal	1/8	12,5
Loma B	2/4	50,0
Maunaloa	2/13	15,4
Montezuma	9/14	64,2
La Abuela	1/2	50,0
Coopeturrique	7/10	70,0
EEFBM*	2/5	40,0

\* Estación Experimental Fabio Baudrit Moreno, Universidad de Costa Rica.

nal. Se confirma de esta manera la sospecha establecida en un estudio anterior (9) en el cual sólo se había hecho el diagnóstico a través de aislamiento con resultados positivos solamente en una de las fincas.

En Costa Rica se ha determinado así, en mayor o menor grado, la bacteria del MP en plantas de vid en todos los viñedos.

Posiblemente el agrá, que no presenta síntomas, es resistente al MP, ya que al muestrear plantas de agrá cercanas a los viñedos más infectados, donde se ven expuestas a una fuente continua de inóculo no se infectan. Esto sugiere que la bacteria del MP sí es endémica de Costa Rica, así como lo es del sureste de los Estados Unidos donde ésta hace imposible el cultivo de la vid (7).

En nuestro país los viñedos existentes son relativamente jóvenes y algunos tales como Montezuma y Tucurrique han sido eliminados casi en su

totalidad por el Mal de Pierce. En California, el MP fue encontrado predominantemente en viñedos adyacentes a riachuelos (16) y la enfermedad puede observarse con más frecuencia en los 100 m adyacentes a cada lado de los riachuelos, lo cual indica que los vectores pueden adquirir el patógeno de plantas silvestres que crecen cerca de las fuentes de agua, ya que no hay evidencia de la diseminación la enfermedad de una planta de vid a la otra (4); en esas condiciones, entonces resulta relativamente fácil su combate. En Costa Rica la situación es diferente ya que la abundante vegetación cercana a las áreas donde se cultiva vid hace que el combate de la enfermedad se dificulte, debido a la presencia de un alto porcentaje de plantas silvestres, hospedadoras del patógeno (8).

### RESUMEN

Con el fin de determinar la distribución del Mal de Pierce (MP) en los distintos viñedos de Costa Rica se realizó un muestreo, durante los meses comprendidos entre febrero de 1981 y marzo de 1982, de plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) en siete fincas de Costa Rica: Coopesardinal, Maunaloa y Loma B en Sardinal; Coopesardinal, Guanacaste; La Abuela y Montezuma, Cóbano de Puntarenas; Estación Experimental Fabio Baudrit Moreno en Alajuela y Coopeturrique, en Tururrique de Cartago.

Las muestras de pecíolos y hojas de vid, se procesaron y probaron por medio del uso de la técnica inmunológica de adsorción con conjugados enzimáticos (ELISA), para determinar la presencia o ausencia de la bacteria del Mal de Pierce (MP).

Se obtuvieron reacciones positivas expresadas como valores de absorbancia (A 405 nm) hasta 3,5 veces mayores para plantas enfermas, que para un testigo absoluto de solución amortiguadora de sales de fosfato (PBS). Al menos una muestra de vid de cada una de las fincas dio valores de absorción mayores al promedio de 30 muestras de plantas sanas, más el doble de su desviación estándar, siendo en la finca de Tururrique en donde se obtuvo mayor porcentaje de muestras (70%) con reacción positiva.

### AGRADECIMIENTO

Los autores desean agradecer a la señora Cristina Visona del ICRMT y a la señora Carmen Rivera del CIBCM de la Universidad de Costa Rica,

por la colaboración prestada. Así como al Dr. Mario Vargas de la Facultad de Microbiología, y al Dr. Ricardo A. Rodríguez, por sus valiosas sugerencias en la revisión del presente trabajo.

### 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. y PURCELL, A.G. 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: 117-128. 1946.
7. 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: 117-128. 1946.
8. JIMENEZ, J.M. Determinación de los hospedantes alternos del Mal de Pierce de la Vid mediante técnicas inmunológicas de adsorción con conjugados enzimáticos. Tesis, Escuela de Fitotecnia - Universidad de Costa Rica, 1982. 114 p.
9. JIMENEZ, L., MORALES, F. y FERNANDEZ, B. Estudio preliminar de la distribución del Mal de Pierce de la vid en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 5 (12): 127-130. 1981.
10. 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. 1958.

11. MIRCETICH, S.M., LOWE, S.K., MOLIER, W.F. y NYLAND, G. Etiology of almond leaf scorch disease and transmission of the causal agent. *Phytopathology* 66: 17-24. 1976.
12. 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.
13. NOME, S.F., RAJU, C.B., GOHEEN, B. y NYLAND, G. Enzyme-linked immunosorbent assay for Pierce's disease bacteria in plant tissue. *Phytopathology* 70: 746-749. 1980.
14. 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.
15. RAJU, B.C., GOHEEN, A.C., TELIZ, D y NYLAND, G. Pierce's disease of grapevine in México. *Plant Disease* 64: 280-282. 1980.
16. RAJU, C.B., GOHEEN, A., TELIZ, C 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.
17. VOLLER, A. The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of General Virology* 33: 165-167. 1976.