

**Detección de *Xylella fastidiosa* Wells et al. por ELISA-DAS en Vid (*Vitis vinifera* L.) y malezas en viñedos del Municipio Mara, estado Zulia, Venezuela.**

**ELISA-DAS detection of *Xylella fastidiosa* Wells et al. in grapevine (*Vitis vinifera* L.) and weeds in vineyards of Mara county, Zulia state, Venezuela.**

Livia Hernández<sup>1</sup>  
Francisco M. Ochoa Corona<sup>2</sup>

### **Resumen**

Se denomina *Xylella fastidiosa* Wells et al. a un grupo de bacterias Gram negativo, limitadas al xilema, que se desarrollan en medios de cultivo muy particulares. Para determinar la existencia de *X. fastidiosa* en algunos hospederos en nuestro país, se realizó un estudio en viñedos del estado Zulia, durante 1993 sobre 16 cultivares de vid (*Vitis vinifera* L.) en los cuales fue posible observar síntomas similares a aquellos inducidos por este grupo bacterial, así como en malezas comunes asociadas al cultivo en la región. Extractos de savia fueron utilizados para determinar la presencia de *X. fastidiosa* por medio de inmunoabsorción ligada a enzima en microceldas (ELISA). *X. fastidiosa* se encontró presente en 8 de los cultivares de vid estudiados: ('French Colombard', 'Reisling', 'Early Muscat', 'Centennial seedless', 'Ruby seedless', 'Salt Creek', 'Alphonse Lavalle', e 'Italia'). Esta bacteria por primera vez es señalada en las malezas: *Boerhavia diffusa* L., *Portulaca oleracea* L., *Merremia glabra* (Aubl.) Hall F., *Heliotropium fruticosum* L., *Heliotropium indicum* L., *Ipomea crassicaulis* (Benth) Rob. y *Passiflora foetida* L.

**Palabras claves:** *Xylella fastidiosa*, ELISA, malezas, vid.

### **Abstract**

*Xylella fastidiosa* Wells, et al. is a Gram negative, xylem limited bacterial group, which grows in specific culture media. In order to study the presence of *X. fastidiosa* in Venezuela, a research in grape orchards of Zulia State was car-

Recibido 04-03-95 • Aceptado el 02-07-1996

1. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Apdo. 4579. Maracay 2101. Aragua. Venezuela.

2. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Apdo. 4579. Maracay 2101. Aragua. Venezuela. Dirección actual: University of Florida. IFAS. Citrus Research and Education Center 700 Experiment Station Road. Lake Alfred. FL. 33850-2299. USA. E-mail: fmoc@gnv.ifas.ufl.edu.

ried out in 1993 by sampling 16 grape cultivars (*Vitis vinifera* L.) that showed bacterial-like symptoms. The most common weeds associated with the grapevine crop were included. Xylem extracts were used as samples to determine *X. fastidiosa* presence by enzyme linked immunosorbant assay (ELISA). *X. fastidiosa* was positive in 8 grape cultivars ('French Colombard', 'Reisling', 'Early Muscat', 'Centennial seedless', 'Ruby seedless', 'Salt Creek', 'Alphonse Lavalle', e 'Italia'). This is the first report on the weeds *Boerhavia diffusa* L., *Portulaca oleracea* L., *Merremia glabra* (Aubl.) Hall F., *Heliotropium fruticosum* L., *Heliotropium indicum* L., *Ipomea crassicaulis* (Benth) Rob. y *Passiflora foetida* L.

**Key words:** *Xylella fastidiosa*, ELISA, weeds, grapevine.

## Introducción

Diferentes razas de *Xylella fastidiosa* Wells *et al.* han sido asociadas a enfermedades que causan pérdidas en algunos cultivos de importancia económica como la vid (*Vitis vinifera* L.), la alfalfa (*Medicago sativa* L.), el duraznero (*Prunus persica* L.) y el ciruelo (*Spondias purpurea* L.) (13), en árboles del medio urbano (8), como el olmo americano (*Ulmus americana* L.) (19), el roble (*Quercus imbricaria* Michx), así como en el *Plantanus occidentalis* L. (8).

Otros hospederos donde se ha encontrado esta bacteria son *Conium maculatum* L., *Cyperus eragrotis* Lam., *Paspalum dilatatum* Poir., *Fragaria vesca* L., *Montia linearis*, (Doug) Greene, *Rubus procerus* P.J. Muell, *Vinca minor* (11), *Sambucus canadensis*, *Parthenocissus quinquefolia* (L). Palnch y *Ampelopsis arborea* (L). Kochne (12).

*X. fastidiosa* pertenece a un grupo de bacterias con características muy particulares: Gram negativo, limitada al xilema, se desarrolla en diferentes medios artificiales de crecimiento, dependiendo del tipo de raza o aislamiento, como PD3, PW,

BCYE y CS-20 (11). Fue descrita por primera vez en 1973 asociada a la "enfermedad de Pierce" en vid, circunstancia que dió inicio al estudio de la bacteria (5, 9). Estos autores han señalado que esta enfermedad está limitada a la zona norte del continente americano, específicamente en California, aunque se afirma que tanto la "enfermedad de Pierce" como el "Phony del duraznero son típicas de áreas tropicales y subtropicales (13).

En Costa Rica fueron detectadas bacterias limitadas al xilema en muestras de hojas de viñedos, similares a las encontradas en EE.UU. (6). En Venezuela, la bacteria causante de la "enfermedad de Pierce" fue reportada por primera vez en 1982, en 4 fincas del estado Zulia próximas a Maracaibo (El Potrón, Los Panchos, Maribelo y Tocuyo), pero no se menciona en que variedades se detectó, y no se hace referencia a ningún hospedero alterno (16, 17). Recientemente esta bacteria ha sido localizada en árboles de cítricos y en 12 malezas comunes asociadas a estos cultivos (10).

Diferentes metodologías han sido utilizadas para el diagnóstico de esta

bacteria, pero la prueba serológica más difundida y utilizada para diagnosticar *X. fastidiosa* en tejidos de plantas ha sido la técnica de inmuno-absorción ligada a enzima (ELISA) (4, 18), de utilidad en vid (11, 16, 17), duraznero, ciruelo, *Vinca minor* (11), cítricos (9, 15), olmo (19, 20) así como plantas de jardín y roble (8).

En EE.UU., el rendimiento del cultivo de la vid disminuyó entre 1981 y 1991 de 17.300 a 16.500 kg/ha. Esta reducción podría ser atribuida, entre otros factores, a la "enfermedad de Pierce", según datos obtenidos por FAO (1).

En los últimos años la producción de uvas en el país ha venido registrando un incremento, que coincide con el aumento del área cultivada y los rendimientos por unidad de superficie (3). El estado Zulia ocupó en 1980 el primer lugar en superficie sembrada y contribuyó con el 90% de la produc-

ción nacional de este cultivo (3). Hasta la fecha, conserva este liderazgo (Prof. Francisco Araujo. Fac de Agronomía. Univ. del Zulia. Comunicación personal).

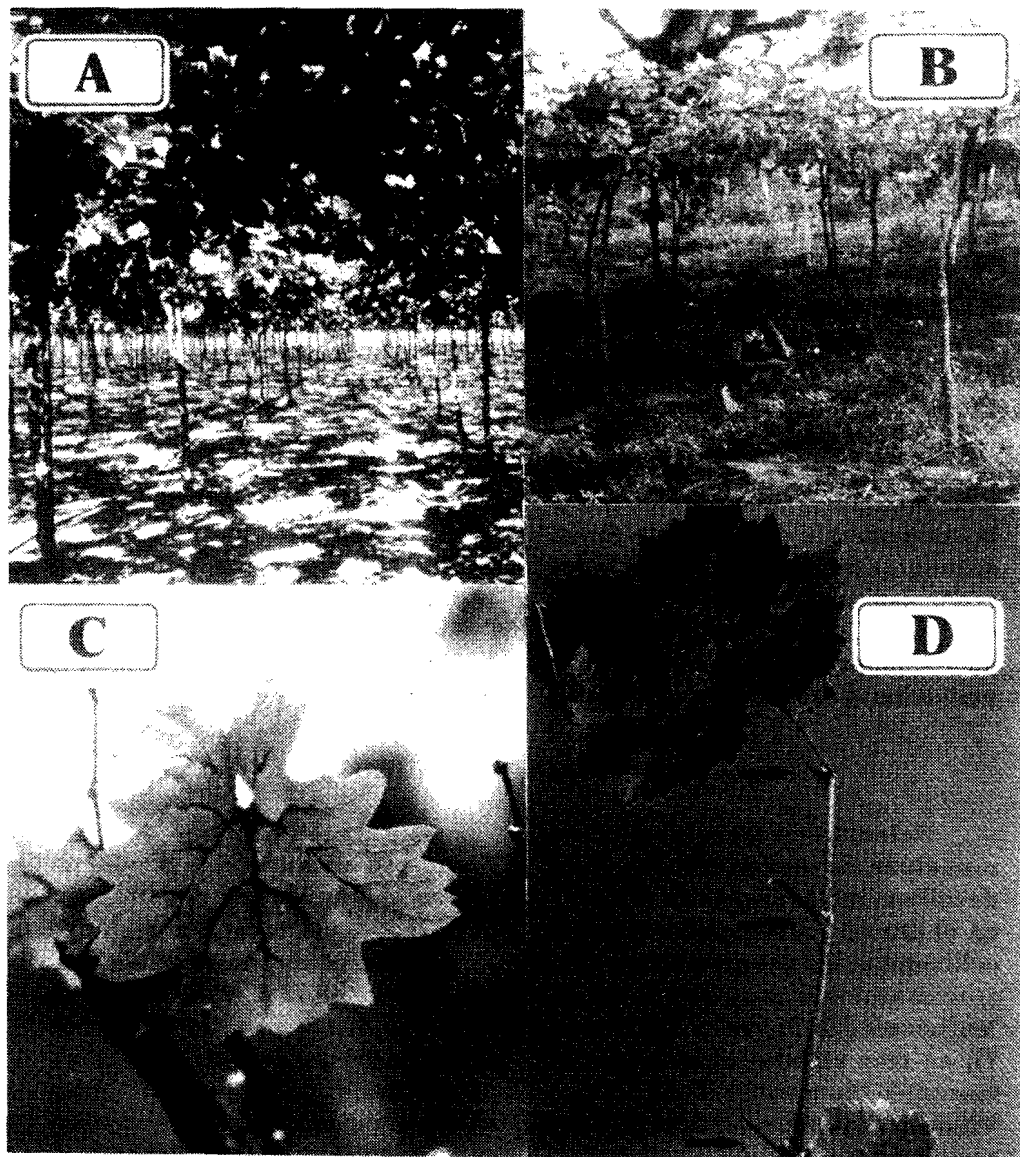
Debido a la importancia que presenta la producción de uvas en el estado Zulia y Venezuela, se hizo necesario la realización de este trabajo para determinar cuales cultivares de vid están afectados por la bacteria que causa la "enfermedad de Pierce" y cuales malezas le sirven como hospederos, ya que es posible que su presencia mantenga alguna relación con el decaimiento, marchitez y defoliación progresiva, observado con mucha frecuencia en los últimos años en viñedos zulianos con cultivares de vid introducidos desde California y Europa; y así mismo debido, a que desde 1982 ningún despistaje comprobatorio ha sido realizado.

## Materiales y métodos

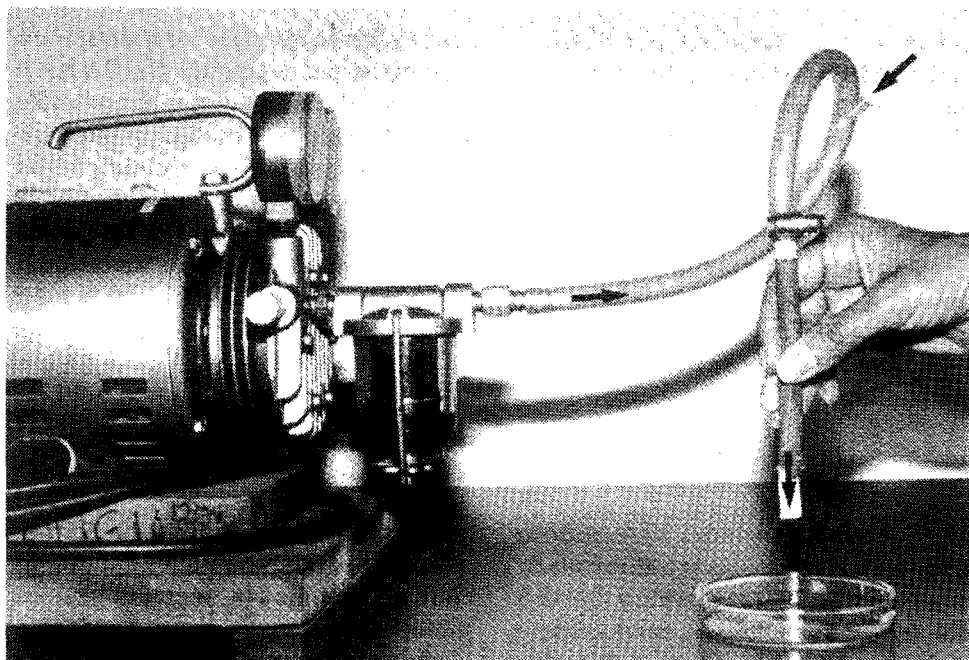
**Selección y recolección de muestras.** Se recolectaron secciones de tallo en ramas de plantas ubicadas en el campo, correspondientes a 16 cultivares de vid que presentaban una sintomatología muy similar a la "enfermedad de Pierce" (7, 21) (figura 1), en tres viñedos ubicados en el municipio Mara, estado Zulia (Centro Vitícola, la Perikle, La Solita), para completar un total de 21 muestras, además se recolectaron las malezas más comunes entre las hileras de plantas, las cuales se conservaron en excicatas para su posterior identificación y análisis.

**Determinación de *X. fastidiosa* en cultivares de vid.** La presencia de la bacteria se determinó en extractos de savia. Para ello se cortaron ramas de aproximadamente 12 cm de longitud por 0.5 - 1.0 cm de diámetro, luego se sellaron ambos extremos con una película de parafina para evitar la deshidratación de los tejidos. Las muestras se mantuvieron en cavas refrigeradas con hielo (4 - 6 °C) hasta su traslado al laboratorio.

El extracto de savia fue obtenido conectando las secciones de tallo a una bomba de aire por medio de una manguera (figura 2). Aproximada-



**Figura 1. a) Plantación con aspecto sano. b) Plantación enferma. Aspectos de la recolección de malezas. c) Síntomas de necrosis en las nervaduras. d) Síntomas de defoliación y permanencia del pecíolo en el tallo.**



**Figura 2. Equipo usado para la obtención del extracto de savia de ramas de vid.**

mente a 2 cm de la conexión tallo-manguera se inyectó 1 mL de solución salina (8.5 g NaCl/L) estéril. Luego, la presión ejercida por la bomba, permitió a la solución atravesar la sección del tallo arrastrando consigo microorganismos presentes. Los extractos fueron refrigerados mientras culminó el proceso de extracción. Una vez obtenidos los extractos, se realizó la prueba ELISA-DAS utilizando un antisuero monoclonal producido sobre *Pervinca rosea* por la compañía Agdia, Inc. y como control positivo *X. fastidiosa* en tejido seco (Agdia, Inc.). Cepas de *Pseudomonas* sp., *Erwinia* sp. y *Xanthomonas* sp., provenientes del laboratorio de Bacteriología Vegetal de la Facultad de Agronomía, U.C.V., fueron incluidas como controles alternos para descartar posibles

reacciones cruzadas. Se colocaron 100  $\mu$ L del extracto de cada muestra por celda. Luego se incubó a temperatura ambiente (35 °C) durante 2 horas. La preparación de la enzima conjugada se hizo minutos antes del primer lavado diluyendo la enzima conjugada concentrada con el tampón conjugado PBS-TP (Phosphate buffer saline + Tween 20 + Polyvinyl pyrrolidone 40.000) en una relación 1:4. El lavado de las muestras se realizó con tampón PBS-TP, agregándose posteriormente 100  $\mu$ L de la enzima conjugada preparada por celda. Se incubó nuevamente a temperatura ambiente por 2 horas y se hizo el segundo lavado de la misma forma, se agregaron 100  $\mu$ L de la solución sustrato OPD (40  $\mu$ L de peróxido de hidrógeno al 30 % en 100 mL de solución). Finalmente se incubó

a temperatura ambiente por 10 min y se efectuó la lectura de los resultados en un espectrofotómetro MULTISKAN PLUS versión 1.4 calibrado a 490 nm de absorbancia con una placa de ELISA limpia. Se consideraron como reacciones positivas aquellas que superaron tres veces al blanco y dentro del margen de desviación del control positivo.

**Determinación de *X. fastidiosa* en malezas.** Se detectó *X. fastidiosa*

en tejidos de malezas mantenidos en excicatas por medio de ELISA tal y como se describió para el diagnóstico en savia. La muestra estuvo constituida por 0.6 g de tallos, ramas y hojas de las malezas en estudio. Estas se maceraron en morteros, a los cuales se agregó 4 mL de solución amortiguadora extractora (PBS-TP 0.05 % + 2 g de polivinil pirrolidone + 0.13 g de sulfito de sodio).

## Resultados

A nivel de campo *X. fastidiosa* pareciera estar asociada a síntomas de necrosis en nervaduras y bordes foliares, defoliación con permanencia del pecíolo en la rama y drástica reducción en los rendimientos. Esto último podría estar asociado a problemas de salinidad propios de la región, nematodos y fitoplasma (MLO's), aún sin estudiar a profundidad. *X. fastidiosa* fue detectada en 8 de los 16 cultivares de vid estudiados (cuadro 1), ellos son: 'French Colombard', susceptible a la "enfermedad de Pierce" (2), 'Reisling', 'Early Muscat', 'Centennial seedless', 'Ruby seedless' y 'Salt Creek'; material este proveniente de Califor-

nia, y plantado en el banco de germoplasma del Centro Vitícola del estado Zulia. Además, la bacteria estuvo presente en los cultivares 'Alphonse Lavalle' e 'Italia', introducidos originalmente desde Italia, y cultivados en los viñedos La Perikle y la Solita, respectivamente.

La bacteria también se encontró presente en las especies de malezas: *Boerhavia diffusa* L., *Portulaca oleracea* L., *Merremia glabra* (Aubl) Hall. f.; dos especies pertenecientes a un mismo género, *Heliotropium fruticosum* L. y *Heliotropium indicum* L., *Ipomea crassicaulis* (Benth) y *Passiflora foetida* L. (cuadro 2).

## Discusión y conclusiones

La detección de *X. fastidiosa* en 8 de los 16 cultivares de vid estudiados y en 7 malezas, confirman los resultados de Jiménez (16, 17), quien realizó una temprana detección de esta bacteria apoyándose en la utilización de técnicas inmunológicas. No obstante, en sus reportes no se detallan las

variedades ni hospederos alternos despistados serológicamente, información valiosa desde el punto de vista epifitológico. Cabe mencionar que este señalamiento ha pasado inadvertido durante los últimos 9 años, período de tiempo suficiente para que el patógeno se haya diseminado ampliamente en

**Cuadro 1. Cultivares de vid y viñedos donde *X. fastidiosa* fue diagnosticada por ELISA-DAS.**

| Cultivar                      | Viñedo          | DO <sub>490</sub> | Reacción |
|-------------------------------|-----------------|-------------------|----------|
| French Colombard              | Centro Vitícola | 0.027             | +        |
| Black Malvasie                | Centro Vitícola | 0.005             | -        |
| Reisling                      | Centro Vitícola | 0.013             | +        |
| Christmas rose                | Centro Vitícola | 0.009             | -        |
| French Colombard <sup>1</sup> | Centro Vitícola | 0.004             | -        |
| Early muscat                  | Centro Vitícola | 0.017             | +        |
| Albana                        | Centro Vitícola | 0.005             | -        |
| Blush seedless                | Centro Vitícola | 0.009             | -        |
| Paulsen 1045                  | Centro Vitícola | 0.007             | -        |
| Centenial seedless            | Centro Vitícola | 0.017             | +        |
| Ruby seedless                 | Centro Vitícola | 0.015             | +        |
| Richter 110                   | Centro Vitícola | 0.007             | -        |
| Salt Creek                    | Centro Vitícola | 0.012             | +        |
| Muscat Blanc                  | Centro Vitícola | 0.006             | -        |
| Bronx seedless                | Centro Vitícola | 0.006             | -        |
| French Clombard               | La Perikle      | 0.003             | -        |
| Alphonese Lavalley            | La Perikle      | 0.020             | +        |
| French Colombard <sup>2</sup> | La Perikle      | 0.006             | -        |
| French Colombard <sup>3</sup> | La Perikle      | 0.003             | -        |
| Italia                        | La Solita       | 0.027             | +        |
| Alphonese Lavalley            | La Solita       | 0.009             | -        |
| Control positivo              |                 | 0.019             |          |
| Blanco                        |                 | 0.003             |          |

1. Afectada por nematodos y nervaduras necrosadas. 2. Nudos en el tallo, apariencia de planta enferma. 3. Planta aparentemente sana. DO. Densidad óptica a 490 nm. +/- : presencia o ausencia.

términos geográficos y estableciera relaciones de vectorización con uno o más insectos, tal y como se intuye de las investigaciones realizadas por Hernández *et al.* (10), quienes detectaron esta bacteria en el estado Yaracuy infectando árboles cítricos y 12 malezas comúnmente asociadas a este cultivo.

Por otra parte, la adaptabilidad de *X. fastidiosa* a la condición tropical de Venezuela concuerda con las afirmaciones de Hopkins (13), quien la considera típica de ambientes tropicales y subtropicales. Pero poco podemos discutir sobre el origen y

presencia de esta bacteria en el país, debido a que aún no está definido si *X. fastidiosa* está constituido por un grupo de bacterias autóctono del continente americano, o que contrariamente ingresó al país proveniente de otras latitudes en material vegetal introducido con propósitos comerciales y de investigación; principalmente desde California, EE.UU. Esta última opción resulta razonable si consideramos que la vid ha presentado la sintomatología que ha motivado esta investigación, durante los últimos años. En conclusión *X. fastidiosa* está presente en Venezuela y podría ser la

**Cuadro 2. Malezas asociadas a viñedos con reacción positiva a *X. fastidiosa*.**

| Especie                                | DO <sub>490</sub> | Reacción |
|----------------------------------------|-------------------|----------|
| <i>Boerhavia diffusa</i> L.            | 0.070             | +        |
| <i>Portulaca oleracea</i> L.           | 0.036             | +        |
| <i>Merremia glabra</i> (Aubl.) Hall F. | 0.120             | ++       |
| <i>Heliotropium fruticosum</i>         | 0.013             | +        |
| <i>Heliotropium indicum</i> (L.)       | 0.013             | +        |
| <i>Ipomoea crassicaulis</i> (Benth)    | 0.017             | +        |
| <i>Passiflora foetida</i> L.           | 0.019             | +        |
| Control positivo                       | 0.016             |          |
| Blanco                                 | 0.003             |          |

+: Bacteria presente. ++: Bacteria presente en mayor concentración. D.O.: Densidad óptica a 490 nm

causa de los síntomas descritos, así como de la baja producción y defoliación observada en vid. Su detección en dos puntos geográficos distantes y la

diversidad de hospederos representa un serio riesgo para la viticultura y la citricultura nacional.

## Recomendaciones

Los resultados obtenidos sugieren la necesidad de realizar aislamientos y el cultivo puro de la bacteria en nuestro país, que permitan la elaboración de antisueros que faciliten la distinción de las razas presentes. También se hace necesario realizar pruebas de patogenicidad (Postulados de Koch) sobre diversos cultivares, que permitan precisar la sintomatología que induce esta bacteria bajo nuestras condiciones agroclimáticas y estimar en que forma estaría limitada la producción de vid.

También es recomendable ampliar el estudio epifitiológico que permita conocer los vectores y otros hospederos de *X. fastidiosa* que esten involucrados en la dispersión de la bac-

teria en las plantaciones de vid y cítricos, así como los períodos del año de mayor dispersión y expresión sintomatológica.

Finalmente, es necesario poner en marcha un programa regional (o nacional) de certificación para este y otros rubros frutícolas con importancia económica en el estado Zulia, que certifique la pureza genética y fitopatológica de las plantas que el fruticultor adquiere. Posiblemente varios microorganismos fitopatogénicos para la vid han sido introducidos desde EE.UU., Francia, Italia y más recientemente desde América del sur. De tal forma, que será necesario elaborar un censo de las enfermedades que afectan a la vid en Venezuela, y

decidir cuales pueden ser controladas a través de este programa, previa

limpieza vía cultivo de meristemos.

## Agradecimiento

Los autores desean expresar su agradecimiento a los Ing. Audo Cedeño y Carlos Sánchez de Fusagri - Zulia por su asistencia durante las visitas de campo. A los profesores Darisol Pacheco y Francisco Araujo de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia, por su colaboración durante la identificación de las malezas y orientación. A la Dra. Morela de Rolo del Instituto de Inves-

tigaciones Veterinarias del Fonaiap, Maracay, por su receptividad y apoyo a la investigación. A la Profesora Yonis Hernández de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, por facilitar los aislamientos de bacteria fitopatógena durante la investigación. Finalmente a la T.S.U. Deyanira Altuve por su valiosa asistencia mecanográfica.

## Literatura citada

1. FAO. 1991. Producción. Anuario Estadístico de la FAO.
2. Fry, S. and R. D. Milholland. 1990. Multiplication and Translocation of *Xylella fastidiosa* in petioles and stems of grapevine resistant, tolerant, and susceptible to Pierce's disease. Phytopathology 80:61-65.
3. FUSAGRI. 1980. Manejo Post-cosecha de la uva de mesa en Venezuela. Noticias Agrícolas de la Fundación Servicio para el Agricultor (FUSAGRI). Venezuela. IX (9): 45 - 46.
4. Garnsey, S. and M. Cambra. 1991. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for citrus pathogens. In: A handbook for detection and diagnosis of graft transmissible disease of citrus. p. 193 - 216.
5. Goheen, A., G. Nyland and S. Lowe. 1973. Association of a rickettsiallike organism with Pierce's disease of grapevines and alfalfa dwarf and heat therapy of the disease in grapevines. Phytopathology 63:341-345.
6. Goheen, A., B. Raju, S. Lowe and G. Nyland. 1979. Pierce's disease of grapevine in Central America. Plant Disease Reporter 63: 788-792.
7. Granata, G. e E. Eger. 1992. Malattie della Vite. Guida alla diagnosi. Galatea Editrice. Acireale. Italia.
8. Hartman, J., B. Eshenaur and Jarloforsu. 1992. Shingle oak a new host for bacterial leaf scorch caused by *Xylella fastidiosa*. Phytopathology 82:498 (abstract).
9. Hopkins, D. L. and H. Mollenhauer. 1973. Rickettsia like bacterium associated with Pierce's disease of grapes. Science 179: 298-300.
10. Hernández, L., F. Ochoa, K. Derrick, M. J. Barreta, O. Castejon, F. Chacin y T. W. Machado. 1993. Relación entre *Xylella fastidiosa* y el Decaimiento Repentino de los Cítricos. Fitopatol. Venez. 6: 42-43 (resumen).
11. Hopkins, D. L. and W. Adlerz. 1988. Natural Host of *Xylella fastidiosa* in Florida. Plant Disease 72: 429-431.
12. Hopkins, D. L. and W. Adlerz. 1988. *Xylella fastidiosa* and other fastidious bacteria of uncertain affiliation. In: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 1988. 2nd edition. N.W. Shaad, editor. APS Press. USA.

13. Hopkins, D. L. and W. Adlerz. 1989. *Xylella fastidiosa*: Xylem-limited bacterial pathogen of plants. Ann. Rev. Phytopathology 27: 271-290.
14. Hopkins, D. L. ; ThopsonN, C. ; Bistline, F. and L. Russo. 1989. Relationship between Xylem - limited bacterial and citrus blight. Proc. of the Florida State Horticult. Soc. 102: 21-23.
15. Hopkins, D. L. ; F. Bistline, L. Russo, L. and C. Thompson. 1991. Seasonal fluctuation in ocurrence of *Xylella fastidiosa* in roots and stems extracts from citrus with blight. Plant Disease 75: 145-147.
16. Jiménez, L. 1985. El mal de Pierce de la viden Venezuela. Evidencia Inmunológica. Phytopathology 75: 1175 (resumen).
17. Jiménez, L. 1985. Evidencia inmunológica del mal de Pierce de la vid en Venezuela. Turrialba 35: 243-247.
18. Ortega, E. 1986. Métodos de detección de virus y viroides en Cítricas. FONAIAP Divulga. Año 4: 37-40.
19. Sherald, J. and J. Lei. 1989. Survey of the National Mall for Elm Scorch associated with *Xylella fastidiosa*. Phytopathology 79: 1165 (abstract).
20. Sherald, J. 1990. Pathogenecity of *Xylella fastidiosa* of America Elm. Phytopathology 80: 1066 (abstract).
21. University of California. 1992. Pierce's disease. In: Grape Pest Management. Division of Agricultural Sciences. Publication No. 4105. pp. 64-69.