

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS
AGRÓNOMOS

TESIS DOCTORAL

LA NECROSIS BACTERIANA DE LA VID, CAUSADA POR
Xylophilus ampelinus. DETECCIÓN SEROLÓGICA,
DISTRIBUCIÓN EN ARAGÓN Y SENSIBILIDAD VARIETAL

MIGUEL A. CAMBRA ÁLVAREZ

VALENCIA, 1997

Miguel A. Cambra Álvarez

**La necrosis bacteriana de la vid, causada por *Xylophilus ampelinus*.
Detección serológica, distribución en Aragón y sensibilidad varietal**

Directores:

M^a Milagros López González

Dra. Ingeniero Agrónomo

Laboratorio de Bacteriología

Mariano Cambra Álvarez

Dr. Ingeniero Agrónomo

Laboratorio de Virología e Inmunología

Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias

MARIA MILAGROS LOPEZ GONZALEZ y MARIANO CAMBRA ALVAREZ, DOCTORES INGENIEROS AGRONOMOS DEL DEPARTAMENTO DE PROTECCION VEGETAL Y BIOTECNOLOGIA DEL INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS.

CERTIFICAN:

Que la presente memoria que lleva por título **La necrosis bacteriana de la vid, causada por *Xylophilus ampelinus*. Detección serológica, distribución en Aragón y sensibilidad varietal** ha sido realizada bajo nuestra dirección por Miguel Angel Cambra Alvarez, Ingeniero Agrónomo, y que, considerando que el trabajo reúne los requisitos necesarios para optar el grado de Doctor Ingeniero Agrónomo, autorizamos su presentación en el Departamento de Producción Vegetal de la Universidad Politécnica de Valencia

Y para que conste firmamos en Moncada (Valencia) a 10 de Julio de 1997

Maria Milagros López

Mariano Cambra



*A mi padre,
Mariano Cambra Ruiz de Velasco*

A mi madre y a mi hermana

A Lola, Inés y Ana

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias y al Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología, donde se han desarrollado parte de los trabajos realizados.

A Chiqui y Mariano, promotores, animadores, colaboradores, directores y hermanos durante todo el trabajo.

A Emilio Carbonell, por su sabio y generoso apoyo técnico en Estadística.

A Teresa Gorris, por su inestimable colaboración, y al resto del personal de los Laboratorios de Bacteriología y de Virología e Inmunología, por su ayuda y el afecto que me han mostrado.

A Agustín Alfaro, del Departamento de Protección Vegetal de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Valencia, junto con mi cariñoso recuerdo, por los consejos y ánimos que siempre supo darme.

A Francisco Ferragut, por su apoyo como Tutor.

Al Centro de Protección Vegetal de la Diputación General de Aragón, sin cuyas instalaciones y medios no hubiera sido posible la realización de este trabajo, a José M^a Sopena, su Director, y al resto de los compañeros del Centro, por su apoyo, que hizo posible compaginar mis tareas habituales con las relacionadas con esta Tesis.

A mis compañeras, a lo largo de estos años, del Laboratorio de Diagnóstico y Prospecciones Fitosanitarias, M^a Jesús Ester, Yolanda Guerrero, M^a Jesús Sancho, Paqui Oses, por su trabajo y apoyo incondicional y a Marisa Palazón en sus dos vertientes, la de analista de laboratorio y la de Licenciada en Filosofía y Letras.

A los técnicos de las ATRIAS de las Denominaciones de Origen Campo de Borja, Somontano y Cariñena.

A Manuel Gracia, con mi especial recuerdo, y a Pedro Cebrián, de la Estación de Viticultura y Enología de Cariñena, por su participación en el ensayo de sensibilidad varietal.

A los miembros del Tribunal, que han aceptado juzgar esta Tesis.

ÍNDICE

ÍNDICE	Página
Resumen	1
Summary	2
Siglas y abreviaturas más utilizadas	3

INTRODUCCIÓN

I.1. Historia de la enfermedad	4
I.2. Distribución geográfica	5
I.3. Distribución geográfica de la enfermedad en España	6
I.4. Posición taxonómica	8
I.5. Caracterización de <i>X. ampelinus</i>	9
I.5.1. Caracteres morfológicos, bioquímicos y fisiológicos	9
I.5.2. Serología	11
I.5.3. Caracterización molecular	12
I.5.4. Electroforesis de proteínas	12
I.5.5. Bacteriófagos	13
I.5.6. Poder patógeno	13
I.6. Síntomas y daños	13
I.7. Ciclo biológico	20
I.8. Factores favorables	21
I.9. Fuentes de inóculo	23
I.10. Transmisión y diseminación	23
I.11. Técnicas de detección, diagnóstico y caracterización	25
I.12. Sensibilidad varietal	27
I.13. Control	29
OBJETIVOS	34

Capítulo 1.- Comparación de la eficiencia de distintos tipos de inmunoensayo ELISA, utilizando anticuerpos monoclonales, para la detección de *Xylophilus ampelinus* en material vegetal.

1.1. Introducción	36
1.2. Material y métodos	37
1.2.1. Cepas bacterianas	37
1.2.2. Material vegetal y su preparación para análisis	38
1.2.3. Tampones de extracción	38
1.2.4. Tipos y variantes de ELISA	40
1.2.4.1. ELISA indirecto convencional (ELISA-I), E1	41
1.2.4.2. ELISA indirecto biotina/estreptoavidina (ELISA-I-b/sa), E2	43
1.2.4.3. ELISA doble sandwich de anticuerpos indirecto convencional (ELISA-DASI), E3	43
1.2.4.4. ELISA doble sandwich de anticuerpos indirecto biotina/ estreptoavidina (ELISA-DASI-b/sa), E4	44
1.2.4.5. ELISA doble sandwich de anticuerpos biotina/estreptoavidina (ELISA-DAS-b/sa), E5	45
1.2.5. Condiciones de comparación	45
1.2.6. Análisis estadístico	46
1.3. Resultados	48
1.4. Discusión	60
1.5. Conclusión	65

Capítulo 2.- Comparación de la eficiencia del aislamiento y de diferentes métodos de detección serológica de *Xylophilus ampelinus*, en material vegetal naturalmente infectado.

2.1. Introducción	66
2.2. Material y métodos	67
2.2.1. Material vegetal	67
2.2.2. Cepas bacterianas	70
2.2.3. Métodos de análisis	70
2.2.3.1. Técnica ELISA-DASI-b/sa	70
2.2.3.2. Inmunofluorescencia indirecta (IF)	71

2.2.3.3. Inmunoimpresión indirecta ELISA (II)	73
2.2.3.4. Aislamientos y caracterización bioquímica	75
2.3. Resultados	75
2.4. Discusión	81
2.5. Conclusiones	86

Capítulo 3.- Puesta a punto del lavado interno de sarmientos para la extracción de *Xylophilus ampelinus* y su detección mediante técnicas serológicas. Comparación con otros métodos.

3.1. Introducción	87
3.2. Material y métodos	88
3.2.1. Material vegetal	88
3.2.2. Descripción del método de lavado interno del sarmiento	90
3.2.3. Métodos de extracción	90
3.2.4. Métodos de análisis serológico	93
3.2.4.1. Técnica ELISA-DASI-b/sa	93
3.2.4.2. Inmunofluorescencia indirecta (IF)	94
3.2.5. Métodos de análisis estadístico	95
3.3. Resultados y discusión	96
3.4. Conclusiones	110

Capítulo 4.- Incidencia de *Xylophilus ampelinus* en las denominaciones de origen Campo de Borja (Zaragoza) y Somontano (Huesca). Distribución espacial de la bacteria en una viña de Tabuenca (Zaragoza).

4.1. Introducción	112
4.2. Material y métodos	113
4.2.1. Zonas de prospección	113
4.2.1.1. Características de la denominación de origen Campo de Borja	114
4.2.1.2. Características de la denominación de origen Somontano	116
4.2.1.3. Características de la viña de Tabuenca (Zaragoza)	118
4.2.2. Diseño de las prospecciones	118

4.2.2.1. Prospección en las denominación de origen Campo de Borja y Somontano	119
4.2.2.2. Prospección en la viña de Tabuena	119
4.2.3. Métodos de análisis	122
4.2.3.1. Técnica ELISA-DASI	122
4.2.3.2. Otras técnicas utilizadas	122
4.2.4. Análisis estadístico de la dispersión de la enfermedad	123
4.3. Resultados	125
4.3.1. Resultados de la prospección en la denominación de origen Campo de Borja y Somontano	125
4.3.2. Distribución de la enfermedad en la parcela de Tabuena	134
4.4. Discusión	141
4.5. Conclusiones	144

Capítulo 5.- Sensibilidad a la necrosis bacteriana de la vid de tres patrones y 19 variedades de vid cultivadas en diferentes zonas españolas.

5.1. Introducción	146
5.2. Material y métodos	147
5.2.1. Localización y características de la parcela	147
5.2.2. Material vegetal	148
5.2.3. Cultivos bacterianos	150
5.2.4. Inoculación	150
5.2.5. Observación de síntomas e índices de clasificación	150
5.2.6. Pluviometría registrada	152
5.3. Resultados	152
5.4. Discusión	166
5.5. Conclusiones	169
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES	170
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	174

RESUMEN

RESUMEN

La necrosis bacteriana de la vid, causada por la bacteria de cuarentena *Xylophilus ampelinus*, es una enfermedad de difícil control químico y que ha causado en España importantes pérdidas económicas. Actualmente, es endémica en distintas zonas de Aragón y Galicia y se han identificado focos aislados en La Rioja.

Ante la carencia de métodos sensibles y específicos de detección de esta bacteria que se puedan utilizar para el análisis rutinario, se ha puesto a punto un método de extracción y un protocolo de detección serológica de *X. ampelinus*. El método de extracción se basa en el lavado interno a presión de los sarmientos a analizar. El protocolo de detección se basa en la técnica ELISA-DASI, utilizando anticuerpos monoclonales específicos. Ambos hacen posible la detección de esta bacteria de cuarentena en material vegetal durante cualquier época del año. También se ha puesto a punto la detección mediante inmunopresión en membrana de nitrocelulosa, que puede ser utilizada para detección rápida o para confirmación de sintomatologías dudosas.

Se ha realizado una prospección en las denominaciones de origen Campo de Borja y Somontano, utilizando el lavado interno de los sarmientos y la técnica ELISA-DASI. Se detectó la bacteria en el 4'7% y 0'9% de los sarmientos analizados, siendo la primera vez que mediante dicha técnica se detecta la enfermedad en sarmientos asintomáticos y en la zona de Somontano. En la prospección se observó una distribución irregular de *X. ampelinus* en las cepas analizadas. La distribución de la bacteria en las plantas de una parcela naturalmente infectada fue al azar.

Se realizó un estudio de sensibilidad a la necrosis bacteriana en plantas de 19 variedades españolas injertadas en los patrones Rupestris de Lot, R-110 y 41-B. Se observó que el primer patrón confería mayor sensibilidad a las variedades injertadas y que todas las variedades ensayadas se mostraron sensibles a *X. ampelinus*. Entre ellas, las variedades Merseguera, Palomino, Airén, Bobal, Juan Ibáñez y Granegro se comportaron como muy sensibles y Mazuela, Tinto basto y Garnacha peluda mostraron baja sensibilidad.

SUMMARY

SUMMARY

Bacterial necrosis of grapevine is caused by the quarantine bacterium *Xylophilus ampelinus*. This disease is of difficult chemical control and is responsible for important economic losses in Spain. Nowadays it is endemic in many areas in Aragón and Galicia, and isolated outbreaks have been identified in La Rioja.

As no sensitive specific detection methods to use in routine analysis are available to detect this bacterium, an extraction method and a protocol for serological detection of *X. ampelinus* have been set up. The extraction method is based on internal washing of the analysed shoots. The detection protocol is based on ELISA-DASI using specific monoclonal antibodies. Both make the detection of this bacterium in plant material feasible at any time during the year. The detection by immunoprinting in nitrocellulose membranes has also been developed and can be used for rapid detection or for confirmation of doubtful symptoms.

A survey in the *denominaciones de origen* Campo de Borja and Somontano has been carried out, using the method of internal washing and the ELISA-DASI technique. The bacterium was detected in 4.7% and 0.9% of the analysed shoots. This is the first time that this disease has been detected by using this technique in asymptomatic shoots and in the Somontano area. In the survey an irregular distribution of the bacterium was observed inside the analysed plants. The distribution of infected plants in a plot naturally infected was at random.

A study of the susceptibility to bacterial necrosis was carried out using 19 Spanish cultivars grafted on the rootstocks Rupestris of Lot, R-110 and 41-B. It was observed that the first one conferred higher sensitivity to the grafted cultivars and that all the assayed cultivars were sensitive to *X. ampelinus*. Among them, the cultivars Merseguera, Palomino, Airén, Bobal, Juan Ibáñez and Granegro were proved to be very sensitive and Mazuela, Tinto basto and Garnacha peluda showed low sensitivity.

SIGLAS Y ABREVIATURAS MÁS UTILIZADAS

SIGLAS Y ABREVIATURAS MÁS UTILIZADAS

AFT: agua fisiológica tamponada.

AMC: anticuerpos monoclonales.

BSA: albúmina de suero bovino.

d.o.: densidad óptica.

d.o.n.: densidad óptica del testigo negativo.

d.o.c.: densidad óptica de cálculo.

DIECA: dietilditiocarbamato sódico.

ELISA: enzyme linked immunosorbent assay.

ELISA-DAS: ELISA-doble *sandwich* de anticuerpos.

ELISA-DAS-b/sa: ELISA-DAS sistema biotina/estreptoavidina.

ELISA-DASI: ELISA-doble *sandwich* de anticuerpos indirecto.

ELISA-DASI-b/sa: ELISA-DASI sistema biotina/estreptoavidina.

ELISA-I: ELISA indirecto.

ELISA-I-b/sa: ELISA indirecto sistema biotina/estreptoavidina.

GAM-AP: anticuerpos de cabra anti-ratón marcados con fosfatasa alcalina.

GAM-b: anticuerpos de cabra anti-ratón marcados con biotina.

IF: inmunofluorescencia.

IVIA: Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias.

LPGA: extracto de levadura, peptona, glucosa y agar.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PVP: polivinilpirrolidona.

TC: tampón carbonato.

ufc: unidades formadoras de colonias.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

I.1. HISTORIA DE LA ENFERMEDAD

La necrosis bacteriana de la vid es una enfermedad con una larga historia, ya que era conocida en Italia desde el siglo pasado, probablemente desde 1854 (Panagopoulos, 1969). En 1879, Garovaglio y Cattaneo describieron por primera vez los síntomas observados y la denominaron "mal nero", en clara referencia al aspecto que adquieren los sarmientos enfermos. Posteriormente, se describieron enfermedades de la vid muy similares en distintos países de Europa meridional y Sudáfrica. Las etiologías de estas enfermedades eran desconocidas, por lo que se las nombró de forma diferente en cada país, incluso en cada región. En Francia, único país en el que la enfermedad ha sido estudiada en algunos aspectos, la observación de síntomas en vides de la isla de Oléron originó la denominación de "maladie d'Oléron", mientras que en la región de Maury fue conocida como "carbou" y, finalmente, se intentó unificar el nombre, denominándola "nécrose bactérienne de la vigne" (Prunier *et al.*, 1970). En Grecia era conocida como "tsilik marasi", en Sudáfrica como "bacterial blight" y "vlamsiekte", como "gota" en Madeira (Portugal) y como "mal negro" en Portugal continental (Ridé *et al.*, 1983).

Durante más de 90 años, se especuló sobre la etiología de la enfermedad. Se implicó a alteraciones fisiológicas, organismos como *Phomopsis viticola* (López *et al.*, 1978; Shear, 1911 y Goidanich, 1937, citados por Grasso, 1979), y bacterias como *Bacillus vitivorus* y *Erwinia vitivora* (Heliot, 1930 y Du Plessis, 1940, citados por Erasmus *et al.*, 1974), pero no se pudo confirmar mediante inoculaciones artificiales la patogenicidad de los cultivos bacterianos aislados del material enfermo. Sin embargo, en 1969, Panagopoulos aisló e identificó el agente causal de la enfermedad conocida como "tsilik marasi", clasificándolo como perteneciente a una nueva especie bacteriana del género *Xanthomonas*, que denominó *Xanthomonas ampelina*. La lentitud de su crecimiento en medio de cultivo (6 a 12 días), y la abundante flora saprofita de rápido crecimiento que acompaña a las vides con síntomas de esta enfermedad, pueden justificar el tiempo, casi un siglo, que se tardó en conocer el agente causante de la enfermedad objeto de esta Tesis doctoral (Galet, 1977).

En los años siguientes, se logró aislar la bacteria en otros países, demostrándose así que las enfermedades descritas en Francia (Prunier *et al.*, 1970), Sudáfrica (Matthee *et al.*, 1970) e Italia (Grasso *et al.*, 1979) tenían el mismo agente causal.

La detección de *X. ampelina* en España data de septiembre de 1978 (López *et al.*, 1978; López *et al.*, 1980), denominándose la enfermedad como "necrosis bacteriana de la vid".

Estudios recientes sobre la posición taxonómica de *X. ampelina* han aconsejado transferirla a un nuevo género (Willems *et al.*, 1987b), adoptando el nombre de *Xylophilus ampelinus* (Panagopoulos) Willems *et al.*

La necrosis bacteriana de la vid, a pesar de su larga historia, está poco estudiada y se disponen de escasos datos sobre su distribución, epidemiología, características bacterianas, sensibilidad de las variedades de vid, etc. La mayor parte de los datos bibliográficos existentes proceden de Francia y España, y, en menor medida, de Grecia.

I.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Existe actualmente cierta confusión sobre la distribución real de la bacteria en el mundo. A los cinco países donde la detección de *X. ampelinus* está plenamente documentada (Grecia, Francia, Italia, España y Sudáfrica), se les ha añadido Portugal y Turquía, en listas confeccionadas por Panagopoulos (1987) y EPPO/CABI (1992), aunque no se han encontrado citas bibliográficas que confirmen el aislamiento e identificación de la bacteria en dichos países. Las listas citadas anteriormente coinciden en señalar a Bulgaria, Suiza, Yugoslavia, Túnez y Argentina como países donde en alguna ocasión se han observado síntomas atribuibles a *Erwinia vitivora*, pero en los que hasta la fecha no ha sido aislada e identificada *X. ampelinus*.

En 1970, en el laboratorio de Bacteriología de Oeiras (Portugal) no se pudo demostrar que las dos enfermedades de la vid "desnaca" y "gota", descritas en el Algarve y Madeira

respectivamente, estuvieran causadas por *Xanthomonas ampelina* (Oliveira, 1970). No ha habido citas posteriores que confirmen la identificación de la bacteria en Portugal.

La distribución de *Xylophilus ampelinus* no está bien documentada en la mayoría de los países. La enfermedad está en expansión en muchos de ellos y los datos existentes, excepto los de Francia, no son recientes.

En 1983, en Grecia la enfermedad estaba ampliamente distribuida en Creta y se habían detectado focos en las islas de Kos, Lesbos y Zakynthos, así como en las comarcas de Achia e Iliá del Peloponeso (Panagopoulos, 1983).

En Francia, como se dijo anteriormente, la enfermedad es conocida desde el siglo pasado en la Isla de Oléron, en el Aude y Pirineos Orientales (Héritier, 1983). Se dispersó por los departamentos franceses de Languedoc, Provenza-Costa Azul, Rhône Alpes, Poitou-Charentes, País de Loire y Aquitania, favorecida por las condiciones climáticas de determinados años (1969, 1975-1980, 1981-1983 y 1993-1994), por los cambios varietales realizados en algunas zonas y por la adopción de nuevas prácticas culturales, como la introducción de la vendimia mecánica y la utilización de productos anti-mildiu distintos al cobre (Ridé, 1996). La enfermedad está, por lo tanto, en expansión y ampliamente distribuida en las más importantes áreas vitivinícolas francesas.

En Sudáfrica, en 1970, la enfermedad estaba en casi todas las áreas más importantes del cultivo de la vid, con especial incidencia en las zonas de regadío de Worcester y Paarl (Mathee *et al.*, 1970).

En Italia, la enfermedad ha sido detectada en la zona de Monterosso (Catania) en Sicilia (Calzolari, 1983) y en Ilbono (Nuoro) en Cerdeña (Fiori *et al.*, 1996).

I.3. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA ENFERMEDAD EN ESPAÑA

En España, durante el periodo comprendido entre 1975 y 1981 se observaron graves síntomas de necrosis bacteriana en viñedos aragoneses, situados preferentemente en zonas de cultivo con una altitud superior a los 500 m, que, inicialmente, fueron atribuidos a ataques de excoriosis o a otras causas, pero en los que finalmente se aisló *X. ampelinus* como agente

causal (López *et al.*, 1978). Posteriormente se localizaron otros focos en La Rioja, Navarra y Galicia (Sampayo *et al.*, 1981). En los años siguientes, los síntomas disminuyeron paulatinamente, llegando a pasar la enfermedad prácticamente desapercibida. No se encuentran, en la bibliografía, más datos posteriores que aquéllos que hacen referencia a la situación tras los primeros años de la detección en cada zona (Sampayo *et al.*, 1981; López, 1983; Gómez y López, 1986; Gracia *et al.*, 1988).

Se estimó que en la provincia de Zaragoza estaban afectadas unas 10.500 ha, localizadas en las tres denominaciones de origen de la provincia, Cariñena, Campo de Borja y Calatayud. Entre 1978 y 1980 se arrancaron aproximadamente 500 ha de viñedos muy afectados, al considerarlos improductivos a causa de la necrosis bacteriana. La enfermedad está considerada endémica en esta provincia, aunque se desconoce la fecha o el origen de su introducción.

En la denominación de origen de Somontano (Huesca) tan sólo hay constancia de la detección de *X. ampelinus* en una muestra procedente de Salas Altas (Huesca) en 1983. En Teruel, se localizó un foco en 1985.

En la denominación de origen Rioja, la bacteria fue detectada en Manjarrés en 1979, localizándose en 1980 unas 50 ha de Garnacha y Macabeo afectadas, distribuidas en unos 12 focos en las dos denominaciones de origen La Rioja Alta y La Rioja Baja. En Navarra, se conoce la existencia de pequeños focos de la enfermedad (Sampayo *et al.*, 1981; Gracia *et al.*, 1988).

En Galicia, en cambio, *X. ampelinus* está ampliamente difundida. Se identificó por primera vez dicha bacteria en 1980, en muestras procedentes de diversas zonas de la denominación de origen de Ribeiro (Orense) y en 1983 en viñedos de Pontevedra. Afecta fundamentalmente a la variedad Alicante (Garnacha tintorera) (Gómez y López, 1986).

La bacteria no está detectada en ninguna otra zona de viñedo de España, a pesar de haberse realizado numerosos análisis en vides con síntomas sospechosos, procedentes de distintas zonas. Bradbury (1973) citaba Canarias como una zona donde se habían observado posibles síntomas de la necrosis bacteriana de la vid, cita que se ha repetido en alguna

publicación posterior (Panagopoulos, 1987; Willems *et al.*, 1987b; Fiori *et al.*, 1996), pero no hay referencias en España que confirmen esta información.

I.4. POSICIÓN TAXONÓMICA

El patógeno causante de la necrosis bacteriana de la vid fue clasificado como perteneciente al género *Xanthomonas*, ya que es un organismo aeróbico que no forma endosporas, Gram negativo, que posee un flagelo polar, produce un pigmento amarillo y metaboliza los hidratos de carbono oxidativamente. Sin embargo, presenta algunas diferencias fisiológicas y bioquímicas fundamentales con respecto a otras especies de *Xanthomonas*, como la aptitud para utilizar L-arabinosa y galactosa, su habilidad para usar el ácido tartárico como fuente de carbono y, sobre todo, su fuerte actividad ureasa en el medio de Christensen que sitúan a la bacteria al margen del grupo muy homogéneo de las *Xanthomonas* fitopatógenas (Panagopoulos, 1969; Prunier *et al.*, 1970; Bradbury, 1973). Panagopoulos (1969) consideró que era una especie atípica de *Xanthomonas* no descrita anteriormente, por lo que la denominó *X. ampelina* sp. nov.

Willems *et al.* (1987 a y b) bordaron el estudio taxonómico de *X. ampelina*, utilizando 106 pruebas enzimáticas diferentes (sistema API), análisis por electroforesis de proteínas celulares y su composición e hibridaciones ADN-ADN y ADN-rARN con una colección de 34 aislados de *X. ampelina* procedentes de Francia, España, Grecia y Sudáfrica. Los resultados obtenidos, comparando los distintos aislados entre sí, demostraron que forma una especie muy homogénea. Sin embargo, las relaciones genéricas y supragenéricas determinadas por hibridaciones ADN-rARN situaron a *X. ampelina* en una subrama de rARN (superfamilia III), no relacionada con el género *Xanthomonas*. Genéricamente, sus relaciones más próximas son, entre otras, con *Pseudomonas acidovorans*, *Alcaligenes paradoxus* y *Comamonas terrigena*. Estos estudios aconsejaron crear un nuevo género denominado *Xylophilus* y transferir a *Xanthomonas ampelina*, como una única especie, con el nombre de *Xylophilus ampelinus*¹, considerando como aislado tipo el NCPPB 2217^T (National Collection of Plant Pathogenic Bacteria. Hatching Green, England).

¹ Del griego: ξυλον, madera; φίλος, amigo; αμπελινος, de vid.

I.5. CARACTERIZACIÓN DE *X. ampelinus*

I.5.1. Caracteres morfológicos, bioquímicos y fisiológicos

X. ampelinus es una bacteria Gram negativa de 0'5-0'8 x 1'6-3'2 μ , no formadora de endosporas, móvil con un flagelo polar, oxidasa negativa, catalasa positiva, que utiliza lentamente la glucosa en aerobiosis en el medio de Hugh Leifson (1953), pero no en anaerobiosis. La temperatura máxima de crecimiento es de 30° C y la mínima de 6° C. La tolerancia al ClNa es baja (1%), tiene una actividad ureasa muy fuerte y rápida, siendo negativa la hidrólisis de la aesculina y positiva la reacción de hipersensibilidad en tabaco. En la tabla I.1 se resumen los caracteres bioquímicos y fisiológicos de esta especie citados por distintos autores, mostrando una gran homogeneidad de todas las cepas de *X. ampelinus* (Panagopoulos, 1969; Prunier *et al.*, 1970; Bradbury, 1973; Erasmus *et al.*, 1974; Grasso *et al.*, 1979; López *et al.*, 1980; Ridé *et al.*, 1983; OEPP, 1984; Panagopoulos, 1987; Willems *et al.*, 1987b). La especie puede ser considerada bioquímica y fisiológicamente homogénea.

Las colonias de *X. ampelinus*, atendiendo a los caracteres que presentan en Nutrient Agar (NA) (Panagopoulos, 1969) y en extracto de levadura-peptona-glucosa-agar (LPGA) (Ridé *et al.*, 1983), muestran un crecimiento muy lento en medio de cultivo. En NA, a 26° C, las colonias son redondas, enteras, brillantes, translúcidas, de color amarillo-pálido, alcanzando un diámetro de 0'2-0'3 mm en seis días y de 0'4-0'6 en ocho a diez días. Después de 15 días de incubación, pueden alcanzar 1 mm de diámetro (Panagopoulos, 1969). En LPGA, las colonias están ligeramente pigmentadas de amarillo, apareciendo entre los cinco y diez días posteriores a la siembra. Alcanzan un diámetro de 1'5-2 mm de diámetro al cabo de cuatro días de incubación a 25° C, adquiriendo luego un color amarillo más oscuro (Ridé *et al.*, 1983). Se observa variabilidad en la pigmentación de este medio al cabo de seis a diez días, ya que muchas cepas, especialmente las de origen mediterráneo o surafricano, pigmentan el medio de marrón oscuro y suelen tener actividad tirosinasa.

Tabla I.1.- Características fisiológicas y bioquímicas de *Xylophilus ampelinus*.

Reacción	Sustrato	Resultado
Producción de ácido a partir de:	D-arabinosa	negativo
	L-arabinosa	positivo
	D-galactosa	positivo
	D-xilosa	negativo
	D-ribosa	negativo
	L-ramnosa	negativo
	D-glucosa	negativo
	D-manosa	negativo
	D-fructosa	negativo
	Sucrosa	negativo
	Trealosa	negativo
	Celobiosa	negativo
	Lactosa	negativo
	Maltosa	negativo
	D-melibiosa	negativo
	Rafinosa	negativo
	Glicogeno	negativo
	Inulina	negativo
	Dextrina	negativo
	Adonitol	negativo
	Dulcitol	negativo
	D-manitol	negativo
	D-sorbitol	negativo
L-sorbosa	negativo	
Salicin	negativo	
α -metil-D-glucósido	negativo	
Arbutina	negativo	
Mesoinositol	negativo	
Utilización de ácidos orgánicos:	A. acético	positivo
	A. crístico	positivo
	A. málico	positivo
	A. propiónico	negativo
	A. succínico	positivo
	A. oxálico	negativo
	A. tartárico	positivo
	A. fumárico	positivo
	A. fórmico	negativo
	A. malónico	negativo
	A. maleico	negativo
	A. glucónico	negativo
	A. benzoico	negativo
Utilización de hidrólisis de:	L-alanina	positivo
	A. glutámico	positivo
	Tirosina	positivo

Tabla I.1.- (Continuación)

Reacción	Sustrato	Resultado
Utilización de hidrólisis de:	Asparagina	positivo
	Litmus milk	negativo
	Urea	positivo
	Aesculina	negativo
	Almidón	negativo
	Caseína	negativo
	Gelatina	negativo
	Arginina	negativo
	Ornitina	negativo
	Lisina	negativo
	Arbutina	negativo
	Hipurato sódico	negativo
	Tween 80	positivo
Reducción de nitritos a nitratos:		negativo
Producción de NH ₃ :	Peptona	negativo
Producción de indol:	Triptófano	negativo
Producción de SH ₂ :	Cisteína	positivo
	Peptona	negativo
	Tiosulfato	positivo
Producción de enzimas pectolíticas:	Patata	negativo

I.5.2. Serología

Los estudios sobre las características serológicas de *X. ampelinus* fueron abordados en varios países por distintos autores. En Francia (Ridé *et al.*, 1977b), Sudáfrica (Erasmus *et al.*, 1974), España (Cambra *et al.*, 1982) e Italia (Fiori *et al.*, 1996) se prepararon varios anticuerpos policlonales o antisueros para ser utilizados en detección. Ridé *et al.* (1977b) utilizaron antisueros en inmunofluorescencia indirecta, observando reacción con todas las cepas francesas analizadas. Erasmus *et al.* (1974) utilizaron la prueba de aglutinación de Wasserman, la hemaglutinación en placa y la inmunodifusión doble de Ouchterlony, observando también homogeneidad en los resultados obtenidos con las cepas surafricanas. Cambra *et al.* (1982) y Fiori *et al.* (1996) utilizaron respectivamente las técnica ELISA-indirecto y ELISA-DAS con distintos antisueros que también reaccionaron con todas las cepas de *X. ampelinus* ensayadas.

Finalmente, Gorris *et al.* (1989) obtuvieron seis anticuerpos monoclonales específicos de *X. ampelinus* que analizaron en ELISA frente a una colección de 63 cepas de distintos orígenes. Observaron que con la mezcla de tres anticuerpos, que denominaron 5C, 7F y 8C, resultaba posible detectar todas las cepas analizadas de dicha especie. Esta mezcla de anticuerpos monoclonales fue utilizada en todos los ensayos de detección reflejados en esta Memoria.

Los resultados obtenidos con anticuerpos policlonales y con monoclonales muestran una elevada homogeneidad serológica de las cepas de *X. ampelinus* de distintos países.

I.5.3. Caracterización molecular

El único estudio publicado sobre la caracterización molecular de *X. ampelinus* es el de Willems *et al.* (1987 a y b), que analizó el contenido en G + C y observó que oscilaba entre 68 y 69 (mol%) para todas las cepas estudiadas. Además, las hibridaciones ADN-rARN y ADN-ADN de ocho cepas estudiadas con sondas de la cepa tipo dieron similares resultados para todas ellas.

Estos datos demuestran que existe homogeneidad de los ácidos nucleicos de todas las cepas de esta especie, así como diferencias con las distintas especies del género *Xanthomonas* por lo que Willems *et al.* (1987b) aconsejaron la creación del nuevo género *Xylophilus*.

I.5.4. Electroforesis de proteínas

Willems *et al.* (1987b) prepararon extractos de proteínas totales de 34 cepas de distintos orígenes y tras electroforesis en gel de poliacrilamida observaron patrones prácticamente idénticos para todas las cepas. Dichos patrones fueron diferenciables de los de distintas especies del género *Xanthomonas*.

I.5.5. Bacteriófagos

El estudio de la sensibilidad de *X. ampelinus* a distintos bacteriófagos aislados del suelo y de agua de riego de parcelas enfermas fue realizado en Francia (Ridé *et al.*, 1983) y permitió detectar al fago $\phi 15$ que se muestra activo frente a todos los aislados de la bacteria. Las bacterias de la flora saprofita acompañante y otras especies de *Xanthomonas* estudiadas no son sensibles a este fago.

I.5.6. Poder patógeno

Los estudios más completos sobre el poder patógeno de distintas cepas de *X. ampelinus* y su variabilidad han sido realizados en Francia. Ridé *et al.* (1983) indican que en inoculaciones en plantas de vid cultivadas en campo se observaron grandes diferencias entre cepas en su poder patógeno: algunas cepas resultaron totalmente avirulentas, mientras otras mostraron distinta agresividad según las variedades de vid.

López *et al.* (1984) observaron también diferencias entre cepas bacterianas e inoculaciones realizadas sobre plantas de vid de las variedades Garnacha y Macabeo cultivadas *in vitro*. En cambio, Peros *et al.* (1995) no observaron diferencias entre dos cepas de *X. ampelinus* en inoculaciones sobre plantas de las variedades Grenache y Gramon cultivadas *in vitro*. Estos resultados sugieren que pueden existir importantes diferencias de agresividad entre cepas de *X. ampelinus*, que deben ser analizadas previamente a su utilización en ensayos de inoculación.

I.6. SÍNTOMAS Y DAÑOS

Las descripciones de los síntomas realizadas en los distintos países coinciden básicamente. Las diferencias son fundamentalmente debidas a la sensibilidad de las distintas variedades cultivadas en cada zona de cultivo y a las características de las mismas.

Los síntomas de la necrosis bacteriana pueden observarse desde el desborre. Las yemas de un pulgar enfermo pueden llegar a no brotar o a desecarse en estados fenológicos tempranos (D, E y F). Los brotes crecen, en ocasiones, raquíuticos o se retuercen y mueren (fotos I.1, I.2 y I.3).

Durante el crecimiento de los sarmientos aparecen, principalmente en su base, en los tres primeros nudos, manchas alargadas de color oscuro que evolucionan necrosándose superficialmente y rodeándose de un margen aceitoso. Conforme la bacteria va invadiendo tejidos más profundos, se produce el agrietamiento de la lesión y la formación de un chancro oscuro o negruzco, generalmente profundo y de tamaño variable, de uno a 15 cm (fotos I.4, I.5, I.6 y I.7). Puede llegar a penetrar hasta el leño o madera del sarmiento y abarcar varios nudos y entrenudos completos. Los chancros también pueden localizarse en el pedúnculo o en el raquis.

En un corte a nivel del xilema de los sarmientos afectados puede observarse una línea continua oscura o una zona con necrosis sectorial o anular que afecta al floema, al xilema y, a veces, incluso a la médula (foto I.10). Los sarmientos se vuelven frágiles y quebradizos inclinándose hacia el suelo o rompiéndose con facilidad. Las plantas presentan entonces, un porte llorón o aparasolado (fotos I.6, I.7, I.14 y I.15). El agostamiento de estos sarmientos al final del periodo vegetativo es irregular, permaneciendo bandas longitudinales de madera sin lignificar.

Se produce un fuerte corrimiento de flor, y los racimos cuajan defectuosamente (fotos I.8 y I.9), por lo que las cepas enfermas ven su producción muy disminuida, e incluso muchas de ellas dejan prácticamente de dar cosecha.

Las infecciones vasculares producen en las hojas necrosis marginales, con atabacamiento y caída de las mismas. Estos síntomas se localizan preferentemente en las hojas más viejas, situadas más cerca de la cepa. En las primaveras lluviosas, las hojas también pueden infectarse desde el exterior. Se originan, entonces, pequeñas manchas en el limbo de pocos mm de diámetro, al principio de aspecto aceitoso, más visibles por el envés, que evolucionan necrosándose y rodeándose frecuentemente de un halo amarillento (fotos I.11,



I.1

Síntomas de necrosis bacteriana de la vid al inicio de la brotación:

Foto I.1.- Yemas abortadas en una cepa de la variedad Garnacha infectada por *X. ampelinus*.

Fotos I.2 e I.3.- Necrosis de brotes en estados fenológicos tempranos.



I.2



I.3



I.4



I.5



I.6



I.7

Síntomas de necrosis bacteriana de la vid en vegetación:

Foto I.4.- Chancro que abarca 3-4 nudos en sarmiento de la variedad Garnacha.

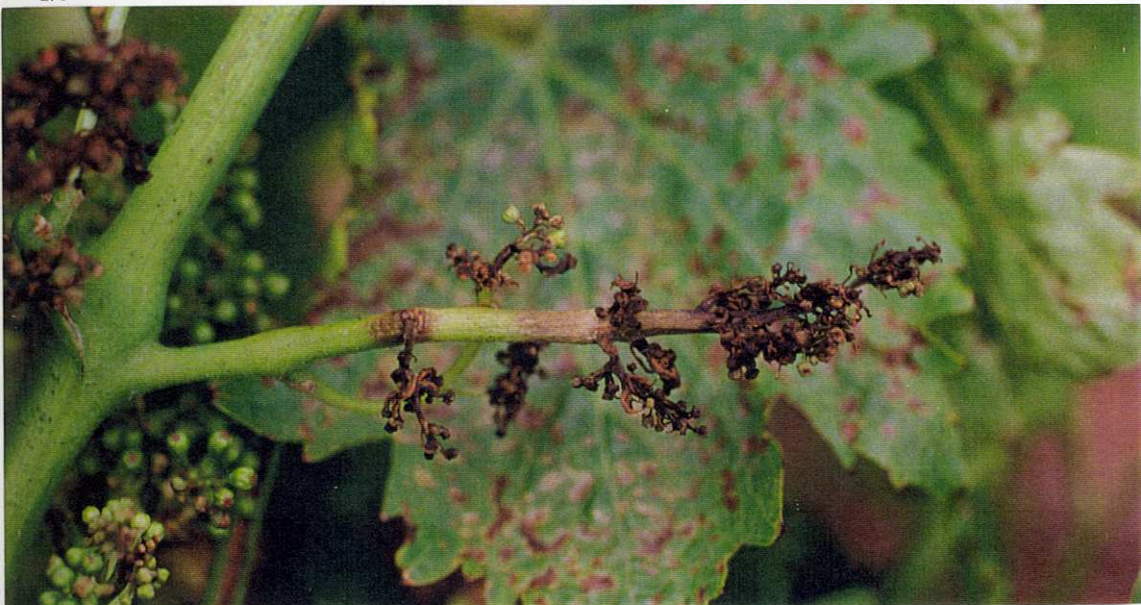
Foto I.5.- Sarmiento de escaso vigor de la variedad Macabeo, mostrando un chancro.

Foto I.6.- Chancro en un sarmiento de la variedad Garnacha quebrado en su base.

Foto I.7.- Aspecto de los chancros y roturas de sarmientos de variedad Garnacha en invierno.



I.8



I.9

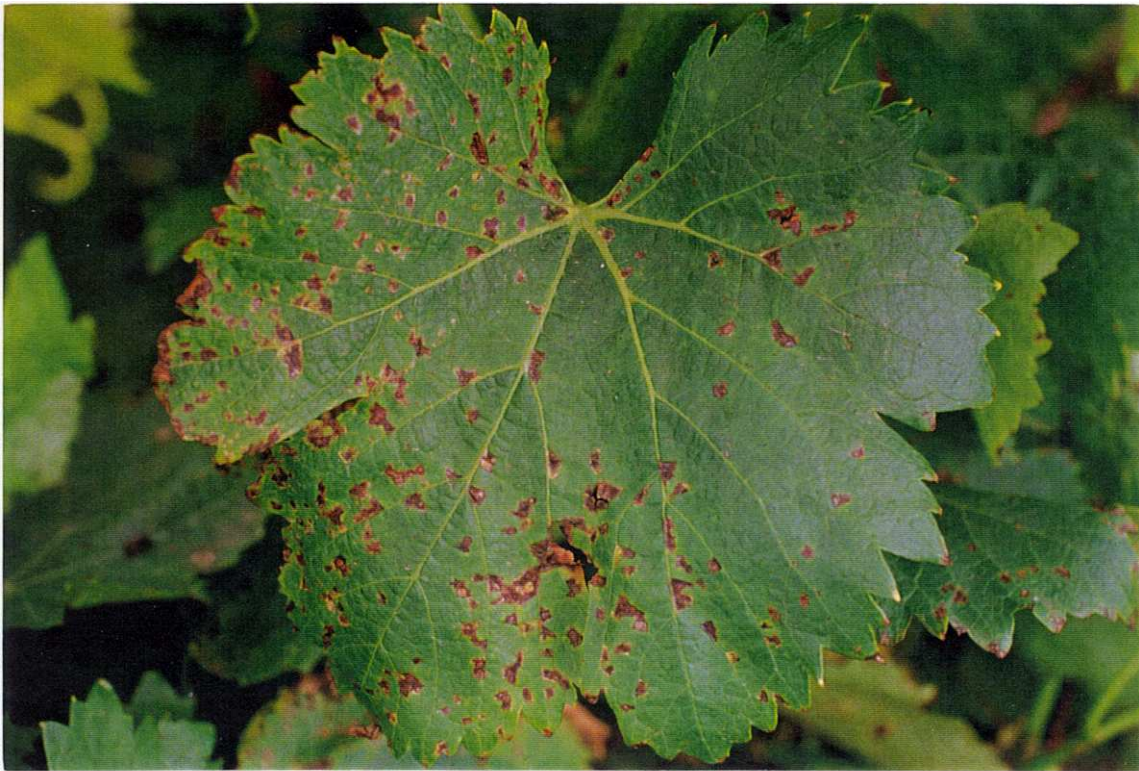


I.10

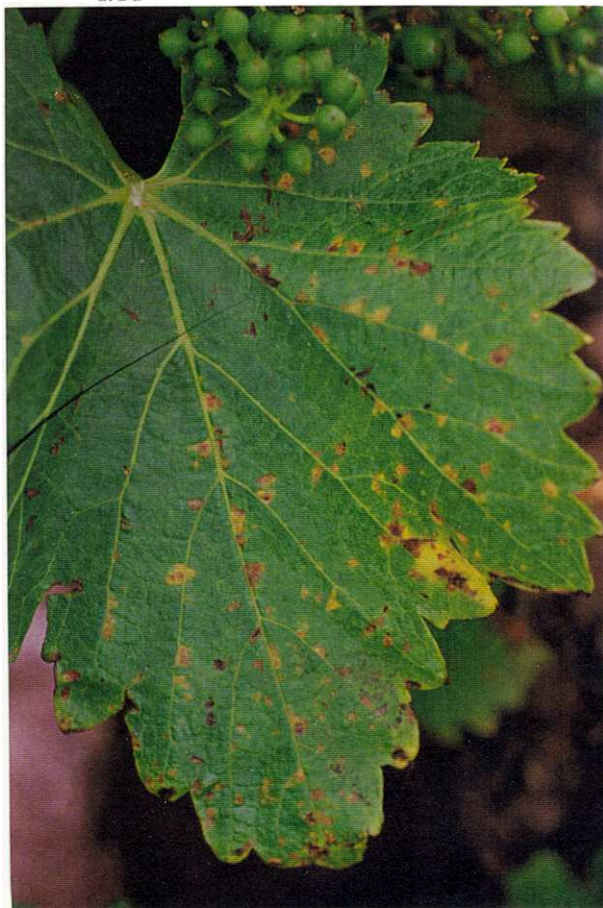
Síntomas de necrosis bacteriana de la vid en racimos y médula:

Foto I.8 e I.9.- Corrimiento de flores y necrosis de racimos en la variedad Garnacha.

Foto I.10.- Sección transversal de pulgar de la variedad Garnacha mostrando necrosis medular.



I.11



I.12



I.13

Síntomas de la necrosis bacteriana de la vid en hojas:

Fotos I.11, I.12 e I.13.- Manchas cloróticas con evolución a necróticas con halo amarillento en hojas de la variedad Garnacha.



I.14



I.15

Porte de plantas afectadas por la necrosis bacteriana de la vid:

Foto I.14.- Aspecto de una cepa en invierno.

Foto I.15.- Porte llorón o aparasolado en verano.

I.12 y I.13). Estas manchas son muy poco frecuentes en cultivos situados en zonas áridas, como Grecia y España.

Algunos de estos síntomas pueden ser confundidos, en determinados momentos, con los producidos con otras enfermedades como excoriosis (*Phomopsis viticola*), eutipiosis (*Eutipa lata*), mildiu (*Plasmopara viticola*), incluso con la yesca o aplopejía (*Stereum hirsutum*). Los daños producidos por el granizo y otras alteraciones o accidentes, también pueden enmascarar los síntomas de la necrosis bacteriana. Estas confusiones son más frecuentes cuando, en las áreas afectadas por la enfermedad, no concurren una serie de factores que favorecen la expresión de los síntomas e incluso condicionan su intensidad, es decir, cuando no es posible observar chancros bien desarrollados, que son el síntoma más característico de la necrosis bacteriana.

I.7. CICLO BIOLÓGICO

El ciclo biológico de *X. ampelinus* ha sido descrito por Ridé (1996). *X. ampelinus* permanece durante el invierno en el interior de la vid, ya que es básicamente un patógeno vascular. Puede multiplicarse durante este periodo y sólo los grandes fríos de hasta -15° C estabilizan su multiplicación.

Con la llegada de la primavera, la bacteria aumenta su actividad y sale al exterior impulsada por los lloros de vid, infectando las yemas adyacentes. Estos órganos también pueden ser contaminados internamente, por vía vascular, si están situados en un pulgar afectado por la enfermedad. En la brotación, las yemas contaminadas se necrosan y abortan, o pueden dar lugar a brotes y hojas con síntomas.

Si las condiciones climáticas son favorables, la bacteria transportada por el viento y lluvia desde órganos enfermos se instalará en las cámaras subestomáticas del envés de las hojas, donde podrá multiplicarse activamente, produciendo síntomas foliares. Un bajo porcentaje de estas bacterias migran a través del peciolo hasta alcanzar la base del sarmiento para asegurar así una infección eficaz al año siguiente. Ridé (1985) cifró este porcentaje en un 2% sobre la variedad Ugni blanc en julio de 1984.

La fase foliar de la enfermedad juega un papel muy importante en la dispersión de la enfermedad, ya que en ella se liberan al exterior gran número de bacterias, siendo especialmente relevante en zonas de cultivo con elevada pluviometría primaveral. En otras zonas con condiciones menos favorables, no suelen observarse los síntomas foliares. Esta situación es la más frecuente en Aragón, donde sólo se han visto síntomas en hojas en años excepcionales de muy elevada pluviometría, como este año 1997.

Al final de la primavera y verano se desarrollan los chancros oscuros característicos de la enfermedad. Se originan por infecciones internas vasculares o a causa de las bacterias que logran penetrar en el interior de los sarmientos desde el exterior, a través de las heridas producidas por el granizo, hielo, exceso de vigor, etc.

Cuando las temperaturas estivales son elevadas, y la humedad baja, desaparece la fase epifita de la bacteria, quedando su actividad limitada al interior de los vasos de la vid. *X. ampelinus* progresa durante el verano en el sistema vascular de la vid. Ridé (1996) detectó por inmunofluorescencia *X. ampelinus* en los entrenudos superiores de los sarmientos enfermos (hasta el entrenudo 18 al final de agosto). Durante el otoño, *X. ampelinus* es capaz de sobrevivir y multiplicarse en los vasos de la madera de la vid, retrasando el agostamiento de los sarmientos enfermos.

I.8. FACTORES FAVORABLES

La necrosis bacteriana fue considerada ya en el siglo pasado, desde las primeras descripciones, como una enfermedad cíclica, que muestra durante ciertos periodos abundantes síntomas y que, en cambio, en otros prácticamente desaparece.

En Francia, Hérítier (1983) describió que en la comarca de l'Aude, tras una serie de años en los que fue posible observar claros síntomas de la enfermedad (1900-1927), siguieron otros en los que las cepas enfermas no mostraron ningún síntoma (1927-1960). Es como si la enfermedad hubiera desaparecido, por lo que los viticultores, confiados, llegaron a olvidarse de la enfermedad, abandonando las medidas culturales que hubieran podido frenar la expansión de la bacteria. Pero la necrosis bacteriana resurgió posteriormente con intensidad (1960-1980), observándose graves daños incluso en zonas nuevas donde nunca había sido diagnosticada.

La enfermedad sólo se manifiesta si existen condiciones favorables para la multiplicación de *X. ampelinus* (Ridé *et al.*, 1983). La información disponible sobre estos factores favorables se debe a la observación de las condiciones acaecidas en los viñedos afectados y a los datos obtenidos en encuestas realizadas, fundamentalmente, en Francia.

Todos los autores coinciden en señalar el clima como el factor más importante. Los años de primaveras muy húmedas, con temperaturas más bien bajas y vientos frescos, son muy favorables para el desarrollo de la enfermedad. Los síntomas se manifiestan rápidamente durante la primavera y comienzo del verano, produciéndose infecciones foliares. Ridé (1996) relacionó la pluviometría (cantidad y número de días de precipitaciones) y el número de días de temperatura mínima inferior a 5° C durante los meses de mayo, junio y julio de 1984 a 1988 con la duración del periodo de incubación en las inoculaciones efectuadas en plantas en estado fenológico F y con el porcentaje de hojas con síntomas.

Si las condiciones climáticas favorables ocurren durante varias primaveras consecutivas, el porcentaje de hojas con síntomas es mayor. Además, si el otoño es lluvioso y con temperaturas suaves, se añadirán las condiciones climáticas favorables para que se produzcan un mayor número de infecciones durante la vendimia.

En las zonas francesas donde se utiliza el riego en la viña como lucha contra las heladas primaverales, como lucha anti-filoxera o como una práctica más de cultivo, se ha constatado que cuando este riego se aplica en primavera (Héritier, 1983; Bernard y Faure, 1983) favorece la exteriorización de los síntomas. Incluso dentro de una parcela, la intensidad de los síntomas es mayor en las zonas del terreno con más humedad en el suelo. Los suelos profundos, con débil contenido en calcio intercambiable y con discontinuidad importante en los perfiles de textura y estructura, producen variaciones bruscas en la alimentación en agua de la vid, limitan las posibilidades de utilización de reservas minerales y favorecen el desarrollo de los síntomas (Mortier, 1985; Desache y Cantagrel, 1987; Ridé, 1996).

La observación de síntomas en algunas zonas de España (Aragón, Navarra y La Rioja) exclusivamente en viñedos ubicados en zonas con altitud superior a 500 m (López, 1983) pudiera estar relacionada con las condiciones climáticas y con las características de los suelos.

También contribuyen otros factores, como presencia de otras enfermedades, daños producidos por heladas, granizo o herbicidas, edad de la planta, tipo de suelos, o determinadas prácticas culturales, que merman el vigor de las vides o facilitan la entrada de la bacteria en la cepa.

I.9. FUENTES DE INÓCULO

El único huésped conocido de *X. ampelinus* es la vid. La bacteria vive principalmente en el sistema vascular de las plantas enfermas (Panagopoulos y Psallidas, 1983), donde es capaz de conservarse largo tiempo sin causar daños. Puede ser considerada como una enfermedad vascular crónica. La bacteria se sitúa preferentemente en la base de los sarmientos (Ridé *et al.*, 1983), esperando una oportunidad para multiplicarse y salir al exterior, impulsada por los lloros de la vid, a través de los chancros y en las lesiones foliares para contaminar a otras plantas.

En los restos de poda dejados sobre el suelo, la bacteria puede permanecer infectiva durante cuatro o cinco meses (Ridé *et al.*, 1983).

La posibilidad de supervivencia de la bacteria en el suelo o fuera de la planta es pequeña. Marcelin (1983) afirma que es posible realizar plantaciones de viña tras viña con un reposo de un año, con la única precaución de eliminar, previamente a la replantación, todos los restos de la primera viña. Sin embargo, el hecho de haberse aislado de suelos de parcelas con plantas infectadas bacteriófagos que afectan a *X. ampelinus* (Ridé *et al.*, 1983), sugiere que la bacteria podría conservarse cierto tiempo en el suelo, aun en bajas poblaciones.

I.10. TRANSMISIÓN Y DISEMINACIÓN

La movilidad de la bacteria queda prácticamente reducida al interior de los vasos de la vid, por lo que *X. ampelinus* necesita ser transportada para transmitirse. A largas distancias, el traslado de material vegetal contaminado es la vía de diseminación de la necrosis bacteriana, y ha sido posiblemente el origen de la introducción de la enfermedad en nuevas zonas. La utilización de material vegetal recogido sin control sanitario en zonas infectadas supone un

grave riesgo de dispersión, ya que en esta enfermedad las infecciones latentes son frecuentes. Se han citado porcentajes elevados de detección de *X. ampelinus* en sarmientos de aspecto sano recolectados en viñas enfermas, el 28% en Francia (Ridé, 1985), entre el 32 y el 50% en Grecia (Panagopoulos, 1987). Ello es especialmente grave debido al carácter cíclico de la enfermedad y a la larga vida útil de las plantas de vid, por lo que es frecuente encontrar plantas de aspecto sano en ciertos años que albergan la bacteria, lo que serviría para su transmisión si se utilizan como fuente de material vegetal.

La transmisión de la enfermedad y las vías de diseminación de *X. ampelinus* a corta distancia, dentro de la misma cepa, entre cepas y entre parcelas próximas, han sido uno de los aspectos más estudiados de la enfermedad. Es bien conocido que las herramientas de poda son medios muy apropiados para dispersar la bacteria. Se han llegado a detectar concentraciones que van desde $3 \cdot 10^3$ hasta 10^5 ufc/ml de *X. ampelinus* en las hojas de corte de las tijeras de poda (Ridé *et al.*, 1983). En las viñas con necrosis bacteriana, la poda constituye una operación de alto riesgo, que facilita el transporte de la bacteria y la penetración en la vid. La receptividad de la planta en el momento en que se realiza la poda influye notablemente en la eficacia de la transmisión.

Los resultados de los experimentos realizados en Francia y Grecia para determinar, mediante inoculaciones, la susceptibilidad a la transmisión de *X. ampelinus* a lo largo del ciclo vegetativo de la vid, no coinciden y, probablemente, las condiciones climáticas influyen en este hecho. En Grecia, el periodo de máximo riesgo de infección mediante las herramientas de poda va desde octubre a enero y desciende durante la primavera, hasta los meses del verano (julio-agosto) en los que la vid se muestra prácticamente inmune (Panagopoulos, 1987). En Francia, se logró infectar a las vides durante todo el año, pero se obtuvo una máxima transmisión de febrero hasta abril, por lo que las podas tardías son las más eficaces para transmitir *X. ampelinus*, sobre todo si coinciden con la emisión de los lloros (Bernard y Faure, 1983; Ridé *et al.*, 1983; Ridé, 1985; Ridé, 1996).

Las podas realizadas en verde, la prepoda y la vendimia son operaciones culturales que producen heridas en las plantas y pueden contribuir a la diseminación de la bacteria. Se considera que una de las causas de la expansión de la bacteria en los últimos años en Francia ha sido la implantación de las máquinas vendimiadoras. Este tipo de vendimia está

considerada como una operación de alto riesgo en las parcelas enfermas, ya que se producen mayor número de heridas en las plantas y la formación de aerosoles que coinciden con un periodo de alta receptividad de la vid, sobre todo durante los otoños lluviosos (Ridé, 1996).

La lluvia y el viento actúan como vehículos naturales en la diseminación de *X. ampelinus*. La gran cantidad de bacterias que salen al exterior en los lloros, en las lesiones foliares y en los chancros pueden ser así transportadas hacia partes sanas de la misma cepa o de otras próximas.

La transmisión del patógeno por el suelo, hasta las raíces, ha sido verificada experimentalmente (Ridé *et al.*, 1983). La bacteria es transportada hasta el suelo por la lluvia y viento, los lloros, los riegos por aspersión, las hojas caídas, la madera de poda, etc. El agua de lluvia y los riegos la conducen hasta las raíces. Las labores del suelo producen heridas en las raíces abriendo el camino a la infección. Los riegos aplicados en primavera son los que más favorecen la infección (Bernard y Faure, 1983; Marcelin, 1983).

I.11. TÉCNICAS DE DETECCIÓN, DIAGNÓSTICO Y CARACTERIZACIÓN

La detección de *X. ampelinus* se realizó por primera vez en 1969 (Panagopoulos, 1969) mediante métodos convencionales: aislamiento e identificación bioquímica y comprobación del poder patógeno de la bacteria. Actualmente, este método de detección sigue siendo en la práctica válido y utilizable con fiabilidad sobre material vegetal con síntomas, pero no está exento de grandes inconvenientes. El aislamiento de la bacteria es difícil, ya que *X. ampelinus* tiene un crecimiento muy lento en medio de cultivo (6-12 días) y suele ir acompañada en los tejidos de la vid de otras bacterias saprofitas de crecimiento rápido que enmascaran frecuentemente su presencia. Pueden, además, existir otros factores negativos, como el efecto inhibitor del medio de cultivo sobre la bacteria, fruto de una sobreesterilización y/o por las características de algún lote de agar (Panagopoulos, 1987). En definitiva, los aislamientos realizados en primavera y verano no suelen tener éxito (Ridé *et al.*, 1983) y sólo deben ser aplicados a muestras con síntomas de la enfermedad (OEPP, 1990).

Una vez aisladas, las bacterias pueden ser caracterizadas mediante pruebas bioquímicas y serológicas. El tiempo que tarda *X. ampelinus* en crecer en medio de cultivo, la coloración amarillo-pálida de las colonias, la fuerte actividad ureasa (2 h), junto con la sensibilidad al fago $\phi 15$ y la inmunofluorescencia son las pruebas propuestas por Ridé *et al.* (1983) para su caracterización rápida. Éstas pueden complementarse con la comprobación de que no crece a 33° C, la producción de ácido de glucosa (-), la producción de álcali de propionato sódico (-) y de tartrato (+), la hidrólisis de la aesculina (-) y la producción de un pigmento marrón difusible en el medio YGC (extracto de levadura, galactosa, CO₃Ca) (Panagopoulos, 1987).

Erasmus *et al.* (1974) aplicaron tres técnicas serológicas, actualmente en desuso, para la caracterización de esta bacteria.

La detección y el diagnóstico rápido de *X. ampelinus* no están actualmente resueltos, lo que agrava aún más los problemas que plantea la enfermedad, ya que no se dispone de un método de análisis para ser utilizado con fiabilidad en el análisis del material vegetal, con vistas a su certificación y estudio del estado sanitario.

La inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos policlonales fue puesta a punto para la detección de *X. ampelinus* en Francia y España (Ridé *et al.*, 1976; López *et al.*, 1980; Cambra *et al.*, 1983) y su utilización ha permitido obtener datos muy interesantes sobre la epidemiología de la enfermedad. Es un método rápido que presenta una sensibilidad entre 10⁴-10⁵ ufc/ml y es utilizable durante todo el año sobre material vegetal (López *et al.*, 1987b), pero adolece de una buena especificidad al utilizarse con anticuerpos policlonales de antisueros, ya que se han detectado frecuentes reacciones cruzadas con la flora saprofita de la vid.

En España e Italia se pusieron a punto varias técnicas inmunoenzimáticas de detección de *X. ampelinus* utilizando antisueros (Cambra *et al.*, 1982; Aramburu *et al.*, 1984; Fiori *et al.*, 1996). Su aplicación a la detección presentaba ciertos problemas de sensibilidad y especificidad que fueron revisados por López *et al.* (1987a). El mayor inconveniente de las técnicas inmunoenzimáticas es que las reacciones cruzadas pasan más fácilmente desapercibidas que en la inmunofluorescencia (López *et al.*, 1987b). Tanto la técnica ELISA

como la de inmunofluorescencia pueden usarse para análisis de confirmación en aislados de bacterias, pero no son recomendables para ser aplicadas directamente sobre material vegetal de vid (OEPP, 1990).

Sin embargo, la producción de anticuerpos monoclonales específicos (AMC) de *X. ampelinus* en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) (Valencia, España) (Gorris *et al.*, 1989) abrió nuevas posibilidades a la detección fiable mediante técnicas serológicas.

La técnica inmunoenzimática ELISA indirecto con el sistema biotina-estreptoavidina, utilizando una mezcla de tres AMC (5C, 8C y 7F) fue capaz de reconocer a 63 aislados de *X. ampelinus*, sin obtener reacción frente a la flora saprofita de la vid y a otras bacterias ensayadas (Gorris *et al.*, 1989). La puesta a punto de técnicas inmunoenzimáticas de detección utilizando esa mezcla de AMC, sobre material vegetal, forma parte de los trabajos programados en esta Tesis doctoral.

No se han puesto a punto técnicas moleculares para la detección de *X. ampelinus* y únicamente se han realizado pruebas de hibridación molecular (Willems *et al.*, 1987b) para la caracterización de la bacteria. Técnicas de amplificación basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se están ensayando en Francia (Manceau, comunicación personal) y serían deseables para mejorar la detección, debido a la potencialidad de las mismas.

I.12. SENSIBILIDAD VARIETAL

Existen citas sobre las diferencias varietales observadas en ensayos de patogenicidad (Matthee *et al.*, 1970; Ridé *et al.*, 1983; López *et al.*, 1984; Peros *et al.*, 1995), pero hay muy pocos estudios sobre la sensibilidad varietal de distintas variedades de vid frente a *X. ampelinus*, obtenidos en ensayos comparativos. En casi todas las publicaciones, se citan las variedades de vid sensibles o que muestran síntomas de la necrosis bacteriana con mayor intensidad, fruto de observaciones realizadas directamente en campo, en años de mayor incidencia de la enfermedad, sin indicación de la existencia de variedades resistentes.

Las dificultades para la realización de los estudios de sensibilidad varietal son evidentes. Los resultados obtenidos en campo están influidos por las condiciones particulares del ensayo, ya que las circunstancias climatológicas acaecidas en los años de duración del estudio, las características edáficas de la parcela y las prácticas culturales condicionan la expresión de los síntomas. Existen también problemas relacionados con la inoculación, tanto por el inóculo utilizado como por el método y la respuesta de las distintas variedades a la inoculación.

No hay variedades totalmente resistentes y se han confeccionado listas de variedades clasificadas según su sensibilidad. En Grecia, se cita a Sultanine y Gold como variedades de muy alta sensibilidad y a Cardinal, Ohanes, Tokay Ribier, Cotsifali y Mandilasi como moderadamente resistentes (Panagopoulos, 1987). Ridé (1985) inventarió todas las variedades en las que se identificó en Francia *X. ampelinus* y ha clasificado 19 variedades en cuatro clases de sensibilidad. Entre las muy sensibles estaban las variedades Alicante Bouschet y Grenache, y como moderadamente resistentes Gris Meunier, Merlot y Syrah (Ridé, 1984). También se estimó que el porta-injerto Rupestris de Lot aumentaba la sensibilidad de las variedades injertadas sobre él y que otros porta-injertos, como 161-49 (Riparia x Berlandieri), R-110 (Berlandieri x Rupestris) y 41B (Chasselas x Berlandieri), la disminuían (Gracia *et al.*, 1980; Ridé *et al.*, 1983).

El cultivo en contenedores en invernadero e inoculando con un inóculo estándar en heridas peciolares frescas, obtenidas desprendiendo hojas en determinados estados de su desarrollo, ha permitido aumentar el número de repeticiones en un espacio reducido y en condiciones controladas, desde el punto de vista de la alimentación y temperatura, y realizar ensayos para conocer el comportamiento de los patrones y de las variedades injertadas sobre los diferentes patrones, así como diferenciar la agresividad de diferentes aislados de *X. ampelinus* (Ridé, 1996). En esas condiciones, se han clasificado como muy sensibles las variedades Alicante Bouschet, Grenache, Gramon y Macabeu, y como tolerantes Chenin, Chasan, Lillorila, Chardonnay, Gris Meunier, Merlot, Pinot noir, Tempranillo, Tannat y Syrah. Los patrones fueron clasificados en dos clases, sensibles y tolerantes, y únicamente se consideró sensible Fercal (Ridé, 1996).

En España, se realizó un ensayo en Tosos (Zaragoza) con 30 variedades españolas de vid en plantación de pie directo, inoculando tres años consecutivos con tres cepas diferentes de *X. ampelinus* en tres épocas diferentes y observando síntomas durante cuatro años. Se comportaron como muy sensibles Airén, Garnacha tintorera o Alicante, Juan Ibáñez, Tinto de Toro y Vidadillo y como de baja sensibilidad Cardinal, Garnacha negra, Mazuela, Monastrell, Pedro Ximénez, Tinto de Madrid y Trepát (López *et al.*, 1987c). En las observaciones realizadas en Galicia, se constató que la variedad Alicante era la más sensible de todas las cultivadas en Galicia, y mostraron menor sensibilidad Loureiro y Treixadura (Gómez y López, 1986).

La inoculación de plantas cultivadas *in vitro* (López *et al.*, 1984) ha sido también utilizada para estudiar el comportamiento varietal frente a *X. ampelinus*, ya que permite utilizar gran número de plantas homogéneas, sin dependencia estacional ni de superficie de parcela, y en condiciones de alta seguridad sin riesgos de diseminación. Sin embargo, se precisa mayor información para poder establecer la correlación entre los resultados de la inoculación de plantas *in vitro* y en el campo (López *et al.*, 1987c). Sirve, al menos, para diferenciar las variedades muy sensibles de las demás, para establecer diferencias patogénicas entre aislados de *X. ampelinus*, así como para estudios de la influencia de los nutrientes del suelo en la sensibilidad de la vid (Peros *et al.*, 1995).

I.13. CONTROL

Las características epidemiológicas de la enfermedad, las dificultades actualmente existentes para el diagnóstico y detección de *X. ampelinus* y la falta de eficacia y escasez de productos fitosanitarios que se pueden utilizar en agricultura contra enfermedades bacterianas son factores que dificultan enormemente el control de la necrosis bacteriana.

El mejor método de lucha es la prevención por lo que, para controlar la dispersión de *X. ampelinus* a largas distancias y evitar la introducción de la enfermedad en nuevas plantaciones de viñedo y en regiones exentas de la enfermedad, es necesario que el material vegetal de propagación sea obtenido en áreas libres de la enfermedad y que la producción de los viveros esté sometida a un estricto control fitosanitario (Panagopoulos, 1987).

La observación visual o inspección directa del material vegetal no ofrece garantías suficientes. La planta madre debe ser analizada para detectar *X. ampelinus* (OEPP, 1990). Aunque la inspección de los síntomas es relativamente sencilla, son posibles las confusiones con otras enfermedades. Asimismo, la necrosis bacteriana produce infecciones latentes. Además, actualmente no es posible proponer un método de análisis para ser utilizado en una planta aparentemente sana (OEPP, 1990), por lo que en la práctica no se puede ejercer un buen control sobre el material vegetal de propagación producido en zonas infectadas por *X. ampelinus*. Sólo es posible reducir el riesgo de la transmisión de la bacteria inspeccionando las plantas-madre. Los esquemas de certificación de vid pueden aportar garantías adicionales (EPPO/CABI, 1992). La OEPP (1994) propone un esquema de certificación, aunque deben armonizarse las listas de enfermedades objeto de control y las técnicas de detección a utilizar (Walter, 1991).

El Ministerio de Agricultura de Grecia publicó un decreto prohibiendo el movimiento de material vegetal de propagación desde regiones contaminadas con *X. ampelinus* (Panagopoulos y Psallidas, 1983). En la Unión Europea, el libre comercio ha primado sobre el control fitosanitario y, aunque en la legislación vigente (RD 2071/1993) se prohíbe la comercialización de plantas infectadas con *X. ampelinus*, no existe ningún requisito oficial que exija la realización de análisis o la producción en zonas libres de la enfermedad.

En Australia, toda importación de material de propagación de vid es sometido a tratamiento con agua caliente y es cultivado bajo condiciones de cuarentena e inspección para evitar la introducción de la enfermedad (Moffet y Croft, 1983, citado por Panagopoulos, 1987). Psallidas y Argyropoulou (1994) ensayaron como método de lucha preventiva el tratamiento del material vegetal de reproducción con agua caliente y concluyeron que una temperatura de 50° C durante 20 minutos es suficiente para erradicar *X. ampelinus* de sarmientos en parada vegetativa sin dañar los tejidos de la vid. Puede ser un método simple, efectivo, económico y respetuoso con el medio ambiente para prevenir la introducción de la enfermedad en zonas nuevas, si bien parece necesaria una mayor experimentación y posiblemente deba complementarse con la superación de un periodo de cultivo en condiciones adecuadas de cuarentena que garanticen la ausencia de infecciones latentes con concentraciones bajas de *X. ampelinus* del material así tratado.

La lucha química contra esta enfermedad, como contra otras bacteriosis, es complicada por la escasez de productos fitosanitarios que puedan utilizarse en agricultura con una buena eficacia. Sin embargo, la actividad bacteriostática del cobre es conocida desde hace mucho tiempo. En el siglo pasado ya se recomendaban aplicaciones, con sulfato de cobre, en la lucha de la necrosis bacteriana de la vid (Ravaz y Bailleau, 1896) y se ha comprobado que muestra una buena eficacia *in vitro* contra *X. ampelinus* (Aramburu *et al.*, 1982; Ridé *et al.*, 1983; Marcelin y Novoa, 1983b). También se comprobó la eficacia *in vitro* de diversos bactericidas y fungicidas, obteniendo un marcado efecto inhibitor de distintos compuestos de cobre, de antibióticos y de algunos desinfectantes y fungicidas (Aramburu *et al.*, 1982).

En estudios epidemiológicos de la necrosis bacteriana también se apreció la eficacia del cobre en campo y se observó una incidencia de la enfermedad menor en aquellos viñedos que recibieron más de siete tratamientos anti-mildiu. Además, en aquellas parcelas en las que las aplicaciones se realizaron con formulaciones de cobre exclusivamente, la incidencia era más baja que si se utilizaba el cobre en mezclas y mucho menor que si se trataba con otros compuestos químicos anti-mildiu (Bernard y Faure, 1983). En ensayos de campo también se comprobó la mayor eficacia del cobre frente a otros fungicidas orgánicos (Marcelin y Novoa, 1983b).

Entre las distintas formulaciones de cobre, el caldo bordelés (sulfato cuprocálcico) es el que posee las características físico-químicas más adecuadas. Su buena persistencia y adherencia, y su no excesiva solubilidad, formando otros compuestos amorfos de cobre, le confieren ventajas frente a las sales simples de cobre (oxicloruro y sulfatos) en la lucha contra la necrosis bacteriana (Barailla, 1983).

Pero la necrosis bacteriana de la vid es una enfermedad fundamentalmente vascular y el poder de penetración del cobre es débil y sólo permite el control de la fase externa de la enfermedad (Marcelin y Novoa, 1983b), por lo que las aplicaciones de cobre tienen un carácter preventivo y no curativo. Reducen el inóculo epifito y protegen contra las contaminaciones externas, dificultando la penetración de *X. ampelinus* en la planta a través de las heridas o de las infecciones en yemas, brotes y hojas (Barailla, 1983).

El calendario de tratamientos, aceptado por todos los autores, cubre los periodos críticos de producción de inóculo de *X. ampelinus* y los estados vegetativos más sensibles de la vid, estableciendo tres momentos de aplicación:

1º- Inmediatamente después de la poda, para proteger las heridas de poda aún frescas. Caldo bordelés al 5%.

2º- Entre la aparición de la punta verde de la yema hasta la salida de hojas (estados fenológicos de la vid C/D). Caldo bordelés al 2%.

3º- Entre la salida de las hojas y hasta que se extienden las tres primeras (estados fenológicos D/E). Caldo bordelés al 2%.

Si se observaran síntomas foliares deberían realizarse aplicaciones complementarias.

Actualmente, existen formulaciones en polvo mojable micronizado que deben aplicarse forzando las dosis al doble de lo indicado en la etiqueta del producto comercial (Gómez y López, 1986). En ensayos realizados en campo no se observaron problemas de toxicidad en las cepas, aunque sí un ligero efecto depresivo de la vegetación (López *et al.*, 1987c).

Además del calendario de tratamientos descrito, en parcelas infectadas se deben tomar una serie de medidas profilácticas, con objeto de reducir el inóculo existente, evitar o disminuir la transmisión de la enfermedad entre cepas y no favorecer la expresión de los síntomas. Es decir, hay que convivir con la enfermedad, procurando limitar al máximo posible los daños que causa. El conjunto de medidas para un control razonable de la necrosis bacteriana fue descrito por Ridé *et al.* (1983), estando generalmente aceptado, y consiste en:

- Arrancar y destruir mediante fuego las cepas enfermas en aquellas parcelas con infecciones iniciales y limitadas.
- Podar exclusivamente durante el periodo de máximo reposo vegetativo.
- Eliminar los brazos y la madera enferma con podas severas y destruirlos mediante fuego, rápidamente.

- Desinfectar con lejía comercial o flameando con alcohol después de podar una cepa y, sobre todo, al cambiar de parcela. La utilización de tijeras neumáticas de poda tipo FELCO, con mecanismo de autodesinfección, puede reducir los tiempos empleados en la poda (Marcelin y Novoa, 1983a).
- No utilizar maquinaria que pueda herir las cepas, como prepodadoras, vendimiadoras, etc.
- Evitar o reducir los riegos tardíos seguidos de labores de suelo.
- Utilizar en las nuevas plantaciones las variedades de menor sensibilidad a la necrosis bacteriana.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

En esta Memoria se ha abordado el estudio de la necrosis bacteriana de la vid, causada por *Xylophilus ampelinus*. Esta importante enfermedad, que puede ser limitante del cultivo, posee un carácter cíclico, muy ligado a condiciones ambientales.

La viticultura aragonesa posee importancia indudable (37.246 ha y cuatro denominaciones de origen), constituyendo la vid un cultivo rentable, de importancia social y en fase de expansión. En 1978 se detectó *X. ampelinus* por primera vez en España, precisamente en Aragón, donde la necrosis bacteriana causó grandes pérdidas económicas (años 1979 al 1983) y tuvieron que arrancarse más de 500 ha.

Desde el año 1983 la enfermedad está en periodo de latencia, corriéndose el riesgo de una nueva manifestación epidémica, ya que no se toman las medidas sanitarias y culturales que traten de evitar la dispersión de la necrosis bacteriana, ni se realizan controles del material vegetal de nuevas plantaciones.

La reciente expansión de la necrosis bacteriana de la vid en nuevas zonas de Francia debe alertar de los riesgos reales de esta enfermedad en la que únicamente las medidas preventivas parecen tener eficacia.

Los objetivos fundamentales de esta Memoria, en función de los antecedentes bibliográficos son: 1) La puesta a punto de un método de detección fiable de *X. ampelinus*, aplicable de forma rutinaria en programas de certificación y control sanitario, 2) la evaluación del grado de infección por la bacteria en Aragón y 3) el establecimiento de la sensibilidad varietal a *X. ampelinus* de los principales cultivares españoles de la vid. Estos objetivos generales (desarrollados en cinco capítulos) suponen el estudio de aspectos de la enfermedad no suficientemente claros, y tratan de cubrir importantes huecos en el estado del conocimiento de la necrosis bacteriana de la vid.

Esta Memoria pretende tener un marcado sentido práctico y proporcionar elementos que faciliten el control de la enfermedad. El aspecto más importante es, sin duda, la puesta a punto de un método sensible y fiable para la detección de *X. ampelinus* en material vegetal asintomático en cualquier época del año. Este método, hasta hoy inexistente, es absolutamente esencial. La disponibilidad del mismo permitiría la realización de controles de plantas importadas y la de análisis sistemáticos de la producción de plantas de vid dentro de un esquema de certificación que aseguraría una viticultura moderna y sin riesgos de necrosis bacteriana.

Todos los objetivos en su conjunto tratan de mejorar tanto los métodos de diagnóstico y detección como de suministrar elementos para la toma de decisiones en nuevas plantaciones. Así, el conocimiento del porcentaje de infección y de la distribución de la enfermedad en Aragón y del grado de sensibilidad de los diferentes cultivares españoles de vid permitirá realizar nuevas plantaciones con las variedades menos sensibles en zonas contaminadas y de variedades más sensibles en zonas libres de la enfermedad.

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1.- COMPARACIÓN DE LA EFICIENCIA DE DISTINTOS TIPOS DE INMUNOENSAYO ELISA, UTILIZANDO ANTICUERPOS MONOCLONALES, PARA LA DETECCIÓN DE *Xylophilus ampelinus* EN MATERIAL VEGETAL.

1.1. INTRODUCCIÓN

Los métodos de inspección y análisis recomendados por la OEPP para el control de *Xylophilus ampelinus* son simplemente la observación visual de síntomas y, en su caso, el aislamiento de la bacteria en medio de cultivo (OEPP, 1984). La OEPP también indica que, al observar síntomas, son posibles las confusiones con otras enfermedades y añade que no es posible proponer un método de análisis para ser utilizado en plantas aparentemente sanas con infecciones latentes (OEPP, 1990).

Como ya se ha indicado, el aislamiento de la bacteria es difícil y, además, debido a su lento crecimiento (5-10 días), su aparición puede quedar enmascarada por la flora saprofita, por lo que prácticamente sólo se obtiene éxito en el aislamiento a partir de muestras con síntomas recolectadas en otoño e invierno (Ridé *et al.*, 1983). Las técnicas serológicas de inmunofluorescencia (IF) y ELISA utilizando antisueros, plantean problemas de sensibilidad y de especificidad debido a la abundante flora saprofita de la viña (López *et al.*, 1987a y b). Aunque ambas pueden usarse para análisis de confirmación en aislados de bacterias, no son recomendadas para ser aplicadas directamente en material de viña (OEPP, 1990).

Para evitar los problemas que plantea la utilización de antisueros, Gorris *et al.* (1989) obtuvieron anticuerpos monoclonales (AMC) específicos de *X. ampelinus*. En este capítulo se ha tratado de poner a punto una técnica inmunoenzimática ELISA, utilizando los tres AMC 5C, 8C y 7F (Gorris *et al.*, 1989) producidos en el IVIA, para ser aplicada con fiabilidad para la detección de *X. ampelinus* en material vegetal. Se unirán las ventajas de la técnica ELISA y las de los anticuerpos monoclonales específicos. Así se podrá disponer de un método sensible para el análisis de muestras, independientemente de que se observen o no síntomas y de la época de muestreo. Para ello, se compararon cinco métodos o variantes ELISA, utilizando distintas concentraciones de *X. ampelinus* que fueron añadidas a extractos de viña y dos métodos de preparación de material vegetal (maceración y triturado de la muestra) en ocho

tampones de extracción. Asimismo, se estudió la sensibilidad de los distintos métodos, con la finalidad de utilizar el más eficiente y así disponer de una herramienta de análisis serológico específica y útil para ser utilizada en la detección sensible y específica de la bacteria en material vegetal.

1.2. MATERIAL Y MÉTODOS

1.2.1. Cepas bacterianas

Se utilizó la cepa 60.7 de *X. ampelinus*, aislada en España, y como control negativo la cepa 1001 de *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, facilitada por el Dr. M.C.M. Perombelon (SCRI, Dundee, Escocia, UK), mantenidas en crioconservación en la colección de bacterias fitopatógenas del IVIA en Moncada (Valencia).

Se prepararon suspensiones de *X. ampelinus* de 10^8 ufc/ml en agua fisiológica tamponada¹ (AFT), tampón carbonato² (TC) y tampón Tris³. A partir de ellas se prepararon suspensiones seriadas por dilución 1/10 en cada uno de los tres tampones, hasta la concentración 10^{-1} .

La concentración bacteriana de las suspensiones se determinó con exactitud preparando una suspensión inicial de la bacteria en cada uno de los tampones y realizando varias suspensiones decimales. Se sembraron 50 µl de cada suspensión en medio LPGA⁴ y a los seis días de incubación a 22° C se realizaron conteos en las placas que tenían entre 30 y 300 colonias de *X. ampelinus*.

Paralelamente, se efectuaron lecturas espectrofotométricas a 443 nm para determinar la densidad óptica (d.o.) de cada suspensión. Así se calculó que la suspensión inicial 10^8 ufc/ml de *X. ampelinus*, cuando se preparó en AFT, correspondía a la absorbancia de 0'356, cuando lo fue en TC, de 0'357 y cuando lo fue en Tris, de 0'354.

¹ ClNa, 8 g; PO₄H₂Na 2H₂O, 0'4 g; PO₄HNa₂ 12H₂O, 2'7 g; agua destilada, 1 litro (pH 7'2-7'4).

² CO₃Na₂, 1'59 g; CO₃HNa, 2'93 g; agua destilada, 1 litro (pH 9'6).

³ Tris, 60'55 g; agua destilada, 1 litro (pH 9).

⁴ Extracto de levadura, 5 g; bacto-peptona, 5 g; glucosa anhidra, 10 g; agar, 20 g; agua destilada, 1 litro (pH 7).

Se prepararon suspensiones 10^8 ufc/ml de *Erwinia carotovora* sbsp. *atroseptica* de forma similar a las realizadas con *X. ampelinus*. En este caso, la absorbancia de la suspensión de 10^8 ufc/ml, medida a 660 nm, fue de 0'168, 0'158 y 0'172 en los tampones AFT, TC y Tris, respectivamente.

1.2.2. Material vegetal y su preparación para análisis

En octubre se recolectaron sarmientos de vid de la variedad Garnacha de plantas libres de *X. ampelinus*, procedentes de vides cultivadas para este fin en macetas en umbráculo. Se conservaron a 4° C hasta su utilización. La preparación del material vegetal para su análisis mediante ELISA se realizó con las dos técnicas que habían resultado de interés para la detección de *X. ampelinus* en ensayos preliminares. Un trozo de la parte basal (tres primeros nudos) de los sarmientos fue troceada en rodajas finas de entre 1-2 mm de espesor para agregarlas a diferentes suspensiones bacterianas en una proporción de un peso de material vegetal en cinco volúmenes de las diferentes suspensiones preparadas en los tampones con aditivos que posteriormente se describirán.

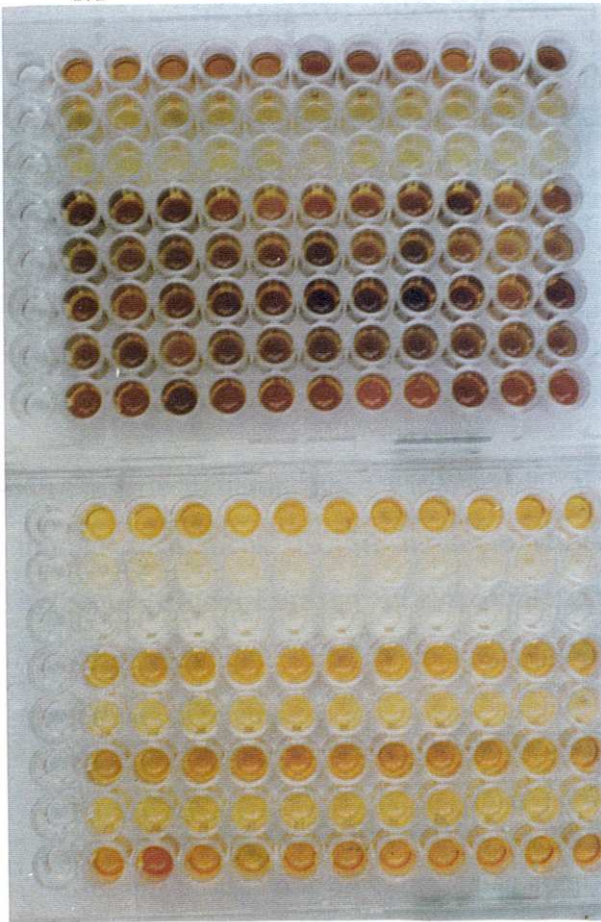
Se prepararon dos series de material vegetal. Una serie se mantuvo en maceración sin homogeneizar, durante 16 h, a temperatura ambiente (P1). La otra fue triturada con un homogeneizador de vástago y de cuchillas (Polytron®, Kinematica), para obtener extractos triturados (P2) (foto 1.1). Tanto los extractos macerados como los triturados fueron dispensados en los pocillos de placas ELISA (foto 1.2), previo tratamiento con calor en baño María durante diez minutos a 100° C, ya que, en ensayos previos no descritos en esta Memoria, se observó mayor eficiencia de la detección mediante ELISA cuando se realizó esta operación (Cambra *et al.*, 1990).

1.2.3. Tampones de extracción

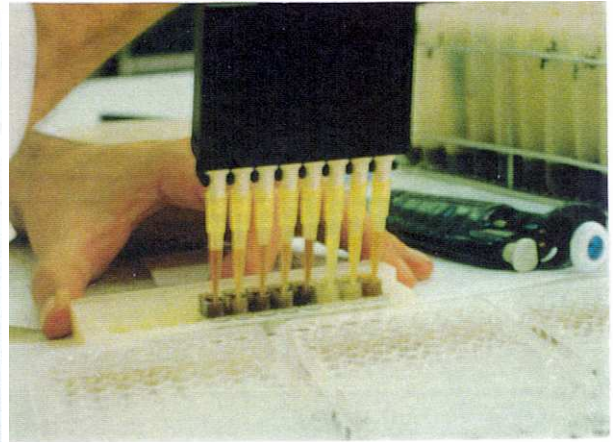
Se compararon ocho tampones de extracción diferentes, basados en los tres tampones más utilizados en la aplicación de técnicas serológicas en Patología Vegetal: AFT, TC y Tris. Se adicionaron compuestos antioxidantes e inhibidores de compuestos fenólicos, tales como polivinilpirrolidona (PVP), nicotina, dietilditiocarbamato sódico (DIECA) o mercaptoetanol.



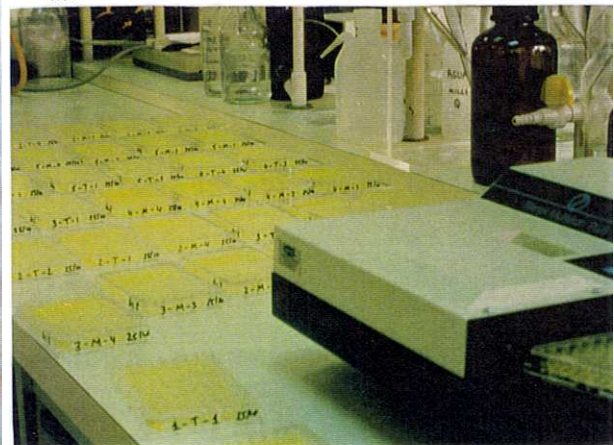
1.1



1.2



1.3



1.4

Foto 1.1.- Detalle del aspecto final de una muestra triturada (izquierda) y macerada (derecha).

Foto 1.2.- Aspecto de las placas ELISA dispensadas con muestras trituradas (arriba) y maceradas (abajo).

Foto 1.3.- Dispensado de suspensiones de *X. ampelinus* con pipeta multicanal.

Foto 1.4.- Lectura final de la absorbancia del experimento con lector automático.

La composición de los tampones utilizados se expone en la tabla 1.1, así como el pH final tras el uso de aditivos.

Tabla 1.1.- Composición de los ocho tampones de extracción comparados.

Tampón	Composición	pH final
1	AFT (pH 7'2-7'4) + 1% PVP-10 + 2'5% sulfato de nicotina	9'7
2	AFT (pH 7'2-7'4) + 0'2% dietilditiocarbamato sódico (DIECA)	7'6
3	AFT (pH 7'2-7'4) + 0'2% mercaptoetanol	7'3
4	TC (pH 9'6) + 1% PVP-10 + 2'5% sulfato de nicotina	9'8
5	TC (pH 9'6) + 0'2% DIECA	9'7
6	Tris (0'5M, pH 9) + 1% PVP-10 + 2'5% sulfato de nicotina	8'8
7	Tris (0'5M, pH 9) + 0'2% DIECA	8'8
8	Tris (0'5M, pH 9) + 0'2% mercaptoetanol	8'7

1.2.4. Tipos y variantes de ELISA

Se estudiaron cinco variantes del método ELISA, basadas en tres tipos de ensayos inmunoenzimáticos: ELISA indirecto (ELISA-I), ELISA doble sandwich de anticuerpos indirecto (ELISA-DASI) y ELISA doble sandwich de anticuerpos (ELISA-DAS) (Sánchez Vizcaíno y Cambra, 1987) y en todos los casos se utilizaron los anticuerpos monoclonales específicos descritos.

En ELISA-I y ELISA-DASI se utilizaron dos tipos de inmunoglobulinas antiespecie (anti-ratón) producidos en cabra, unas conjugadas con fosfatasa alcalina y otras con biotina. Con su utilización se obtuvieron dos variantes de estos tipos de ELISA: el convencional y el basado en el sistema de amplificación mediante la reacción biotina/estreptoavidina (b/sa). La estreptoavidina fue utilizada marcada también con fosfatasa alcalina. En todos los análisis se emplearon placas de poliestireno de 96 pocillos y fondo plano, Polisorp® (Nunc).

Las variantes de las técnicas ELISA ensayadas fueron: ELISA-I convencional (E1), ELISA-I-b/sa (E2), ELISA-DASI convencional (E3), ELISA-DASI-b/sa (E4) y ELISA-DAS-b/sa (E5). En la figura 1.1 aparecen esquematizadas todas las variantes ELISA ensayadas, que se describen paso a paso a continuación.

1.2.4.1. ELISA indirecto convencional (ELISA-I), E1

Tapizado de la placa con el antígeno. Se emplearon 200 µl por pocillo del antígeno o muestra a analizar, es decir, de las suspensiones de *X. ampelinus* descritas anteriormente. Se incubó durante 16 h a 4° C, tapando las placas con un plástico autoadhesivo. Posteriormente se lavó la placa tres veces con tampón de lavado (AFT + Tween 20 al 0'05%) para eliminar restos y posibles antígenos no fijados o fijados deficientemente.

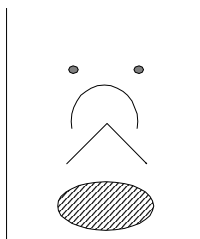
Adición de anticuerpos anti- *X. ampelinus*. Se añadieron 200 µl por pocillo de la mezcla de anticuerpos monoclonales 8C, 7F y 5C (Gorris *et al.*, 1989) a la dilución 1/25.000, en el caso de 5C, y 1/50.000, en el caso de 8C y 7F, en AFT más 0'5% de albúmina de suero bovino (BSA). Se incubó durante 2 h a 37° C en placas tapadas con un plástico autoadhesivo y se lavó tres veces la placa con tampón de lavado.

Adición de inmunoglobulinas antiespecie conjugadas con fosfatasa alcalina. Se añadieron 200 µl por pocillo de anticuerpos de cabra anti-ratón marcados con fosfatasa alcalina comerciales (GAM-AP, Boehringer Mannheim) a la dosis de 1/2.500 en AFT. Se incubó la placa durante 2 h a 37° C, tapando las placas con un plástico autoadhesivo, lavando a continuación tres veces con tampón de lavado.

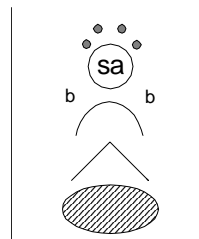
Revelado colorimétrico. Se añadieron 200 µl por pocillo del sustrato compuesto por una solución de un miligramo de paranitrofenil-fosfato por mililitro de tampón sustrato (10% dietanolamina, pH 9'8, en agua destilada). Se incubó a temperatura ambiente y se leyeron las

Figura 1.1.- Tipos de ELISA

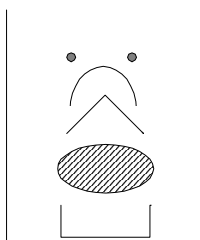
ELISA-I



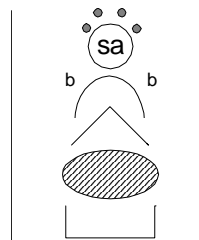
ELISA-I-b/sa



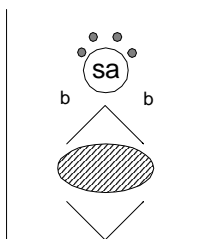
ELISA-DASI










ELISA-DASI-b/sa



ELISA-DAS-b/sa



-  Antígeno-*X. ampelinus*
-  Anticuerpos monoclonales anti-*X. ampelinus*
-  Inmunoglobulinas antiespecie, de cabra anti-ratón, conjugadas con fosfatasa alcalina
-  Anticuerpos monoclonales anti-*X. ampelinus*, conjugados con biotina
-  Anticuerpos policlonales anti-*X. ampelinus*
-  Estreptoavidina conjugada con fosfatasa alcalina
-  Inmunoglobulinas antiespecie, de cabra anti-ratón, conjugadas con biotina

microplacas en un lector automático (Titertek ® Multiscan, Flow) a 405 nm, a los 15, 45, 75 y 105 minutos.

1.2.4.2. ELISA indirecto biotina/estreptoavidina (ELISA-I-b/sa), E2

Tapizado de la placa con el antígeno. Se realizó de idéntica forma que en ELISA-I convencional.

Adición de anticuerpos anti- *X. ampelinus*. Se procedió de igual forma que en ELISA-I. La única diferencia fue la duración de la incubación, que en este caso fue 1 h y 30 min a 37° C.

Adición de inmunoglobulinas antiespecie conjugadas con biotina. Para amplificar la reacción final se utilizaron 200 µl por pocillo de una solución 1/10.000 en AFT de anticuerpos anti-ratón marcados con biotina (GAM-b, Boehringer Mannheim). Se incubó la placa tapada durante 1 h y 30 min a 37° C, lavando a continuación tres veces con tampón de lavado.

Adición de estreptoavidina conjugada con fosfatasa alcalina. Se añadieron 200 µl por pocillo de una solución 1/2.000 de estreptoavidina conjugada con fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim) en AFT. Se incubó durante media hora en oscuridad y a temperatura ambiente. Se lavó igualmente con tampón de lavado.

Revelado colorimétrico. Se utilizó el mismo tampón sustrato y lectura que en ELISA-I.

1.2.4.3. ELISA doble sandwich de anticuerpos indirecto convencional (ELISA-DASI), E3

Tapizado de la placa con anticuerpos policlonales. Se sensibilizó la placa con 200 µl por pocillo de una solución de 2 µg/ml en tampón carbonato de anticuerpos policlonales anti-*X. ampelinus* (As-8), producidos en el IVIA. Se incubó durante 4 h a 37° C en placas tapadas con plástico autoadhesivo y se lavó tres veces con tampón de lavado.

Adición del antígeno. Se añadieron 200 µl por pocillo de la muestra a analizar, es decir de las mismas suspensiones de *X. ampelinus* antes descritas. Se incubó durante 16 h a 4° C en placas tapadas, lavándose a continuación tres veces con AFT.

Adición de anticuerpos anti -*X. ampelinus*. Se procedió de igual modo que en el paso correspondiente de ELISA-I.

Adición de inmunoglobulinas antiespecie conjugadas con fosfatasa alcalina. Se procedió de igual modo que en el paso correspondiente de ELISA-I.

Revelado colorimétrico. Se utilizó el mismo tampón sustrato y lectura que en ELISA-I.

1.2.4.4. ELISA doble sandwich de anticuerpos indirecto biotina/estreptoavidina (ELISA-DASI-b/sa), E4

Tapizado de la placa con anticuerpos policlonales. Se procedió de igual modo que en el paso correspondiente de ELISA-DASI.

Adición del antígeno. Se procedió de igual modo que en el paso correspondiente de ELISA-DASI.

Adición de anticuerpos anti -*X. ampelinus*. Se procedió de igual modo que en el paso correspondiente de ELISA-I-b/sa.

Adición de inmunoglobulinas antiespecie conjugadas con biotina. Se procedió de igual modo que en el paso correspondiente de ELISA-I-b/sa.

Adición de estreptoavidina conjugada con fosfatasa alcalina. Se procedió de igual modo que en el paso correspondiente de ELISA-I-b/sa.

Revelado colorimétrico. Se utilizó el mismo tampón sustrato y lectura que en ELISA-I.

1.2.4.5. ELISA doble sandwich de anticuerpos biotina/estreptoavidina (ELISA-DAS-b/sa), E5

Tapizado de la placa con anticuerpos monoclonales. Se tapizó con 200 µl por pocillo de una dilución en tampón carbonato de la mezcla de anticuerpos monoclonales (Gorris *et al.*, 1989) purificados de líquido ascítico a la concentración final de 1'5 µg/ml (0'5 µg/ml de cada uno de los anticuerpos 5C, 8C y 7F utilizados). Se incubó la placa tapada con plástico autoadhesivo durante 4 h a 37° C, lavándose a continuación tres veces con tampón de lavado.

Adición del antígeno. Se procedió de igual modo que en el paso correspondiente de ELISA-DASI.

Adición de anticuerpos monoclonales conjugados con biotina. Se añadieron 200 µl por pocillo de una dilución 1/1.000 en AFT más 0'5% de BSA de los anticuerpos monoclonales empleados en el tapizado, pero conjugados con biotina (dosis final 0'1 µg/ml de cada anticuerpo). El biotinado se realizó según el método descrito por Gorris *et al.* (1994) con éster de biotina (Sigma). Se incubó durante 4 h a 37° C, lavándose a continuación tres veces con tampón de lavado.

Adición de estreptoavidina conjugada con fosfatasa alcalina. Se procedió de igual modo que en el paso correspondiente de ELISA-I-b/sa.

Revelado colorimétrico. Se utilizó el mismo tampón sustrato y lectura que en ELISA-I.

1.2.5. Condiciones de comparación

El experimento de comparación consistió en analizar simultáneamente mediante las cinco variantes de la técnica ELISA descritas las diez suspensiones de *X. ampelinus* realizadas en cada uno de los ocho tampones de extracción y con los dos tipos de preparación del material vegetal. Se realizaron cuatro repeticiones de cada combinación ELISA - preparación, de manera que en conjunto se utilizaron 40 placas ELISA. En cada placa se dispensaron las diez suspensiones de *X. ampelinus* (10^8 a 10^{-1} ufc/ml). Se utilizó un pocillo por cada

suspensión y tampón. Además, se rellenaron ocho pocillos en cada placa con una suspensión 10^7 ufc/ml de *X. ampelinus* en AFT (estándar positivo), y una suspensión de 10^8 ufc/ml de *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, realizada en cada uno de los ocho tampones descritos (un pocillo por cada tampón), como testigo negativo. Las placas se marcaron con un número que indicaba la técnica (de 1 a 5), una letra (M o T) que permitía identificar el tipo de procesado del material vegetal, seguida de otro número (de 1 a 4) que señalaba el número de repetición.

Para hacer mínimas las diferencias entre placas, el dispensado en todas las etapas de cada técnica ELISA comparada fue realizado con pipetas automáticas de ocho y 12 canales (Titertek ®, Flow) y se realizó de forma que aseguraba que las repeticiones se efectuaran de forma similar en tiempo (foto 1.3). La distribución del sustrato se realizó con un dispensador automático Autodrop ® (Flow), rellenando una placa cada medio minuto. Posteriormente, se realizaron cuatro lecturas a los 15, 45, 75 y 105 minutos de haber dispensado el tampón sustrato, realizando la lectura de una placa cada medio minuto. Dichas lecturas se realizaron en un lector automático Titertek ® Multiskan MKII Plus (Flow), en el que previamente se había hecho el cero con una placa que contenía el tampón sustrato utilizado (foto 1.4). Esto permitió que las lecturas de cada placa se realizaran a un tiempo exacto de incubación con el tampón sustrato.

Se consideraron reacciones positivas aquéllas que mostraron un valor de la absorbancia de, al menos, dos veces el valor alcanzado por el testigo negativo.

1.2.6. Análisis estadístico

Con los datos de la absorbancia o d.o. obtenidos a los 75 minutos de haber dispensado el tampón sustrato, se realizó un análisis de varianza según el siguiente modelo matemático:

$$\Phi_{ijklmn} = \mu + E_i + P_j + T_k + S_l + R_{m(ij)} + EP_{ij} + ET_{ik} + ES_{il} + PT_{jk} + PS_{jl} + TS_{kl} + \epsilon_{n(ijklm)}$$

donde Φ_{ijklmn} representa la d.o. de cálculo (d.o.c.1) que fue la diferencia entre la d.o. media de las cuatro repeticiones de cada valor (x1.000) menos la d.o. del testigo negativo (x1.000) (d.o.n.) correspondiente (d.o.c.1 = d.o. - d.o.n.) y se descompone en los 13 términos siguientes:

μ = media general.

E_i = efecto de la técnica ELISA "i" (fijo).

P_j = efecto de la preparación de la vid "j" (fijo).

T_k = efecto del tampón de extracción "k" (fijo).

S_l = efecto de la suspensión de *X. ampelinus* "l" (fijo).

$R_{m(ij)}$ = efecto de la repetición o tanda "m" dentro de la técnica ELISA "i" y de la preparación de la vid "j".

EP = efecto de la interacción de la técnica ELISA con la preparación de la vid.

ET = efecto de la interacción de la técnica ELISA con el tampón de extracción.

ES = efecto de la interacción de la técnica ELISA con la suspensión de *X. ampelinus*.

PT = efecto de la interacción de la preparación de la vid con el tampón de extracción.

PS = efecto de la interacción de la preparación de la vid con la suspensión de *X. ampelinus*.

TS = efecto de la interacción del tampón de extracción con la suspensión de *X. ampelinus*.

ε = efecto individual de cada d.o. y de otros efectos no controlados o residuales, como interacciones triples que se consideran inexistentes.

Siendo el número total de niveles de cada efecto:

ELISA (E)	i = 1.....5
Preparación vid (P)	j = 1.....2
Tampón de extracción (T)	k = 1.....8
Suspensión de <i>X. ampelinus</i> (S)	l = 1.....10
Repetición (R)	m = 1.....4

El análisis del modelo completo se realizó mediante el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (1988), utilizando la suma de cuadrados tipo III. Cuando algún efecto

fue declarado estadísticamente significativo, se realizó una comparación de medias por el método Duncan a diferentes niveles, considerando las medias alcanzadas por las distintas variantes ELISA independientemente de la preparación del material vegetal (P1+P2) y sólo cuando se utilizó el material vegetal macerado (P1).

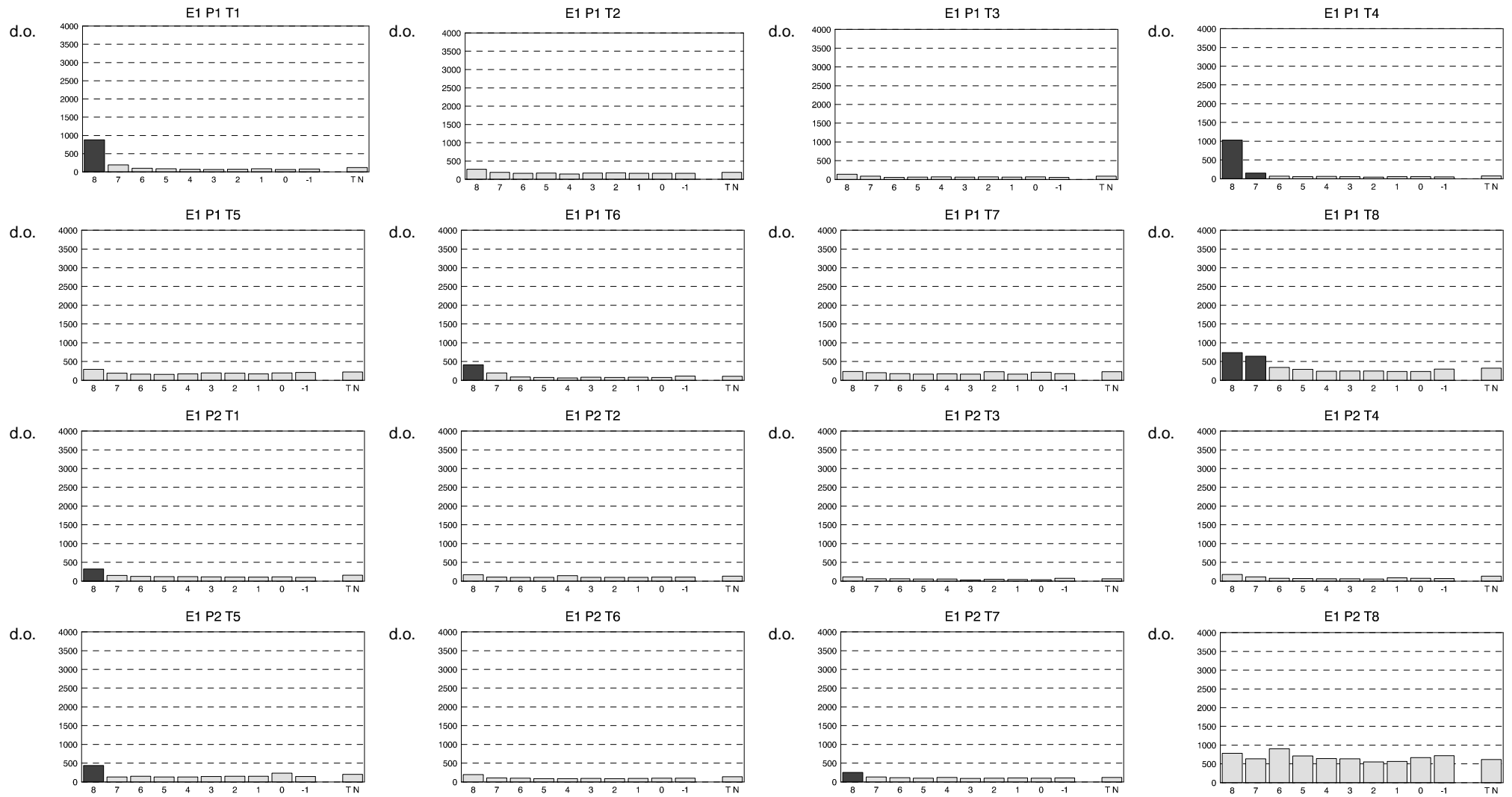
Para estudiar el comportamiento de los diferentes tampones de extracción, se realizaron comparaciones de medias de la variable d.o.c.1 a distintos niveles (tabla 1.6). Se utilizaron tres tipos de datos: 1) los valores medios de la d.o. alcanzados con los distintos tampones (T) en todas las técnicas ELISA e independientemente del tipo de preparación del material vegetal (medias de 400 valores, pertenecientes a las combinaciones $E_i P_j T_k$); 2) los valores medios de la d.o. obtenidos con todas las técnicas ELISA cuando se utilizó sólo el material vegetal macerado (medias de 200 valores de las combinaciones $E_i P_1 T_k$); y 3) los valores obtenidos exclusivamente con la técnica ELISA-DASI-b/sa con material vegetal macerado (medias de 40 valores, combinaciones $E_4 P_1 T_k$). También se compararon las medias de una nueva variable calculada (d.o.c.2) restando a la d.o. alcanzada ($\times 1.000$) con los distintos tampones en la combinación $E_4 P_1 T_k$ el doble de la d.o. de los testigos negativos ($\times 1.000$) correspondiente (d.o.c.2 = d.o. - 2 d.o.n.), es decir, utilizando el criterio habitual que define cuándo un resultado es considerado positivo en la técnica ELISA.

Asimismo, se realizaron contrastes entre los valores obtenidos con dos suspensiones decimales consecutivas, cuando se utilizó la técnica y la preparación del material vegetal que habían mostrado una mayor eficiencia.

1.3. RESULTADOS

En las figuras 1.2, 1.3, 1.4, 1.5 y 1.6 se exponen en forma de diagrama de barras los valores de la d.o. alcanzada a los 75 minutos de haber dispensado el tampón sustrato, como media de las cuatro repeticiones de cada suspensión de *X. ampelinus* obtenidas con cada

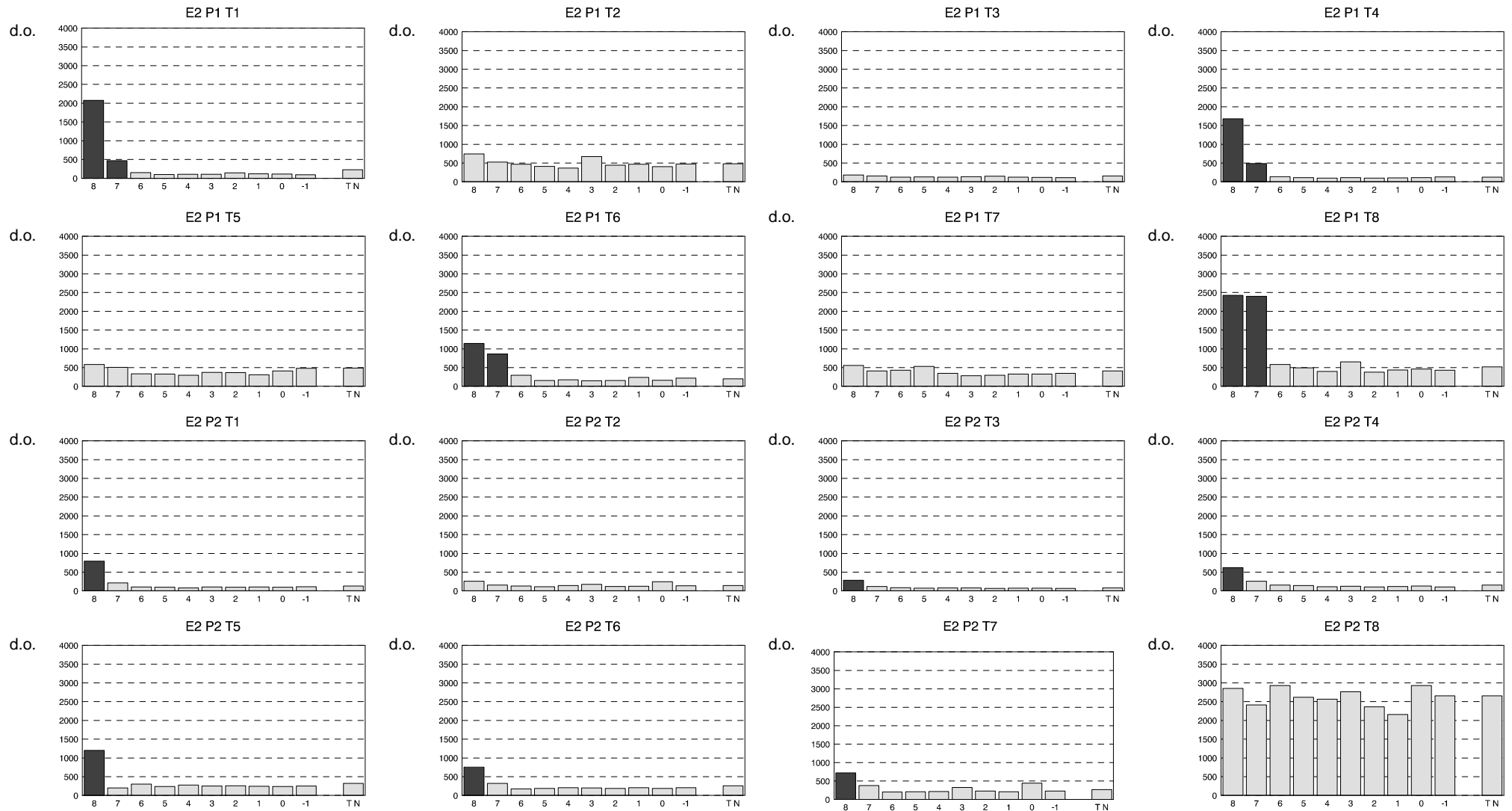
Figura 1.2.- Densidad óptica media ($\times 1.000$) en la técnica ELISA indirecto convencional, según tratamientos (lectura obtenida a los 75 minutos de incubación).



E1 = ELISA indirecto convencional
 P1 = material vegetal macerado
 P2 = material vegetal homogeneizado
 T1 - T8 = diferentes tampones de extracción

8....-1 = suspensiones decimales consecutivas de *X. ampelinus* (10^8 ufc/ml ... 10^{-1} ufc/ml)
 TN = testigo negativo, suspensión 10^8 ufc/ml de *E. carotovora* sbsp. *atroseptica*
 d.o. = densidad óptica (405 nm)
 ■ = valores de la d.o. que superan el doble del valor de la d.o. del TN

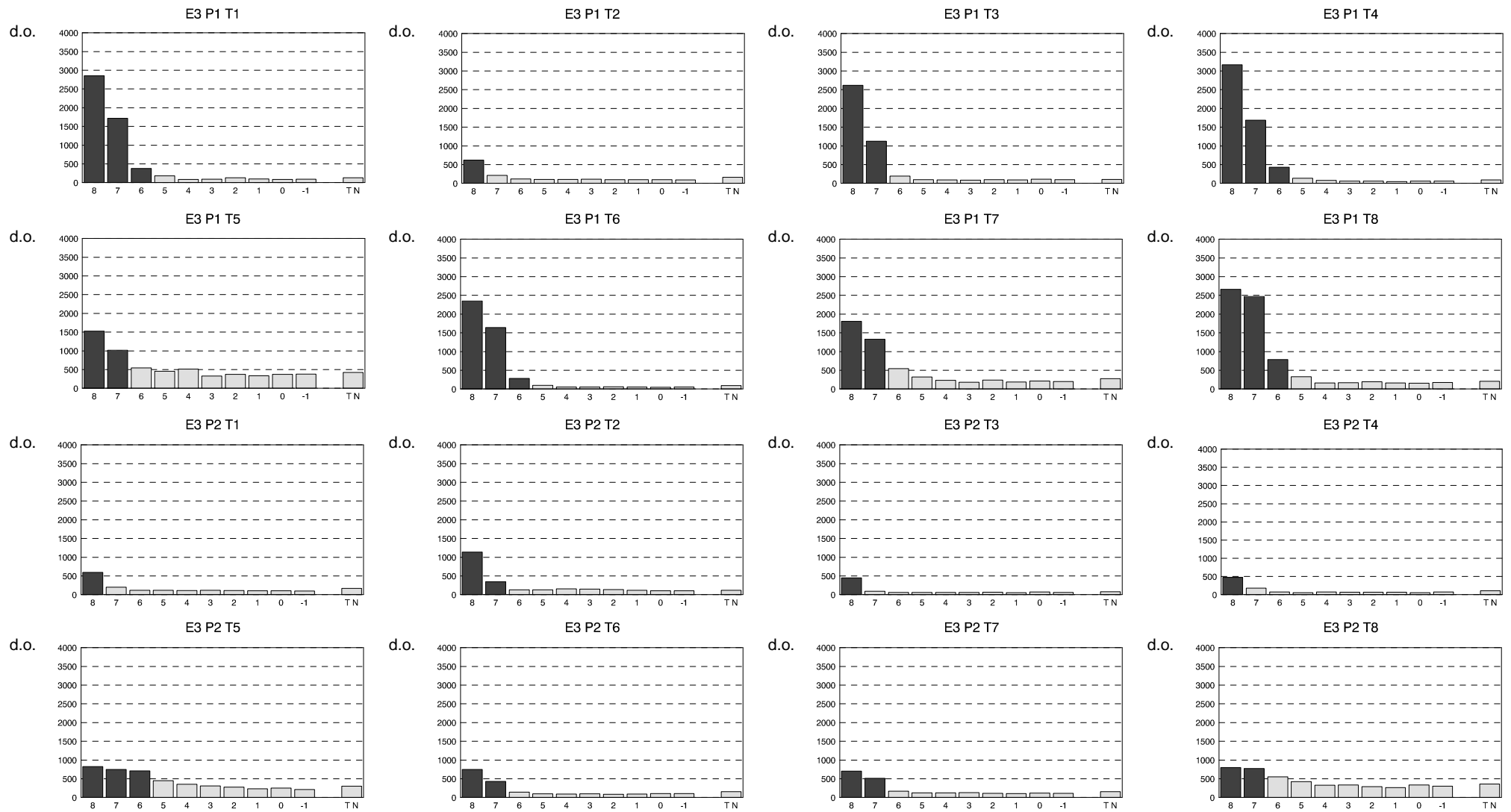
Figura 1.3.- Densidad óptica media ($\times 1.000$) en la técnica ELISA indirecto b/sa, según tratamientos (lectura obtenida a los 75 minutos de incubación).



E2 = ELISA indirecto b/sa
 P1 = material vegetal macerado
 P2 = material vegetal homogeneizado
 T1 - T8 = diferentes tampones de extracción

8....-1 = suspensiones decimales consecutivas de *X. ampelinus* (10^8 ufc/ml ... 10^{-1} ufc/ml)
 TN = testigo negativo, suspensión 10^8 ufc/ml de *E. carotovora* sbsp. *atroseptica*
 d.o. = densidad óptica (405 nm)
 ■ = valores de la d.o. que superan el doble del valor de la d.o. del TN

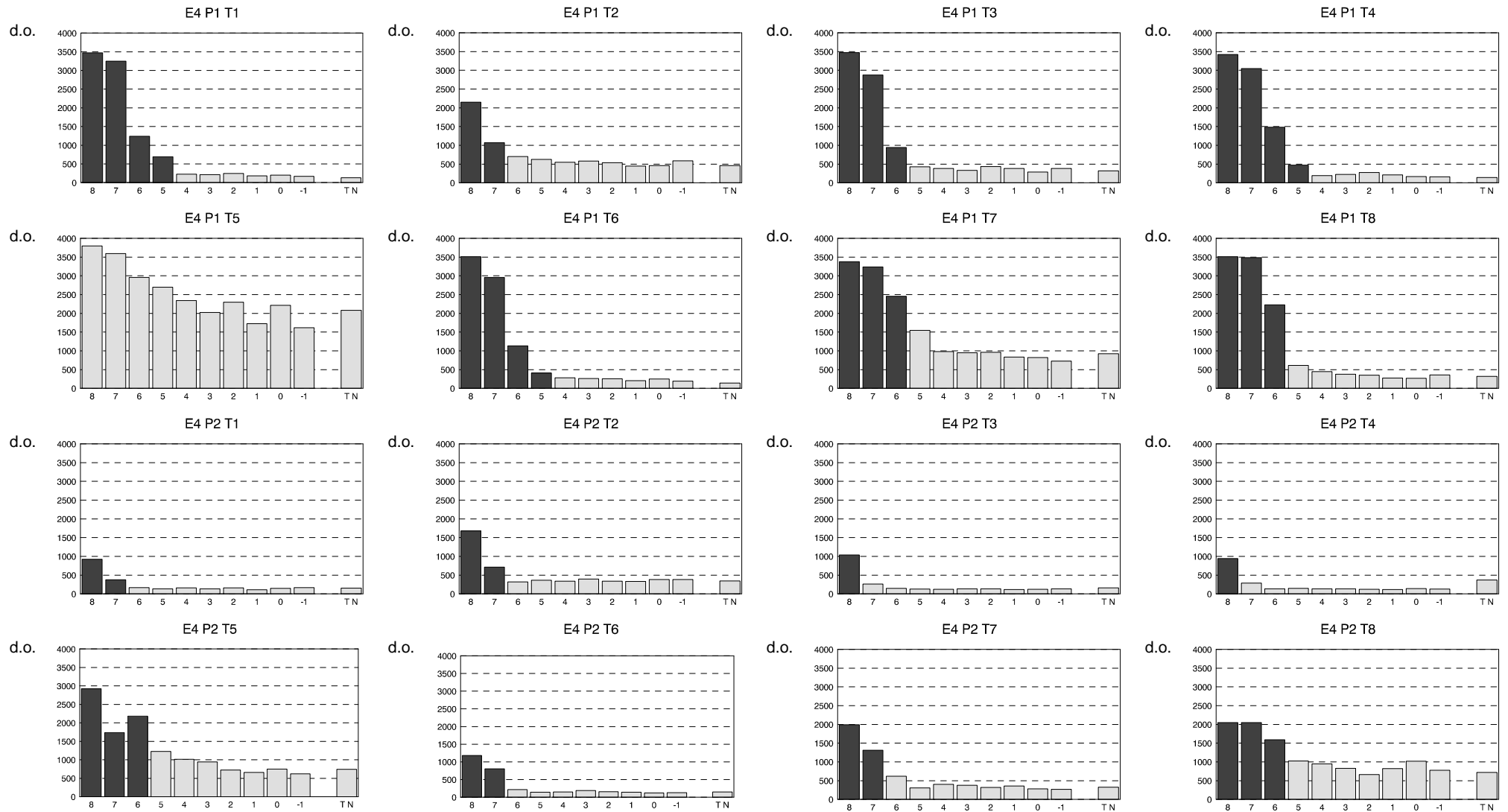
Figura 1.4.- Densidad óptica media ($\times 1.000$) en la técnica ELISA-DASI convencional, según tratamientos (lectura obtenida a los 75 minutos de incubación).



E3 = ELISA-DASI convencional
 P1 = material vegetal macerado
 P2 = material vegetal homogeneizado
 T1 - T8 = diferentes tampones de extracción

8....-1 = suspensiones decimales consecutivas de *X. ampelinus* (10^8 ufc/ml ... 10^{-1} ufc/ml)
 TN = testigo negativo, suspensión 10^8 ufc/ml de *E. carotovora* sbsp. *atroseptica*
 d.o. = densidad óptica (405 nm)
 ■ = valores de la d.o. que superan el doble del valor de la d.o. del TN

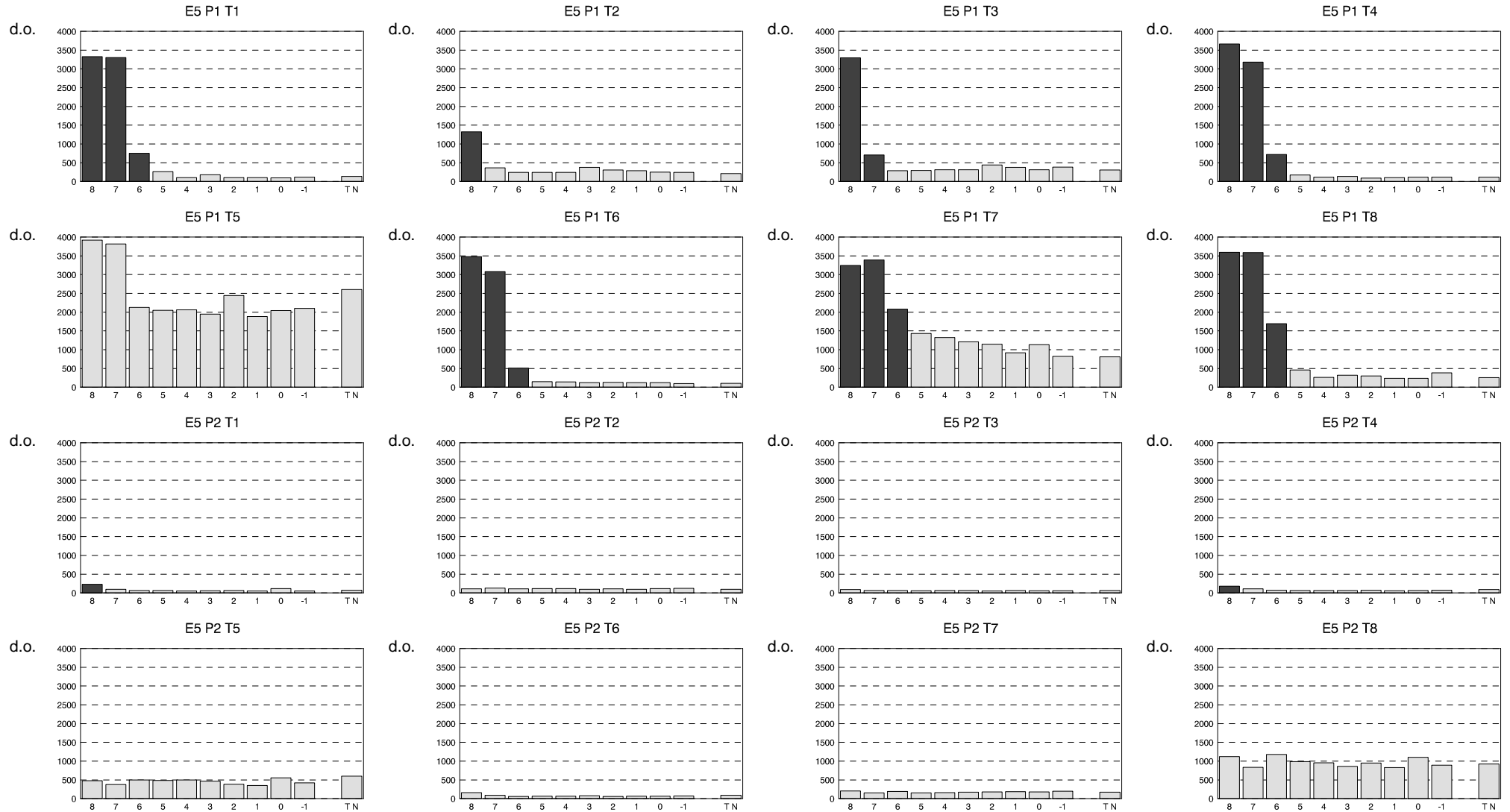
Figura 1.5.- Densidad óptica media ($\times 1.000$) en la técnica ELISA-DASI-b/sa, según tratamientos (lectura obtenida a los 75 minutos de incubación).



E4 = ELISA-DASI-b/sa
 P1 = material vegetal macerado
 P2 = material vegetal homogeneizado
 T1 - T8 = diferentes tampones de extracción

8....-1 = suspensiones decimales consecutivas de *X. ampelinus* (10^8 ufc/ml ... 10^{-1} ufc/ml)
 TN = testigo negativo, suspensión 10^8 ufc/ml de *E. carotovora* sbsp. *atroseptica*
 d.o. = densidad óptica (405 nm)
 ■ = valores de la d.o. que superan el doble del valor de la d.o. del TN

Figura 1.6.- Densidad óptica media ($\times 1.000$) en la técnica ELISA-DAS-b/sa, según tratamientos (lectura obtenida a los 75 minutos de incubación).



E5 = ELISA-DAS-b/sa
 P1 = material vegetal macerado
 P2 = material vegetal homogeneizado
 T1 - T8 = diferentes tampones de extracción

8....-1 = suspensiones decimales consecutivas de *X. ampelinus* (10^8 ufc/ml ... 10^{-1} ufc/ml)
 TN = testigo negativo, suspensión 10^8 ufc/ml de *E. carotovora* sbsp. *atroseptica*
 d.o. = densidad óptica (405 nm)
 ■ = valores de la d.o. que superan el doble del valor de la d.o. del TN

combinación ELISA (E), preparación del material vegetal (P) y tampón de extracción (T), comparados junto con el valor del testigo negativo correspondiente. En cada diagrama se han oscurecido aquellas barras que representan a las suspensiones de *X. ampelinus*, cuyos valores de d.o. superan el doble del valor de la d.o. obtenida con el testigo negativo.

Se observó una gran dispersión de los valores de la d.o. obtenida. Como es habitual en los resultados obtenidos mediante la técnica ELISA, se dió una lógica variabilidad de los resultados, ya que había suspensiones con concentraciones elevadas de *X. ampelinus* y otras con una concentración inferior al límite de detección de las técnicas. También hubo combinaciones de ELISA-preparación de material vegetal-tampón (E-P-T) con las que no se llegó a detectar la bacteria en ninguna de las suspensiones, alcanzando todas ellas, incluido el testigo negativo, valores similares entre sí.

En la tabla 1.2 se contabilizó el número de resultados positivos obtenidos con las diferentes técnicas ELISA, según el tipo de preparación del material vegetal utilizado, lo que da idea de la sensibilidad de la detección mediante cada una de las estudiadas. Con la maceración (P1) de trozos de sarmiento en tampón, se obtuvo en todas las técnicas ELISA, mayor número de resultados positivos (74) que con la homogeneización (P2) de los trozos de sarmiento (41). Con la técnica ELISA-DASI-b/sa (E4) se obtuvo el mayor número de positivos (39), tanto utilizando la maceración (23), como la trituración (16). Por el contrario, los tipos de ELISA-Indirecto (E1 y E2) fueron los peores (14 y nueve positivos, respectivamente). Con las dos técnicas en las que se utilizó el sistema de amplificación de la reacción, el sistema biotina-avidina, ELISA-I-b/sa y ELISA-DASI-b/sa (E2 y E4) se obtuvo mayor número de resultados positivos (14 y 39) que con los métodos convencionales correspondientes ELISA-I y ELISA-DASI (E1 y E3), ya que totalizaron nueve y 33 positivos, respectivamente. El método ELISA-DAS-b/sa (E5) alcanzó valores intermedios (20 positivos). En este método existieron claras diferencias entre los resultados obtenidos con el material macerado (18 positivos) y triturado (dos). La combinación ELISA-DAS-b/sa (E5) con material vegetal triturado (P2) es con la que se obtuvo el menor número de resultados positivos de todas las ensayadas.

Tabla 1.2.- Número de resultados positivos obtenidos con diferentes técnicas ELISA, utilizando 10 suspensiones decimales de *X. ampelinus* (10^8 a 10^{-1} ufc/ml) en ocho tampones diferentes según dos tipos de preparación del material vegetal (maceración y trituración).

Técnica	Material vegetal		Total
	Macerado	Triturado	
ELISA-I	6	3	9
ELISA-I-b/sa	8	6	14
ELISA-DASI	19	14	33
ELISA-DASI-b/sa	23	16	39
ELISA-DAS-b/sa	18	2	20
Total	74	41	115

En las tablas 1.3 y 1.4 se recogen los resultados positivos obtenidos con las técnicas ELISA ensayadas cuando se utilizó material vegetal macerado y triturado, respectivamente, según los diferentes tampones de extracción comparados. Estos resultados positivos se correspondían con las suspensiones decimales de *X. ampelinus* y, por tanto, indicaban la sensibilidad en la detección de *X. ampelinus* de las combinaciones ELISA-preparación y tampón de extracción comparadas. Tres combinaciones, de la técnica ELISA-DASI-b/sa con la maceración, las correspondientes a los tampones T1, T4 y T6 (tabla 1.3) llegaron a reconocer hasta cuatro suspensiones de *X. ampelinus*, es decir, detectaron 10^8 , 10^7 , 10^6 y 10^5 ufc/ml, siendo las únicas de todas las ensayadas que detectaron esa concentración. Hubo 15 combinaciones que sólo detectaron las concentraciones de 10^8 , 10^7 y 10^6 ufc/ml, 19 detectaron hasta 10^7 ufc/ml, 20 sólo 10^8 ufc/ml y 23 no detectaron ninguna suspensión de *X. ampelinus*. Observando en el número de resultados positivos obtenido con cada tampón independientemente de las técnicas ELISA, el T4, con 14 positivos (tabla 1.3), y el T1, T6 y T8, con 13 positivos, fueron los que proporcionaron mayor número de resultados positivos. Estos tres tampones contenían PVP + nicotina o Tris + mercaptoetanol.

Con el material vegetal macerado, el T5 (TC + DIECA) se comportó como el peor de los ensayados, con sólo dos suspensiones detectadas como positivas entre todas las técnicas ELISA (tabla 1.3). De igual forma, el T3 (AFT + mercaptoetanol) (tabla 1.4) fue el que peor se comportó con material vegetal triturado. En los dos casos, en la mayoría de las técnicas ELISA no logró detectar como positivas a ninguna de las suspensiones de *X. ampelinus* ensayadas.

Tabla 1.3.- Número de suspensiones de *X. ampelinus* con material vegetal macerado, que fueron detectadas por cada método ELISA, según el tampón de extracción utilizado (T1-T8).

Técnica ELISA	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	Total
E-Indirecto	1	0	0	2	0	1	0	2	6
E-Indirecto-b/sa	2	0	0	2	0	2	0	2	8
E-DASI	3	1	2	3	2	3	2	3	19
E-DASI-b/sa	4	2	3	4	0	4	3	3	23
E-DAS-b/sa	3	1	2	3	0	3	3	3	18
Total	13	4	7	14	2	13	8	13	

T1: AFT+PVP+nicotina
T2: AFT+DIECA
T3: AFT+mercaptoetanol

T4: TC+PVP+nicotina
T5: TC+DIECA

T6: Tris+PVP+nicotina
T7: Tris+DIECA
T8: Tris+mercaptoetanol

Tabla 1.4.- Número de suspensiones de *X. ampelinus* con material vegetal triturado, que fueron detectadas por cinco métodos ELISA diferentes, según el tampón de extracción utilizado (T1-T8).

Técnica ELISA	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	Total
E-Indirecto	1	0	0	0	1	0	1	0	3
E-Indirecto-b/sa	1	0	1	1	1	1	1	0	6
E-DASI	1	2	1	1	3	2	2	2	14
E-DASI-b/sa	2	2	1	1	3	2	2	3	16
E-DAS-b/sa	1	0	0	1	0	0	0	0	2
Total	6	4	3	4	8	5	6	5	

T1: AFT+PVP+nicotina
T2: AFT+DIECA
T3: AFT+mercaptoetanol

T4: TC+PVP+nicotina
T5: TC+DIECA

T6: Tris+PVP+nicotina
T7: Tris+DIECA
T8: Tris+mercaptoetanol

En el análisis de varianza se obtuvo que todos los efectos estudiados y sus interacciones fueron significativas, debido al elevadísimo número de grados de libertad del error. La preparación del material vegetal mediante maceración (P1) alcanzó una media ($325'84 \pm 859'95$) superior a la trituración (P2) ($53'50 \pm 294'42$). En la tabla 1.5, figuran los valores medios de la variable estudiada (d.o.c.1) para las diferentes variantes ELISA (E_i), cuando se utilizan los datos sin considerar el tipo de preparación del material vegetal (P1 +

P2) y cuando tan sólo se tuvieron en cuenta las medias obtenidas al utilizar el material vegetal macerado (P1).

Tabla 1.5.- Medias y error estándar residual (ESR) de cinco variantes ELISA, independientemente del tipo de preparación del material vegetal o con el material vegetal macerado.

Variantes ELISA	Media de d.o.c.1	
	Material vegetal macerado (P1)	Material vegetal macerado y triturado (P1+P2)
E-Indirecto	11'05 d	0'12 c
E-Indirecto-b/sa	86'29 d	54'25 c
E-DASI	324'70 c	191'40 b
E-DASI-b/sa	681'00 a*	444'87 a*
E-DAS-b/sa	526'16 b	257'72 b
ESR	813'49	662'94

d.o.c.1 = densidad óptica de cálculo 1 = d.o. - d.o. del testigo negativo.

* Las medias de la columna con diferente letra difirieron significativamente (P=0'05), según el método de Duncan.

Las comparaciones de medias efectuadas por el método de Duncan (tabla 1.5) permitieron diferenciar las variantes ELISA ensayadas en tres o cuatro grupos o niveles de significación diferentes, según se comparen las medias de todos los valores obtenidos con cada técnica ELISA o tan sólo los valores obtenidos en cada técnica con el materia vegetal macerado, respectivamente. En ambos casos ELISA-DASI-b/sa fue la técnica con media más alta y significativamente diferente a las demás. ELISA-I y ELISA-I-b/sa fueron las peores, sin que existieran diferencias significativas entre ellas. La comparación efectuada exclusivamente con los datos obtenidos con el método de maceración (P1), permitieron diferenciar a ELISA-DAS-b/sa de ELISA-DASI. La interacción ELISA-preparación del material vegetal (EP_{ij}) fue significativa, siendo siempre superior la media ELISA-maceración (EP_{i1}) que la de ELISA-trituración (EP_{i2}).

Los resultados de las comparaciones de medias realizadas por el método Duncan, para el estudio del comportamiento de los diferentes tampones de extracción, se exponen en la tabla 1.6.

Tabla 1.6.- Medias de las densidades ópticas calculadas (d.o.c.1 y 2) y error estándar residual (ESR) a partir de los valores de la densidad óptica (d.o.) (x 1.000) alcanzada con ocho tampones de extracción a diferentes niveles dentro de las combinaciones ELISA-preparación del material vegetal.

Tampón de extracción	d.o.c. 1= d.o. - d.o.n.			d.o.c. 2 =
	E _i P _j	E _i P1	E4 P1	d.o. - 2 d.o.n.
T1	231'77 b	434'60 b	855'00 a	721'50 a
T2	81'37 d	98'03 e	311'50 d	-147'25 d
T3	147'67 c	272'25 d	672'48 b	352'73 c
T4	215'83 b	461'88 b	825'00 a	685'25 a
T5	83'10 d	66'89 e	443'73 c	-1.639'03 f
T6	221'79 b	408'11 b	804'30 a	662'05 a
T7	212'42 b	342'17 c	662'80 b	-263'70 e
T8	323'43 a	522'82 a	873'20 a	555'70 b
ESR	323'72	286'27	202'06	202'06

Las medias de la columna con diferente letra difirieron significativamente (P=0'05), según método de Duncan.

E_iP_j: Combinación de cinco tipos de ELISA con dos preparaciones de material vegetal.

E_iP1: Combinación de cinco tipos de ELISA con material vegetal macerado.

E4P1: Combinación de la técnica ELISA-DASI-b/sa con material vegetal macerado.

T1: AFT+PVP+nicotina

T4: TC+PVP+nicotina

T6: Tris+PVP+nicotina

T2: AFT+DIECA

T5: TC+DIECA

T7: Tris+DIECA

T3: AFT+mercaptoetanol

T8: Tris+mercaptoetanol

Cuando se utilizaron las d.o.c. 1 de E_i P_j y E_i P1, el tampón T8 proporcionó una media de la variable d.o.c. significativamente superior a la de los demás tampones, seguido de T1, T4, T6, T7 y de T1, T4, T6, respectivamente, no existiendo diferencias significativas en cada caso entre ellos. Al analizar la media de la combinación E4 P1, no existieron diferencias significativas entre las medias de la d.o.c. de T8, T1, T4 y T6. Sólo al utilizar la variable d.o.c.2 los tampones T1, T4 y T6 se revelaron como capaces de proporcionar una media significativamente superior a T8. En general, los tampones T2 y T5 alcanzaron valores de la media más bajos.

En la tabla 1.7 se exponen los resultados obtenidos en los contrastes efectuados entre las suspensiones decimales de *X. ampelinus* analizadas mediante la técnica ELISA-DASI-b/sa, utilizando material vegetal macerado (P1), independientemente de los tampones de extracción (T_k) y con las suspensiones realizadas en cada uno de los ocho tampones ensayados. Cuando no se tuvo en cuenta el tampón (T_k), las cuatro primeras suspensiones de la bacteria 10^8 , 10^7 , 10^6 y 10^5 ufc/ml fueron significativamente diferentes entre sí. A partir de 10^4 ufc/ml no se obtuvieron diferencias significativas con la siguiente suspensión decimal. También las suspensiones 10^4 y 10^5 fueron significativamente diferentes con T1, T4 y T7. Con los tampones T3, T6 y T8 las diferencias se situaron entre 10^5 y 10^6 . Con T2 sólo existieron diferencias entre 10^8 y 10^7 y con T5 no hubo diferencias entre dos suspensiones consecutivas.

Tabla 1.7.- Contraste entre dos suspensiones decimales consecutivas de *X. ampelinus* con la técnica ELISA-DASI-b/sa y con el material vegetal macerado, utilizando la variable d.o.c.2 (d.o.-2 x d.o.n.). Valores de la probabilidad del nivel de significación.

Suspensión	T_k	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
10^8-10^7 ufc/ml	0'0001	0'0547	0'0001	0'0001	0'0001	0'4721	0'0001	0'3102	0'8263
10^7-10^6 ufc/ml	0'0001	0'0001	0'0445	0'0001	0'0001	0'0294	0'0001	0'0001	0'0001
10^6-10^5 ufc/ml	0'0001	0'0001	0'6673	0'0001	0'0001	0'3491	0'0001	0'0001	0'0001
10^5-10^4 ufc/ml	0'0001	0'0002	0'6703	0'5924	0'0001	0'2074	0'0932	0'0003	0'2371
10^4-10^3 ufc/ml	0'2688	0'8834	0'8695	0'5080	0'5951	0'2533	0'8215	0'7924	0'6300
10^3-10^2 ufc/ml	0'3253	0'7711	0'7978	0'1993	0'4117	0'3202	0'9400	0'9253	0'8503
10^2-10^1 ufc/ml	0'0072	0'5816	0'6100	0'5305	0'2826	0'0465	0'4940	0'3631	0'5724
10^1-10^0 ufc/ml	0'3037	0'8743	0'9289	0'2124	0'5210	0'0857	0'5293	0'9382	0'9609
10^0-10^{-1} ufc/ml	0'2325	0'7886	0'4730	0'2309	0'8591	0'0376	0'4164	0'5073	0'5140

T1: AFT+PVP+nicotina
T2: AFT+DIECA
T3: AFT+mercaptoetanol

T4: TC+PVP+nicotina
T5: TC+DIECA
T6: Tris+PVP+nicotina

T7: Tris+DIECA
T8: Tris+mercaptoetanol
 T_k : Todos los tampones

1.4. DISCUSIÓN

Aunque las primeras aplicaciones de la técnica ELISA en la detección de bacterias fitopatógenas datan de finales de los setenta (Cambra y López, 1978; Vrugging, 1978; Weaver y Guthrie, 1978; Cother y Vrugging, 1979; Stevens y Tsiantos, 1979), no existe información sobre ensayos comparativos que permitan evaluar la eficiencia de distintos tipos de ELISA, tampones de extracción y preparaciones de extractos vegetales. Todos estos factores deben ser optimizados en cada modelo para aumentar la sensibilidad de la detección.

La mayoría de los autores coinciden en señalar que los distintos tipos de ELISA presentan una relativamente baja sensibilidad en la detección de bacterias fitopatógenas, muy inferior a la observada en el caso de la detección de virus de plantas (Clark y Adams, 1977). Ello puede estar en relación con el mayor tamaño de las células bacterianas y su mayor dificultad para fijarse al soporte de las placas ELISA (López *et al.*, 1987a).

Los resultados obtenidos en este capítulo sirven de base para determinar los métodos serológicos de interés para la detección de *X. ampelinus* en el material vegetal.

En nuestro caso, la técnica ELISA-DASI-b/sa (E4) fue la mejor de todas las ensayadas, tanto por el número total de resultados positivos obtenidos como por las superiores densidades ópticas obtenidas, estadísticamente analizadas. Probablemente, esto es debido a la suma de una serie de efectos favorables, como son la habilidad de las inmunoglobulinas policlonales usadas para fijar el antígeno, la amplificación de la reacción final lograda con el sistema antiespecie conjugado con biotina y la adición final y también amplificadora de estreptoavidina conjugada con fosfatasa alcalina. El buen comportamiento de esta variante de ELISA había sido comprobado en la detección del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) (Cambra *et al.*, 1991a).

Las técnicas ELISA indirectas (E1 y E2) fueron las que peores resultados obtuvieron. Se ensayaron, por su mayor facilidad de realización, pero, en ambos casos, *X. ampelinus* tuvo que competir con restos vegetales, otras proteínas de origen vegetal, otras bacterias, etc., para fijarse en la pared del pocillo de una placa ELISA. En este sentido, las técnicas basadas en la

fijación del antígeno mediante anticuerpos supusieron una modificación ventajosa (Clark y Adams, 1977), ya que realizan una primera selección que mejora los resultados.

ELISA-indirecto fue aplicado a la detección de bacterias fitopatógenas por Afanador y Victoria (1981), Civerolo y Helkie (1981) e Yven *et al.* (1987), que la aplicaron sólo a cultivos puros de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* y de *X. campestris* pv. *campestris*. Lin *et al.* (1987) la usaron para la detección de *Erwinia amylovora* y, en general, es el método más rápido y simple para la identificación de cultivos, pero presenta problemas en su aplicación a la detección bacteriana en material vegetal, por la baja afinidad de las bacterias para fijarse a los pocillos de la placa ELISA y la competición de los antígenos a detectar con el material vegetal de la muestra.

Las diferencias entre las técnicas ELISA en las que se tapizó con anticuerpos monoclonales o policlonales no fueron importantes. El número total de resultados positivos obtenidos parece indicar que la habilidad de los anticuerpos policlonales, utilizados en las técnicas ELISA-DASI y ELISA-DASI-b/sa, para atrapar a *X. ampelinus* fuera superior a la mezcla de tres anticuerpos monoclonales ELISA-DAS-b/sa. Ello es lógico, por el carácter policlonal de las inmunoglobulinas de un antisuero.

La utilización de anticuerpos monoclonales para la detección de bacterias fitopatógenas data de finales de los ochenta (Lin *et al.*, 1987; Yven *et al.*, 1987; De Boer *et al.*, 1988; Bishop *et al.*, 1989; De Boer y McCann, 1989) y en los casos en los que se han obtenido anticuerpos monoclonales de buena especificidad han desplazado totalmente a los policlonales, debido a la práctica ausencia de reacciones cruzadas. Ello es especialmente importante cuando se utiliza la técnica ELISA en la que no es posible detectar los falsos positivos.

En nuestro caso, en ELISA-DASI y ELISA-DASI-b/sa, la especificidad de la reacción viene determinada por el anticuerpo monoclonal, y la utilización de policlonales para fijar la bacteria al soporte sólo contribuyó positivamente para aumentar el número de células o antígenos bacterianos fijados o inmovilizados.

La utilización del sistema de amplificación de la reacción supuso una mejora que se observó en los resultados de ELISA-DASI-b/sa con respecto a ELISA-DASI. También esto justificaría que la media de d.o.c.1 en ELISA-DAS-b/sa fuera superior a la de ELISA-DASI.

Lin *et al.* (1987) y Gorris *et al.* (1989) son las únicas citas bibliográficas encontradas que hacen referencia a la utilización del sistema biotina/estreptoavidina en la detección de bacterias fitopatógenas. También observaron un incremento de la sensibilidad de la técnica ELISA-indirecta en la detección de *Erwinia amylovora* y *X. ampelinus*, respectivamente.

El tipo de preparación de las muestras de vid, para su análisis serológico mediante ELISA, se reveló como un efecto muy influyente. Con la maceración (P1) se alcanzó una d.o.c.1 muy superior a la trituración (P2). También con todas las técnicas ELISA se obtuvieron mejores resultados al analizar los extractos macerados. Esta interacción ELISA-preparación se puso claramente en evidencia en la técnica ELISA-DAS-b/sa (E5), ya que, mientras E5-P1 fue una de las mejores combinaciones, E5-P2 fue la peor. La forma de preparación influyó en la composición química final de los extractos, lo que se puso de manifiesto por las diferencias de coloración entre los obtenidos con los dos métodos ensayados. Los extractos triturados fueron más oscuros que los macerados, ya que con la trituración se disgregan tejidos y células (fotos 1.1 y 1.2). Por lo tanto, se pueden liberar al medio mayor cantidad de compuestos fenólicos, produciéndose más oxidaciones, que sin duda pueden interferir en las reacciones de la técnica ELISA.

La trituración con un homogeneizador de vástago requiere también el troceado previo de la muestra, por lo que la maceración durante 16 h en tampón, aunque es un proceso que retrasa la obtención de los resultados, es más rápida y sencilla de preparar y reduce los riesgos de posibles contaminaciones que pudieran ocurrir en la trituración de varias muestras. En posteriores ensayos, en otros capítulos de la presente Memoria, se comprobará que la maceración de sarmientos de vid naturalmente infectados permite con eficiencia la salida al exterior de antígenos de *X. ampelinus*, reconocibles mediante las técnicas ELISA utilizadas.

Se dispone de escasa información sobre la aplicación de la técnica ELISA a la detección de bacterias fitopatógenas en material vegetal de vid. Se usó en la detección de *Xylella fastidiosa* (Nomé *et al.*, 1980), mediante extractos molidos de peciolo, brotes y

nerviaciones, sometidos a centrifugación, y para la de *Agrobacterium tumefaciens* en tumores, pero en este caso se sembraba previamente el extracto en un medio selectivo y se analizaban, mediante ELISA, las colonias obtenidas (Bishop *et al.*, 1989).

Los ocho tampones ensayados consistieron en la combinación de tres básicos: AFT, TC y Tris, a los que se les adicionaron tres tipos de antioxidantes: PVP + nicotina, DIECA o mercaptoetanol, que han sido utilizados por distintos autores en la detección mediante ELISA de virus o bacterias en material vegetal. Si se estudia la composición de los cuatro tampones más eficientes (T8, T1, T4 y T6), se observa que los tres tampones básicos proporcionaron similares resultados. La adición de PVP + nicotina a cualquiera de ellos proporcionó la combinación óptima (T1, T4, T6). Además, el tampón Tris dió excelentes resultados cuando se utilizó mercaptoetanol como antioxidante (T8). Esto induce a pensar que las diferencias entre ellos las marcaron más los antioxidantes que los tampones básicos, lo que es compatible con la hipótesis de que el factor limitante pudiera ser la riqueza en compuestos fenólicos, presentes en gran cantidad en los extractos de vid. En este sentido, PVP + nicotina fue el mejor de los antioxidantes, seguido de mercaptoetanol. Con la adición de DIECA se obtuvieron los peores resultados en conjunto, ya que con T2 y T5 se alcanzaron las medias más bajas y con T7 intermedias.

Con el tampón Tris + mercaptoetanol (T8) se obtuvo una d.o.c.1 significativamente más alta que con el resto de los tampones ensayados, cuando se compararon las medias globales y también las obtenidas con el material macerado (E_i -P1). Pero esto tiene un valor relativo, ya que lo que interesa es conocer qué tampón es el más adecuado para ser utilizado con la técnica ELISA-DASI-b/sa (E4) y con el tipo de preparación en maceración (P1). En definitiva, conocer cuál es la mejor combinación ELISA-preparación-tampón.

Con valores de la combinación ELISA-DASI-b/sa-maceración (E4-P1) no existen diferencias entre T8 y T1, T4 y T6 al comparar las medias de la d.o.c. 1, pero T8 alcanzó un valor medio de d.o.c.2 significativamente más bajo que T1, T4 y T6. Estos resultados indican que el testigo negativo, con el T8, alcanzó un valor algo más alto que con los otros tres tampones, rebajando la media hasta situarla en un nivel de significación inferior. Sin embargo, en otras experiencias a menor escala no incluidas en esta Memoria, se observó una buena eficiencia del T8, por lo que fue seleccionado para los capítulos posteriores.

Los contrastes efectuados entre dos suspensiones decimales consecutivas mostraron cómo, en ocasiones, no hubo diferencias significativas entre las dos primeras concentraciones estudiadas. Esto se explica porque a altas concentraciones de *X. ampelinus* (10^8 y 10^7 ufc/ml) hay saturación de antígenos. Conforme desciende la concentración de la bacteria, las diferencias son significativas hasta que éstas vuelven a desaparecer, ya que las concentraciones de antígenos se sitúan por debajo del límite de detección del método de análisis. Esta desaparición del grado de significación entre los contrastes efectuados con el método más eficiente ELISA-DASI-b/sa-maceración (E4P1) (tabla 1.7) coincidió con la primera suspensión de *X. ampelinus* no detectada (figura 1.5), lo que aporta seguridad para definir cuál es el límite de detección del método. Sólo hubo diferencias en tres métodos: E4 P1 T2 y E4 P1 T6, que detectaron 10^6 y 10^5 ufc/ml, respectivamente (figura 1.5), pero los contrastes efectuados (tabla 1.7) indicaron en esos casos que dichos valores están más próximos al negativo que al positivo; con el método E4 P1 T7 ocurre lo contrario, ya que el límite de detección se situaría entre 10^6 y 10^5 ufc/ml.

Los mejores métodos de análisis (combinaciones E-P-T) permitieron detectar con fiabilidad 10^5 ufc de *X. ampelinus* por ml de muestra final analizada. Ello sitúa la sensibilidad de la técnica ELISA en valores próximos a los más sensibles que describe la bibliografía (López *et al.*, 1987b) para la técnica IF realizada con antisueros en la detección de *X. ampelinus* (10^4 - 10^5 ufc/ml).

Otros autores, con otros tipos de ELISA, obtuvieron sensibilidades similares, como $5 \cdot 10^3$ células/ml de *Erwinia amylovora* (Lin *et al.*, 1987), 10^4 ufc/ml de *Agrobacterium tumefaciens* (Bishop *et al.*, 1989), entre 10^4 y 10^5 células/ml de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Civerolo y Fan, 1982), 10^5 células/ml de *Xylella fastidiosa* (Nomé *et al.*, 1980), $5 \cdot 10^5$ ufc/ml de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Afanador y Victoria, 1981), estimadas analizando suspensiones de cultivo puro de las bacterias, y entre 10^5 y 10^6 células/ml de *Pseudomonas phaseolicola* en hojas de judía (Barzic y Trigalet, 1982), 10^6 células/ml de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* en hojas de col (Álvarez y Lou, 1985) y 10^6 células/ml de *Corynebacterium sepedonicum* en tubérculos de patata (De Boer y McCann, 1989). Se observa que, en todos los casos, la mayor sensibilidad se sitúa en torno a 10^4 - 10^5 células/ml, y éste parece un límite difícilmente superable. Únicamente la introducción de una

etapa de enriquecimiento previo (Beguin *et al.*, 1984; Gorris *et al.*, 1994; Gorris *et al.*, 1996a) ha posibilitado elevar el límite de sensibilidad a 10^{-10^2} células/ml, debido a la multiplicación selectiva de *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* o de *E. amylovora*, antes de la detección mediante ELISA. En nuestro caso, al no disponerse de información sobre medios selectivos para el aislamiento de *X. ampelinus*, no se ha podido poner a punto la etapa de enriquecimiento previo que podría mejorar la sensibilidad de la detección, entre otras causas por tratarse de una bacteria de crecimiento muy lento.

1.5. CONCLUSIÓN

- Se ha puesto a punto un protocolo para la detección de *X. ampelinus*, utilizando anticuerpos monoclonales específicos mediante ELISA-DASI-biotina/estreptoavidina. El método permite detectar dicha bacteria con fiabilidad y con una sensibilidad de 10^5 ufc/ml de *X. ampelinus* en material vegetal macerado en los tampones AFT, TC ó Tris con 1% PVP-10 + 2'5% sulfato de nicotina.

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2.- COMPARACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL AISLAMIENTO Y DE DIFERENTES MÉTODOS DE DETECCIÓN SEROLÓGICA DE *Xylophilus ampelinus*, EN MATERIAL VEGETAL NATURALMENTE INFECTADO.

2.1. INTRODUCCIÓN

El diagnóstico o detección fiable de *X. ampelinus* en material vegetal objeto de multiplicación vegetativa, es indispensable para el control de la enfermedad y para evitar su diseminación a larga distancia. En el capítulo anterior se puso a punto una técnica inmunoenzimática de detección utilizando anticuerpos monoclonales, los cuales confieren al diagnóstico especificidad. No obstante, la técnica únicamente fue ensayada con muestras "artificialmente" infectadas, ya que al material vegetal sano se añadieron suspensiones de cultivos puros de la bacteria. Con ello se pretendió comparar la eficiencia de distintas técnicas ELISA para la detección sensible de *X. ampelinus*.

En este capítulo se trata de comparar los métodos de diagnóstico de *X. ampelinus* disponibles en la bibliografía, que son el aislamiento y la inmunofluorescencia indirecta (IF), con otros métodos puestos a punto en este trabajo, como la inmunopresión y ELISA, aplicándolos a la detección de la bacteria en material vegetal naturalmente infectado procedente de viñas enfermas. No se han aplicado técnicas de detección de ácidos nucleicos, como la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otras, ya que cuando se realizaron los ensayos descritos no había sido clonado ningún gen de *X. ampelinus* y actualmente no se dispone todavía de secuencias específicas publicadas.

Los métodos serológicos ofrecen muchas ventajas sobre otros métodos de diagnóstico rutinario en material vegetal, no sólo en virología vegetal (Cambra *et al.*, 1996) sino en bacteriología, ya que muchos de los inconvenientes de los métodos serológicos aplicados a bacterias fitopatógenas (López *et al.*, 1987b) han sido superados por la actual disponibilidad de anticuerpos monoclonales. Quedan todavía numerosos aspectos técnicos y metodológicos por resolver, especialmente cuando se aplican en un cultivo como la vid, rico en compuestos fenólicos (Ribéreau-Gayou, 1968) que interfieren en la realización de muchas técnicas de

detección y en años en los que no concurren las condiciones climáticas necesarias para el desarrollo de la enfermedad.

La inspección visual de síntomas y el aislamiento de la bacteria son los únicos métodos aconsejados hasta ahora para la detección de *X. ampelinus* (OEPP, 1990). El uso de técnicas serológicas habituales, como IF o ELISA, sólo estaba indicado para identificar cultivos puros de la bacteria, ya que dichos métodos no eran suficientemente sensibles para la detección de la bacteria, especialmente en vides asintomáticas, y ésta puede ser la causa de la dispersión de la enfermedad por distintas zonas de cultivo con material vegetal portador de infecciones latentes.

Este capítulo tiene dos objetivos fundamentales. El primero es validar, en condiciones de campo, el método ELISA puesto a punto con anticuerpos monoclonales en el capítulo anterior. El segundo objetivo es compararlo con los diferentes métodos convencionales y serológicos, con el fin de poder recomendar el más apropiado para una detección fiable en material vegetal infectado por *X. ampelinus*.

Los ensayos se han efectuado en diferentes periodos vegetativos de la vid, ya que interesa disponer tanto de métodos aplicables en plena vegetación como de aquéllos capaces de detectar la bacteria en parada vegetativa, cuando se comercializa el material vegetal.

2.2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.2.1. Material vegetal

Para cumplir el primer objetivo, es decir, para valorar la eficiencia del método ELISA-DASI-b/sa, puesto a punto en el capítulo 1, en la detección de *X. ampelinus* en material naturalmente infectado por la bacteria y para comprobar la utilidad del método ELISA en distintas épocas, se realizaron varios ensayos previos. Finalmente se describen los resultados obtenidos en el análisis de 80 sarmientos de la variedad Garnacha en otoño, 23 en invierno y 36 en verano. Todos ellos procedían de parcelas naturalmente infectadas por necrosis bacteriana, situadas en Tabuenca (Zaragoza). La toma de muestras en campo se realizó

eligiendo exclusivamente sarmientos que mostraban claros síntomas de necrosis bacteriana o, por el contrario, sarmientos totalmente asintomáticos.

Con el fin de comparar las distintas técnicas (aislamiento, ELISA, inmunofluorescencia e inmunopresión) en el diagnóstico rutinario de la necrosis bacteriana en vides enfermas (segundo objetivo de este capítulo), se realizaron numerosos ensayos previos con distintos tipos de material vegetal, para la puesta a punto de las distintas técnicas utilizadas, exponiéndose sólo los resultados finales obtenidos con 47 sarmientos de la variedad Garnacha recogidos en invierno y 66 en verano. Además, se recogieron en abril los lloros de 40 pulgares de vid de la variedad Garnacha. La toma de muestras en campo se realizó anotando en cada caso la presencia o ausencia de síntomas de necrosis bacteriana en los sarmientos elegidos. Se anotaron como positivos aquellos sarmientos que presentaban alguna sospecha de síntomas y como negativos los totalmente asintomáticos. En el caso de las cepas de las que se extrajeron los lloros fue necesario observar los síntomas en las cepas en invierno antes de la poda, realizando la misma anotación que con los sarmientos.

Un sarmiento muestra consistió en un trozo del mismo cortado desde su inserción al pulgar y de una longitud mínima de tres nudos. Cada sarmiento fue identificado y conservado a 4° C hasta el momento de su análisis (foto 2.1). Los lloros-muestra se obtuvieron directamente de los pulgares de poda, lo más asépticamente posible en condiciones de campo. Para ello, se realizó una limpieza superficial del pulgar con alcohol de 70°. Tras renovar el corte de poda, se acopló una goma de látex de paredes gruesas y diámetro apropiado al grosor del pulgar. El extremo libre de la goma se unió a una jeringa de 50 cc. Se estiró del émbolo para producir presión negativa y forzar el paso del lloro directamente del pulgar a la jeringa. En ocasiones, para obtener un volumen de lloro suficiente, fue necesario mantener la depresión, lo que se logró evitando el retorno del émbolo de la jeringa mediante un clavo que atravesaba la espiga del émbolo por su base (Cambra, 1993). Los lloros así obtenidos se introdujeron en recipientes estériles y se mantuvieron a 4° C hasta su análisis (fotos 2.2, 2.3, 2.4 y 2.5).

En todos los casos se utilizaron como controles negativos sarmientos de la variedad Cardinal, procedentes de plantas de Vall de Flors (Valencia), que habían sido previamente analizadas y resultaron libres de *X. ampelinus* y, además, estaban cultivadas en una zona en la que no ha sido descrita esta enfermedad.



2.1

Foto 2.1.- Tipo de sarmientos muestra.



2.2

Foto 2.2.- Aspecto de los lloros de vid utilizados como muestra.



2.3



2.5

Foto 2.3.- Material necesario para extraer lloros de vid.

Foto 2.4.- Extracción de lloros de un pulgar.

Foto 2.5.- Extracción de múltiples lloros en una viña.



2.4

2.2.2. Cepas bacterianas

Se utilizaron las mismas cepas bacterianas que las descritas en el capítulo anterior (apartado 1.2.1.). Las concentraciones bacterianas de *X. ampelinus* utilizadas como testigos fueron 10^8 ufc/ml en ELISA, 10^6 y 10^7 ufc/ml en IF y, como testigo negativo, la concentración 10^8 ufc/ml de *Erwinia carotovora* sbsp. *atroseptica*, todas ellas en AFT o en agua destilada estéril.

2.2.3. Métodos de análisis

2.2.3.1. Técnica ELISA-DASI-b/sa

Este método de análisis se ha descrito detalladamente en el apartado 1.2.4.4. del capítulo anterior. Para proceder a su análisis, la parte basal de los sarmientos-muestra fue troceada en rodajas de aproximadamente 1 mm de espesor, mediante tijeras de poda. Cuando el material vegetal mostraba síntomas, se eligieron las zonas afectadas de los tres primeros nudos, y únicamente del primer nudo en los sarmientos asintomáticos. Las tijeras de poda empleadas se desinfectaron flameando entre cada muestra.

Cuando se realizaron análisis por la técnica ELISA se utilizó un peso de material vegetal, que fue introducido en cinco volúmenes de tampón Tris 0'5M + 0'2% mercaptoetanol, macerándolo durante 16 horas en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, y antes de dispensar en las placas ELISA los extractos macerados, fueron tratados con calor al baño María durante diez minutos a 100° C, ya que en ensayos previos, no descritos en esta Memoria, se observó mayor eficiencia de la detección mediante ELISA cuando se realizó esta operación (Cambra *et al.*, 1990).

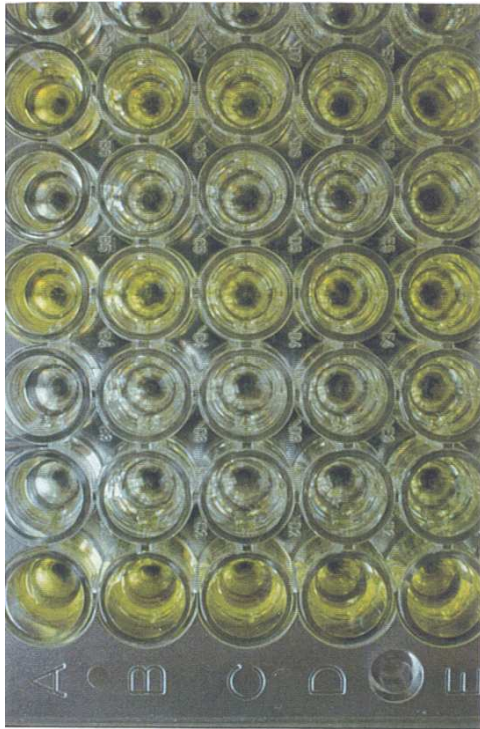
Los lloros de vid fueron dispensados directamente en las placas ELISA, sin recibir ningún tratamiento previo, ya que en ensayos preliminares no se mejoraron los resultados al someter los lloros a tratamiento de calor.

Se consideró positivo todo aquel resultado cuya densidad óptica, medida después de una hora de haberse dispensado el tampón sustrato, superó el doble de la densidad óptica media alcanzada con los testigos negativos (foto 2.6).

2.2.3.2. Inmunofluorescencia indirecta (IF)

La preparación del material vegetal para realizar análisis por IF se diferenció de la de los extractos obtenidos para su utilización en la técnica ELISA únicamente en que los trozos de sarmiento fueron macerados en agua destilada estéril, no habiendo sido sometidos a tratamiento con calor. La técnica IF empleada fue la descrita por De Boer (1990), con pequeñas modificaciones. Del material macerado en agua destilada o de los llores de vid obtenidos como se detalla en el apartado 2.2.1., se dispensaron 20 µl en dos pocillos de un portaobjetos para IF (Durviz-Real). Las muestras fueron secadas en una estufa a 40° C y se fijaron con metanol absoluto durante diez minutos hasta evaporación para fijar el antígeno. A continuación, se lavaron con AFT y se añadió la mezcla de anticuerpos monoclonales (Gorris *et al.*, 1989) en forma de líquido ascítico diluido 1/1.000 en AFT (1/3.000 5C y 1/30.000 7F y 8C) y se incubó durante 30 min a 37° C en cámara húmeda. Transcurrido este tiempo se lavó el portaobjetos con agua destilada. Se aplicaron 20 µl del inmunoglobulinas de cabra anti-ratón conjugadas con isocianato de fluoresceína (Boehringer Mannheim) a la dilución de uso en AFT y se incubaron durante 30 min a 37° C. Por último, se lavó el portaobjetos con AFT y se montó la preparación con una disolución de p-fenilendiamina², que reduce la pérdida de fluorescencia durante la observación. La lectura de los pocillos del portaobjetos se realizó en un microscopio equipado con iluminación de epifluorescencia (Leitz Dialux® 22). Se consideró que el resultado de IF era positivo cuando, tras observar 60 campos microscópicos de un pocillo de IF se contabilizaron más de 15 bacterias con morfología típica de *X. ampelinus* y negativo cuando no fue así (foto 2.7).

² Glicerol 9'0 ml; AFT 1 ml; p-fenilendiamina 10 mg.



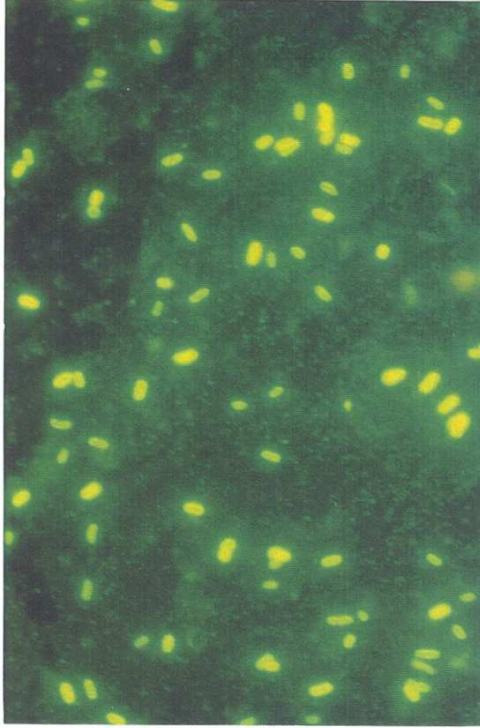
2.6

Foto 2.6.- Técnica ELISA-DASI b/sa: aspecto de pocillos con resultados positivos y negativos.



2.8

Foto 2.8.- Técnica de inmunopresión: huellas de muestras infectadas (2 partes superiores izquierda) y sanos (partes inferiores y superior derecha).



2.7

Foto 2.7.- Técnica de inmunofluorescencia: células fluorescentes de *X. ampelinus*.



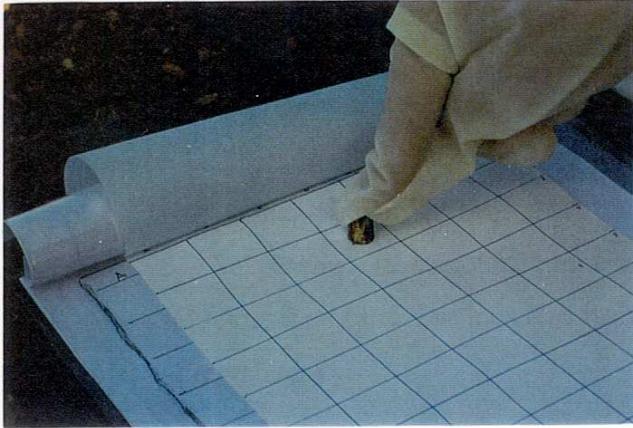
2.9

Foto 2.9.- Aislamiento en el medio LPGA: cultivo puro de *X. ampelinus* (17 días de crecimiento).

2.2.3.3. Inmunoimpresión indirecta ELISA (II)

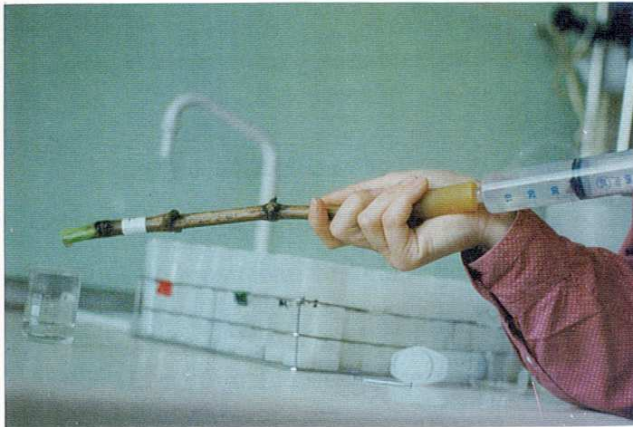
Se utilizó la técnica descrita originalmente por Lin *et al.* (1990), con las variaciones introducidas por Cambra *et al.* (1991b, 1992a y 1994), para el diagnóstico y localización de bacterias en cortes de tejido vegetales. Se emplearon membranas de nitrocelulosa de 0'45 μm (Millipore®). Para la preparación de la muestra (sarmientos) se realizaron cortes transversales limpios con tijera de podar y se presionaron las secciones contra la membrana firmemente durante unos segundos, hasta lograr una impresión o huella en la nitrocelulosa (foto 2.10). En algunos casos, fue necesario hidratar previamente el sarmiento con AFT. Para ello, se renovaron los cortes de los extremos del sarmiento muestra y se acopló en uno de los extremos una goma de látex de paredes gruesas, en la que se insertó una jeringa que contenía AFT. A continuación se presionó manualmente el émbolo para forzar el paso del AFT a través del sarmiento, hasta que se observó la salida de una gota de líquido por el extremo libre del sarmiento (foto 2.11) (Cambra, 1993), método similar al utilizado por Psallidas y Argyropoulou (1994) para realizar inoculaciones artificiales de *X. ampelinus* en sarmientos. Una vez así rehidratados, se refrescó de nuevo el corte y se procedió a realizar las impresiones. Las membranas impresas en campo o en laboratorio fueron conservadas a temperatura ambiente y lugar seco hasta su uso.

La segunda etapa consistió en el bloqueo con una solución de BSA al 1% en agua destilada durante una hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4° C. Se aplicó una ligera agitación. A continuación se añadió la mezcla de líquido ascítico de los anticuerpos monoclonales específicos de *X. ampelinus* 5C, 8C y 7F (Gorris *et al.*, 1989), diluidos 1/25.000 el primero y 1/50.000 los dos últimos en AFT. Se incubaron las membranas durante 1h 30 min a temperatura ambiente con ligera agitación. Se lavaron tres veces consecutivas en abundante tampón de lavado, durante cinco minutos, a temperatura ambiente y bajo fuerte agitación. A continuación, se añadieron inmunoglobulinas de cabra anti-ratón marcadas con biotina (Boehringer Mannheim) a la dilución de uso en AFT con 0'5% de BSA, y se incubaron 1 h 30 min a temperatura ambiente y bajo agitación suave. Tras este proceso, se lavaron las membranas como se ha descrito anteriormente y se añadió una solución 1/5.000 en AFT de estreptoavidina marcada con fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim), incubándose durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Se lavaron como en los pasos anteriores y, por último, las membranas fueron sumergidas en el tampón sustrato (Tris ClH 0'1M + ClNa 0'1M + Cl₂Mg 5 mM; pH 9'5) al que se le había añadido 0'33 mg de Nitro Blue Tetrazolium



2.10

Foto 2.10.- Impresión de muestras en membranas de nitrocelulosa.



2.11

Foto 2.11.- Método de hidratación de un sarmiento muestra.

Foto 2.12.- Revelado de una membrana con resultados positivos (zonas teñidas de oscuro) y negativos.



2.12



2.13

Foto 2.13.- Detalle de una huella positiva por inmunopresión.

(NBT) y 0'175 mg de Bromo Chloro-Indolyl Phosphate (BCIP) por cada mililitro de tampón sustrato. En algunos casos se utilizaron pastillas BCIP-NBT (SigmaFast), que fueron disueltas en agua destilada (1 pastilla/10 ml). Se incubaron a temperatura ambiente hasta la aparición de precipitados violeta-púrpura en las huellas impresas de los testigos positivos (fotos 2.8, 2.12 y 2.13). Se paralizó la reacción con agua corriente, dejando finalmente secar la membrana sobre papel de filtro. Las muestras fueron observadas bajo una lupa binocular Wild (10-20 x) y fotografiadas.

2.2.3.4. Aislamientos y caracterización bioquímica

Los aislamientos se realizaron de forma clásica. Se tomaron asépticamente porciones del interior de los sarmientos, situadas en la zona límite de los chancros o del primer nudo, si aquéllos no mostraban síntomas. Se dilaceraron en agua destilada estéril y, tras 40 minutos de maceración, se realizaron dos diluciones del extracto que fueron sembradas con un asa en medio de cultivo LPGA (véase apartado 1.2.1.). Los llores de vid y sus dos suspensiones decimales, realizadas en agua destilada estéril, se sembraron, a su llegada al laboratorio, lo más rápidamente posible, para evitar que la conservación pudiera favorecer el desarrollo de la flora bacteriana acompañante. Las placas sembradas se incubaron invertidas a 25° C. Se marcaron para descartar los crecimientos bacterianos obtenidos a las 48 h de la siembra. Se realizaron nuevas observaciones de las placas a los seis, ocho y 12 días de la siembra, escogiendo colonias pequeñas, lisas, con coloración amarilla para su caracterización bioquímica mediante la tinción Gram (negativa), oxidasa negativa, ureasa positiva en pocas horas y realizando IF de los cultivos purificados (foto 2.9).

2.3. RESULTADOS

Los resultados obtenidos mediante la técnica ELISA-DASI-b/sa utilizando la mezcla de anticuerpos monoclonales en el análisis de 139 sarmientos de vid infectados naturalmente por *X. ampelinus* y recolectados en tres épocas diferentes, se exponen en la tabla 2.1, comparándolos con los datos de la sintomatología observada en cada sarmiento.

Tabla 2.1.- Comparación entre sintomatología observada y resultados obtenidos mediante la técnica ELISA-DASI-b/sa en el análisis de 139 sarmientos de vid recolectados en tres épocas diferentes, de vides variedad Garnacha en Tabuena (Zaragoza).

	Otoño		Invierno		Verano		Total	
	ELISA +	ELISA -	ELISA +	ELISA -	ELISA +	ELISA -	ELISA +	ELISA -
Síntomas +	50	0	5	0	15	0	70	0
Síntomas -	7	23	13	5	4	17	24	45
Nº sarmientos	80		23		36		139	

Síntomas +/- : Presencia de claros síntomas de necrosis bacteriana / ausencia total de síntomas.
 ELISA +/- : Presencia / ausencia de reacción.

La técnica ELISA permitió detectar a *X. ampelinus* en todos los sarmientos analizados que tenían síntomas claros de necrosis bacteriana, independientemente de la época de su recolección. Además, de los 69 sarmientos analizados y que tenían aspecto sano, en 24 se detectó *X. ampelinus*, según los resultados obtenidos por la técnica ELISA. Esto significa que un 34'8% de los sarmientos sin síntomas analizados fueron encontrados positivos. El invierno fue la época en que se detectó *X. ampelinus* en más sarmientos asintomáticos.

Los resultados obtenidos con los aislamientos y con las distintas técnicas serológicas para el diagnóstico de la necrosis bacteriana en sarmientos naturalmente infectados, recolectados en invierno y verano, figuran en las tablas 2.2 y 2.3, respectivamente.

En invierno, de los 16 sarmientos en los que en un principio se habían observado síntomas sospechosos de necrosis bacteriana, tan sólo en siete de ellos se detectó la bacteria. Ello pudo ser debido a la confusión en los síntomas en años poco favorables para su expresión o a una baja concentración de *X. ampelinus* en esas muestras. Sin embargo, en cinco sarmientos asintomáticos se obtuvo algún resultado serológico positivo.

La dificultad para obtener impresiones en las membranas de nitrocelulosa a partir de vides en parada vegetativa hizo que sólo se analizaran mediante inmunopresión 18 sarmientos de los 47 recolectados en esta época. Los cinco resultados positivos obtenidos mediante inmunopresión correspondían a muestras con síntomas sospechosos y cuyo

diagnóstico también fue positivo utilizando otras técnicas serológicas. En tres de ellos fue posible aislar la bacteria.

De todos los aislamientos realizados a partir de las muestras recolectadas en invierno, sólo se detectó *X. ampelinus* en cuatro sarmientos.

Tabla 2.2.- Resultados del análisis con diferentes técnicas para la detección de *X. ampelinus* en 47 sarmientos de vid variedad Garnacha recolectados en invierno de vides enfermas en Tabuena (Zaragoza).

Nº muestras	Síntomas	ELISA	IF	II	Aislamiento
3	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	-
1	+	+	+	-	+
1	+	+	+	-	-
1	-	+	+	-	-
1	-	+	+	nd	-
3	-	+	-	nd	-
9	+	-	-	nd	-
10	-	-	-	-	-
16	-	-	-	nd	-
Nº total positivos	16	12	9	5	4

+/- : Presencia o ausencia de síntomas sospechosos, o de reacción, o de colonias tipo.

nd : No determinado.

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay, tipo DASI-b/sa.

IF : Inmunofluorescencia indirecta.

II : Inmunoimpresión indirecta ELISA-b/sa.

En verano (tabla 2.3), se recolectaron y analizaron 66 sarmientos. De los 29 con síntomas sospechosos de necrosis bacteriana se detectó en 16 la presencia de antígenos de *X. ampelinus* mediante la técnica ELISA-DASI. Por lo tanto, 13 sarmientos, en los que se habían apreciado síntomas sospechosos, fueron diagnosticados como sanos y las causas de esta discrepancia podrían ser similares a las antes comentadas. En cinco de los 38 sarmientos asintomáticos se obtuvo algún resultado serológico positivo.

En vides con savia, existieron también problemas para lograr buenas impresiones en membranas de nitrocelulosa, por lo que en ocasiones fue necesario inyectar AFT. Se analizaron 38 muestras mediante inmunopresión, obteniendo tres resultados positivos, todos ellos en sarmientos con síntomas y diagnosticados como enfermos utilizando las otras técnicas serológicas.

Tabla 2.3.- Resultados del análisis con diferentes técnicas para la detección de *X. ampelinus* en 66 sarmientos de vid variedad Garnacha recolectados en verano de vides enfermas en Tabuena (Zaragoza).

Nº muestras	Síntomas	ELISA	IF	II	Aislamiento
3	+	+	+	+	-
6	+	+	+	nd	-
1	+	+	+	-	-
1	+	+	-	-	-
1	+	+	-	nd	-
1	-	+	+	-	-
4	+	-	+	-	-
3	-	+	-	nd	-
13	+	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-
18	-	-	-	nd	-
Nº total positivos	29	16	15	3	0

+/- : Presencia o ausencia de síntomas sospechosos, o de reacción, o de colonias tipo.

nd : No determinado.

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay, tipo DASI-b/sa.

IF : Inmunofluorescencia indirecta.

II : Inmunopresión indirecta ELISA-b/sa.

Como era de esperar, no se logró aislar la bacteria en ninguna de las muestras recolectadas en esta época.

Los resultados obtenidos con distintas técnicas de análisis aplicadas a llores de vid se exponen en la tabla 2.4. Debido a las condiciones climáticas de Aragón, y especialmente en los años secos, las vides lloran muy irregularmente o incluso llega a producirse el desborre de las yemas sin llorar. Estas circunstancias de sequía y cambios bruscos de temperatura en la época de los llores han influido negativamente en la recolección de llores. No se han podido

obtener lloros de todas las cepas previstas en la planificación del experimento, a pesar de haberse realizado incluso un riego a las cepas escogidas para recolectar los lloros, trasladando un camión-cuba a la parcela objeto de la toma de muestras, y a pesar de haberse favorecido la salida de los lloros ejerciendo una depresión en el pulgar con una jeringa, como se describe en el apartado 2.2.1. En total, se obtuvieron lloros de 40 cepas: 14 de ellas con síntomas de necrosis bacteriana y 26 de ellas asintomáticas.

En ninguna de las muestras de lloros tomados de cepas o sarmientos asintomáticos se detectó la presencia de *X. ampelinus*, ya fuera mediante técnicas serológicas o mediante aislamiento. En cambio, de los 14 lloros de pulgares situados en brazos de cepas con síntomas de necrosis bacteriana antes de la poda, los análisis para detectar *X. ampelinus* concluyeron que en seis casos se detectó la presencia de antígenos de *X. ampelinus* mediante las técnicas ELISA-DASI e IF; en tres casos se detectó sólo por ELISA y en uno sólo por IF; sólo en un caso se detectó su presencia mediante todos los métodos, incluido el aislamiento. En tres muestras procedentes de cepas con síntomas no se detectó *X. ampelinus* ni sus antígenos.

ELISA-DASI fue la técnica que proporcionó más resultados positivos en el análisis de los lloros procedentes de cepas con síntomas (10/14), seguida de la inmunofluorescencia (8/14). El aislamiento a partir de lloros se mostró poco efectivo (1/14).

Tabla 2.4.- Resultados del análisis con diferentes técnicas para la detección de *X. ampelinus* en 40 lloros de vid variedad Garnacha de viñas enfermas en Tabuena (Zaragoza).

Nº muestras	Síntomas	ELISA	IF	Aislamiento
1	+	+	+	+
6	+	+	+	-
3	+	+	-	-
1	+	-	+	-
3	+	-	-	-
26	-	-	-	-
Nº total positivos	14	10	8	1

+/- : Presencia o ausencia de síntomas, o de reacción, o de colonias tipo.

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay, tipo DASI-b/sa.

IF : Inmunofluorescencia indirecta.

En la tabla 2.5 se resumen y contrastan los resultados obtenidos con las técnicas ELISA e IF, que fueron las que mejores resultados proporcionaron analizando sarmientos, recolectados en invierno y verano, y lloros de vid.

Tabla 2.5.- Comparación de resultados mediante la técnica ELISA-DASI e inmunofluorescencia indirecta (IF) en el análisis de muestras de vid variedad Garnacha en diferentes periodos vegetativos.

	Invierno		Verano		Lloros		Total	
	ELISA +	ELISA -	ELISA +	ELISA -	ELISA +	ELISA -	ELISA +	ELISA -
IF +	9	0	11	4	7	1	27	5
IF -	3	35	5	46	3	29	11	110
Nº total muestras	47		66		40		153	

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay, tipo DASI-b/sa.

IF : Inmunofluorescencia indirecta.

IF y ELISA +/- : Presencia / ausencia de reacción.

Con la técnica ELISA-DASI se ha obtenido el mayor número de resultados positivos: 38 de 153 análisis realizados (24'8%). Estos resultados son similares a los obtenidos con la técnica IF: 32 de 153 (20'9%). Además, entre ambas técnicas existe un alto porcentaje (89'5%) de resultados coincidentes. No obstante, el 7'2% de los resultados obtenidos fueron positivos mediante ELISA y negativos por IF. En la situación contraria, es decir, positivos por IF y negativos por ELISA se encontraban un 3'3% de las muestras analizadas.

En la tabla 2.6 se exponen los resultados obtenidos por ELISA-DASI en todos los análisis descritos en este capítulo, comparándolos con los síntomas observados. En el 78'4% de los 292 análisis coincidieron la apreciación de síntomas con los resultados ELISA. El número global de positivos visuales fue de 129 y mediante ELISA-DASI fue de 132. No obstante, en un 23'3% se apreciaron síntomas de necrosis bacteriana y el diagnóstico mediante ELISA fue negativo, mientras que en el 20'2% de los sarmientos asintomáticos se obtuvo resultado positivo por ELISA.

Tabla 2.6.- Comparación de resultados obtenidos mediante la técnica ELISA-DASI y la apreciación visual de síntomas en sarmientos de la variedad Garnacha.

	Experimento 1		Experimento 2		Total	
	ELISA +	ELISA -	ELISA +	ELISA -	ELISA +	ELISA -
Síntomas +	70	0	29	30	99	30
Síntomas -	24	45	9	85	33	130
Nº total sarmientos	139		153		292	

Síntomas + : Presencia de claros síntomas de necrosis bacteriana (experimento 1) o de síntomas sospechosos (experimento 2).

Síntomas - : Ausencia total de síntomas (experimentos 1 y 2).

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay, tipo DASI-b/sa.

ELISA +/- : Presencia/ausencia de reacción.

2.4. DISCUSIÓN

Las circunstancias climáticas acaecidas durante la realización de todos los análisis expuestos en este capítulo fueron poco favorecedoras para la expresión de los síntomas de la necrosis bacteriana de la vid. Los datos pluviométricos de la estación meteorológica de Cariñena (Zaragoza) se exponen en el capítulo 5 de esta Memoria y son representativos de la sequía soportada en Aragón, incluso a nivel nacional, durante la década 1985-1995.

Los resultados obtenidos mediante la técnica ELISA-DASI confirmaron las apreciaciones visuales en la mayoría de los análisis de plantas con síntomas claros de necrosis bacteriana. Los chancros longitudinales, oscuros, situados en la base de los sarmientos (tres primeros nudos) fueron los síntomas más característicos y específicos de la enfermedad, pero la manifestación de síntomas de la enfermedad no fue siempre clara. En vides enfermas situadas en zonas de cultivo de baja pluviometría, fue frecuente encontrar exclusivamente síntomas descritos como sospechosos de ser causados por *X. ampelinus*, como aborto de yemas, brotaciones débiles, chancros pequeños o necrosis, falta de lignificación del sarmiento, etc., confundibles e incluso enmascarados con los síntomas producidos por otras

enfermedades y accidentes climáticos como el granizo. No se dieron en primavera condiciones climáticas para que se desarrollara la fase foliar de la enfermedad. Ello favorece que la observación de síntomas esté sujeta a errores (OEPP, 1990) y explicaría el relativamente elevado porcentaje (23'3%) de sarmientos considerados con síntomas sospechosos en los que no fueron detectados antígenos de *X. ampelinus* por ELISA (tabla 2.6). Por lo tanto, resulta imprescindible el análisis en laboratorio para confirmar la presencia de la bacteria.

Mediante la técnica ELISA-DASI, el 34'8% de los sarmientos de aspecto sano recolectados en parcelas afectadas fueron diagnosticados como enfermos (tabla 2.1). Porcentajes elevados de infecciones en sarmientos sanos recolectados de vides enfermas se citan en la bibliografía, como el 28% en Francia (Ridé, 1985) y entre el 32 y el 50% en Grecia (Panagopoulos, 1987). Realizando esa misma comparación entre síntomas y resultados obtenidos con ELISA en el conjunto de los 292 análisis realizados en este capítulo, el porcentaje fue del 20'2% (tabla 2.6). Los resultados obtenidos mediante ELISA con sarmientos recolectados en viñas enfermas son coherentes con los obtenidos por otros autores (Fiori *et al.*, 1996) e indican que esta técnica es válida y utilizable con material vegetal en cualquier época del año, independientemente de su aspecto externo.

La técnica que presentó mayores problemas de realización práctica fue la inmunopresión. Un sarmiento de vid es un material vegetal leñoso que se agosta en otoño-invierno, lo que dificulta la obtención de impresiones en membranas de nitrocelulosa, necesarias en la realización de estos análisis. En invierno, con los sarmientos en parada vegetativa, fue necesario hidratar artificialmente los sarmientos. En verano, con los sarmientos ya lignificados, sólo se obtuvieron buenas impresiones en alguna ocasión, apoyando la sección del sarmiento en la membrana, inmediatamente después de realizar el corte para separarlo de la cepa. Esto complicó la realización de la técnica de inmunopresión y desvirtuó la detección de la bacteria en una determinada sección del sarmiento, que era uno de los objetivos a alcanzar con dicha técnica. Sin embargo, esta técnica pudiera ser útil con sarmientos en estado herbáceo, recogidos en el periodo entre la brotación y la lignificación de los mismos.

Mediante inmunopresión se obtuvo un número de detecciones de *X. ampelinus* más bajo que con las otras dos técnicas serológicas (ELISA e IF). Todos los sarmientos diagnosticados como enfermos mediante inmunopresión mostraban síntomas de necrosis bacteriana, y mediante las técnicas ELISA e IF también se habían detectado antígenos de la bacteria. Contrariamente, no todos los sarmientos diagnosticados como enfermos por ELISA e IF lo fueron por inmunopresión (tablas 2.2 y 2.3). Con las dificultades indicadas, esta técnica es utilizable durante todo el año, aunque se obtiene un nivel de detección inferior al obtenido con las otras dos técnicas serológicas. No obstante, por su rapidez, sencillez y posibilidad de uso en campo, puede ser utilizada para la confirmación rápida en casos de sintomatología dudosa o para la toma de muestras en membranas en campo y su posterior envío a laboratorio para su análisis.

Los resultados obtenidos confirman que el aislamiento es una técnica que sólo puede utilizarse en la detección de *X. ampelinus* durante una parte del año y únicamente tiene éxito en muestras con síntomas de la enfermedad, lo que limita bastante su utilidad. El nivel de detección fue similar al obtenido con inmunopresión.

La dificultad de aislamiento de *X. ampelinus* es achacable a que suele ir acompañada en los tejidos enfermos de otras bacterias de crecimiento más rápido, lo que impide su crecimiento, o éste queda enmascarado (Ridé *et al.*, 1983; López *et al.*, 1987b; Panagopoulos, 1987). No fue posible el aislamiento de *X. ampelinus* en verano, época en que la flora acompañante es abundante (foto 2.15). Sólo se tuvo éxito realizando aislamientos en sarmientos recolectados en invierno y en un caso a partir de lloros de vid (fotos 2.16, 2.17 y 2.18). Además, en todos estos casos, las muestras tenían síntomas de la enfermedad, habían sido diagnosticadas mediante las técnicas ELISA e IF como enfermas y, en su mayoría, también lo habían sido en los análisis mediante inmunopresión.

Los resultados obtenidos con las técnicas ELISA e IF fueron similares entre sí. Entre ambas técnicas existió un alto porcentaje de resultados coincidentes (89'5%) (tabla 2.5). Las diferencias observadas podrían achacarse a situaciones próximas al límite de detección de las técnicas, o explicarse por la mayor sensibilidad de una técnica con respecto a la otra, o bien por el hecho de que mediante diferentes técnicas se detecten diferentes tipos de antígenos. En efecto, mediante ELISA se detectan fundamentalmente antígenos solubles que no son



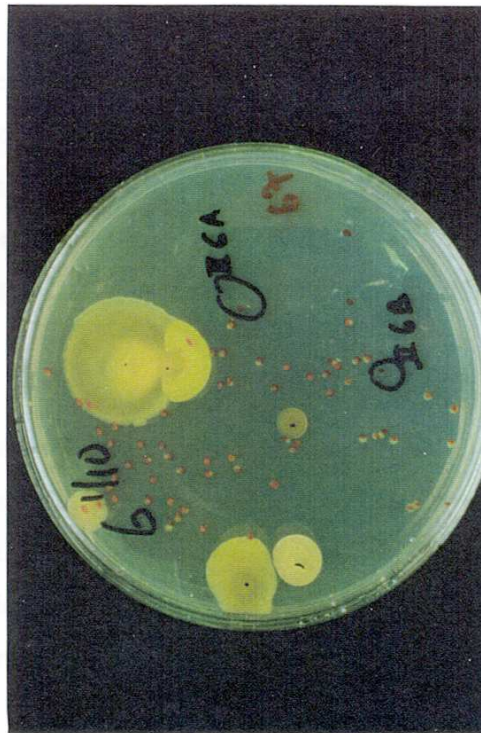
2.15

Foto 2.15.- Resultados típicos del aislamiento en LPGA de *X. ampelinus* realizado en verano.



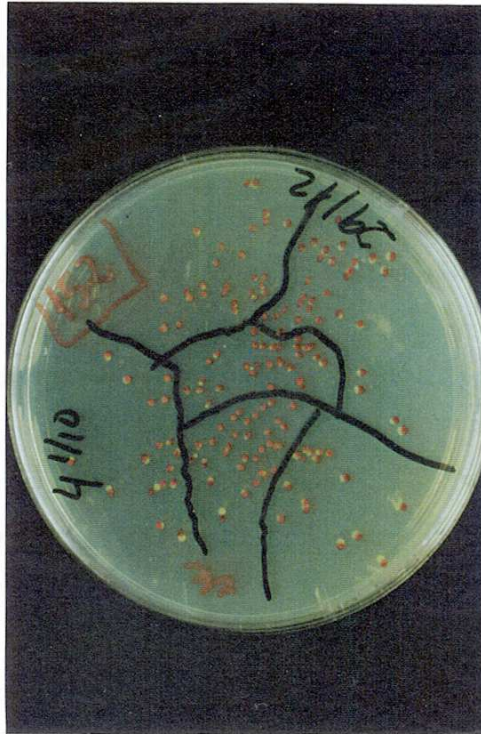
2.16

Foto 2.16.- Aislamiento de *X. ampelinus* en LPGA utilizando dos diluciones.



2.17

Foto 2.17.- Detalle de un aislamiento en LPGA con colonias de *X. ampelinus*; diferencias de crecimiento con bacterias de la flora saprofita.



2.18

Foto 2.18.- Placas de aislamiento en LPGA con crecimiento de *X. ampelinus* en cultivo puro.

detectados por IF y, al contrario, los antígenos somáticos son más fácilmente detectados mediante IF. En el capítulo anterior de esta Memoria, analizando muestras "artificialmente" infectadas, se obtuvo mediante la técnica ELISA una sensibilidad de 10^5 ufc/ml, ligeramente inferior a la sensibilidad alcanzada (10^4 - 10^5 ufc/ml) con la técnica IF utilizando antisueros en la detección de *X. ampelinus* (López *et al.*, 1987b).

En el capítulo anterior, también se puso de manifiesto la gran influencia que tienen los métodos de extracción utilizados con un vegetal tan rico en compuestos fenólicos, como es la vid. Con la maceración de trozos de sarmiento, se liberaron al tampón menores cantidades de esos compuestos no deseables y restos vegetales que cuando la extracción se realizó por homogeneización, obteniéndose mejores resultados con la técnica ELISA y menor fluorescencia secundaria en la técnica IF. Es posible que, a pesar de ello, la cantidad de compuestos fenólicos siga siendo importante y distorsione los resultados obtenidos, tanto con la técnica ELISA como con IF, lo que explicaría las diferencias observadas ya comentadas, que además podrían también justificarse ante el hecho de realizarse una lectura espectrofotométrica objetiva en el caso de la técnica ELISA y una lectura visual al microscopio, y por tanto subjetiva, en el caso de IF.

Sería, por tanto, necesario poner a punto un método que permitiera extraer la bacteria sin romper tejidos y células, con lo que los extractos tendrían un menor contenido en fenoles y en restos vegetales, y la detección mediante la técnica ELISA tendría mayor sensibilidad y proporcionaría, por lo tanto, resultados más fiables. Posiblemente, se reduciría también parte de la fluorescencia secundaria en la técnica IF. Además, un método no destructivo podría tener interés adicional.

Independientemente de estas discrepancias, con ambas técnicas serológicas se obtuvo mayor número de detecciones de *X. ampelinus* que con las otras técnicas ensayadas y, como se indicaba anteriormente, pueden utilizarse con material vegetal recolectado en cualquier época del año e independientemente de su aspecto externo, lo que abre nuevas posibilidades al control de la bacteria y a la selección sanitaria de la vid.

2.5. CONCLUSIONES

- La sintomatología de la necrosis bacteriana de la vid no siempre es clara. Se ha observado que el diagnóstico basado en la observación visual de síntomas puede estar sujeto a errores que podrían tener importantes repercusiones prácticas.
- El aislamiento de la bacteria ha resultado difícil, ya que prácticamente sólo se tiene éxito con sarmientos que presenten chancros característicos de la enfermedad, recolectados en invierno o con lloros de vid.
- La dificultad para obtener huellas de la sección de un sarmiento lignificado o agostado en una membrana de nitrocelulosa limita la realización de la técnica de inmunopresión. No obstante, puede ser una alternativa rápida para una confirmación de la etiología de síntomas dudosos.
- Las técnicas ELISA e IF utilizando anticuerpos monoclonales específicos de *X. ampelinus* han resultado válidas y fiables, en cualquier época del año, para el análisis de sarmientos de vid naturalmente infectados o lloros. Ello abre nuevas posibilidades al diagnóstico y detección de esta bacteria de cuarentena con fines de selección sanitaria o control del estado sanitario del material vegetal.

CAPÍTULO 3

CAPÍTULO 3.- PUESTA A PUNTO DEL LAVADO INTERNO DE SARMIENTOS PARA LA EXTRACCIÓN DE *Xylophilus ampelinus* Y SU DETECCIÓN MEDIANTE TÉCNICAS SEROLÓGICAS. COMPARACIÓN CON OTROS MÉTODOS.

3.1. INTRODUCCIÓN

En el capítulo 1, se compararon cinco métodos inmunoenzimáticos de detección de *X. ampelinus* y dos métodos de extracción de la muestra, concluyendo que con la técnica ELISA-DASI-b/sa y el método de extracción basado en la maceración de finas rodajas del sarmiento en tampón (Cambra *et al.*, 1992) se obtenían los mejores resultados. La maceración se mostró como un método de preparación del material vegetal muy superior al de la trituración para ser utilizado en los análisis ELISA. No obstante, en el capítulo 2 se encontraron diferencias entre los resultados de los análisis mediante IF y ELISA utilizando extractos de maceración en agua estéril y parte de estas diferencias también pueden ser achacadas a los compuestos fenólicos existentes en los extractos macerados de los sarmientos de vid.

Los sarmientos de vid tienen una estructura interna que permite el paso de líquidos si se ejerce presión en uno de sus extremos (Sperry *et al.*, 1987; Tyree y Ewers, 1991). El uso de bombas de vacío para forzar el paso de líquido a través de un vegetal había sido utilizado para el diagnóstico de *Xylella fastidiosa* en vid (Bazzi *et al.*, 1990; Scortichini, 1991), en melocotonero (French *et al.*, 1977) y en cítricos (Hopkins, 1988) y para el diagnóstico de *Agrobacterium tumefaciens* en vid (Bazzi *et al.*, 1987), aplicando para la detección técnicas microscópicas, espectrofotométricas, de aislamiento y serológicas. También había sido utilizado como método de inoculación artificial de *X. ampelinus* en material vegetal que iba a ser tratado con agua caliente (Psallidas y Argyropoulos, 1994). En el capítulo 2 se utilizó el vacío o presión ejercido por una jeringa de 50 cc para obtener lloros de vid directamente de los pulgares de la cepa y para hidratar el interior de los sarmientos, permitiendo así obtener huellas de secciones de sarmientos en membranas de nitrocelulosa. Los extractos así obtenidos fueron transparentes, lo que posiblemente indica un bajo contenido en los compuestos fenólicos. Por ello, se ha trabajado en la puesta a punto de un nuevo método de extracción de *X. ampelinus*, basado en el lavado interno del sarmiento, forzando el paso del tampón a través de los vasos del mismo. Ello permite obtener un extracto más limpio y transparente, que podría evitar la adición de antioxidantes y el tratamiento con calor y que

permitiría, por tanto, utilizar los mismos extractos para su análisis mediante las técnicas ELISA e IF.

En este capítulo se pretende comparar los resultados obtenidos mediante la técnica ELISA-DASI-b/sa, utilizando dicho método de extracción, denominado de lavado interno, y comparar los resultados obtenidos con el de la maceración, que fue el que mejores resultados proporcionó en los ensayos anteriores. Para ello se plantearon ensayos en dos épocas, invierno y verano, para delimitar la cantidad de tampón adecuada para lavar internamente las muestras de sarmientos de vid en reposo y en plena vegetación de la cepa.

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1. Material vegetal

Se recolectaron 48 sarmientos de la variedad Garnacha, 24 en parada vegetativa (E1), en enero, y 24 en plena vegetación de la vid (E2), en julio. Las características de los mismos se muestran en la tabla 3.1.

Durante el año de ejecución del experimento (1994) así como durante los años anteriores no se dieron las condiciones climáticas favorables para el desarrollo de síntomas de la necrosis bacteriana en Aragón, con unas pluviometrías primaverales y anuales sensiblemente más bajas que las medias históricas (tabla 3.2.). Este hecho obligó a considerar como con síntomas negativos exclusivamente aquellos sarmientos recolectados en cepas cultivadas en condiciones controladas, que garantizaron la exención de *X. ampelinus*, como con síntomas dudosos aquellos sarmientos asintomáticos recolectados en parcelas enfermas y como con síntomas positivos los sarmientos que mostraban síntomas sospechosos de *X. ampelinus*.

Los sarmientos fueron conservados a 4° C durante un periodo máximo de una semana hasta su análisis.

Tabla 3.1.- Características de los sarmientos de vid de la variedad Garnacha utilizados como muestras.

Época	Sarmiento	Síntomas	Origen
Enero (E ₁)	1, 2, 3, 4	+	Tabuena (Zaragoza)
	7, 8, 9, 10	+	
	13, 14, 15	+	
	19, 20, 21	+	Cultivo en maceta en invernadero
	5, 6, 11	- / +	
	12, 16, 17	- / +	
Julio (E ₂)	18, 22, 23, 24	-	Cultivo en maceta en invernadero
	25, 26, 27, 28, 29	+	
	30, 31, 32, 33, 34	+	
	35, 36, 37	+	Cultivo en maceta en invernadero
	38, 39, 40, 41, 42, 43	- / +	
	44, 45, 46, 47, 48	-	

- + Sarmientos en los que se apreciaron síntomas sospechosos de necrosis bacteriana.
- /+ Sarmientos asintomáticos recolectados en viñas enfermas.
- Sarmientos de cepas sanas cultivadas en maceta en invernadero.

Tabla 3.2.- Estación Meteorológica de Cariñena (Zaragoza). Pluviometría registrada durante los años 1992, 1993 y 1994.

Año	Ene.	Febr.	Mar.	Abr.	May.	Jun.	Jul.	Agos.	Sep.	Oct.	Nov.	Dic.	Anual
1992	2'8	8'8	18'3	9'7	43'3	69'8	8'7	25'3	21'6	124'1	4'1	17'8	354'3
1993	0'0	17'6	17'2	16'5	34'8	23'9	1'8	7'8	60'4	73'3	12'0	9'3	274'5
1994	7'5	23'1	9'5	20'9	38'2	0'0	85'0	22'5	41'8	78'6	33'8	21	381'9
Media histórica*	37'9	32'8	42'2	48'2	72'4	65'9	32'0	35'8	42'3	40'3	30'8	54'9	535'5

* Media histórica calculada con los datos de 30 años (De León *et al.*, 1987).

3.2.2. Descripción del método de lavado interno del sarmiento

Se utilizaron como muestras, porciones de sarmiento de una longitud de uno o dos nudos (2-3 entrenudos completos). En un extremo de la muestra se acopló una goma de látex de paredes gruesas y de un diámetro de luz adecuado al grosor del sarmiento, que se conectó a su vez a una jeringa de plástico de 50 cc, de punta troncocónica. El extremo libre de la muestra se introdujo en un vaso de precipitado que contenía la cantidad de tampón a ensayar en cada caso para el lavado interno. Sin extraer la muestra del tampón, se estiró del émbolo de la jeringa hasta el máximo, produciendo vacío, y aspirando así el tampón a través del sarmiento hasta la jeringuilla. Para impedir el retroceso del émbolo, éste se mantuvo fijo atravesando la espiga del émbolo con un clavo más largo que el diámetro de la jeringa (Cambra, 1993). Así se obtuvo una depresión máxima inicial del orden de 0'088 MPa, valor del mismo orden que la presión ejercida por la raíz de la vid al inicio de la brotación (Sperry *et al.*, 1987). En las fotos 3.1 a 3.10 se puede observar con detalle y paso a paso este método de lavado interno en los sarmientos.

3.2.3. Métodos de extracción

Cada uno de los 48 sarmientos sirvió para efectuar los siguientes tipos de extracción de antígenos de *X. ampelinus*:

a) Se trocearon porciones basales de cada sarmiento en finas rodajas o, cuando fue posible, aquellas zonas del sarmiento que mostraban síntomas, hasta obtener al menos 1 g. Una parte se maceró durante una noche (16 h) en agitación (1/5 p/v) con tampón Tris 0'5 M + 0'2% de mercaptoetanol (M6) y la otra con agua fisiológica tamponada (AFT) (M7). Los extractos así obtenidos se emplearon directamente en la técnica de IF o fueron dispensados en pocillos de placas ELISA, previo tratamiento a 100° C durante diez minutos (baño María).

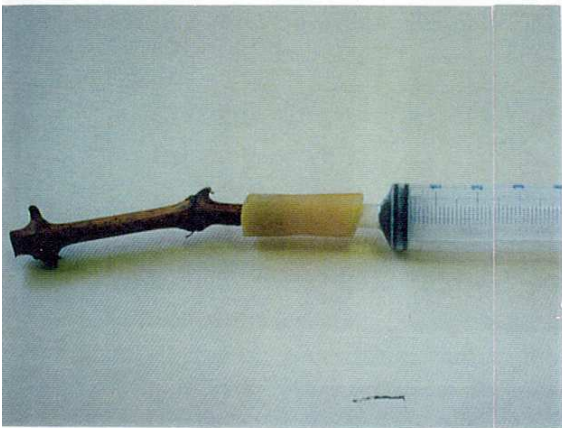
b) La porción inmediatamente superior a la parte previamente troceada de cada sarmiento, que contenía uno o dos nudos, se utilizó para aplicar el método de lavado interno en cuatro ocasiones consecutivas, utilizando cada vez 3 ml de AFT, recogiendo por separado las cuatro fracciones de lavado (M1, M2, M3 y M4). Un quinto extracto de lavado fue



3.1



3.2



3.3

Lavado interno de sarmientos:

Foto 3.1.- Renovación de los cortes del sarmiento muestra.

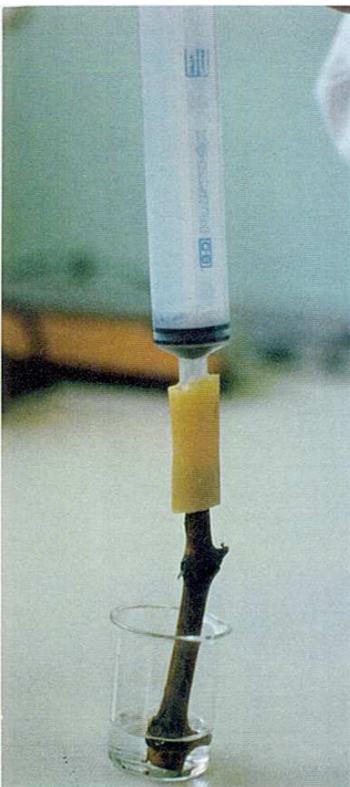
Foto 3.2.- Ajuste de una goma de látex.

Foto 3.3.- Inserción de una jeringa de 50 cc.

Foto 3.4.- Introducción del extremo libre del sarmiento en tampón.

Foto 3.5.- Depresión inicial (0'088 MPa) por elevación del émbolo.

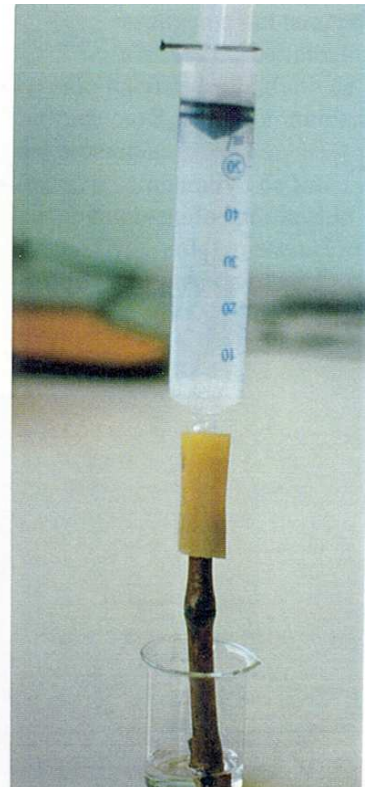
Foto 3.6.- Un clavo evita el retroceso del émbolo, manteniendo la succión.



3.4



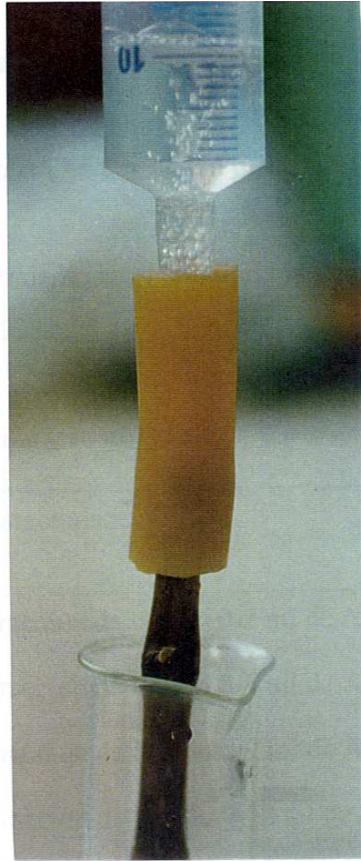
3.5



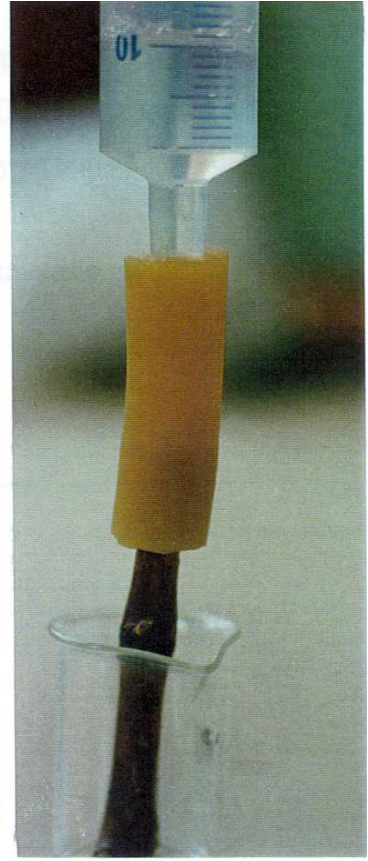
3.6



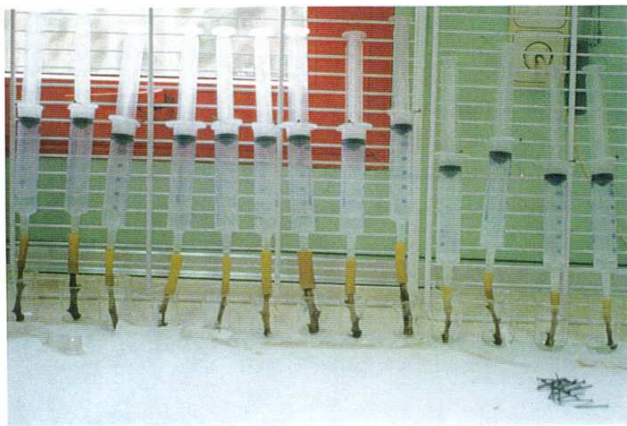
3.7



3.8



3.9



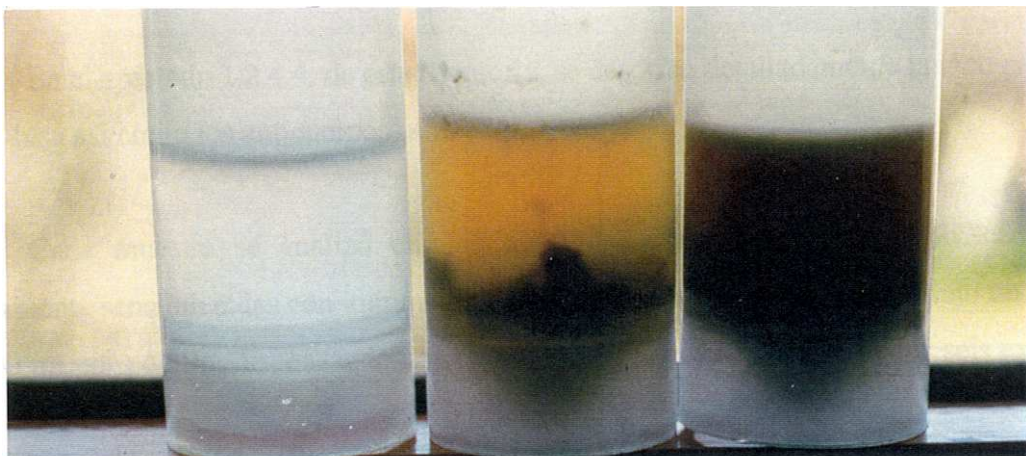
3.10

Lavado interno de sarmientos:

Fotos 3.7, 3.8 y 3.9.- Detalles de la aspiración del tampón a través del sarmiento.

Foto 3.10.- Lavado interno de un grupo de sarmientos. Realización rutinaria del método.

Foto 3.11.- Aspecto comparativo de los extractos obtenidos por lavado interno (izquierda), maceración (centro) y trituración (derecha).



3.11

obtenido mezclando 1 ml de cada fracción de lavado, lo que representó la fracción de 0-12 ml, equivalente al lavado del sarmiento con 12 ml de AFT (M5). Los productos de los diferentes lavados se dispensaron directamente en placas ELISA y en portaobjetos de IF.

En resumen, de cada sarmiento se obtuvieron los siete extractos o productos de lavado interno que se indican en la tabla 3.3.

Tabla 3.3.- Métodos de extracción y su utilización.

Método de extracción	Características	Técnica
M1	Fracción de lavado 0-3 ml de AFT	ELISA e IF
M2	Fracción de lavado 3-6 ml de AFT	ELISA e IF
M3	Fracción de lavado 6-9 ml de AFT	ELISA e IF
M4	Fracción de lavado 9-12 ml de AFT	ELISA e IF
M5	Fracción de lavado 0-12 ml de AFT (M1+M2+M3+M4)	ELISA e IF
M6	Maceración 16 h Tris + mercaptoetanol y baño María a 100° C 10 min	ELISA
M7	Maceración 16 h en AFT	IF

3.2.4. Métodos de análisis serológico

3.2.4.1. Técnica ELISA-DASI-b/sa

En el apartado 1.2.4.4. de esta Memoria, se describe detalladamente la técnica ELISA-DASI-b/sa así como los anticuerpos utilizados.

Cada muestra se analizó en dos microplacas de poliestireno (PolySorp, Nunc), previamente sensibilizadas con inmunoglobulinas anti-*X. ampelinus*. Se introdujo un volumen de 100 ml por pocillo, dispensando dos pocillos por placa de cada uno de los seis extractos o

productos del lavado interno (M1, M2, M3, M4, M5 y M6) (tabla 3.2), obtenidos de cada sarmiento. En cada placa se introdujo, como testigo positivo, una suspensión de 10^8 ufc/ml de *X. ampelinus* en AFT y, como testigos negativos, el extracto de maceración de viña sana en Tris + mercaptoetanol al que se le añadió una suspensión de 10^9 ufc/ml de *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* y el extracto obtenido por lavado interno de un sarmiento sano al que se le adicionó la misma cepa de *E. carotovora* subsp. *atroseptica* y a idéntica concentración.

En estos análisis, se consideraron positivos aquellos valores de la densidad óptica (d.o.) que superaron el doble del valor medio de la d.o. alcanzada por los testigos negativos respectivos.

3.2.4.2. Inmunofluorescencia indirecta (IF)

Se utilizó, como técnica de contraste, la inmunofluorescencia (IF), tal y como se describe en el capítulo 2 de esta Memoria, ya que ha sido la técnica más utilizada para la detección de *X. ampelinus* por distintos autores (Ridé *et al.*, 1977a; López *et al.*, 1987b).

Se analizaron seis de los extractos o productos de lavado interno obtenidos de cada sarmiento (M1, M2, M3, M4, M5 y M7) (tabla 3.3). Se dispensaron 40 μ l de cada uno en dos pocillos de un mismo portaobjetos (diez pocillos/portaobjetos), incluyendo testigos positivos y negativos. Éstos fueron los mismos que se utilizaron en la técnica ELISA, a excepción del testigo negativo de los extractos macerados (M7), ya que la viña sana fue macerada en AFT.

Los resultados de IF se clasificaron según el siguiente criterio tras observar 60 campos en dos ejes perpendiculares de cada pocillo de un portaobjetos:

+++	> 10 bacterias/campo
++	1-9 bacterias/campo
+	15-59 bacterias/60 campos
±	< 15 bacterias/60 campos
-	0 bacterias/60 campos

Cuando se contabilizaron más de 15 bacterias/60 campos en un pocillo de IF, se consideró el resultado como positivo.

3.2.5. Métodos de análisis estadístico

Con los valores de la d.o. obtenidos mediante la técnica ELISA-DASI, se realizó un análisis de varianza según el siguiente modelo matemático:

$$\Phi_{ijklmn} = \mu + E_i + P_{j(i)} + p_{k(ij)} + s_{l(ij)} + ps_{kl(ij)} + M_m + EM_{im} + \epsilon_{n(ijklm)}$$

donde la d.o. (F_{ijklmn}) se descompone en nueve términos:

μ = media general.

E_i = efecto de la época “i” (fijo).

$P_{j(i)}$ = efecto de la pareja de placas “j” dentro de la época “i”.

$p_{k(ij)}$ = efecto de la placa “k” dentro de la pareja de placas “j” y de la época “i”.

$s_{l(ij)}$ = efecto del sarmiento “l” dentro de la pareja de placas “j” y de la época “i”.

$ps_{kl(ij)}$ = efecto de la interacción de la placa “l” y del sarmiento “k” dentro de la pareja de placas “j” y de la época “i”.

M_m = efecto del método de extracción o de lavado interno “m” (fijo).

EM_{im} = efecto de la interacción de la época “i” con el método “m”.

$\epsilon_{n(ijklm)}$ = efecto individual de cada d.o. y de otros efectos no controlados o residuales, como son las interacciones del efecto factorial, método de extracción con los jerárquicos pareja de placas, placa y sarmiento y la triple interacción placa, sarmiento y método de extracción, que se consideraran inexistentes.

Siendo el número total de niveles de cada efecto:

Época (E)	i = 1 2
Pareja placas (P)	j = 1 8
Placas (p)	k = 1 16

Sarmiento (s)	$l = 1$ 48
Método de extracción o de lavado interno (M)	$m = 1$ 6
Error residual (ϵ)	$n = 1$ 1.152

El análisis del modelo completo se realizó mediante el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (1988), utilizando la suma de cuadrados tipo I.

Cuando el efecto método de extracción fue considerado estadísticamente significativo, se realizó una comparación de medias por el método de las diferencias mínimas significativas (L.S.D.) o prueba “T” múltiple, de acuerdo con unas comparaciones previamente establecidas.

Ambos análisis estadísticos fueron realizados con los valores considerados positivos y negativos, por separado y en conjunto, tanto en cada época de muestreo como con las dos épocas juntas.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores medios de la d.o. (x1000) obtenida en las lecturas de las placas de ELISA-DASI realizadas con los 48 sarmientos y los seis métodos de extracción, se exponen, junto con su desviación típica en las tablas 3.4 y 3.6. Los resultados obtenidos tras observar 60 campos en cada uno de los análisis IF figuran en las tablas 3.5 y 3.7. Los resultados obtenidos mediante la técnica ELISA, comparados con los obtenidos en las lecturas de los portaobjetos de IF, se muestran en las tablas 3.8 y 3.9.

En invierno (E1), se obtuvieron resultados negativos en todos los análisis de las muestras asintomáticas (sarmientos 5, 6, 11, 12, 16 y 17) recogidas en Tabuena (Zaragoza), pero, sin embargo, se detectó *X. ampelinus*, al menos por alguno de los métodos de análisis, en todas las muestras con síntomas sospechosos recogidas en esa época.

Tabla 3.4.- Valores medios y desviación típica de la densidad óptica (405 nm) obtenida mediante la técnica ELISA-DASI-b/sa, utilizando seis métodos de extracción (M) con 24 sarmientos recolectados en enero.

		Lavado interno del sarmiento						Maceración	
Sarmiento		M1	M2	M3	M4	M5	M6		
placas 1 y 2	1	258 ± 30	378 ± 55	380 ± 41	733 ± 175	430 ± 114	756 ± 71		
	2	195 ± 16	259 ± 18	321 ± 49	273 ± 60	239 ± 48	761 ± 118		
	3	377 ± 68	1200 ± 123	1273 ± 247	1427 ± 362	707 ± 93	1071 ± 94		
	4	565 ± 54	1188 ± 56	1013 ± 149	1206 ± 127	1255 ± 86	946 ± 157		
	5	336 ± 8	361 ± 35	324 ± 38	379 ± 74	373 ± 42	488 ± 69		
	6	229 ± 79	347 ± 102	174 ± 20	268 ± 86	144 ± 10	382 ± 53		
	T-	204 ± 36	204 ± 36	204 ± 36	204 ± 36	204 ± 36	403 ± 51		
T+	1534 ± 40	1534 ± 40	1534 ± 40	1534 ± 40	1534 ± 40	1534 ± 40	1534 ± 40		
placas 3 y 4	7	346 ± 34	1455 ± 114	1472 ± 96	1251 ± 85	1495 ± 88	691 ± 111		
	8	541 ± 26	903 ± 52	1066 ± 50	921 ± 53	1108 ± 121	857 ± 215		
	9	539 ± 34	650 ± 31	573 ± 73	683 ± 58	502 ± 28	799 ± 190		
	10	756 ± 38	913 ± 6	866 ± 50	906 ± 109	882 ± 47	556 ± 71		
	11	354 ± 53	330 ± 99	277 ± 45	298 ± 41	272 ± 50	507 ± 132		
	12	336 ± 171	314 ± 114	115 ± 19	374 ± 57	201 ± 78	474 ± 79		
	T-	205 ± 28	205 ± 28	205 ± 28	205 ± 28	205 ± 28	367 ± 91		
T+	1738 ± 199	1738 ± 199	1738 ± 199	1738 ± 199	1738 ± 199	1738 ± 199	1738 ± 199		
placas 5 y 6	13	697 ± 94	1034 ± 197	915 ± 91	1003 ± 134	918 ± 125	687 ± 93		
	14	819 ± 104	1146 ± 117	1735 ± 159	1333 ± 85	1433 ± 114	927 ± 87		
	15	434 ± 105	976 ± 80	1669 ± 189	1394 ± 105	1681 ± 135	929 ± 106		
	16	344 ± 107	272 ± 52	302 ± 88	417 ± 159	326 ± 76	580 ± 63		
	17	187 ± 37	178 ± 36	136 ± 18	182 ± 30	150 ± 15	405 ± 86		
	18	259 ± 44	257 ± 30	251 ± 101	240 ± 126	248 ± 88	328 ± 42		
	T-	235 ± 40	235 ± 40	235 ± 40	235 ± 40	235 ± 40	544 ± 64		
T+	1576 ± 44	1576 ± 44	1576 ± 44	1576 ± 44	1576 ± 44	1576 ± 44	1576 ± 44		
placas 7 y 8	19	347 ± 42	607 ± 53	397 ± 43	893 ± 39	621 ± 32	757 ± 21		
	20	541 ± 19	678 ± 18	827 ± 53	992 ± 117	983 ± 89	861 ± 107		
	21	1280 ± 75	1989 ± 239	2150 ± 162	2054 ± 120	2041 ± 178	768 ± 21		
	22	281 ± 36	198 ± 33	219 ± 5	252 ± 27	220 ± 39	470 ± 197		
	23	288 ± 141	189 ± 31	204 ± 7	246 ± 31	163 ± 43	512 ± 102		
	24	242 ± 48	265 ± 50	188 ± 18	187 ± 57	204 ± 74	402 ± 132		
	T-	222 ± 57	222 ± 57	222 ± 57	222 ± 57	222 ± 57	271 ± 59		
T+	1784 ± 105	1784 ± 105	1784 ± 105	1784 ± 105	1784 ± 105	1784 ± 105	1784 ± 105		

T- : Testigo negativo.

T+ : Testigo positivo.

En negrita los valores que superan el doble del valor medio alcanzado con los T- respectivos.

Cada cifra supone la media de los valores obtenidos en cuatro pocillos (dos pocillos por placa ELISA).

Tabla 3.5.- Resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia (IF), utilizando seis métodos de extracción (M), con 24 muestras recolectadas en enero.

Sarmiento	Lavado interno del sarmiento					Maceración
	M1	M2	M3	M4	M5	M7
1	+	++	++	++	++	++
2	++	+	+	+	+	+
3	++	++	++	++	++	++
4	++	++	++	++	++	++
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	+	+++	+++	++	+++	+
8	++	++	+++	+++	++	-
9	++	++	++	++	++	-
10	++	+++	+++	++	++	++
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-
13	++	++	++	++	++	++
14	++	++	+++	+++	++	-
15	-	++	+++	+++	++	-
16	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-
19	+	++	++	++	++	++
20	+++	+++	+++	++	++	-
21	+++	+++	+++	+++	++	+++
22	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-

+++ > 10 bacterias/campo
 ++ 1-9 bacterias/campo
 + 15-59 bacterias/60 campos
 - 0 bacterias/60 campos

Tabla 3.6.- Valores medios y desviación típica de la densidad óptica (405 nm) obtenida mediante la técnica ELISA-DASI-b/sa, utilizando seis métodos de extracción (M) con 24 sarmientos recolectados en julio.

		Lavado interno del sarmiento					Maceración	
Sarmiento		M1	M2	M3	M4	M5	M6	
placas 9 y 10	25	2281 ± 287	1674 ± 153	1855 ± 136	1319 ± 175	1548 ± 114	1111 ± 45	
	26	891 ± 37	616 ± 59	597 ± 70	473 ± 46	563 ± 47	1251 ± 117	
	27	256 ± 23	252 ± 51	208 ± 24	189 ± 25	246 ± 45	595 ± 78	
	28	1374 ± 462	1394 ± 130	1442 ± 212	1900 ± 513	1740 ± 916	1097 ± 159	
	29	1106 ± 233	1982 ± 422	1944 ± 397	1742 ± 206	1684 ± 247	900 ± 78	
	30	2106 ± 298	1752 ± 72	1989 ± 228	1861 ± 378	1306 ± 400	878 ± 74	
	T -	289 ± 77	289 ± 77	289 ± 77	289 ± 77	289 ± 77	336 ± 136	
	T+	2155 ± 122	2155 ± 122	2155 ± 122	2155 ± 122	2155 ± 122	2155 ± 122	
placas 11 y 12	31	1663 ± 146	2002 ± 107	2070 ± 69	2215 ± 146	1656 ± 144	1084 ± 157	
	32	926 ± 78	1070 ± 33	1258 ± 82	1247 ± 63	1054 ± 109	1150 ± 134	
	33	1568 ± 79	1796 ± 171	1814 ± 121	2104 ± 22	1717 ± 51	800 ± 52	
	34	1398 ± 105	2109 ± 262	2283 ± 326	2149 ± 144	1873 ± 163	960 ± 105	
	35	546 ± 83	341 ± 49	295 ± 43	385 ± 36	404 ± 100	955 ± 103	
	36	1092 ± 102	1192 ± 128	1206 ± 254	977 ± 132	732 ± 205	855 ± 32	
	T -	274 ± 19	274 ± 19	274 ± 19	274 ± 19	274 ± 19	299 ± 60	
	T+	2377 ± 154	2377 ± 154	2377 ± 154	2377 ± 154	2377 ± 154	2377 ± 154	
placas 13 y 14	37	2500 ± 114	1901 ± 172	2201 ± 298	2216 ± 187	2564 ± 177	1564 ± 226	
	38	382 ± 60	377 ± 90	607 ± 55	757 ± 41	495 ± 32	1478 ± 67	
	39	507 ± 70	672 ± 212	758 ± 146	763 ± 109	577 ± 101	1258 ± 208	
	40	525 ± 86	343 ± 103	392 ± 180	395 ± 109	443 ± 126	1532 ± 174	
	41	1552 ± 302	956 ± 134	1108 ± 163	937 ± 183	1106 ± 385	1589 ± 127	
	42	544 ± 139	486 ± 99	279 ± 68	608 ± 244	264 ± 54	420 ± 98	
	T -	250 ± 44	250 ± 44	250 ± 44	250 ± 44	250 ± 44	320 ± 96	
	T+	2958 ± 36	2958 ± 36	2958 ± 36	2958 ± 36	2958 ± 36	2958 ± 36	
placas 15 y 16	43	420 ± 64	946 ± 119	1408 ± 141	1419 ± 225	920 ± 410	2082 ± 384	
	44	279 ± 60	232 ± 46	242 ± 42	217 ± 39	246 ± 34	377 ± 86	
	45	313 ± 23	260 ± 20	262 ± 48	236 ± 28	232 ± 31	463 ± 122	
	46	404 ± 43	286 ± 51	294 ± 93	276 ± 72	276 ± 66	388 ± 54	
	47	313 ± 61	285 ± 8	240 ± 48	241 ± 52	230 ± 32	260 ± 20	
	48	259 ± 34	198 ± 16	221 ± 48	256 ± 36	241 ± 43	357 ± 81	
	T -	250 ± 58	250 ± 58	250 ± 58	250 ± 58	250 ± 58	318 ± 83	
	T+	2922 ± 229	2922 ± 229	2922 ± 229	2922 ± 229	2922 ± 229	2922 ± 229	

T- : Testigo negativo.

T+ : Testigo positivo.

En negrita los valores que superan el doble del valor medio alcanzado con los T- respectivos.

Cada cifra supone la media de los valores obtenidos en cuatro pocillos (dos pocillos por placa ELISA).

Tabla 3.7.- Resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia (IF), utilizando seis métodos de extracción o de lavado interno en 24 muestras recolectadas en julio.

Sarmiento	Lavado interno del sarmiento					Maceración
	M1	M2	M3	M4	M5	M7
25	++	++	++	++	++	++
26	-	-	+	+	+	+
27	-	-	-	-	-	-
28	++	++	++	++	++	++
29	+	+	++	++	++	++
30	++	++	++	++	++	++
31	+	+	+	++	++	++
32	+	+	+	+	++	++
33	++	++	++	++	++	++
34	+	++	++	++	++	++
35	-	-	-	-	-	-
36	+	+	+	+	+	++
37	+	+	++	++	++	++
38	-	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-
41	+	+	++	++	++	++
42	-	-	-	-	-	-
43	+	+	+	+	+	++
44	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-

++ 1-9 bacterias/campo
+ 15-59 bacterias/60 campos
- 0 bacterias/60 campos

Tabla 3.8.- Resultados obtenidos mediante ELISA e IF con 24 muestras recolectadas en enero y en julio, utilizando distintos métodos de extracción: lavado interno (M1 a M5) y maceración (M6 y M7).

Sarmiento	Lavado interno del sarmiento										Maceración	
	M1		M2		M3		M4		M5		M6	M7
	ELISA	IF	ELISA	IF	ELISA	IF	ELISA	IF	ELISA	IF	ELISA	IF
1	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+
2	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
3	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
15	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
34	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
38	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
39	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
40	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
41	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
43	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ELISA + = valores de la d.o. que superan el doble del valor medio de la d.o. alcanzada por los testigos negativos.
 ELISA - = valores de la d.o. que no superan el doble del valor medio de la d.o. alcanzada por los testigos negativos.
 IF + = > 15 bacterias/60 campos.
 IF - = 0-15 bacterias/60 campos.
 Muestras recolectadas en enero: sarmientos del 1 al 24.
 Muestras recolectadas en julio: sarmientos del 25 al 48.

Tabla 3.9.- Comparación de los resultados obtenidos mediante ELISA e IF para cada método de extracción o de lavado interno, en dos épocas de recolección de muestras y en el conjunto de ambas épocas.

	Época 1		Época 2		Época 1 + Época 2	
Método 1	ELISA +	ELISA -	ELISA +	ELISA -	ELISA +	ELISA -
IF +	8	5	11	1	19	6
IF -	0	11	4	8	4	19
Total muestras	24		24		48	
Método 2	ELISA +	ELISA -	ELISA +	ELISA -	ELISA +	ELISA -
IF +	12	2	12	0	24	2
IF -	0	10	2	10	2	20
Total muestras	24		24		48	
Método 3	ELISA +	ELISA -	ELISA +	ELISA -	ELISA +	ELISA -
IF +	11	3	13	0	24	3
IF -	0	10	2	9	2	19
Total muestras	24		24		48	
Método 4	ELISA +	ELISA -	ELISA +	ELISA -	ELISA +	ELISA -
IF +	13	1	12	1	25	2
IF -	0	10	3	8	3	18
Total muestras	24		24		48	
Método 5	ELISA +	ELISA -	ELISA +	ELISA -	ELISA +	ELISA -
IF +	13	1	12	1	25	2
IF -	0	10	1	10	1	20
Total muestras	24		24		48	
Métodos 6 y 7	ELISA +	ELISA -	ELISA +	ELISA -	ELISA +	ELISA -
IF +	4	5	13	0	17	5
IF -	3	12	4	7	7	19
Total muestras	24		24		48	

+ Presencia de reacción.

- Ausencia de reacción.

En julio (E2), de los seis sarmientos asintomáticos recolectados en viñas enfermas (38 al 43), dos de ellos resultaron estar infectados (41 y 43). Por el contrario, los análisis no detectaron la presencia de *X. ampelinus* en dos de los sarmientos (27 y 35) en los que se había apreciado la existencia, en un principio, de síntomas sospechosos causados por *X. ampelinus*. Ello pudo ser debido a que la sintomatología de la enfermedad en ocasiones no fue clara y, por lo tanto, la observación visual de síntomas estuvo sujeta a errores, sobre todo en años secos y cuando las observaciones se realizaron sobre cepas en vegetación. La mejor época para realizar observaciones visuales de síntomas parece ser el invierno, a la caída de las hojas, cuando los chancros están totalmente desarrollados. Quizás en zonas con condiciones climáticas favorables, la observación visual esté sujeta a menos problemas. Los síntomas foliares son observables con consistencia en Francia (Ridé, 1996) y resultan raros de observar en Aragón, incluso en años favorables para el desarrollo de síntomas, lo que en la práctica dificulta las observaciones que se realizan sobre cepas en vegetación.

En la tabla 3.8 se aprecia que en 29 muestras coincidieron los 12 resultados de los análisis (seis métodos de extracción y procesado mediante IF y ELISA); en ocho casos (sarmientos 3, 8, 9, 10, 13, 20, 35 y 43) tan sólo existió un resultado discrepante; con dos, tres y cuatro resultados discordantes hubo cinco (7, 14, 19, 40 y 42), uno (38) y tres (1, 15 y 26) casos, respectivamente, pero que finalmente no ofrecieron dificultad para diagnosticarlos como sanos o enfermos. En cambio, en dos casos (2 y 39) no coincidieron los resultados de ELISA e IF. Con el sarmiento 2, todos los resultados obtenidos mediante la técnica ELISA fueron negativos y, por el contrario, todos los resultados de IF fueron positivos. El caso contrario ocurrió con el sarmiento 39. Para los análisis estadísticos posteriores, se consideraron como muestra positiva y negativa, respectivamente, ya que la IF, considerada como técnica de control, inclinó la decisión hacia uno u otro sentido.

En la tabla 3.9 se comparan los resultados obtenidos mediante la técnica ELISA y de IF por épocas y para cada método de extracción. Las discrepancias mayores entre las técnicas ELISA e IF se produjeron cuando se utilizó la maceración (M6 y M7), ya que en 12 casos de los 48 analizados los resultados obtenidos mediante la técnica ELISA (M6) fueron diferentes de los de la técnica IF (M7). Esas diferencias observadas entre las técnicas cuando se utilizó la maceración como método de extracción fueron posiblemente debidas al alto contenido de componentes fenólicos del extracto así procesado, ya observadas en el capítulo 2, y que

sugirió la búsqueda de otro método de extracción. En la foto 3.11 se aprecia la coloración de los extractos obtenidos por lavado interno, maceración y trituración. El extracto obtenido por lavado interno de los sarmientos es mucho más limpio y transparente que los extractos obtenidos con los otros dos métodos de extracción. En los métodos basados en el lavado interno (M1 a M5), el mayor número de discrepancias se alcanzaron con M1. Con M5, tan sólo hubo tres diferencias, siendo el método con menor número de discrepancias entre ambas técnicas. Con los métodos M2, M3 y M4 las diferencias fueron cuatro, cinco y cinco casos, respectivamente.

Por lo tanto, en general, los resultados obtenidos con las técnicas ELISA e IF y con el lavado más adecuado fueron coincidentes, con escasas diferencias entre ellos. Éstas pueden explicarse, en un caso, por la mayor sensibilidad de la técnica de IF con respecto a la de la técnica ELISA, en muestras con concentraciones de *X. ampelinus* próximas al límite de detección de la técnica ELISA. En otros casos, se han considerado como negativos valores de d.o. cuya media era inferior al doble del control negativo, pero con elevada desviación típica. En la técnica ELISA, ello puede estar causado por distintos factores no fácilmente controlables.

Los resultados obtenidos en los análisis de varianza se resumen como valores de la probabilidad del nivel de significación y del error estándar residual (ESR) en la tabla 3.10.

El valor medio de las densidades ópticas alcanzadas con todas las muestras positivas y negativas se representan en gráficos de barras para cada método de extracción, en cada época y considerando las dos épocas en conjunto (figuras 3.1, 3.2 y 3.3).

La comparación de medias entre los distintos métodos de extracción se esquematizan en las figuras 3.4, 3.5 y 3.6, que resumen las comparaciones en las dos épocas por separado y en su análisis en conjunto. El triángulo superior derecho de cada figura representa las comparaciones entre los métodos, realizadas con los valores negativos y el triángulo inferior izquierdo con los positivos. Se ha colocado una “X” en aquellas casillas donde se ha obtenido una diferencia significativa al nivel del 5% entre dos métodos comparados.

Tabla 3.10.- Resultados obtenidos en el análisis de varianza. Valores de la probabilidad del nivel de significación y del error estándar residual (ESR).

Épocas 1 y 2 (enero y julio)

Efectos	Positivos y negativos	Negativos	Positivos
Método	0'0001 ***	0'0001 ***	0'0001 ***
Época	0'1446	0'2641	0'0178 *
Pareja de placas	0'1015	0'0091 **	0'7913
Placa	0'0120 *	0'0209 *	0'0608 *
Sarmiento	0'0001 ***	0'0001 ***	0'0001 ***
Placa-Sarmiento	0'1071	0'6731	0'0550 *
Época-Método	0'0001 ***	0'0001 ***	0'0001 ***
ESR	286	138	318

Época 1 (enero)

Efectos	Positivos y negativos	Negativos	Positivos
Método	0'0001 ***	0'0001 ***	0'0001 ***
Época	-	-	-
Pareja de placas	0'9725	0'7089	0'5274
Placa	0'0341 *	0'8813	0'0042 **
Sarmiento	0'0001 ***	0'0440 *	0'0001 ***
Placa-Sarmiento	0'8447	0'0031 **	0'9468
Época-Método	-	-	-
ESR	226	80	247

Época 2 (julio)

Efectos	Positivos y negativos	Negativos	Positivos
Método	0'1055	0'0001 ***	0'0001 ***
Época	-	-	-
Pareja de placas	0'0484 *	0'0054 **	0'8136
Placa	0'0516 *	0'0039 **	0'2108
Sarmiento	0'0001 ***	0'0003 ***	0'0003 ***
Placa-Sarmiento	0'0547 *	0'9531	0'0255 *
Época-Método	-	-	-
ESR	335	175	380

Nivel de significación: 5%.

* Valores de la probabilidad comprendidos entre 10^{-1} y 10^{-2} .

** Valores de la probabilidad comprendidos entre 10^{-2} y 10^{-3} .

*** Valores de la probabilidad comprendidos entre 10^{-3} y 10^{-4} .

Figuras 3.1, 3.2 y 3.3.- Valor medio de las densidades ópticas (d.o.) alcanzadas mediante la técnica ELISA-DASI-b/sa, utilizando extractos obtenidos con seis métodos de extracción (M) de sarmientos recolectados en diferentes épocas.

Figura 3.1.- Época 1 (invierno).

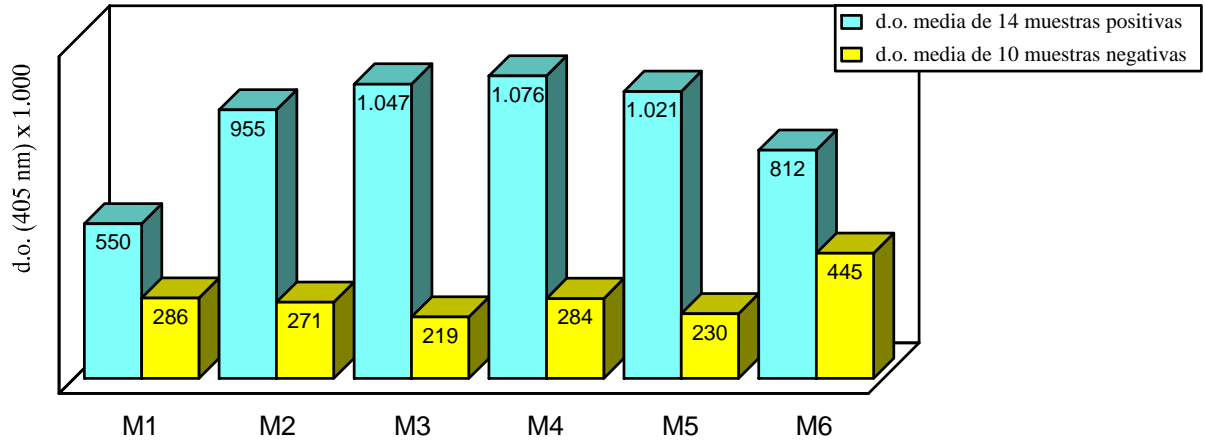


Figura 3.2.- Época 2 (verano).

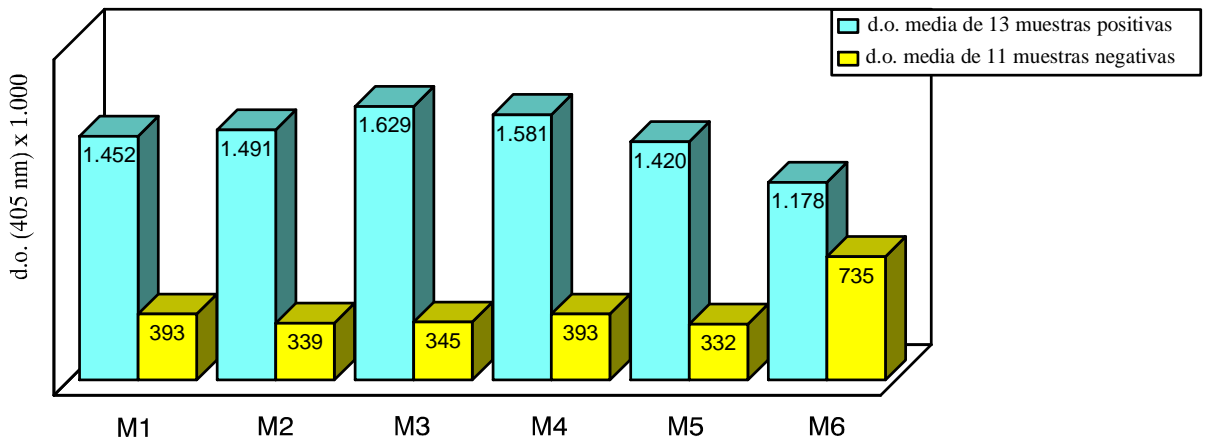
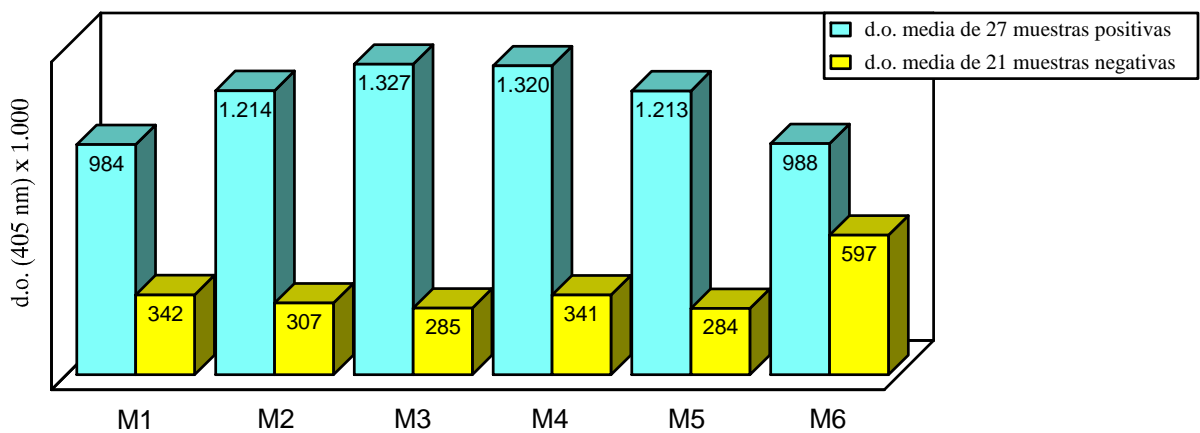


Figura 3.3.- Épocas 1 y 2 .



M1 = Fracción de lavado interno 0-3 ml.
 M2 = Fracción de lavado interno 3-6 ml.
 M3 = Fracción de lavado interno 6-9 ml.

M4 = Fracción de lavado interno 9-12 ml.
 M5 = Fracción de lavado interno 0-12 ml.
 M6 = Maceración

Figuras 3.4, 3.5 y 3.6.- Comparación de medias entre los seis métodos de extracción por el método de las mínimas diferencias significativas LSD en las diferentes épocas.

Figura 3.4.- Época 1 (invierno).

Negativos

		M1	M2	M3	M4	M5	M6
P o s i t i v o s	M1	M1		X		X	X
	M2	X	M2	X		X	X
	M3	X		M3	X		X
	M4	X	X		M4	X	X
	M5	X				M5	X
	M6	X	X	X	X	X	M6

Figura 3.5.- Época 2 (verano).

Negativos

		M1	M2	M3	M4	M5	M6
P o s i t i v o s	M1	M1					X
	M2		M2				X
	M3	X		M3			X
	M4				M4		X
	M5			X	X	M5	X
	M6	X	X	X	X	X	M6

Figura 3.6.- Épocas 1 y 2 conjuntamente.

Negativos

		M1	M2	M3	M4	M5	M6
P o s i t i v o s	M1	M1		X		X	X
	M2	X	M2				X
	M3	X	X	M3	X		X
	M4	X	X		M4	X	X
	M5	X		X	X	M5	X
	M6		X	X	X	X	M6

M1 = Fracción de lavado interno 0-3 ml.
M2 = Fracción de lavado interno 3-6 ml.
M3 = Fracción de lavado interno 6-9 ml.
M4 = Fracción de lavado interno 9-12 ml.
M5 = Fracción de lavado interno 0-12 ml.
M6 = Maceración
X = Comparación significativamente diferente, P = 0'05

Se comprobó la existencia de dos efectos muy influyentes, los sarmientos y los métodos de extracción (tabla 3.10). Es lógico que los sarmientos lo fueran, según su diferente concentración bacteriana. Se observó que el método de extracción basado en la maceración (M6) (figuras 3.4, 3.5 y 3.6) difirió prácticamente de todos los métodos basados en el lavado interno de los sarmientos (M1 a M5), tanto en enero (E1) como en julio (E2) y analizando separadamente positivos y negativos. No difirió del M1 cuando se consideraron los positivos analizando las dos épocas en conjunto. Los valores obtenidos en la E1 con el M1 con los positivos (figura 3.1) rebajaron la media obtenida por este método en julio (E2) (figura 3.2), haciéndola, en el conjunto de las dos épocas (figura 3.3), no estadísticamente diferente de la alcanzada por el M6 (figura 3.4).

La maceración (M6) se ha comportado estadísticamente como el método de menor interés entre los ensayados, a pesar de haber sido el único utilizado para la detección de *X. ampelinus* por distintos autores (Ridé y López, comunicación personal). Las diferencias entre positivos y negativos fueron menores, ya que los valores de la d.o. alcanzada con los sarmientos infectados fueron más bajos que los obtenidos por los otros métodos (figuras 3.1, 3.2 y 3.3) y, por el contrario, los de los sanos más altos. Fue el método que presentó mayor número de resultados que difirieron de los obtenidos mediante IF (tabla 3.9). Las lecturas de los portaobjetos de IF por este método de extracción, tuvieron más dificultades al observarse mayor fluorescencia secundaria y, en general, el número de células fluorescentes fue inferior al de los portaobjetos en los que se analizaron las muestras tras lavados internos. Además, utilizando maceración se complica la realización de la técnica ELISA, ya que se requiere el uso de antioxidantes y el tratamiento con calor de los extractos obtenidos tras la maceración. En ensayos preliminares se comprobó que el tratamiento a 100° C del producto de lavado interno no aportaba mejora en los resultados y alargaba el protocolo de análisis.

Con los valores negativos obtenidos en enero (E1), existieron algunas diferencias significativas entre las distintas fracciones de lavado interno (M1 a M5) (figura 3.4), pero éstas no fueron importantes (figura 3.1) y pueden considerarse normales, asumibles por la propia técnica ELISA. En julio (E2), los resultados con estos valores fueron más homogéneos, y no existieron diferencias estadísticas apreciables entre ellos (figuras 3.2 y 3.5).

La comparación de medias con los valores positivos ha permitido discernir cuáles han sido los mejores métodos de extracción entre las fracciones de lavado interno. En invierno (E1) los mejores resultados se han obtenido con los métodos M3, M4 y M5 (figura 3.1), no existiendo diferencias significativas entre ellos (figura 3.4). En julio (E2) se obtuvieron buenos resultados con los métodos M2, M3 y M4 (figuras 3.2 y 3.5) y cuando se analizaron ambas épocas en conjunto, los mejores resultados se obtuvieron con M3 y M4 (figuras 3.3 y 3.6). Es decir, la fracción de lavado comprendida entre 6-12 ml fue, estadísticamente, la mejor para utilizar como extracto en la técnica ELISA-DASI.

Aunque las diferencias entre los mejores métodos fueron pequeñas, éstas parecen indicar, también, que es conveniente una cierta cantidad de tampón para lavar internamente los sarmientos y extraer la bacteria tanto en invierno como en verano. Esta hipótesis se vió reforzada al comprobar que la interacción época de muestreo-método de extracción fue también muy influyente en el análisis de varianza (tabla 3.10).

La observación de los valores positivos en las figuras 3.1 y 3.2 induce a pensar que esa interacción sea debida a los valores alcanzados con el método de extracción 1 en invierno (E1) (figura 3.1). La evolución de las gráficas con las siguientes fracciones de lavado y con el macerado (M6) en esa época fue más homogénea (figuras 3.2 y 3.3). Por lo tanto, la presencia de la interacción es debida al efecto diferencial del M1 con respecto a las dos épocas. Es decir, la fracción de lavado 0-3 ml es insuficiente para extraer todas las bacterias en invierno. Es lógico que en sarmientos recolectados en invierno, agostados y secos, sea necesario lavar con mayor cantidad de tampón para arrastrar las células bacterianas.

Esa interacción época-método con los valores negativos fue igualmente influyente (tabla 3.10), pero en este caso los métodos se comportaron de modo similar en ambas épocas (figuras 3.1 y 3.2), por lo que se trata de una interacción de índole matemática, más que de interés práctico real. El M6 alcanzó valores superiores en ambos casos y el resto de los métodos fueron similares o mostraron diferencias lógicas debidas al error experimental.

Otros factores influyeron con menor intensidad en determinada época y analizando separadamente valores positivos y negativos (tabla 3.10), como parejas de placas y placas en la época 2, etc., pero pueden considerarse como normales dentro de la realización de la técnica ELISA.

Los resultados obtenidos demuestran que el lavado interno de los sarmientos es una técnica de extracción rápida, de fácil realización y que permite recuperar mayores cantidades de *X. ampelinus* que la maceración, método convencional usado por otros autores, como Ridé *et al.* (1977b), para la detección de *X. ampelinus*. El volumen de tejido vegetal muestreado en cada lavado interno es mayor que el utilizado con los otros métodos de extracción (French *et al.*, 1977). Por sus características y la relativa pureza de los fluidos así obtenidos, el método del lavado interno de los sarmientos podría también ser empleado para detección de patógenos con otras técnicas, como la amplificación mediante PCR. Además, el lavado interno somete a la muestra a presiones inferiores a las que soportan los vasos de los sarmientos durante su ciclo vegetativo (Sperry *et al.*, 1987) y, al ser un método no destructivo del material vegetal, pudiera permitir el uso del mismo sarmiento analizado como material propagativo.

Bazzi *et al.* (1987), Bazzi *et al.* (1990) y Scortichini (1991), utilizando bombas de vacío, obtuvieron una buena eficiencia en la extracción de *A. tumefaciens* y *X. fastidiosa* en sarmientos de vid. Con los resultados obtenidos con el método de lavado interno se confirma también la eficiencia del mismo para la detección de bacterias fitopatógenas vasculares en vid, ya que *X. ampelinus* en condiciones como las aragonesas se encuentra fundamentalmente en la zona vascular de los sarmientos. Sin embargo, sería necesario determinar el tampón y las condiciones idóneas para la detección combinada de *A. tumefaciens*, *X. fastidiosa* y *X. ampelinus* en programas de selección sanitaria o certificación.

3.4. CONCLUSIONES

- La mejor época para realizar observaciones visuales de síntomas de *X. ampelinus* fue en invierno, ya que se obtuvo total coincidencia entre los síntomas observados y los resultados obtenidos mediante análisis serológicos.
- El método de lavado interno ha proporcionado mejores resultados que el basado en maceración, tanto mediante ELISA como mediante IF.
- La extracción de bacterias y/o de antígenos bacterianos del sarmiento, tanto en invierno como en verano, se logró como mayor eficacia al realizar el lavado interno con volúmenes

entre 6 y 12 ml. No obstante, a nivel práctico parece aconsejable realizar el lavado interno de sarmientos con 12 ml de tampón.

- El lavado interno, al no ser destructivo, permitiría propagar el mismo material utilizado en los análisis.
- El método de extracción de bacterias y antígenos bacterianos mediante el lavado interno de sarmientos puede ser fácilmente adoptado de forma rutinaria en programas de selección sanitaria y podría tener interés para otros patógenos y métodos de análisis. Al no ser necesario preparar extractos, el método propuesto presenta numerosas ventajas por economizar tiempo, evitar contaminaciones e inhibidores.

CAPÍTULO 4

CAPÍTULO 4.- INCIDENCIA DE *Xylophilus ampelinus* EN LAS DENOMINACIONES DE ORIGEN CAMPO DE BORJA (ZARAGOZA) Y SOMONTANO (HUESCA). DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE LA BACTERIA EN UNA VIÑA DE TABUENCA (ZARAGOZA)

4.1. INTRODUCCIÓN

La viticultura de Aragón está dirigida en su práctica totalidad a la vinificación de su cosecha. La producción está distribuida fundamentalmente en cuatro denominaciones de origen: Cariñena (19.920 ha), Campo de Borja (7.050 ha) y Calatayud (8.340 ha) en la provincia de Zaragoza, y Somontano (1.956 ha) en Huesca (datos Gobierno de Aragón, 1994). Existe otro núcleo, menos importante, en el que se ha venido tradicionalmente cultivando vid, situado en la comarca del Bajo Aragón (Zaragoza y Teruel).

La producción de 1994, considerado de cosecha media-baja, alcanzó un total de 431.410 hl: 217.000 hl en Cariñena, 96.400 hl en Campo de Borja, 80.500 hl en Calatayud y 37.510 hl en Somontano. Así pues, la viticultura aragonesa posee cierta importancia económica, además de su valor social.

Todo el vino producido en el Somontano oscense fue comercializado calificado, es decir, con la etiqueta de la denominación de origen correspondiente. Sin embargo, en la provincia de Zaragoza, sólo se comercializó calificado el 59'2% de su producción (datos Gobierno de Aragón, 1994).

En 1978, se detectó *X. ampelinus* por primera vez en España (López *et al.*, 1978), precisamente en Aragón, en la zona de Tosos, perteneciente a la denominación de origen Cariñena. A partir de ese año, la bacteria fue detectada en focos aislados en las diferentes denominaciones de origen de Aragón (López, 1983). No obstante, no se han efectuado prospecciones sistemáticas que permitan una evaluación de la incidencia real de la enfermedad, independientemente de que se observe o no la sintomatología característica de la necrosis bacteriana.

La viticultura de Aragón está en expansión en Campo de Borja y, especialmente, en el Somontano de Huesca. Por ello, se ha creído oportuno realizar una amplia prospección en ambas zonas, utilizando la técnica ELISA-DASI y extractos obtenidos por lavado interno de los sarmientos (métodos puestos a punto en los capítulos 1 y 3 de esta Memoria). Los resultados de esta prospección son necesarios para conocer la incidencia de la enfermedad en cada zona y su distribución y, en función de ello, aconsejar las medidas a tomar que disminuyan o eviten la diseminación de la enfermedad. También resulta de interés el estudio de la distribución espacial de la enfermedad en una viña con incidencia de la misma, por aportar datos epidemiológicos que podrían sugerir medidas complementarias de control.

Se han efectuado análisis espaciales para algunas bacterias como *Xanthomonas citri* y greening (Gottwald *et al.*, 1988; Gottwald *et al.*, 1989; Gottwald *et al.*, 1991). Sin embargo, no se han realizado estudios encaminados a conocer la distribución espacial de la necrosis bacteriana de la vid; por ello, se ha creído conveniente realizar algún tipo de análisis que permita obtener conclusiones sobre la posible existencia de algún gradiente relacionado con operaciones culturales, orientación, etc.

Se trata de la primera vez que se aplica la técnica ELISA a la realización de una prospección sistemática y a estudios de distribución espacial de la enfermedad en años no favorables para el desarrollo de síntomas. Las prospecciones realizadas en distintos países, tanto a nivel de grandes zonas afectadas por la enfermedad como a nivel de parcela, se han basado, hasta la fecha, exclusivamente en la observación visual de síntomas en los años de mayor incidencia de la enfermedad. Estos trabajos han sido realizados en Grecia (Panagopoulos y Psallidas, 1983), Francia (Ridé *et al.*, 1977b; Bernard y Fauré, 1983; Héritier, 1983; Fabre, 1983) y España (Sampayo *et al.*, 1981; López, 1983; Gómez y López, 1986).

4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1. Zonas de prospección

De las cuatro denominaciones de origen existentes en Aragón, se han escogido dos de ellas, Somontano y Campo de Borja, ya que sus características se adaptan bien al trabajo

programado y por el gran interés que tiene conocer su estado sanitario, ya que la viticultura de esas zonas está en expansión. Posteriormente, se realizó además el análisis individual de todas las plantas de una subparcela de la viña en la que se habían detectado en la prospección un mayor número de cepas enfermas.

4.2.1.1. Características de la denominación de origen Campo de Borja

La denominación de origen Campo de Borja la componen 15 términos municipales de la provincia de Zaragoza: Agón, Ainzón, Alberite, Albeta, Ambel, Bisimbre, Borja, Bulbunte, Bureta, El Buste, Fuendejalón, Magallón, Maleján, Pozuelo de Aragón, Tabuena y Vera de Moncayo. La superficie de vid en cada término se observa en la tabla 4.1.

Tabla 4.1.- Superficie de viñedo en los términos municipales que componen la denominación de origen Campo de Borja (datos facilitados por la denominación de origen en diciembre 1994).

Término municipal	Superficie (ha)
Agón	80
Ainzón	1.096
Alberite	60
Albeta	15
Ambel	120
Bisimbre	60
Borja	956
Bulbunte	85
Bureta	225
El Buste	55
Fuendejalón	2.608
Magallón	642
Pozuelo de Aragón	600
Tabuena	533
Vera de Moncayo	40
Superficie total	7.173

El Campo de Borja está situado entre las sierras del Sistema Ibérico próximas al Moncayo y la ribera del Ebro (figura 4.1). Los viñedos aparecen sobre las terrazas calizas del Ebro en Magallón (350 m de altitud) y poco a poco van ascendiendo hasta sobrepasar los 750 m de altitud en las estribaciones de las sierras, donde el contenido en caliza del suelo es prácticamente nulo. La precipitación media anual, aunque variable de una zona a otra, es baja (alrededor de 398 mm), con un periodo seco muy prolongado (Lorente y Barbacil, 1994).

La elaboración de vinos protegidos se realiza exclusivamente con uvas de las variedades indicadas a continuación (art. 5º OM 2/9/91, BOE 108 de 6/9/91), que se citan en la tabla 4.2 junto a la superficie cultivada y su porcentaje respecto al viñedo total.

Tabla 4.2.- Superficie ocupada por las distintas variedades de vid cultivadas en el Campo de Borja y su porcentaje respecto al total del viñedo (datos facilitados por la denominación de origen en diciembre de 1993).

Variedades tintas	Superficie (ha)	Porcentaje (%)
Garnacha tinta	5.576	74'50
Tempranillo o Cencibel	834	11'10
Mazuela-Cariñena	16	0'23
Cabernet-Sauvignon	18	0'25
Variedades blancas	Superficie (ha)	Porcentaje (%)
Viura o Macabeo	1.009	13'50
Moscatel romano	25	0'33
Superficie total	7.173	

Estos porcentajes de superficie con respecto al total de la denominación de origen son variables en cada localidad, ya que, por ejemplo, en Tabuena casi la totalidad es Garnacha y en Ainzón es la localidad donde mayor superficie existe de Tempranillo.

Existen seis Bodegas-Cooperativas situadas en Borja, Magallón, Ainzón, Fuendejalón, Pozuelo de Aragón y Tabuena, así como seis bodegas particulares (Lorente y Barbacil, 1994).

4.2.1.2. Características de la denominación de origen Somontano

La denominación de origen Somontano está situada en la provincia de Huesca, al pie de la Sierra de Guara entre los ríos Alcanadre y Cinca. Barbastro es el principal núcleo de población (figura 4.2). Está formada por un número elevado de pequeños municipios (43 exactamente), pero la mayor parte de los viñedos se encuentran en las proximidades del río Vero, entre Barbastro y Salas. La superficie cultivada con vid en los distintos términos, se aprecia en la tabla 4.3.

Tabla 4.3.- Superficie de viñedo en los términos municipales que componen la denominación de origen Somontano (datos facilitados por la denominación de origen en diciembre de 1994).

Término municipal	Superficie (ha)
Barbastro	279
Castillazuelo	77
Pozán de Vero	130
Salas Altas	478
Salas Bajas	459
otros 38 términos municipales	512
Superficie total	1.935

Las precipitaciones medias anuales se sitúan en torno a 503 mm, pero, no obstante, la mayor parte de los viñedos se encuentra en el fondo de los valles o en las terrazas del río Cinca, por debajo de los 550 m de altitud, donde las cepas gozan de un microclima más benigno, siendo la denominación de origen más agraciada de Aragón en cuanto a clima se refiere. Las sierras están constituidas por calizas, margas y conglomerados, sobre los que se han desarrollado, en las mejores zonas, suelos profundos, permeables y francos, muy aptos para el cultivo de la vid (Lorente y Barbacil, 1994).

Las variedades autorizadas en esta denominación de origen se reseñan junto a su superficie cultivada y su porcentaje respecto al viñedo total en la tabla 4.4.

Tabla 4.4.- Superficie ocupada por las distintas variedades de vid cultivadas en Somontano y su porcentaje respecto al total del viñedo (datos facilitados por la denominación de origen en diciembre de 1993).

Variedades tintas	Superficie (ha)	Porcentaje (%)
Moristel	428	22'10
Tempranillo	434	22'40
Garnacha	62	3'20
Parraleta	4	0'23
Cabernet-Sauvignon	344	17'80
Variedades blancas	Superficie (ha)	Porcentaje (%)
Macabeo	221	11'40
Garnacha blanca	5	0'26
Alcañón	72	3'70
Chardonnay	139	7'20
Otras variedades	Superficie (ha)	Porcentaje (%)
Experimentales	108	5'60
Portainjertos	23	1'20
Común	95	4'90
Superficie total	1.935	

De estas cifras se deduce que esta denominación de origen está en evolución, con introducción de nuevas variedades e incrementando la superficie. A final de los años 80 y principio de los 90, dos grandes empresas, Compañía Vitivinícola Aragonesa S.A. (COVISA)

y Viñedos y Crianzas del Alto Aragón, han plantado nuevas viñas y construido modernas bodegas, dando un impulso importante y decisivo a la denominación de origen. En total, existen actualmente siete bodegas (Lorente y Barbacil, 1994).

4.2.1.3. Características de la viña de Tabuena (Zaragoza)

Se seleccionó la parcela nº 15 tras la prospección sistemática de la necrosis bacteriana en la denominación de origen Campo de Borja, porque en ella se detectó una mayor incidencia de la enfermedad. Está situada en Tabuena (Zaragoza), en el paraje denominado “Pie Gordo”, a más de 800 m de altitud. Posee 2.125 cepas de la variedad Garnacha de 20 años de edad. Se trata de una viña estrecha y larga, con 29 filas de cepas en su parte más ancha y con 95 columnas, en ladera descendente desde una plantación de almendros hasta el camino perimetral de acceso a la viña. La situación de la parcela puede apreciarse en el fotograma HMN352 pasada E fotografía nº 641 del vuelo de agosto de 1990, de escala original 1/20.000, de la Dirección General de Política Alimentaria del MAPA (fotos 4.1 y 4.2).

Se trata de una viña bien cultivada, sin presencia de malas hierbas y donde se apreciaron síntomas de necrosis bacteriana y de otras enfermedades, como oidio, excoriosis y yesca. La parcela poseía un porcentaje bastante elevado (17'1%) de huecos o fallos por muerte de cepas de etiología, inicialmente, desconocida. El suelo tiene una textura franco-arenosa, tipo grueso, es ligeramente alcalino, con contenido medio en materia orgánica, fósforo y magnesio, alto en potasio y poco carbonatado.

4.2.2. Diseño de las prospecciones

Se realizaron dos prospecciones. En ambas, las muestras de los sarmientos que se tomaron fueron de una longitud suficiente para contener, al menos, los tres primeros nudos. Se recolectaron tres sarmientos de una misma cepa que fueron unidos con una cinta aislante y marcados. Las muestras se almacenaron a 4° C hasta su análisis.

4.2.2.1. Prospección en las denominación de origen Campo de Borja y Somontano

Se muestrearon viñas elegidas al azar en cada denominación de origen, realizándose la prospección en el mes de diciembre de 1993, año poco favorable para la expresión de síntomas, ya que la pluviometría media mensual y anual estuvieron muy por debajo de las medias históricas en Aragón. En el apartado 3.2.1 se exponen datos de la estación meteorológica de Cariñena, que puede ser representativa de las escasas incidencias pluviométricas acaecidas en Aragón durante ese año considerado muy seco. El número de viñas seleccionadas fue proporcional a la superficie de cultivo.

En la denominación de origen Somontano el muestreo se dirigió a la zona donde se concentraba el cultivo, es decir, en los cinco términos municipales de Salas Altas, Salas Bajas, Barbastro, Pozán de Vero y Castillazuelo, puesto que representaban el 73'5% de la superficie total del viñedo de esta denominación de origen. En las figuras 4.1 y 4.2 se muestra la localización y distribución de las parcelas de muestreo, asignadas con el uso de fotografías aéreas (fotogramas del vuelo de agosto de 1990 a escala 1/20.000 de la Dirección General de Política Alimentaria del MAPA). Se tomó material de 39 parcelas en Campo de Borja (7.173 ha) y de 11 en Somontano (1.423 ha), representando una intensidad de muestreo entre el 0'5-0'8% de la superficie cultivada de viñedo.

En cada parcela elegida se muestrearon diez cepas que fueron seleccionadas al azar, pero homogéneamente repartidas, en la diagonal mayor de cada parcela de cultivo concreta. Por tanto, se muestrearon 500 cepas (390 en Campo de Borja y 110 en Somontano). Como es sabido que *X. ampelinus* no se distribuye de forma regular en el interior de la planta, de cada cepa se tomaron tres sarmientos, uno de cada brazo de la cepa. El número total de sarmientos analizados fue de 1.500 (1.170 en Campo de Borja y 330 en Somontano). En el momento de la toma de muestras se observaron las cepas de la parcela, anotando aquéllas donde se apreciaron síntomas de necrosis bacteriana.

4.2.2.2. Prospección en la viña de Tabuena

En diciembre de 1994, un año después de haber realizado la prospección en las denominaciones de origen antes mencionadas, se recolectaron 2.010 sarmientos de 670 cepas

Figura 4.1.- Localización de la denominación de origen del Campo de Borja. Distribución de las 39 parcelas muestreadas.

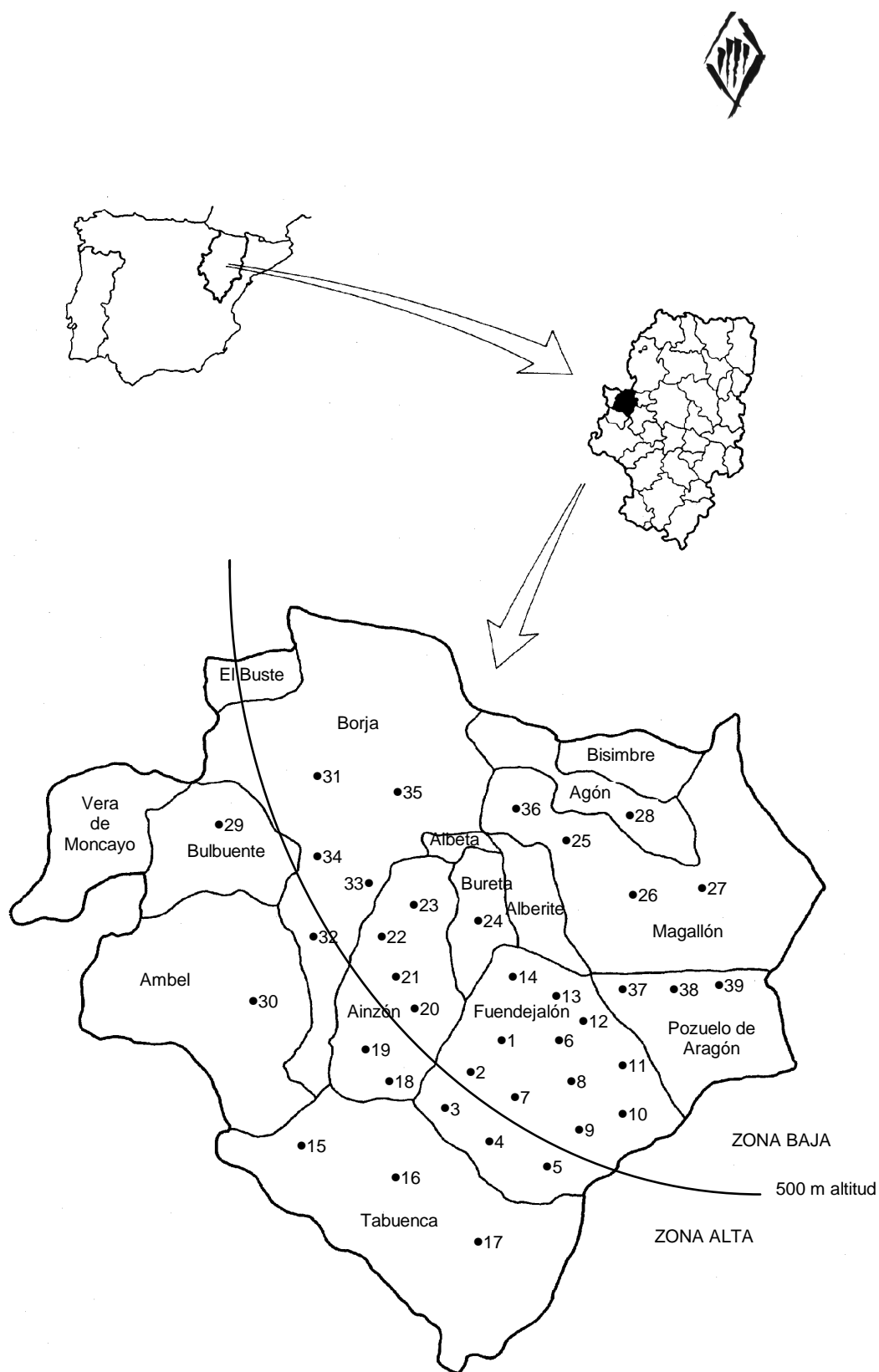
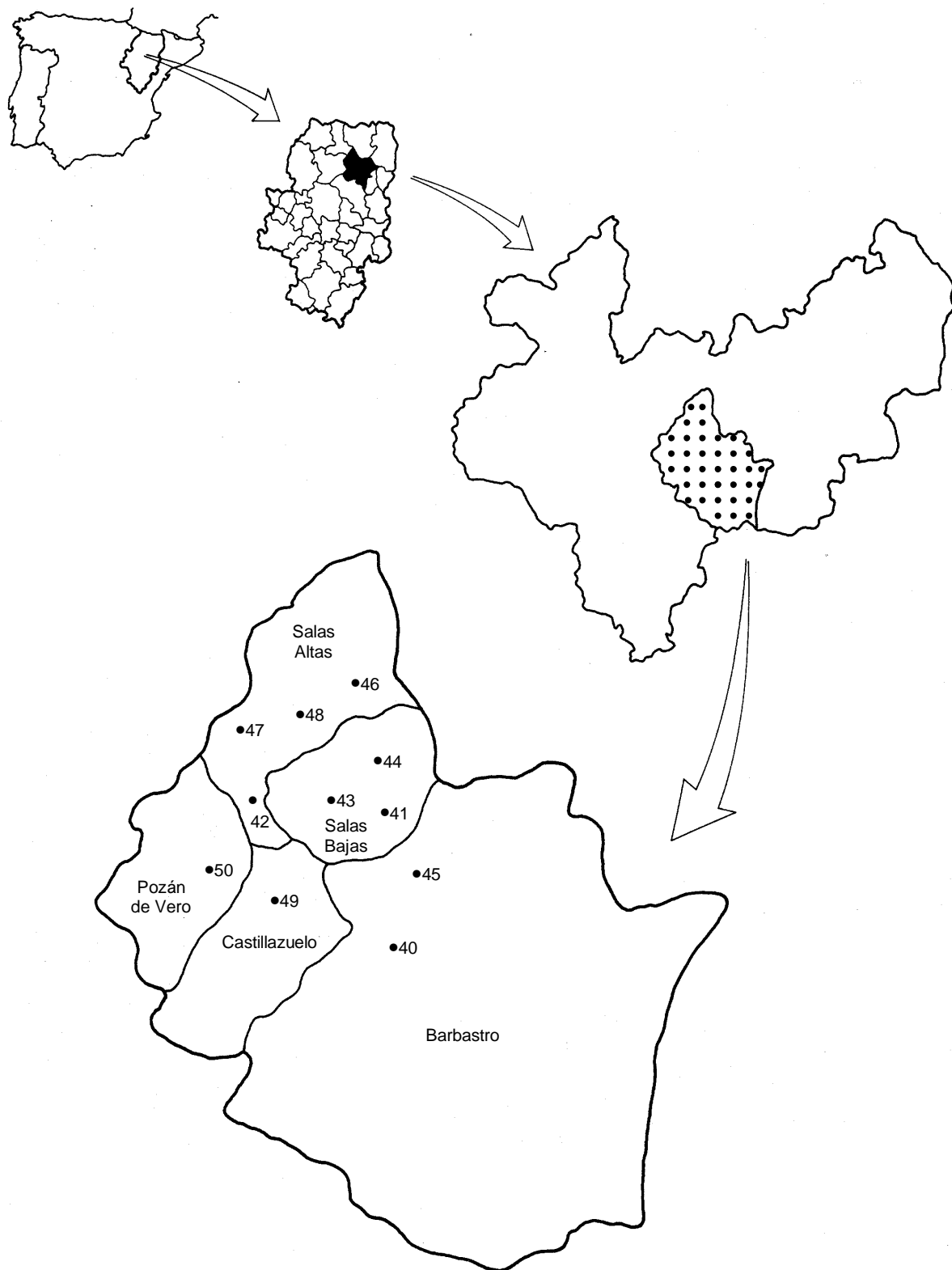


Figura 4.2.- Localización de la denominación de origen Somontano. Distribución de las 11 parcelas muestreadas en los términos municipales prospectados.



ubicadas en una subparcela de la viña nº 15 en Tabuena (Zaragoza). También 1994 fue un año de escasa pluviometría en Aragón (ver apartado 3.2.1). El aspecto de la viña en invierno y verano, así como la localización de la parcela en relación con la localidad de Tabuena y de la subparcela en la viña puede apreciarse en las ampliaciones del fotograma HMN352 pasada E fotografía nº 641 (MAPA), efectuadas con ayuda de una lupa binocular (6x-45x) (fotos 4.1 a 4.5).

4.2.3. Métodos de análisis

4.2.3.1. Técnica ELISA-DASI

Los tres sarmientos de cada cepa muestreada fueron individualmente analizados mediante la técnica ELISA-DASI-biotina/estreptoavidina, utilizando los anticuerpos monoclonales y el método de lavado interno, descritos anteriormente en los apartados 1.2.4.4 y 3.2.2 de esta Memoria, respectivamente. El volumen de solución de lavado fue de 10-12 ml. Como testigo negativo se utilizó el fluido de lavado interno de sarmientos de la variedad Cardinal, libres de *X. ampelinus*, procedentes de Vall de Flors (Valencia) y como control positivo una suspensión de 10^7 ufc/ml de la cepa de *X. ampelinus* 60.7 en AFT. Se utilizaron dos pocillos por placa para cada muestra de la prospección. Se consideró como positiva toda reacción que proporcionó una absorbancia igual o superior al doble de la obtenida con la media de las absorbancias de los controles negativos.

4.2.3.2. Otras técnicas utilizadas

En la prospección sistemática realizada en las dos denominaciones de origen, se seleccionaron 30 extractos obtenidos de los sarmientos que procedían de las parcelas 15, 18, 19, 20, 23 y 27, para contrastar los resultados obtenidos mediante la técnica ELISA-DASI con otras técnicas. En esta selección se incluyeron todos los extractos con los que se habían obtenido resultados positivos, así como cinco negativos de las citadas parcelas.

Se tomó 1 ml de cada extracto para realizar siembras en el medio de cultivo LPGA y 40 ml para dispensarlos en portas para inmunofluorescencia. Se sembraron tres diluciones,

realizadas a partir del extracto utilizado en la técnica ELISA. Las placas de cultivo (con medio LPGA) se incubaron durante 14 días a 25° C y las colonias con morfología típica que crecieron fueron estudiadas, realizando las pruebas de caracterización descritas en el capítulo 2. En la realización de la técnica IF, fueron utilizados los mismos anticuerpos monoclonales que en ELISA, siguiendo el protocolo descrito en el capítulo 2.

4.2.4. Análisis estadístico de la dispersión de la enfermedad

Los datos obtenidos en la prospección efectuada en la parcela de Tabuena fueron únicamente utilizados para estudiar la dispersión espacial de la enfermedad. No ha podido realizarse un estudio temporal, por disponer sólo de datos de un año, lo que resulta insuficiente para hacer una aproximación a algunos de los modelos conocidos de Van der Plank (1963) (Gottwald *et al.*, 1996).

El análisis espacial ha sido empleado para conocer los niveles de agregación por filas o columnas de la parcela (se consideraron filas las vides en dirección N-E y columnas en la dirección N-O (ver fotos 4.1, 4.2 y 4.3 y figura 4.3). Para ello se utilizaron los siguientes análisis e índices:

a) Ordinary runs analysis (ORA).- Mediante este análisis se pretendía ver si en las parcelas estudiadas existía agregación de vides enfermas, por filas o por columnas dentro de la parcela (Modjeska y Rawlings, 1983). Para este análisis se requería conocer los siguientes parámetros:

n = número de vides enfermas por fila o columna.

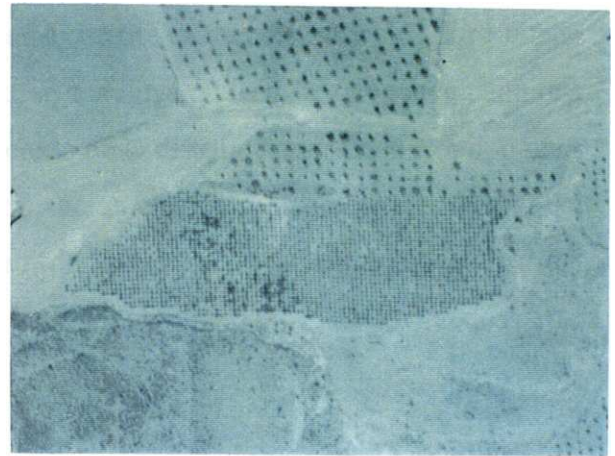
N = número total de vides por fila o columna.

Runs = número de saltos o número de plantas con igual signo (grupos en **negrita** en la figura 4.3).

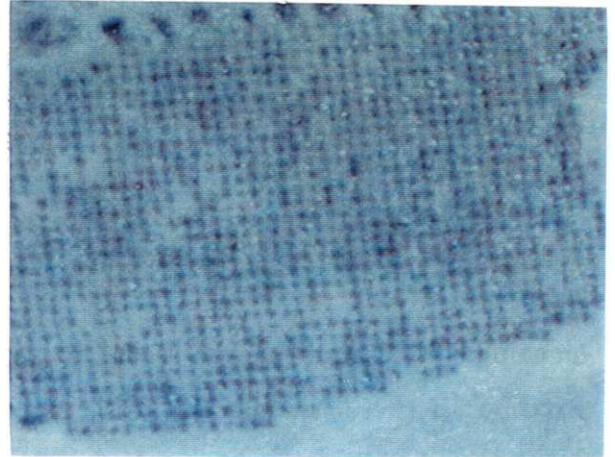
Se realizaron dos análisis diferentes. En uno de ellos se consideraron las faltas como vides sanas y, en el segundo de ellos, como causadas por la enfermedad. Con estos datos, el ORA determina que no existe agregación por fila o por columna cuando el resultado del análisis Z sea menor que $-1'64$ (con un nivel de significación $P = 0'05$).



4.1



4.2



4.3



4.4



4.5

Parcela situada en el paraje “Pie Gordo” de Tabuena (Zaragoza):

Foto 4.1.- Situación de la parcela (ampliación fotograma HMN 352 pasada E fotografía 641) en relación con la localidad de Tabuena (Zaragoza).

Foto 4.2.- Detalle del conjunto de la parcela.

Foto 4.3.- Detalle de la subparcela donde se realizó la prospección.

Foto 4.4.- Aspecto de la parcela en invierno.

Foto 4.5.- Aspecto de la parcela en verano.

- b) F - test.- Este análisis mide el grado de desorden existente en una distribución. El resultado de esta prueba es un valor F_0 . Si $F_0 > F\text{-statistic}$, se concluye que existe agregación, con una significación p , siendo $F\text{-statistic}$ un valor obtenido de la distribución F-Snedecor con unos grados de libertad concretos y el nivel de significación elegido. Los grados de libertad del denominador son $n-1$ (siendo n el número de *quadrats* o subparcelas) y los del denominador infinito (Ostle, 1972).
- c) Lloyd's index of patchiness (LIP).
- d) Índice de dispersión de Morisita (MI).

Con el fin de poder trabajar con estos índices y con el test-F, la parcela se subdividió en subparcelas (*quadrats*) de 2x2, 2x3, 4x6 y 8x15, para lo cual, y con la intención de hacer la parcela regular, no se contabilizaron las filas 1, 2, 3, 28 y 29 de la figura 4.3.

En el caso del índice de Morisita se considera que la enfermedad está regularmente distribuida si $MI < 1$, al azar si $MI = 1$ y en agregados si $MI > 1$ (Morisita, 1959). El índice de Lloyd LIP tiene una interpretación similar al índice de Morisita (Gottwald *et al.*, 1993 y Gottwald *et al.*, 1996).

Para realizar estos análisis estadísticos se ha empleado el programa informático LOCR2 (Gottwald *et al.*, 1992b), amablemente cedido por el Dr. T.R. Gottwald del Agricultural Research Laboratory del USDA de Orlando (Florida, USA).

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Resultados de la prospección en la denominación de origen Campo de Borja y Somontano

En las figuras 4.1 y 4.2 y en la tabla 4.5 se puede observar la distribución de las parcelas en cada denominación de origen y en las tablas 4.6 y 4.7 las características de las parcelas muestreadas.

Tabla 4.5.- Número de parcelas muestreadas y su distribución en las denominaciones de origen Campo de Borja y Somontano.

Término Municipal	Total ha viña	Nº parcelas muestreadas		Total
		Zona alta >550 m	Zona baja <550 m	
Agón	80	-	1	1
Ainzón	1.096	2	4	6
Alberite	60	-	-	-
Albeta	15	-	-	-
Ambel	120	1	-	1
Bisimbre	60	-	-	-
Borja	250	1	4	5
Bulbuenta	85	1	-	1
Bureta	225	-	1	1
El Buste	55	-	-	-
Fuendejalón	2.608	3	11	14
Magallón	642	-	4	4
Pozuelo de Aragón	600	-	3	3
Tabuenca	533	3	-	3
Vera de Moncayo	40	-	-	-
Total Campo de Borja	7.173	11	28	39
Barbastro	279	-	2	2
Castillazuelo	77	-	1	1
Pozán de Vero	130	-	1	1
Salas Altas	478	-	4	4
Salas Bajas	459	-	3	3
Total Somontano*	1.423	-	11	11

* Área prospectada en Somontano

Tabla 4.6.- Características de las parcelas muestreadas en la denominación de origen Campo de Borja.

Nº parcela	Término municipal	Paraje	Nº cepas	Edad	Variedad	Altitud (m)
1	Fuendejalón	El Juncalillo / Ctra. Tabuena, km 5	400	0-10	Garnacha	450-500
2	Fuendejalón	La Huecha	500	20-30	Garnacha	500-550
3	Fuendejalón	Cocorueta / Barranco Molino	300	20-30	Garnacha	550-600
4	Fuendejalón	Filludo	300	10-20	Garnacha	550-600
5	Fuendejalón	Cabezo del olivo	500	30-40	Garnacha	550-600
6	Fuendejalón	Landillas	350	20-30	Garnacha	450-500
7	Fuendejalón	Cañada del Rubio	500	20-30	Garnacha	500-550
8	Fuendejalón	Azubias	1.300	10-20	Garnacha	450-500
9	Fuendejalón	La Planilla	>1.500	10-20	Tempranillo	450-500
10	Fuendejalón	Los Corrales	>1.500	30-40	Garnacha	450-500
11	Fuendejalón	Barranco de Fontella	250	30-40	Garnacha	400-450
12	Fuendejalón	El Ginestar	2.500	20-30	Garnacha	450-500
13	Fuendejalón	Huertas - pueblo	600	0-10	Garnacha	450-500
14	Fuendejalón	Plano Alto / champiñonera	4.300	10-20	Garnacha	450-500
15	Tabuena	Pie Gordo	2.100	10-20	Garnacha	>800
16	Tabuena	Callejuela / balsa	1.000	10-20	Garnacha	700-750
17	Tabuena	Rané	1.200	10-20	Garnacha	650-700
18	Ainzón	Corrales Roma	1.100	20-30	Garnacha	650-700
19	Ainzón	Bolloncillos	600	20-30	Garnacha	700-750
20	Ainzón	Machuquillo	2.140	10-20	Garnacha	450-500
21	Ainzón	El Tormo	1.225	10-20	Garnacha	450-500
22	Ainzón	Pandiñaruela	1.050	20-30	Macabeo	400-450
23	Ainzón	km 1'300 Ctra. Tabuena	750	0-10	Tempranillo	400-450
24	Bureta	La Nava / balsa	500	20-30	Garnacha	400-450
25	Magallón	Huertas	2.200	10-20	Macabeo	350-400
26	Magallón	El Plano	2.250	30-40	Garnacha	350-400
27	Magallón	Santuario San Sebastián	2.500	10-20	Garnacha	350-400
28	Magallón	La Nava	800	30-40	Garnacha	350-400
29	Bulbuenta	Cabezatón	3.000	40-50	Garnacha	550-600
30	Ambel	Valdecabras	600	20-30	Tempranillo	600-650
31	Borja	La Gotera	450	10-20	Garnacha	450-500
32	Borja	Campellas	4.000	20-30	Garnacha	550-600
33	Borja	Campo	1.600	30-40	Garnacha	450-500
34	Borja	Campo	240	10-20	Tempranillo	450-500
35	Borja	Porroyo Cogullota	665	20-30	Garnacha	450-500
36	Magallón	Camino de las Tablas	1.100	30-40	Garnacha	350-400
37	Pozuelo	Rambla	450	10-20	Garnacha	400-450
38	Pozuelo	Barranco del Bayo	1.700	20-30	Garnacha	350-400
39	Pozuelo	La Mayada	850	40-50	Garnacha	300-350

Tabla 4.7.- Características de las parcelas muestreadas en la denominación de origen Somontano.

Nº parcela	Término municipal	Paraje	Nº cepas	Edad	Variedad	Altitud (m)
40	Barbastro	Bodega Lalane	2.470	0-10	Cabernet-Sauvignon	300-350
41	Salas Bajas	Barranco Fuster	574	10-20	Tempranillo	400-450
42	Salas Altas	-	560	30-40	Moristel	400-450
43	Salas Bajas	Barranco Fonciellas	1.200	20-30	Moristel	400-450
44	Salas Bajas	pueblo / COVISA	5.750	10-20	Macabeo	450-500
45	Barbastro	San Marcos	3.300	10-20	Tempranillo	400-450
46	Salas Altas	Camino cementerio	3.000	10-20	Moristel	400-450
47	Salas Altas	Barranco Cebeñera	740	20-30	Tempranillo	450-500
48	Salas Altas	Balsa Nueva	1.350	10-20	Tempranillo	450-500
49	Castillazuelo	Huertas pueblo	2.550	0-10	Tempranillo	350-400
50	Pozán de Vero	Monte	630	10-20	Tempranillo	400-450

En las 50 parcelas muestreadas al azar, proporcionalmente al área de cultivo de cada denominación de origen estudiada, 11 estuvieron situadas a más de 550 m de altitud (todas ellas en Campo de Borja) y 39 por debajo de dicha altitud (28 en Campo de Borja y 11 en Somontano). Se tuvo en cuenta el dato de altitud, ya que se ha afirmado que, en Aragón, la enfermedad se desarrolla preferentemente a cierta altura sobre el nivel del mar (López, 1983).

La intensidad del muestreo en Campo de Borja y Somontano estuvo entre el 0'5-0'8% de la superficie cultivada de viñedo, es decir, una parcela cada 184 ha o cada 129 ha de viña, respectivamente. Se estimó que la parcela media en Campo de Borja tenía una superficie de 0'65 ha y de 1'6 ha en Somontano, por lo que se muestreó aproximadamente el 0'35% y el 1'2% de las parcelas existentes. Si se acepta que la densidad media de plantación en Aragón es de 2.000 cepas /ha, el muestreo que se efectuó representó el 2'7‰ y el 3'9‰ de las cepas cultivadas en Campo de Borja y Somontano, respectivamente.

Todas las parcelas donde se observaron síntomas sospechosos de la enfermedad (parcelas nº 4, 5, 15, 19 y 20) pertenecían a Campo de Borja y estaban situadas por encima de los 550 m de altitud. La parcela nº 15 fue la única donde se observaron chancros típicos producidos por *X. ampelinus*.

De las 39 parcelas muestreadas en Campo de Borja, 33 eran de la variedad Garnacha, cuatro de Tempranillo y dos de Macabeo o Viura. En Somontano, la variedad Tempranillo fue la más representada, en seis de las 11 parcelas muestreadas. Las variedades cultivadas en las restantes parcelas fueron Moristel (tres parcelas), Macabeo (una parcela) y Cabernet-Sauvignon (una parcela).

En la tabla 4.8 y figura 4.3 se muestran los resultados obtenidos mediante la técnica ELISA-DASI con los 30 sarmientos tomados en cada una de las 39 parcelas de la denominación de origen Campo de Borja y en la tabla 4.9 y figura 4.4, los obtenidos en las 11 parcelas de Somontano. En la tabla 4.10 se exponen las d.o. medias de los valores obtenidos con los sarmientos diagnosticados como positivos mediante ELISA-DASI, las d.o. medias de los siete testigos negativos incluidos en sus respectivas placas ELISA, junto con sus desviaciones típicas, así como el número de la parcela, municipio, número de cepa y número de sarmiento de cada valor.

Las comprobaciones mostraron que mediante IF fue posible observar células con la morfología característica de *X. ampelinus* en aquellas muestras que mediante la técnica ELISA habían dado positivas, y cuyos resultados fueron contrastados. Tan sólo en tres casos, todos ellos pertenecientes a la parcela nº 15, se logró aislar *X. ampelinus* a partir de las siembras realizadas, concretamente los sarmientos 7-2, 7-3 y 10-3.

En Campo de Borja se detectó *X. ampelinus* o sus antígenos en 6 de las 10 localidades muestreadas (figura 4.3) y en 17 de las 39 parcelas analizadas. Esto supuso un 43'6% de las parcelas, 14 de ellas de la variedad Garnacha, dos de Tempranillo y una parcela de Macabeo. Los resultados de los análisis realizados indicaron que en la zona alta (>550 m de altitud) se detectaron más parcelas con *X. ampelinus* que en la zona baja (<550 m). En la zona alta, además, se detectaron más cepas afectadas y más sarmientos con *X. ampelinus*. Efectivamente, el 63'6% de las parcelas, el 15'5% de las cepas y el 7'3% de los sarmientos analizados y recolectados en la zona alta de Campo de Borja resultaron infectados, frente al 35'7, 7'1 y 2'7%, respectivamente, de la zona baja. De los 330 sarmientos analizados en la zona alta, en 24 se detectó la bacteria y tan sólo en 23 de los 840 recolectados en la zona baja.

Tabla 4.8.- Análisis, mediante ELISA-DASI, de 1.170 sarmientos de 39 parcelas pertenecientes a la denominación de origen Campo de Borja.

	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5	Cepa 6	Cepa 7	Cepa 8	Cepa 9	Cepa 10																												
nº parcela	Sarmientos analizados por cepa																																					
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3								
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
3	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
15	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
20	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ d.o. superior al doble de la del testigo negativo.
 - d.o. no superior al doble de la del testigo negativo.

Figura 4.3.- Campo de Borja. Localización de las parcelas en las que se detectó *X. ampelinus* (⊕).

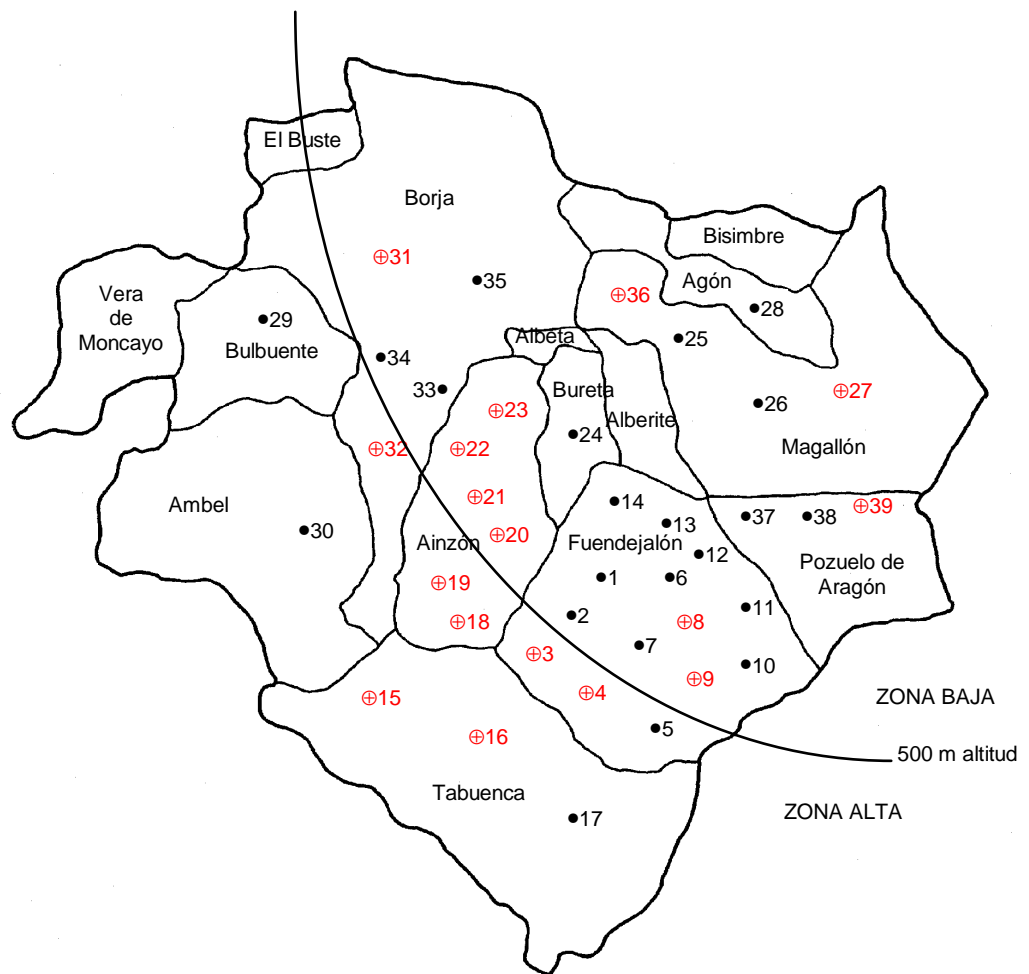


Tabla 4.9.- Análisis, mediante ELISA-DASI, de 330 sarmientos de 11 parcelas pertenecientes a la denominación de origen Somontano.

	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5	Cepa 6	Cepa 7	Cepa 8	Cepa 9	Cepa 10
n° parcela	Sarmientos analizados por cepa									
	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3
40	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
41	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
42	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
43	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
44	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
45	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
46	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
47	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
48	+ - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
49	- - -	+ - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
50	- - -	- - -	- - -	- - +	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -

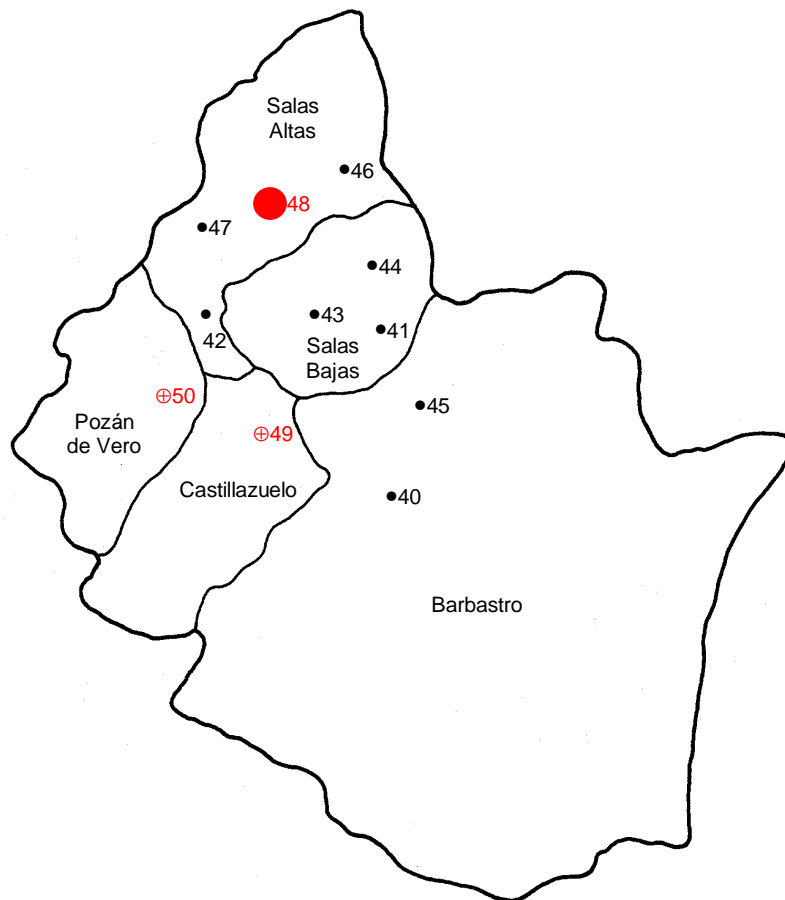
+ d.o. superior al doble de la del testigo negativo
 - d.o. no superior al doble de la del testigo negativo

En total se detectó *X. ampelinus* en Campo de Borja en 37 cepas de las 390 analizadas (9'5% de las cepas) y en 47 de los 1.170 sarmientos (4'0%). La parcela n° 5 fue la única donde, a pesar de haberse apreciado síntomas relativamente sospechosos de la necrosis bacteriana, no fue posible detectar serológicamente ni aislar *X. ampelinus* con ninguna de las técnicas utilizadas, por lo que se supone que la sintomatología observada correspondía a la de alguna otra enfermedad.

En la denominación de origen Somontano sólo se detectó *X. ampelinus* o sus antígenos en tres sarmientos pertenecientes a cepas y parcelas diferentes, situadas en tres términos municipales (figura 4.4). Es decir, en el 0'9% de los sarmientos analizados, en el 2'7% de las cepas, en el 27'3% de las parcelas (todas de la variedad Tempranillo) y en tres de los cinco términos municipales muestreados.

En el conjunto de la prospección realizada en las dos denominaciones de origen, se ha detectado *X. ampelinus* en 20 de las 50 parcelas estudiadas (40%), en 40 de 500 cepas muestreadas (8%) y en 50 de los 1.500 sarmientos analizados (3'3%).

Figura 4.4.- Somontano. Localización de las parcelas en las que se detectó *X. ampelinus* (●).



En la tabla 4.10 se puede apreciar que en la mayoría de las parcelas con sarmientos infectados (11 de las 20 parcelas), sólo fue posible detectar *X. ampelinus* en un sarmiento de los 30 analizados en cada parcela. En las nueve parcelas restantes, hubo un número variable de plantas con *X. ampelinus*, con un máximo de cinco plantas positivas (parcelas 3 y 20) y un máximo de 10 sarmientos infectados (parcela 15).

No se detectó por igual la bacteria o sus antígenos en los tres brazos analizados de una misma cepa. En la mayoría de los casos (32 de 40 cepas) tan sólo se detectó en uno de los tres brazos, en seis casos en dos de los brazos, y en dos casos en los tres sarmientos analizados (parcela 15, cepas 7 y 10).

4.3.2. Distribución de la enfermedad en la parcela de Tabuena

Los valores medios de la d.o. alcanzada con muestras procedentes de la parcela de Tabuena (Zaragoza), y diagnosticadas como positivas, se exponen en la tabla 4.11. La distribución espacial en la parcela de las cepas y de los sarmientos enfermos queda reflejada en la figura 4.5.

La subparcela donde se efectuó el muestreo podía albergar 808 cepas, pero existía un alto porcentaje (17'1%) de faltas o fallos, por lo que el número total de cepas de donde fue posible recolectar los sarmientos utilizados en los análisis como muestras fueron sólo 670. En la parcela se observaron muertes de plantas causadas por el hongo *Stereum hirsutum*, causante de la enfermedad denominada yesca o apoplejía, aunque existe gran cantidad de cepas con rebrotes del patrón. Probablemente, la responsabilidad de las faltas deba ser compartida por *S. hirsutum* y *X. ampelinus*.

Según el resultado de los análisis efectuados sobre sarmientos procedentes de la subparcela de Tabuena, 184 de los 2.010 sarmientos analizados estaban enfermos (9'1%). Estos sarmientos pertenecían al 21'6% de las cepas de la subparcela (145 cepas de 670). En la mayor parte de las cepas enfermas (112) sólo se detectó *X. ampelinus* o sus antígenos en uno de los tres sarmientos, en 27 casos lo fue en dos sarmientos y en seis ocasiones en los tres sarmientos recolectados de esa cepa. Esto representó el 77'2%, 18'6% y 4'1% de los casos, respectivamente.

Tabla 4.10.- Localización y características de las muestras con resultados positivos obtenidos mediante ELISA-DASI, procedentes de las denominaciones de origen Campo de Borja y Somontano.

Parcela nº	Municipio	Muestras positivas			Testigos negativos
		Cepa nº	Sarmiento nº	d.o. media \pm σ (x 1000)	d.o. media \pm σ (x 1000)
3	Fuendejalón	1	3	392 \pm 23	140 \pm 17
		2	1	288 \pm 17	
			2	307 \pm 34	
		6	3	322 \pm 39	
		7	1	302 \pm 19	
		10	2	470 \pm 7	
4	Fuendejalón	4	2	2.479 \pm 59	140 \pm 17
		8	2	309 \pm 11	
8	Fuendejalón	2	2	486 \pm 18	175 \pm 37
9	Fuendejalón	7	1	307 \pm 6	140 \pm 17
		10	2	301 \pm 37	
			3	320 \pm 10	
15	Tabuena	1	1	2.972 \pm 51	161 \pm 36
			3	2.557 \pm 36	
		4	2	1.801 \pm 120	
			3	2.194 \pm 91	
		7	1	841 \pm 18	
			2	2.888 \pm 59	
			3	2.556 \pm 116	
		10	1	734 \pm 37	
	2	964 \pm 63	154 \pm 37		
	3	1.389 \pm 47			
16	Tabuena	6	1	1.109 \pm 83	154 \pm 37
		9	3	411 \pm 103	
18	Ainzón	6	1	376 \pm 7	161 \pm 36
19	Ainzón	2	1	428 \pm 64	161 \pm 36
		8	3	307 \pm 11	
20	Ainzón	1	1	568 \pm 30	156 \pm 28
		2	3	366 \pm 17	
		4	2	328 \pm 13	
			3	1.713 \pm 125	
		6	3	1.111 \pm 58	
		8	2	351 \pm 3	
21	Ainzón	6	1	361 \pm 18	148 \pm 28
22	Ainzón	7	1	322 \pm 22	156 \pm 28
23	Ainzón	2	2	580 \pm 99	156 \pm 28
		4	1	364 \pm 16	
		6	2	327 \pm 39	
			3	315 \pm 21	
		10	3	393 \pm 25	
27	Magallón	10	2	360 \pm 6	148 \pm 17
31	Borja	7	3	428 \pm 30	187 \pm 33
32	Borja	1	2	580 \pm 2	187 \pm 33
36	Magallón	3	1	285 \pm 28	112 \pm 21
		7	3	426 \pm 15	
		9	2	272 \pm 19	
39	Pozuelo	7	2	300 \pm 37	112 \pm 21
48	Salas Altas	1	1	321 \pm 27	106 \pm 16
49	Castillazuelo	2	1	360 \pm 23	161 \pm 27
50	Pozán de Vero	4	3	348 \pm 19	161 \pm 27

Las parcelas nº 48, 49 y 59 pertenecen a la denominación de origen Somontano.

Tabla 4.11.- Valores medios de la d.o. alcanzada con las muestras procedentes de la parcela de “Pie Gordo” de Tabuena (Zaragoza), que superaron el doble de la media de la d.o. de los testigos negativos, mediante la técnica ELISA-DASI.

n° placa	Densidad óptica (x 1000)			n° muestra
	Media T (+) $\pm \sigma$	Media T (-) $\pm \sigma$	Media muestra $\pm \sigma$	
1	2.644 \pm 79	143 \pm 19	341 \pm 38	1-15-1
			370 \pm 51	1-15-2
			293 \pm 6	1-15-3
			313 \pm 22	1-7-3
			311 \pm 17	2-1-1
2	1.539 \pm 150	137 \pm 48	359 \pm 25	2-13-3
4	2.025 \pm 128	164 \pm 10	368 \pm 7	15-24-2
			3.373 \pm 37	15-24-3
5	2.324 \pm 331	102 \pm 14	322 \pm 34	15-18-2
			560 \pm 1	14-17-2
			590 \pm 7	15-18-3
7	3.105 \pm 382	125 \pm 25	349 \pm 18	13-25-3
8	3.182 \pm 30	123 \pm 30	318 \pm 9	9-28-2
			484 \pm 150	13-30-1
			591 \pm 71	9-28-3
10	2.272 \pm 220	170 \pm 18	420 \pm 5	5-17-2
			355 \pm 3	13-19-1
11	2.980 \pm 6	140 \pm 17	333 \pm 60	9-24-3
			295 \pm 12	9-20-3
			408 \pm 62	6-19-2
			3.503 \pm 51	9-27-2
			308 \pm 6	9-18-3
12	3.167 \pm 16	124 \pm 25	408 \pm 10	12-19-3
			282 \pm 11	2-17-2
			3.201 \pm 76	9-25-3
			457 \pm 18	2-17-3
			330 \pm 23	6-25-2
			443 \pm 15	6-25-3
			379 \pm 35	3-20-1
			378 \pm 89	2-19-2
			366 \pm 65	12-17-3
			316 \pm 50	12-28-2
			360 \pm 32	9-22-3
13	3.087 \pm 11	118 \pm 22	351 \pm 37	19-9-3
			516 \pm 16	18-8-2
			411 \pm 24	2-16-3
			323 \pm 57	9-26-1
			455 \pm 89	18-13-1
			3.193 \pm 59	18-10-2
14	3.412 \pm 13	118 \pm 16	709 \pm 37	28-14-3
15	3.334 \pm 119	123 \pm 22	284 \pm 28	25-14-3
			294 \pm 21	22-10-1
			279 \pm 67	22-6-1
16	3.334 \pm 118	126 \pm 27	282 \pm 44	25-1-3
17	1.157 \pm 164	93 \pm 19	412 \pm 115	13-14-2
18	1.672 \pm 10	110 \pm 18	379 \pm 60	19-10-3
19	1.465 \pm 70	130 \pm 16	422 \pm 30	7-5-1
			384 \pm 45	19-4-3
			842 \pm 56	13-8-2
			296 \pm 33	10-14-1
			315 \pm 51	4-7-2
			346 \pm 10	7-13-1
			276 \pm 11	4-14-2
			294 \pm 42	10-11-1
			313 \pm 42	10-10-3
20	1.382 \pm 157	118 \pm 28	374 \pm 7	4-6-2
			764 \pm 101	3-3-2
			402 \pm 39	7-3-1
			258 \pm 13	4-2-3
			304 \pm 14	3-4-2

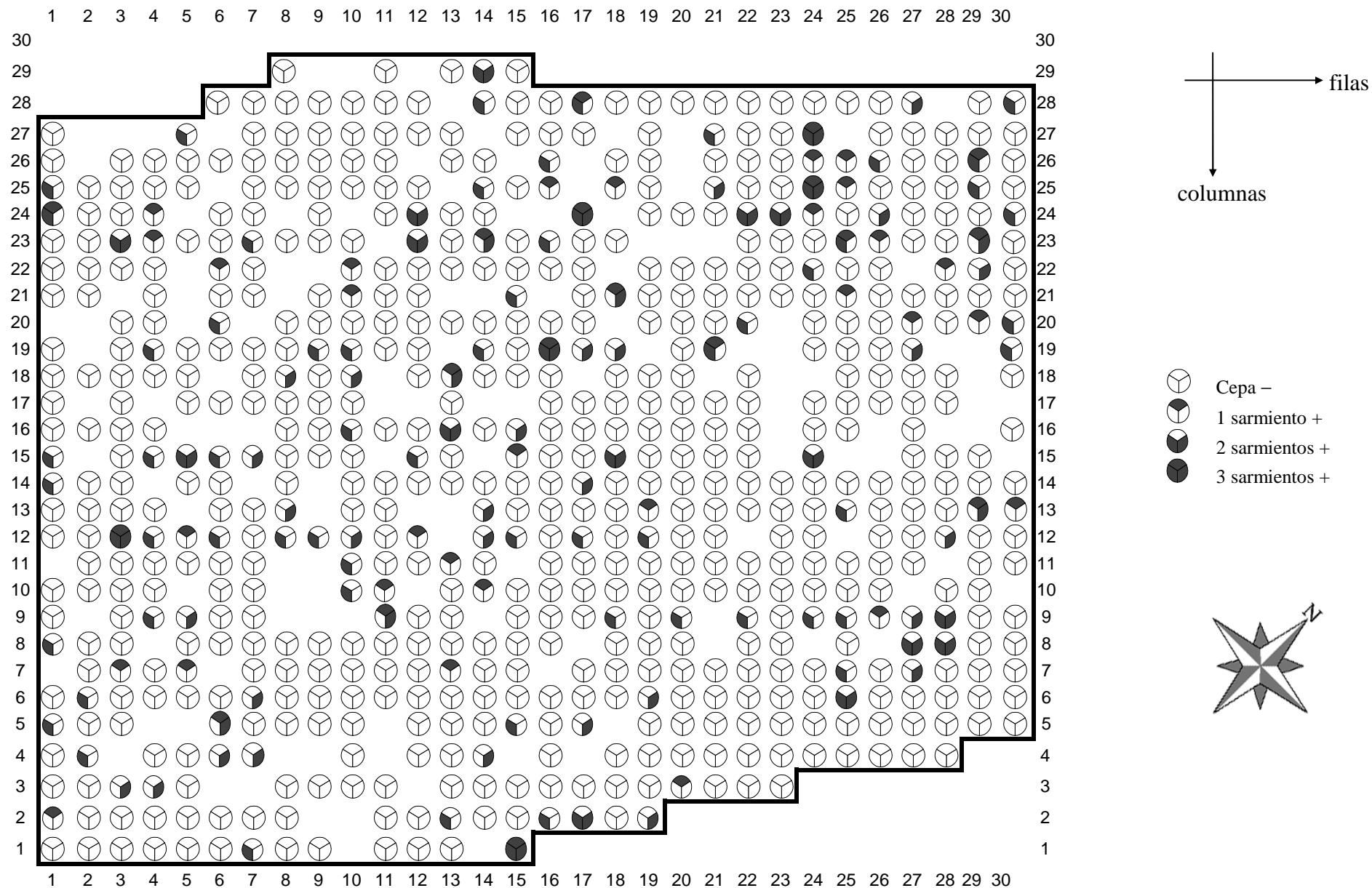
Tabla 4.11.- (continuación)

n° placa	Densidad óptica (x 1000)			n° muestra
	Media T (+) $\pm \sigma$	Media T (-) $\pm \sigma$	Media muestra $\pm \sigma$	
21	1.301 \pm 80	114 \pm 20	474 \pm 47	9-5-2
			314 \pm 52	9-4-3
			320 \pm 39	9-11-1
			418 \pm 99	9-11-2
22	3.452 \pm 13	173 \pm 38	472 \pm 116	6-7-2
			3.453 \pm 14	6-2-3
23	2.465 \pm 213	112 \pm 9	256 \pm 13	5-15-3
			2.618 \pm 53	15-1-3
24	1.210 \pm 144	117 \pm 13	443 \pm 1	8-1-3
			252 \pm 17	24-12-2
			283 \pm 21	5-6-1
			242 \pm 3	24-12-3
			2.601 \pm 36	5-1-3
25	2.726 \pm 114	121 \pm 10	290 \pm 19	5-6-2
			478 \pm 64	23-14-1
			375 \pm 0	23-7-3
			256 \pm 9	23-14-2
26	3.131 \pm 27	170 \pm 26	422 \pm 2	24-1-1
			389 \pm 37	24-1-3
			518 \pm 6	18-13-2
			260 \pm 38	29-14-2
27	1.634 \pm 22	89 \pm 19	423 \pm 33	12-15-3
			3.392 \pm 14	29-14-3
			252 \pm 17	19-14-3
			311 \pm 18	24-4-1
			284 \pm 14	12-4-3
			293 \pm 71	23-12-2
			220 \pm 6	23-12-3
			233 \pm 37	20-6-3
			203 \pm 4	21-15-3
			133 \pm 9	23-3-2
28	1.740 \pm 5	62 \pm 20	208 \pm 28	21-10-1
			146 \pm 6	23-3-3
			387 \pm 19	19-30-3
			186 \pm 16	22-29-2
30	2.301 \pm 96	83 \pm 23	273 \pm 12	20-22-3
			261 \pm 4	20-30-3
32	2.029 \pm 82	89 \pm 30	331 \pm 44	7-25-3
			190 \pm 8	21-25-1
			1.137 \pm 37	23-16-3
			191 \pm 1	23-25-1
			235 \pm 30	19-17-2
			214 \pm 27	20-29-1
			248 \pm 8	22-28-1
			271 \pm 64	23-25-3
			193 \pm 1	23-26-1
			210 \pm 38	19-21-3
			182 \pm 30	19-16-2
			198 \pm 17	28-17-1
			178 \pm 16	19-16-3
216 \pm 27	28-17-3			
267 \pm 19	20-27-1			
192 \pm 4	22-24-3			
215 \pm 29	19-27-2			
219 \pm 28	19-18-2			
192 \pm 18	23-29-1			
213 \pm 10	28-30-3			
155 \pm 2	23-29-2			
245 \pm 53	21-18-1			
201 \pm 22	19-21-1			
211 \pm 10	21-18-2			
174 \pm 22	19-16-1			

Tabla 4.11.- (continuación)

n° placa	Densidad óptica (x 1000)			n° muestra
	Media T (+) $\pm \sigma$	Media T (-) $\pm \sigma$	Media muestra $\pm \sigma$	
36	2.007 \pm 95	73 \pm 16	233 \pm 33	27-21-3
			196 \pm 10	28-27-2
			161 \pm 2	26-16-3
			257 \pm 5	26-25-1
37	1.726 \pm 68	55 \pm 7	270 \pm 17	25-21-2
			167 \pm 44	26-24-1
			148 \pm 3	27-24-1
			207 \pm 6	25-29-3
			153 \pm 38	27-24-2
			132 \pm 6	25-16-1
			171 \pm 32	27-24-3
			238 \pm 14	24-30-3
			165 \pm 8	25-24-1
			126 \pm 7	24-23-2
			145 \pm 23	25-24-2
			127 \pm 2	24-23-3
			157 \pm 30	25-24-3
120 \pm 5	24-24-1			
38	1.472 \pm 202	64 \pm 15	167 \pm 3	24-26-2
			175 \pm 5	26-29-1
			191 \pm 51	25-18-1
			159 \pm 22	24-17-1
			236 \pm 17	26-29-3
			156 \pm 14	24-22-2
			234 \pm 17	24-17-2
			159 \pm 14	24-22-3
			176 \pm 45	24-17-3
39	1.972 \pm 71	123 \pm 20	241 \pm 1	25-25-1
			306 \pm 50	26-26-3
41	1.796 \pm 40	59 \pm 23	145 \pm 1	7-27-2
			169 \pm 2	8-27-2
			241 \pm 2	8-27-3
			946 \pm 18	13-29-1
			216 \pm 8	13-29-2
			127 \pm 6	8-28-2
124 \pm 4	8-28-3			
42	1.908 \pm 15	68 \pm 27	202 \pm 54	11-10-3
			328 \pm 7	14-1-3
			161 \pm 17	11-13-1
44	1.532 \pm 138	73 \pm 24	351 \pm 49	12-14-2
			1.726 \pm 120	16-15-2
45	2.766 \pm 3	100 \pm 28	285 \pm 34	12-6-3
			231 \pm 25	12-3-1
			227 \pm 23	15-7-2
			475 \pm 125	12-3-2
			231 \pm 12	12-3-3
			230 \pm 2	12-8-3
			249 \pm 48	12-5-1
			277 \pm 40	15-4-3
			220 \pm 20	12-9-3
			241 \pm 12	15-5-2
			225 \pm 9	15-5-3
			304 \pm 23	12-10-2
			2.594 \pm 29	15-12-3
			220 \pm 13	15-15-1
			357 \pm 2	12-12-1
286 \pm 86	15-6-3			
46	2.487 \pm 138	92 \pm 34	201 \pm 11	16-13-2
			197 \pm 5	23-4-1
			1.215 \pm 91	16-13-3
			201 \pm 17	16-10-3
			502 \pm 30	27-5-3

Figura 4.5.- Distribución espacial de los sarmientos en los que se detectó *X. ampelinus* mediante ELISA-DASI en la parcela de "Pie Gordo" de Tabuena (Zaragoza), en 1994.



Si se comparan los resultados (expresados como porcentaje de cepas enfermas con uno, dos o tres sarmientos infectados) de las denominaciones de origen con los de la parcela de Tabuena (tabla 4.12), se observa que los porcentajes son muy similares entre sí. En conjunto, *X. ampelinus* fue detectada en un solo sarmiento en el 77'84% de las cepas, en dos sarmientos en el 17'84% y en los tres sarmientos tan sólo en el 4'32%.

Tabla 4.12.- Porcentajes de cepas enfermas con uno, dos o tres sarmientos infectados y detectados en las denominaciones de origen Campo de Borja y Somontano y en una parcela de la localidad de Tabuena (Zaragoza)*.

	Cepas enfermas					
	1 sarmiento infectado		2 sarmientos infectados		3 sarmientos infectados	
Campo de Borja	78'4%	(29/37)	16'2%	(6/37)	5'4%	(2/37)
Somontano	100'0%	(3/3)	0'0%	(0/0)	0'0%	(0/0)
Total denominaciones	80'0%	(32/40)	15'0%	(6/40)	5'0%	(2/40)
Tabuena	77'2%	(112/145)	18'6%	(27/145)	4'1%	(6/145)
Total	77'8%	(144/185)	17'8%	(33/185)	4'3%	(8/185)

* Las cifras entre paréntesis se refieren al número de cepas enfermas con un sarmiento, dos sarmientos o tres sarmientos infectados sobre el total de cepas enfermas.

El análisis ORA para la parcela estudiada, en función de la orientación filas o columnas, dio como resultado la existencia de agregación en las columnas 11, 23 y 27 (orientación NO); en las columnas 11 y 27, únicamente cuando se consideraron las faltas como debidas a la enfermedad; y en la columna 23, cuando las faltas se consideraron como plantas sanas. No existieron agregaciones en el análisis de filas.

En la tabla 4.13 se presentan los valores de los índices de Lloyd (LIP) y Morisita (MI), así como los valores de F_0 para estimar la existencia de agregación entre las vides enfermas de la parcela.

Los índices LIP y MI, así como el test F_0 dieron resultados similares entre sí, indicando que no existió agregación. En los *quadrats* 2x2 se obtuvieron valores de estos índices inferiores a la unidad, es decir, las cepas infectadas por *X. ampelinus* estaban

distribuidas regularmente en la parcela. En los restantes *quadrats*, los valores de los índices alcanzaron valores muy próximos a la unidad, lo que indica una distribución al azar.

Tabla 4.13.- Valores del test - F_0 y de los índices de Lloyd (LIP) y de Morisita (MI) en la parcela de Pie Gordo de Tabuena (Zaragoza), analizada en 1994.

		Tamaño de los <i>quadrats</i>			
		2x2	2x3	4x6	8x15
F_0	1	0'9136	0'9709	1'3262	2'6338
	2	0'6909	0'7872	1'0484	2'1812
LIP	1	0'8804	0'9731	1'0752	1'0754
	2	0'7827	0'9002	1'0056	1'0276
MI	1	0'8872	0'9806	1'0836	1'0837
	2	0'7857	0'9038	1'0096	1'0317

1 : supuesto de fallos equivalentes a plantas sanas.

2 : supuesto de fallos equivalentes a plantas enfermas.

Con el test F a un nivel del 95% se podría considerar que existe agregación, siempre que F_0 sea mayor que 1'07, 1'22, 1'45 y 2'21, cuando los *quadrats* sean de 2x2, 2x3, 4x6 y 8x15, respectivamente (valores obtenidos de la tabla F-Snedecor). Con ello, se puede afirmar que no hay agregación, ya que tan sólo en el supuesto 1 con el *quadrat* 8x15 se obtienen valores de $F_0 > F$ -Snedecor, aunque muy próximos.

4.4. DISCUSIÓN

No existe información sobre la realización de prospecciones de *X. ampelinus* en las que se utilicen análisis de laboratorio para la detección de la bacteria en material vegetal con o sin síntomas. Los resultados obtenidos indican que *X. ampelinus* tiene una incidencia relativamente elevada en la denominación de origen Campo de Borja (4% de los sarmientos analizados, 9'5% de las cepas y 43'6% de las parcelas muestreadas); inferior, pero preocupante, en la denominación de origen Somontano (0'9% de los sarmientos, 2'7% de las

cepas y 27'3% de las parcelas muestreadas); y mucho más grave en la parcela de Tabuena (9'1% de los sarmientos y 21'6% de las cepas).

Estas incidencias se basan en las determinaciones positivas, pero podrían ser incluso superiores, ya que los valores de d.o. de muchas muestras positivas con respecto a *X. ampelinus* fueron próximos al doble de la d.o. media obtenida con los testigos negativos, es decir, al límite de detección de la técnica utilizada. Podría ocurrir que *X. ampelinus* estuviera presente en algunas muestras consideradas como sanas, pero en poblaciones inferiores al límite de detección de la técnica ELISA-DASI-b/sa, que se estima en 10^5 ufc/ml (ver capítulo 1).

En el momento de la prospección, sólo en cinco parcelas se observaron síntomas sospechosos de *X. ampelinus*. Las condiciones climáticas de los últimos años, en especial la falta de lluvias, posiblemente dificultaron la expresión de los síntomas. Fue necesario basarse exclusivamente en síntomas secundarios como el porte de las cepas, la rotura de sarmientos, las yemas abortadas y los sarmientos débiles o poco vigorosos, por lo que es arriesgado afirmar con seguridad que una parcela está afectada por la necrosis bacteriana. La presencia de síntomas específicos, como los chancros característicos sobre sarmientos, peciolo o pedúnculos (Bernard y Fauré, 1983), sólo se observó en la parcela nº 15, no habiéndose manifestado síntomas foliares de la enfermedad en ninguna parcela. En Aragón, La Rioja y Navarra, en años propicios para el desarrollo de la enfermedad, los síntomas se observaron exclusivamente por encima de los 500 m de altitud (López, 1983) y esto último también fue constatado en Campo de Borja, ya que, aun con climatología adversa, las únicas parcelas infectadas y que presentaron síntomas externos se encontraron en esa altitud reseñada o en cotas superiores.

Aunque las prospecciones no tenían la finalidad de conocer exactamente la incidencia de la necrosis bacteriana en cada término municipal de las denominaciones de origen, los resultados obtenidos en Campo de Borja parecen indicar que existe una concentración de parcelas afectadas en Ainzón, Tabuena y zonas altas de Borja y Fuendejalón (figura 4.3). En Ainzón, fue donde hubo mayor incidencia, ya que se detectó a *X. ampelinus* en las seis parcelas muestreadas de esa localidad. La más frecuente detección serológica en la zona alta (63'6% de las parcelas frente al 35'7% en zona baja) se correlaciona positivamente con una

mayor manifestación de síntomas y, probablemente, podría ir asociada a poblaciones más elevadas de *X. ampelinus* en las plantas afectadas.

Se trata de la primera vez que *X. ampelinus* fue detectado en Aragón en sarmientos asintomáticos procedentes de viñas situadas en cotas inferiores a los 500 m de altitud. Es lógico pensar que la bacteria estuviera presente en esas zonas bajas, ya que hasta hace unos años se había venido empleando tradicionalmente material vegetal de la misma denominación de origen para injertar, sin considerar más que el aspecto externo de las cepas. Esto pudo contribuir, junto con las herramientas de poda, a la dispersión de la necrosis bacteriana en toda la denominación de origen, independientemente de la altitud de las parcelas. Al disponer de una técnica aplicable a muestras asintomáticas, y con una adecuada sensibilidad, se pudo poner de manifestó la presencia de *X. ampelinus* en nuevas áreas.

Los estudios epidemiológicos basados exclusivamente en la sintomatología de la enfermedad inducen a error, al existir numerosos falsos negativos, al menos en condiciones climáticas similares a las de Aragón. Por ello, es necesario el uso de técnicas serológicas que demuestren la presencia de *X. ampelinus* independientemente de las manifestaciones sintomatológicas. En otras condiciones más favorables para la exteriorización de los síntomas, quizá exista una mayor correlación entre sintomatología y detección serológica.

En la legislación fitosanitaria actualmente vigente (RD 2071/1993) se prohíbe la comercialización de plantas infectadas con *X. ampelinus*, pero, como ya se ha indicado, no hay ningún requisito oficial, que exija la realización de análisis. Una inspección visual realizada una vez al año es suficiente para cumplir la legislación, pero, evidentemente, no evita la dispersión de la enfermedad, puesto que la bacteria puede estar presente en plantas asintomáticas. Por todo ello, se debería introducir, en los programas de certificación y de control, análisis serológicos de detección de *X. ampelinus* que permitieran eliminar posibles plantas portadoras y asintomáticas.

En la parcela de Tabuena se encontró que la distribución de las cepas enfermas presentó agregación (análisis ORA) únicamente en tres columnas de 30 estudiadas y en ninguna de las filas. La coincidencia de agregación por columnas con la dirección NO, en la que sopla el viento dominante (cierzo), pudiera ser una simple casualidad, ya que la frecuencia

de esta agregación es baja. En general, los agregados son más patentes cuanto menos tiempo haya transcurrido desde que apareció la enfermedad en una parcela. Es lógico pensar que las posibles agregaciones que pudieran haber existido en los primeros años de introducción de la bacteria en la viña de Tabuena han desaparecido con el paso de los años. Actualmente, el nivel de infección en la parcela es elevado y la distribución es al azar. Posiblemente, *X. ampelinus*, de fácil diseminación y con periodos importantes de latencia, fue introducida hace bastantes años. Los posibles gradientes de dispersión, producidos por las operaciones de poda, de cultivo o por el viento y la lluvia, se han solapado, enmascarando las tendencias. Para este tipo de estudios, sería interesante escoger una parcela con un bajo índice de infección, realizando análisis serológicos para la detección de *X. ampelinus* durante varios años consecutivos. Esto permitiría un estudio completo, tanto de la dispersión espacial como temporal de la necrosis bacteriana de la vid.

Se comprobó que *X. ampelinus* estaba irregularmente distribuida en las cepas. Los porcentajes de cepas enfermas con uno, dos o tres sarmientos infectados (77'84%, 17'84% y 4'32%, respectivamente) justifican tomar varias cepas por parcela y varios sarmientos por cepa para su análisis.

La carencia absoluta de información sobre la toma de muestras más adecuada para este tipo de prospecciones hizo que fuera necesario decidir *a priori* el número de muestras a tomar en cada parcela. Con los datos obtenidos se podrá estimar en el futuro la presión a ejercer en el muestreo. Se sugiere aumentarla en zonas en las que no se aprecien síntomas o se sospeche una baja incidencia de la necrosis bacteriana, como ocurre en la denominación de origen Somontano.

4.5. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este capítulo, se pueden deducir las siguientes conclusiones con repercusión práctica:

- Los síntomas de la enfermedad sólo fueron observables en parcelas situadas por encima de los 550 m de altitud.

- La técnica ELISA-DASI se ha mostrado eficaz en la detección de *X. ampelinus* en condiciones de campo, lográndose la detección en cepas asintomáticas.
- Se ha detectado *X. ampelinus* en las denominaciones de origen Campo de Borja y Somontano en el 4'7% y el 0'9%, respectivamente, de los sarmientos analizados. Ello supone una incidencia media-alta en Campo de Borja y una incidencia más baja, pero inquietante, en Somontano.
- La detección de *X. ampelinus* en Somontano constituye la primera cita de la enfermedad en dicha zona y es de importancia práctica, ya que en la misma se producen vinos de calidad y se trata de una viticultura en expansión.
- Es la primera vez que se detecta *X. ampelinus* en Aragón en sarmientos asintomáticos procedentes de viñas situadas en cotas inferiores a los 550 m de altitud.
- Se demuestra el irregular reparto o distribución de *X. ampelinus* dentro de las cepas.
- El análisis de la distribución espacial de *X. ampelinus* en una parcela naturalmente infectada de Tabuena (Zaragoza) muestra que no parece existir agregación de la enfermedad por filas o columnas en la parcela. El cálculo de los índices de agregación indican que la distribución de las cepas enfermas por *X. ampelinus* es al azar. Ello podría indicar que la presencia de la enfermedad en Tabuena data de hace varios años.
- La presencia de *X. ampelinus* en cepas sin síntomas supone un riesgo potencial. Para multiplicación, se debe emplear únicamente variedades y portainjertos procedentes de zonas libres de *X. ampelinus* y con garantías sanitarias, así como tener presente las medidas culturales recomendadas para evitar la dispersión de la enfermedad con los útiles de cultivo y aperos.

CAPÍTULO 5

CAPÍTULO 5.- SENSIBILIDAD A LA NECROSIS BACTERIANA DE LA VID DE TRES PATRONES Y 19 VARIEDADES DE VID CULTIVADAS EN DIFERENTES ZONAS ESPAÑOLAS

5.1. INTRODUCCIÓN

Los métodos de lucha contra la necrosis bacteriana de la vid son fundamentalmente preventivos, ya que una vez implantada la enfermedad, resulta muy difícil su control (Ridé *et al.*, 1983). En parcelas afectadas por *X. ampelinus* se recomiendan tratamientos con cobre y medidas culturales para ayudar a convivir con la enfermedad, aunque no son suficientes para lograr su control efectivo en años con condiciones climáticas favorables para ésta. Por ello, es de interés disponer de información sobre la sensibilidad a la necrosis bacteriana de la vid de las variedades más cultivadas, para aconsejar aquellas menos sensibles para las nuevas plantaciones o replantaciones a realizar en zonas en las que esta bacteriosis sea endémica. También se podría preveer, en función de la sensibilidad de las variedades cultivadas y de la climatografía de cada zona, la gravedad potencial de la enfermedad.

A nivel mundial, los conocimientos actuales sobre la sensibilidad a la necrosis bacteriana de los distintos patrones y variedades utilizados son escasos. Los datos existentes se basan, fundamentalmente, en las observaciones realizadas en años propicios para la manifestación de síntomas en zonas afectadas, directamente sobre vides enfermas o en las diferencias observadas en ensayos de patogenicidad (Matthee *et al.*, 1970; Ridé *et al.*, 1983; Panagopoulos y Psallidas, 1983; Panagopoulos, 1987; Ridé, 1996), existiendo muy pocos estudios sobre la sensibilidad varietal en ensayos comparativos (Ridé, 1985; Panagopoulos 1987; Peros *et al.*, 1995; Ridé 1996).

Las primeras informaciones sobre la sensibilidad de las variedades españolas surgieron de la observación directa en campo de los síntomas producidos en vides enfermas en Aragón, Rioja y Galicia (López *et al.*, 1980; Gracia *et al.*, 1980; MAPA, 1981; Sampayo *et al.*, 1981; López, 1983; Gómez y López, 1986). Posteriormente, la puesta a punto de una técnica de inoculación *in vitro* (López *et al.*, 1984) y la realización de un ensayo de sensibilidad, utilizando 30 variedades españolas en plantación a pie directo, en Tosos (Zaragoza) e

inoculadas en tres épocas diferentes del año y durante tres años consecutivos (López *et al.*, 1987c; López *et al.*, 1987d), proporcionaron la única información disponible sobre la sensibilidad a la necrosis bacteriana de la vid en España.

La sensibilidad de una determinada variedad puede estar condicionada por factores ambientales, como las características edáficas, climáticas y el manejo del cultivo, y por factores intrínsecos del ensayo, como son el método de inoculación, la época y el aislado bacteriano utilizado (Ridé *et al.*, 1983; López *et al.*, 1984). También es conocido que el patrón podría influir en la sensibilidad de la variedad que se injerta (Gracia *et al.*, 1980; MAPA, 1981; Sampayo *et al.*, 1981; López, 1983; Ridé *et al.*, 1983), por lo que era de interés estudiar, comparativamente, el comportamiento de las variedades viníferas españolas injertadas sobre distintos portainjertos.

Por ello, se planeó un ensayo en una parcela situada en Tosos (Zaragoza) en una zona afectada por la enfermedad. Durante cinco años se analizó el comportamiento de 19 variedades españolas de vid injertadas en los patrones más utilizados. Se seleccionaron para su estudio variedades de interés para la zona, otras de amplia distribución en distintas regiones y algunas variedades autóctonas, así como los patrones más utilizados en Aragón. Se realizaron inoculaciones con dos aislados bacterianos obtenidos en la zona del estudio para evitar que la cepa bacteriana influyera en la respuesta de la vid a la inoculación. Se seleccionó la época y el método que permitieran la máxima receptividad de la vid a la bacteria y se realizaron las inoculaciones durante dos años consecutivos.

5.2. MATERIAL Y MÉTODOS

5.2.1. Localización y características de la parcela

La parcela en la que se realizaron las inoculaciones estaba situada en el paraje "Camino de las Torcas" de Tosos (Zaragoza), localidad perteneciente a la denominación de origen Cariñena y se consideró representativa de la zona. Fue plantada expresamente para estudiar la sensibilidad varietal a la necrosis bacteriana de la vid de tres patrones de savia americana y 19 variedades viníferas cultivadas en diferentes áreas españolas. Tanto el paraje

como la localidad donde se ubicó la parcela pertenecen a una zona donde se habían observado durante 1978-1981 abundantes síntomas de la enfermedad y donde se había estudiado anteriormente la sensibilidad varietal en otro ensayo con plantas a raíz directa (López *et al.*, 1987). El suelo de la parcela tiene una clase textural franca, de tipo medio, es decir, con una combinación óptima de arena, limo y arcilla, fácil de trabajar, con una buena capacidad de retención de humedad y de nutrientes, y poco propensa a la compactación. Conlleva capacidades de intercambio catiónico medias, en función del contenido de arcilla y de materia orgánica. Tiene un pH (8'31) moderadamente básico y un contenido medio en materia orgánica y magnesio, y muy alto en fósforo y potasio, siendo la relación K/Mg alta. Es un suelo carbonatado, con un contenido en caliza activa de 7%.

5.2.2. Material vegetal

El cinco de abril de 1982 se plantaron tres patrones al marco y densidad de plantación habitualmente utilizados en la zona de estudio (2'20 m x 2'20 m; 2.000 plantas/ha). Estos patrones fueron Rupestris de Lot, R-110 (Berlandieri x Rupestris) y 41-B (Chasselas x Berlandieri).

Sobre los tres patrones se injertaron, el 13 de abril de 1983, 19 variedades viníferas pertenecientes a la colección de variedades de vid de Longares (Zaragoza), de la Estación de Viticultura y Enología (Gobierno de Aragón), que se exponen en la tabla 5.1 junto a las sinonimias utilizadas en los catálogos de variedades de las colecciones del Rancho de la Merced (Jerez de la Frontera) (García y Lara, 1989) y El Encín (Madrid) (Comunidad de Madrid, 1990).

Esas variedades alcanzan porcentajes de cultivo en España superiores al 45% en las variedades blancas y al 18% en las variedades negras (Hidalgo, 1993), representando, prácticamente, a todas las regiones vitivinícolas españolas. La ausencia de variedades importantes, como Garnacha, Macabeo, Zalema, Charello, etc., fue debida a problemas surgidos durante la plantación, lo que impidió obtener datos de una número suficiente de plantas, por lo que no se incluyeron en este estudio comparativo.

La parcela se plantó con 38 filas por 27 columnas, lo que supuso un total de 1.026 cepas, es decir, 342 cepas por patrón, 54 cepas por variedad y 18 cepas por cada combinación patrón y variedad estudiadas.

Tabla 5.1.- Variedades españolas de *Vitis vinifera* ensayadas y sus sinonimias*.

Variedades blancas	Sinonimias
Airén	Aidén, Lairén, Manchega, Valdepeñas, Valdepeñero.
Blanca basta	No descrita.
Cayetana	Cayetana blanca, Robal.
Malvasía	Malvasía de la Rioja, Rojal, Subirat, Subirat parent.
Merseguera	Escanyavella, Exquixagos, Marisancho, Masadera, Meseguera, Verdosilla.
Palomino	Albán, Jerez, Listán, Listán blanco.
Pedro Ximénez	Casta de Montuo, Duro, Jetibi, Pero Ximén, Pedro Jiménez, Pedro Ximénez de Jerez, Pedro Ximénez de Montilla, Perruno y Perruno de la Sierra.
Variedades negras	Sinonimias
Bobal	Bobos, Coreana, Provehón, Requena, Requeno, Tinto Requena.
Garnacha peluda	Lledoner pelut, Lledoner gris.
Graciano	Graciana, Morrastel.
Granegro	Gran negro, Grand noir de la Calmette, Grau negro.
Juan Ibáñez	Concejón, Muguel de Arcos, Miguel del Arco, Miguelillo, Moristel, Salceño.
Mazuela	Carignan, Carignane, Cariñena, Crusilló, Mazuelo, Samsó.
Monastrell	Alcayata, Garrut, Morastell, Morrastell, Mourvedre.
Tempranillo	Aragonez, Cencibel, Jacivera, Tempranillo negro, Tinta Roriz, Tinta Santiago, Tinto fino, Tinto país, Ull de Llebre, Verdiell.
Tinto basto	Borrachón.
Tinto de Madrid	Negra de Madrid, Negral, Tinto común.
Tinto de Toro	No descrita.
Tinto del país	Tempranillo negro.

* Según García y Lara (1989) y Comunidad de Madrid (1990).

Se incluyeron en el ensayo las variedades Graciano y Monastrell que parecen ser sinonimias, así como Tempranillo y Tinto del país, ya que se consideraban como distintas por sus características morfológicas en la colección de vid de Longares. Ante la carencia de estudios genéticos que permitieran concluir sobre su identidad, se han considerado como diferentes en este trabajo.

5.2.3. Cultivos bacterianos

Se utilizaron dos cepas de *X. ampelinus*, aisladas por M.M. López en 1978 y 1983 en la misma localidad del ensayo, Tosos (Zaragoza). Estas cepas pertenecen a la colección de bacterias fitopatógenas del IVIA-Valencia y tienen como número de referencia el 60.7 y 64. La cepa 60.7 ha sido depositada en la Collection Nationale de Bactéries Phytopathogènes (CNBP) de Angers (Francia). Para las inoculaciones, se utilizaron cultivos bacterianos de 72 h en medio LPGA, de los que se preparó una suspensión en agua estéril de aproximadamente 10^9 ufc/ml, con absorbancia de 0'8 a 443 nm.

5.2.4. Inoculación

La primera inoculación se realizó cuando se consideró que la mayoría de las variedades de vid estaban bien establecidas, a los cinco años de la plantación. La inoculación se llevó a cabo renovando las heridas de poda de todos los pulgares de cada cepa y depositando 100 μ l de la suspensión de *X. ampelinus* en la herida recién efectuada (López *et al.*, 1987d). Se inocularon todas las cepas de la parcela en marzo de 1987. Una segunda inoculación se realizó un año más tarde en el mismo mes, utilizando una cepa bacteriana diferente. El primer año se utilizó la cepa 60.7 y el segundo año la cepa 64.

5.2.5. Observación de síntomas e índices de clasificación

En invierno, antes de la poda, se observaron los síntomas de cada cepa, adjudicándole una nota según el siguiente criterio:

- 0 - Ausencia de síntomas. Planta de aspecto sano.
- 1 - Brotaciones débiles, achaparramiento. Planta sospechosa.
- 2 - Síntomas en un sarmiento o pulgar.
- 3 - Síntomas en dos sarmientos o pulgares.
- 4 - Síntomas en más de dos sarmientos o pulgares que afectan a la vegetación de forma importante.
- 5 - Más de dos yemas abortadas y/o chancros de una longitud de más de tres entrenudos. Planta muy afectada.

Se realizaron cuatro lecturas, en los años 1987, 1988, 1990 y 1991. En 1989 no fue posible tomar datos por haberse podado la viña antes de realizar las lecturas.

Para la clasificación de la sensibilidad varietal a la enfermedad se ha seguido un método similar al utilizado para determinar la susceptibilidad a *Erwinia amylovora* en variedades de peral asiático (Lecomte, 1993). Este método tiene en cuenta tres criterios:

- Severidad de los síntomas (S): media de la nota adjudicada según los síntomas observados, elaborado para cada variedad y calculado según la escala de lectura.
- Frecuencia de la enfermedad (F): Porcentaje de plantas con síntomas.
- Índice de sensibilidad (I): Producto del valor de la severidad por la frecuencia de enfermedad (S x F).

Se efectuó la clasificación de la sensibilidad varietal en tres clases, cuando los índices calculados alcanzaron simultáneamente los siguientes valores:

Clase	Severidad de los síntomas	Frecuencia de la enfermedad	Índice de sensibilidad
I Muy sensible	$\geq 1'5$	$\geq 70\%$	≥ 100
II Moderadamente sensible	$< 1'5$ y ≥ 1	$< 70\%$ y $\geq 50\%$	< 100 y ≥ 50
III Poco sensible	< 1	$< 50\%$	< 50

5.2.6. Pluviometría registrada

Durante la década 1982-1991, la estación meteorológica más próxima a la parcela del ensayo registró las pluviometrías mensuales que se exponen en la tabla 5.8. Las pluviometrías fueron escasas, con valores anuales inferiores a la media histórica y con frecuentes y prolongadas épocas de déficit hídrico.

Tabla 5.2.- Estación Meteorológica de Cariñena (Zaragoza). Pluviometría registrada durante la década 1982-1991.

Año	Ene.	Febr.	Mar.	Abr.	May.	Jun.	Jul.	Agos.	Sep.	Oct.	Nov.	Dic.	Anual
1982	10'5	43'0	21'0	18'5	68'5	26'7	53'0	71'0	13'0	91'0	23'5	8'0	447'7
1983	0'0	7'0	17'5	6'0	4'0	52'5	31'0	26'9	1'8	13'2	46'5	19'5	225'9
1984	3'0	27'4	40'0	13'5	93'7	25'5	0'0	4'8	9'0	10'0	132'7	9'0	368'6
1985	11'0	18'5	13'4	17'0	63'5	30'0	18'5	0'0	0'0	29'0	18'5	18'0	238'4
1986	19'9	39'5	34'5	43'5	44'0	66'5	20'0	3'0	84'5	112'0	18'5	24'0	509'9
1987	55'0	40'0	16'5	14'5	52'0	6'0	15'0	7'0	8'5	74'0	52'6	46'6	387'7
1988	41'8	5'0	2'0	208'0	76'5	140'5	11'0	0'0	0'0	30'0	8'6	1'0	524'4
1989	0'0	12'5	41'5	74'5	66'5	11'0	8'5	40'5	41'0	2'0	44'0	41'0	383'0
1990	22'0	0'2	8'7	20'0	38'2	75'5	43'1	42'6	68'1	29'3	12'6	13'0	373'3
1991	6'5	75'6	46'9	68'6	33'4	34'3	30'1	8'9	67'3	26'8	14'0	17'8	430'2
Media histórica*	37'9	32'8	42'2	48'2	72'4	65'9	32'0	35'8	40'3	42'3	30'8	54'9	535'5

* Media histórica calculada con los datos de 30 años (De León, 1987).

En negrita los valores pluviométricos mensuales que superan la media histórica.

5.3. RESULTADOS

Durante los años transcurridos desde la plantación de la viña (1982) hasta las últimas lecturas realizadas (1991), se produjeron bajas de algunas vides, lo que no permitió inocular en algún año todas las cepas previstas o realizar en su momento alguna lectura. Para que las lecturas de cada año tuvieran el mismo peso en los resultados obtenidos, sólo se han analizado los datos de aquellas plantas que habían sido inoculadas en dos años (1987 y 1988) y de las que se pudo tener lecturas en los cuatro años (1987, 1988, 1990 y 1991).

El 85% de las cepas plantadas cumplieron esas condiciones. En la tabla 5.3 figura el número exacto de vides estudiadas de cada combinación patrón-variedad, así como los totales de cada variedad y de cada patrón.

Tabla 5.3.- Número de cepas de cada combinación patrón-variedad de las que se han obtenido datos para el estudio de la sensibilidad.

Variedad	R. de Lot	Patrón			Total
		R-110	41-B		
Airén	14	16	15		45
Blanca basta	16	15	17		48
Bobal	12	16	16		44
Cayetana	6	14	13		33
Garnacha peluda	15	15	17		47
Graciano	16	16	17		49
Granegro	13	15	15		43
Juan Ibáñez	13	13	16		42
Malvasía	12	14	17		43
Mazuela	14	16	18		48
Merseguera	16	15	13		44
Monastrell	17	17	17		51
Palomino	14	13	17		44
Pedro Ximénez	16	15	14		45
Tempranillo	17	17	17		51
Tinto basto	16	17	16		49
Tinto de Madrid	15	18	17		50
Tinto de Toro	17	18	15		50
Tinto del país	13	17	17		47
Total	272	297	304		873

Los datos obtenidos de la observación de síntomas de cada variedad se exponen en la tabla 5.4. En las tablas 5.5, 5.6, 5.7 y 5.8 se resumen los índices calculados en cada año para cada combinación variedad/patrón y para las variedades en el conjunto de los patrones. Se observaron síntomas de necrosis bacteriana (notación distinta de cero), al menos en uno de

Tabla 5.4.- Notación de los síntomas de las variedades estudiadas, injertadas sobre tres patrones. Lecturas realizadas en 1987, 1988, 1990 y 1991 en Tosos (Zaragoza).

Variedades	Año	Patrones																																											
		Rupestris de Lot						R - 110						41 - B																															
Airén	1987	1	1	3	3	1	0	3	1	0	0	1	1	3	0	0	3	1	0	1	3	0	0	3	0	0	3	0	0	1	0	3	1	1											
	1988	2	3	2	2	2	2	2	2	3	2	2	0	2	3	2	0	2	3	2	0	2	3	0	2	2	0	2	2	0	3	1	2	0	3										
	1990	4	4	4	2	2	3	0	1	1	3	1	1	3	2	0	3	3	1	1	2	3	1	1	3	1	0	3	2	3	3	1	1	0	1										
	1991	3	2	3	1	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	2	2	3	1	1	2	2	4	3	3	3	3	3	1	1	1										
Blanca basta	1987	1	0	0	0	1	3	0	0	0	3	1	0	2	3	3	0	1	1	1	0	0	3	0	3	0	0	3	0	0	1	0	1	0											
	1988	4	0	4	1	0	5	0	2	2	0	1	1	3	5	3	0	1	0	1	1	0	0	2	0	3	0	2	0	3	0	3	3	3											
	1990	3	0	2	2	0	1	2	0	3	3	0	3	2	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	3	2	2	0										
	1991	1	1	0	3	2	2	3	2	2	0	1	2	0	4	2	2	0	1	1	1	3	3	3	0	3	0	3	1	1	2	2	2	0	2										
Bobal	1987	0	1	3	3	3	2	4	0	1	3	1	3	1	3	1	3	1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	4	0											
	1988	3	5	5	4	2	2	3	3	2	2	3	3	2	5	5	0	4	1	2	5	3	1	2	0	0	3	3	3	5	1	3	2	1	2										
	1990	3	2	4	2	2	1	3	1	2	3	3	3	0	2	0	2	3	1	2	3	1	3	0	2	2	2	3	0	1	2	2	1	3	0	1									
	1991	2	1	3	0	2	2	3	3	2	4	2	3	3	4	2	0	2	3	0	2	3	2	2	0	2	3	2	2	0	2	1	4	2	3	3									
Cavetana	1987		0			0	4	1	1	4				0	0	3	1	1	1	0	0	0	0	3	3	1	1	3	3	1	3	1	2	0	0										
	1988		1			4	0	1	4	4				0	0	3	0	1	4	0	1	1	0	5	4	5	4	3	0	3	0	3	0	3	0	3									
	1990		4			1	2	0	0	1				3	0	4	0	4	4	0	0	1	0	2	3	4	0	0	3	2	3	2	0	0	1	0	1								
	1991		0			3	0	0	0	0				2	0	0	0	3	3	0	0	3	0	0	1	2	1	0	1	2	3	3	0	0	2	0	2	0							
Garnacha peluda	1987	0	0	0	1	0	0	0	0	3	3	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0									
	1988	0	0	2	3	0	0	0	0	2	3	3	3	3	0	0	0	0	1	2	3	0	3	2	3	0	2	0	2	0	2	1	3	0	3	0	0	0							
	1990	2	3	3	1	2	1	1	0	0	0	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	1	2	0	0	0	0	0							
	1991	2	0	0	2	3	0	1	0	3	2	1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3	3	0	1	0	2	3	1	0	0	0	0						
Graciano	1987	0	1	3	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	3	2						
	1988	2	2	2	1	3	4	2	2	2	0	2	1	2	3	0	3	1	3	0	0	2	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	2	2	0	0	0	0					
	1990	3	0	2	2	3	0	2	2	1	3	3	0	0	0	2	1	1	0	0	0	2	1	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0				
	1991	1	0	3	1	1	1	3	4	1	1	2	3	3	1	0	2	0	2	2	2	2	2	1	2	2	0	0	2	2	0	0	1	0	1	2	2	2	0	2	2				
Granegro	1987	1	1	3	0	1	3	3	3	1	3	0	3	3	1	0	0	3	0	1	1	0	0	4	1	0	1	3	3	0	1	1	3	3	0	3	1	1	2	0	3				
	1988	5	0	3	3	2	2	3	0	1	2	2	3	2	2	1	1	1	0	1	0	1	0	3	0	3	3	2	0	1	3	0	3	0	1	0	3	1	1	0	1				
	1990	3	0	3	0	3	2	1	0	1	0	0	0	2	0	0	3	2	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	1991	4	3	3	3	4	3	3	0	2	3	2	2	3	3	3	3	3	2	2	0	3	2	2	0	3	2	2	3	4	3	2	2	1	1	2	3	3	0	3	2				
Juan Ibáñez	1987	1	1	1	3	0	2	2	1	0	1	1	2	2	3	0	1	3	0	1	3	0	2	3	3	1	0	3	0	1	2	1	1	3	3	0	1	2	1	3	2	3			
	1988	3	2	1	5	0	1	1	3	0	4	3	3	1	2	5	3	5	5	3	3	1	3	1	1	0	3	0	1	1	1	2	5	1	0	1	2	3	2	1	1	0	0		
	1990	0	1	2	0	0	1	1	0	4	0	2	2	1	0	3	0	0	0	0	0	1	2	1	2	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0			
	1991	3	3	3	3	2	3	3	2	3	3	3	3	4	3	4	2	3	2	2	3	1	2	3	1	2	3	3	3	3	3	2	2	2	1	2	3	2	3	2	2	2			
Malvasía	1987	3	0	0	0	3	3	3	3	3	2	3	1	0	0	0	1	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	1988	2	1	2	0	2	2	0	0	0	2	3	0	1	2	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	1990	2	2	2	0	2	2	0	2	1	0	0	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	1991	1	0	3	3	3	0	0	3	1	2	1	3	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Mazuela	1987	1	3	0	3	0	0	1	1	0	2	0	1	0	1	0	3	0	0	4	3	1	1	3	0	1	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	1988	0	1	3	2	0	0	5	0	0	3	1	0	1	1	0	3	4	3	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1990	0	2	0	0	1	0	1	0	0	3	2	0	0	2	0	0	0	0	0	2	2	0	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1991	2	3	0	3	3	3	0	1	3	3	0	0	0	3	0	1	2	1	1	2	1	1	1	0	1	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Merseguera	1987	3	1	4	3	1	3	0	3	3	1	4	1	3	1	1	0	3	3	1	0	1	3	3	3	3	3	4	1	0	3	0	0	3	3	1	3	1	0	0	0	0			
	1988	5	5	2	4	1	2	0	4	2	2	0	5	5	4	2	5	5	3	1	1	0	5	3	0	1	5	2	3	0	0	0	2	0	2	2	3	3	3	0	0	0	0		
	1990	4	4	3	3	3	4	0	2	3	3	3	3	4	3	1	3	0	3	3	3	3	1	1	4	3	4	1	3	3	4	0	0	3	3	3	1	3	1	0	0	0	0		
	1991	4	4	4	3	4	3	4	3	1	3	3	2	3	3	3	4	3	3	2	3	3	4	3	3	2	3	1	3	3	2	4	3	3	4	3	4	3	4	5	3	1	2	3	
Monastrell	1987	3	1	3	0	1	1	3	1	0	1	1	0	0	3	1	1	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1988	0	2	3	1	1	3	3	1	0	1	0	1	0	3	1	2	1	5	0	0	1	1	0	1	3	1	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1990	0	0	1	0	1	0	3	3	3	0	3	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1991	0	0	3	2	0	0	1	0	3	0	2	1	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Palomino	1987	1																																											

Tabla 5.5.- Severidad de los síntomas, frecuencia de la enfermedad e índice de sensibilidad a *X. ampelinus*, valores medios y desviación típica de 19 variedades españolas de vid injertadas sobre Rupestris de Lot. Datos obtenidos durante los años 1987, 1988, 1990 y 1991.

	Severidad de los síntomas					Frecuencia de la enfermedad					Índice de sensibilidad				
	1987	1988	1990	1991	Media	1987	1988	1990	1991	Media	1987	1988	1990	1991	Media
Airén	1'5 ± 1'2	2'1 ± 0'7	2'2 ± 1'3	2'7 ± 0'6	2'1 ± 0'4	79	93	93	100	91 ± 8	118	192	206	271	197 ± 55
Blanca basta	1'1 ± 1'2	1'9 ± 1'8	1'5 ± 1'3	1'7 ± 1'1	1'5 ± 0'3	50	69	63	81	66 ± 11	53	133	94	137	104 ± 34
Bobal	2'0 ± 1'3	3'1 ± 1'0	2'4 ± 0'9	2'3 ± 1'0	2'4 ± 0'4	83	100	100	92	94 ± 7	167	308	242	206	231 ± 52
Cayetana	1'7 ± 1'7	2'3 ± 1'7	1'3 ± 1'4	0'5 ± 1'1	1'5 ± 0'7	67	83	67	17	58 ± 25	111	194	89	8	101 ± 66
Garnacha peluda	0'9 ± 1'3	1'5 ± 1'4	1'4 ± 1'2	1'2 ± 1'2	1'3 ± 0'2	40	53	67	60	55 ± 10	37	78	93	72	70 ± 21
Graciano	1'3 ± 1'1	2'0 ± 0'9	1'6 ± 1'2	1'6 ± 1'2	1'6 ± 0'3	88	94	69	88	84 ± 9	109	188	112	142	138 ± 32
Granegro	1'9 ± 1'2	2'2 ± 1'3	1'2 ± 1'2	2'7 ± 1'0	2'0 ± 0'6	85	85	54	92	79 ± 15	163	182	62	249	164 ± 67
Juan Ibáñez	1'3 ± 0'8	2'1 ± 1'5	1'1 ± 1'1	2'9 ± 0'5	1'8 ± 0'7	85	85	62	100	83 ± 14	111	176	66	292	161 ± 85
Malvasía	2'2 ± 1'3	1'3 ± 1'0	1'3 ± 1'0	1'7 ± 1'2	1'6 ± 0'3	75	67	67	75	71 ± 4	163	89	89	125	116 ± 30
Mazuela	0'9 ± 1'0	1'1 ± 1'5	0'7 ± 1'0	1'7 ± 1'4	1'1 ± 0'4	57	50	43	64	54 ± 8	53	57	31	110	63 ± 29
Merseguera	2'1 ± 1'2	3'2 ± 1'8	3'0 ± 0'9	3'1 ± 0'8	2'8 ± 0'4	94	88	94	100	94 ± 4	193	279	281	306	265 ± 43
Monastrell	1'3 ± 1'2	1'2 ± 1'1	1'2 ± 1'4	0'8 ± 1'0	1'1 ± 0'2	71	71	53	47	60 ± 11	91	87	65	39	71 ± 21
Palomino	1'4 ± 1'1	3'0 ± 1'7	2'6 ± 1'1	3'2 ± 0'4	2'5 ± 0'7	79	86	93	100	89 ± 8	107	257	239	321	231 ± 78
Pedro Ximénez	1'1 ± 1'3	2'6 ± 1'4	1'6 ± 1'0	1'1 ± 1'1	1'6 ± 0'6	56	94	81	50	70 ± 18	63	240	127	53	121 ± 74
Tempranillo	1'2 ± 1'2	1'6 ± 1'5	0'7 ± 1'2	2'3 ± 0'7	1'4 ± 0'6	59	65	29	100	63 ± 25	69	103	21	229	106 ± 77
Tinto basto	1'1 ± 1'3	1'5 ± 1'5	0'8 ± 1'1	1'0 ± 1'2	1'1 ± 0'3	50	63	44	50	52 ± 7	56	94	36	50	59 ± 21
Tinto de Madrid	0'7 ± 1'0	1'7 ± 1'7	1'2 ± 1'2	1'7 ± 1'3	1'3 ± 0'4	40	67	60	73	60 ± 12	27	116	72	127	85 ± 40
Tinto de Toro	0'9 ± 0'9	1'9 ± 1'5	0'4 ± 0'5	2'1 ± 1'0	1'3 ± 0'7	65	71	35	100	68 ± 23	57	133	12	212	104 ± 76
Tinto del país	0'8 ± 1'0	1'5 ± 1'2	1'1 ± 1'2	0'8 ± 1'1	1'0 ± 0'3	46	62	54	46	52 ± 6	36	90	58	39	56 ± 22
Media	1'3 ± 0'4	2'0 ± 0'6	1'4 ± 0'7	1'9 ± 0'8	1'6 ± 0'5	66 ± 16	75 ± 14	64 ± 20	77 ± 24	71 ± 14	86 ± 49	148 ± 72	90 ± 77	144 ± 98	116 ± 62

Tabla 5.6.- Severidad de los síntomas, frecuencia de la enfermedad e índice de sensibilidad a *X. ampelinus*, valores medios y desviación típica de 19 variedades españolas de vid injertadas sobre R-110. Datos obtenidos durante los años 1987, 1988, 1990 y 1991.

	Severidad de los síntomas					Frecuencia de la enfermedad					Índice de sensibilidad				
	1987	1988	1990	1991	Media	1987	1988	1990	1991	Media	1987	1988	1990	1991	Media
Airén	1'2 ± 1'2	1'7 ± 0'9	2'1 ± 1'0	2'1 ± 0'8	1'8 ± 0'4	63	88	94	100	86 ± 14	74	148	199	206	157 ± 53
Blanca basta	0'8 ± 1'0	1'3 ± 1'2	0'4 ± 1'0	1'7 ± 1'1	1'1 ± 0'5	53	80	13	87	58 ± 29	43	101	5	150	75 ± 55
Bobal	1'5 ± 1'3	2'4 ± 1'7	1'6 ± 1'1	2'1 ± 1'1	1'9 ± 0'4	81	81	75	81	80 ± 3	122	198	117	168	151 ± 33
Cayetana	1'2 ± 1'2	2'0 ± 2'0	1'8 ± 1'7	1'1 ± 1'2	1'5 ± 0'4	64	64	57	50	59 ± 6	78	129	102	54	91 ± 28
Garnacha peluda	0'3 ± 0'8	1'1 ± 1'2	0'5 ± 1'0	0'7 ± 1'2	0'6 ± 0'3	13	47	20	33	28 ± 13	4	50	9	24	22 ± 18
Graciano	0'6 ± 0'7	0'9 ± 1'0	0'9 ± 1'1	1'4 ± 1'0	1'0 ± 0'3	50	63	50	69	58 ± 8	31	59	47	95	58 ± 23
Granegro	1'2 ± 1'3	1'5 ± 1'1	0'8 ± 1'2	2'4 ± 0'8	1'5 ± 0'6	60	80	33	93	67 ± 23	72	117	27	224	110 ± 73
Juan Ibáñez	1'9 ± 1'3	2'7 ± 1'6	1'0 ± 1'1	2'5 ± 0'7	2'0 ± 0'7	77	92	54	100	81 ± 18	148	249	54	246	174 ± 80
Malvasía	0'5 ± 0'8	1'0 ± 1'1	0'2 ± 0'4	1'0 ± 1'0	0'7 ± 0'3	36	50	21	57	41 ± 14	18	50	5	57	32 ± 22
Mazuela	1'3 ± 1'4	1'1 ± 1'4	0'8 ± 1'1	1'1 ± 0'9	1'1 ± 0'2	56	44	38	75	53 ± 14	74	46	30	84	59 ± 21
Merseguera	1'9 ± 1'2	2'8 ± 1'9	2'5 ± 1'3	2'7 ± 0'7	2'5 ± 0'3	87	87	93	100	92 ± 6	168	243	230	273	226 ± 38
Monastrell	0'8 ± 1'0	1'2 ± 1'2	0'6 ± 1'1	0'8 ± 1'0	0'9 ± 0'2	53	71	29	47	50 ± 15	44	83	19	39	46 ± 23
Palomino	1'8 ± 1'3	1'2 ± 1'0	1'3 ± 1'1	2'5 ± 0'8	1'7 ± 0'5	77	62	62	100	75 ± 16	142	71	80	254	137 ± 73
Pedro Ximénez	0'7 ± 1'0	1'1 ± 1'0	1'3 ± 1'3	1'0 ± 1'3	1'0 ± 0'2	40	60	53	60	53 ± 8	27	64	68	60	55 ± 16
Tempranillo	1'1 ± 1'3	1'2 ± 1'1	0'6 ± 1'0	1'6 ± 1'1	1'1 ± 0'4	47	71	29	76	56 ± 19	50	87	17	126	70 ± 41
Tinto basto	0'2 ± 0'4	1'2 ± 1'6	0'3 ± 0'7	0'6 ± 0'8	0'6 ± 0'4	24	47	18	53	35 ± 15	6	55	5	34	25 ± 21
Tinto de Madrid	0'2 ± 0'7	1'5 ± 1'3	0'2 ± 0'4	1'6 ± 1'1	0'9 ± 0'7	11	72	17	83	46 ± 32	2	108	3	134	62 ± 60
Tinto de Toro	0'6 ± 1'0	2'1 ± 1'3	0'3 ± 0'7	1'3 ± 1'0	1'1 ± 0'7	33	83	22	78	54 ± 27	19	176	7	99	75 ± 68
Tinto del país	1'1 ± 1'0	2'1 ± 1'1	0'7 ± 0'8	0'6 ± 0'9	1'1 ± 0'6	71	88	53	41	63 ± 18	75	182	37	27	80 ± 61
Media	1'0 ± 0'5	1'6 ± 0'6	0'9 ± 0'6	1'5 ± 0'7	1'2 ± 0'5	52 ± 21	70 ± 15	43 ± 24	72 ± 21	59 ± 17	50 ± 49	110 ± 64	40 ± 64	109 ± 81	73 ± 54

Tabla 5.7.- Severidad de los síntomas, frecuencia de la enfermedad e índice de sensibilidad a *X. ampelinus*, valores medios y desviación típica de 19 variedades españolas de vid injertadas sobre 41-B. Datos obtenidos durante los años 1987, 1988, 1990 y 1991.

	Severidad de los síntomas					Frecuencia de la enfermedad					Índice de sensibilidad				
	1987	1988	1990	1991	Media	1987	1988	1990	1991	Media	1987	1988	1990	1991	Media
Airén	1'1 ± 1'2	1'7 ± 1'0	1'7 ± 1'1	2'3 ± 1'0	1'7 ± 0'4	60	80	87	100	82 ± 14	68	139	150	227	146 ± 56
Blanca basta	0'6 ± 1'1	1'5 ± 1'4	0'7 ± 1'0	2'1 ± 0'8	1'2 ± 0'6	29	59	35	100	56 ± 28	19	90	25	206	85 ± 75
Bobal	0'8 ± 1'3	1'4 ± 1'4	1'3 ± 1'1	2'1 ± 1'1	1'4 ± 0'5	38	69	69	88	66 ± 18	30	99	90	186	101 ± 55
Cayetana	1'7 ± 1'3	1'5 ± 1'4	1'2 ± 1'1	1'0 ± 1'2	1'3 ± 0'3	69	62	62	46	60 ± 8	117	95	71	46	82 ± 26
Garnacha peluda	0'5 ± 1'0	1'1 ± 1'3	0'6 ± 1'0	0'6 ± 0'8	0'7 ± 0'2	24	47	35	41	37 ± 9	11	50	23	24	27 ± 14
Graciano	0'8 ± 0'8	0'6 ± 0'8	0'4 ± 0'8	1'3 ± 0'8	0'8 ± 0'3	59	41	24	76	50 ± 20	45	24	8	99	44 ± 34
Granegro	1'5 ± 1'2	0'9 ± 1'1	0'5 ± 1'0	2'5 ± 0'8	1'4 ± 0'7	73	53	33	100	65 ± 25	108	50	18	247	105 ± 88
Juan Ibáñez	1'6 ± 1'0	1'3 ± 1'3	0'2 ± 0'4	2'3 ± 0'6	1'4 ± 0'8	88	75	19	100	70 ± 31	142	98	4	231	119 ± 82
Malvasía	1'2 ± 1'5	1'1 ± 1'0	1'2 ± 1'0	1'5 ± 1'4	1'3 ± 0'1	47	65	65	53	57 ± 8	58	72	76	78	71 ± 8
Mazuela	0'9 ± 1'2	0'8 ± 1'1	0'2 ± 0'5	0'6 ± 0'8	0'7 ± 0'3	50	44	17	44	39 ± 13	47	37	4	27	29 ± 16
Merseguera	1'5 ± 1'4	1'5 ± 1'3	1'8 ± 1'4	3'2 ± 0'8	2'0 ± 0'7	62	62	77	100	75 ± 16	90	95	136	323	161 ± 95
Monastrell	1'1 ± 0'5	0'5 ± 0'8	0'2 ± 0'7	0'9 ± 1'2	0'6 ± 0'3	88	29	6	41	41 ± 30	93	14	1	36	36 ± 35
Palomino	1'3 ± 1'3	1'5 ± 1'5	2'1 ± 1'2	2'9 ± 0'9	2'0 ± 0'6	59	65	82	100	76 ± 16	76	99	170	294	160 ± 85
Pedro Ximénez	1'1 ± 1'3	1'8 ± 1'8	1'4 ± 1'2	0'8 ± 0'8	1'3 ± 0'4	50	57	71	57	59 ± 8	54	102	102	45	76 ± 27
Tempranillo	0'5 ± 1'0	0'5 ± 1'0	0'2 ± 0'7	2'1 ± 0'9	0'8 ± 0'7	29	29	6	94	40 ± 33	16	16	1	194	56 ± 79
Tinto basto	1'2 ± 1'4	1'2 ± 1'2	0'5 ± 0'9	0'6 ± 0'9	0'9 ± 0'3	50	63	31	38	45 ± 12	59	74	16	23	43 ± 24
Tinto de Madrid	0'9 ± 1'1	1'2 ± 1'2	0'2 ± 0'5	1'4 ± 0'9	0'9 ± 0'5	53	65	12	82	53 ± 26	47	80	2	116	61 ± 42
Tinto de Toro	0'7 ± 1'1	1'7 ± 1'3	0'3 ± 0'5	1'7 ± 1'2	1'1 ± 0'6	33	67	33	80	53 ± 21	22	111	11	139	71 ± 55
Tinto del país	0'6 ± 1'0	1'2 ± 1'2	1'2 ± 1'4	0'8 ± 1'0	1'0 ± 0'3	35	53	47	53	47 ± 7	21	62	58	44	46 ± 16
Media	1'0 ± 0'4	1'2 ± 0'4	0'8 ± 0'6	1'6 ± 0'8	1'2 ± 0'2	52 ± 18	57 ± 13	41 ± 26	73 ± 24	56 ± 13	53 ± 36	68 ± 34	34 ± 54	117 ± 97	64 ± 41

Tabla 5.8.- Severidad de los síntomas, frecuencia de la enfermedad e índice de sensibilidad a *X. ampelinus*, valores medios y desviación típica de 19 variedades españolas de vid injertadas sobre tres patrones de savia americana (R. de Lot, R-110 y 41-B). Datos obtenidos durante los años 1987, 1988, 1990 y 1991.

	Severidad de los síntomas					Frecuencia de la enfermedad					Índice de sensibilidad				
	1987	1988	1990	1991	Media	1987	1988	1990	1991	Media	1987	1988	1990	1991	Media
Airén	1'3 ± 1'2	1'8 ± 0'9	2'0 ± 1'1	2'3 ± 0'9	1'9 ± 0'4	67	87	91	100	86 ± 12	84	158	184	233	165 ± 54
Blanca basta	0'8 ± 1'1	1'6 ± 1'5	0'9 ± 1'2	1'8 ± 1'0	1'3 ± 0'4	44	69	38	90	60 ± 21	37	109	33	164	86 ± 55
Bobal	1'4 ± 1'4	2'3 ± 1'6	1'7 ± 1'1	2'1 ± 1'1	1'9 ± 0'3	66	82	80	86	78 ± 8	91	184	136	185	149 ± 39
Cayetana	1'5 ± 1'4	1'9 ± 1'7	1'5 ± 1'5	0'9 ± 1'2	1'4 ± 0'3	67	67	61	42	59 ± 10	99	125	88	40	88 ± 31
Garnacha peluda	0'6 ± 1'1	1'2 ± 1'3	0'8 ± 1'1	0'8 ± 1'1	0'9 ± 0'2	26	49	40	45	40 ± 9	14	58	34	37	36 ± 16
Graciano	0'9 ± 0'9	1'2 ± 1'1	1'0 ± 1'2	1'4 ± 1'0	1'1 ± 0'2	65	65	47	78	64 ± 11	57	76	45	111	72 ± 25
Granegro	1'5 ± 1'3	1'5 ± 1'3	0'8 ± 1'2	2'5 ± 0'9	1'6 ± 0'6	72	72	40	95	70 ± 20	109	107	32	239	122 ± 75
Juan Ibáñez	1'6 ± 1'1	2'0 ± 1'6	0'7 ± 1'0	2'5 ± 0'7	1'7 ± 0'7	83	83	43	100	77 ± 21	135	165	31	255	146 ± 80
Malvasía	1'3 ± 1'4	1'1 ± 1'0	0'9 ± 1'0	1'4 ± 1'3	1'2 ± 0'2	51	60	51	60	56 ± 5	64	69	46	83	66 ± 13
Mazuela	1'1 ± 1'2	1'0 ± 1'3	0'6 ± 0'9	1'1 ± 1'1	0'9 ± 0'2	54	46	31	60	48 ± 11	58	46	18	67	47 ± 18
Merseguera	1'8 ± 1'3	2'6 ± 1'8	2'5 ± 1'3	3'0 ± 0'8	2'5 ± 0'4	82	80	89	100	88 ± 8	151	204	218	300	218 ± 54
Monastrell	1'1 ± 1'0	1'0 ± 1'1	0'7 ± 1'2	0'8 ± 1'1	0'9 ± 0'1	71	57	29	45	50 ± 15	75	55	20	38	47 ± 20
Palomino	1'5 ± 1'3	1'9 ± 1'6	2'0 ± 1'3	2'9 ± 0'8	2'1 ± 0'5	70	70	80	100	80 ± 12	104	133	159	291	172 ± 71
Pedro Ximénez	1'0 ± 1'2	1'8 ± 1'6	1'4 ± 1'2	1'0 ± 1'1	1'3 ± 0'4	49	71	69	56	61 ± 9	47	130	98	53	82 ± 34
Tempranillo	0'9 ± 1'2	1'1 ± 1'3	0'5 ± 1'0	2'0 ± 0'9	1'1 ± 0'5	45	55	22	90	53 ± 25	42	61	11	180	74 ± 64
Tinto basto	0'8 ± 1'2	1'3 ± 1'4	0'5 ± 0'9	0'8 ± 1'0	0'9 ± 0'3	41	57	31	47	44 ± 10	34	74	16	35	40 ± 21
Tinto de Madrid	0'6 ± 1'0	1'5 ± 1'4	0'5 ± 0'9	1'6 ± 1'1	1'0 ± 0'5	34	68	28	80	53 ± 22	20	101	13	126	65 ± 49
Tinto de Toro	0'7 ± 1'0	1'9 ± 1'4	0'3 ± 0'6	1'7 ± 1'1	1'2 ± 0'7	44	74	30	86	59 ± 22	31	141	10	146	82 ± 62
Tinto del país	0'8 ± 1'0	1'6 ± 1'2	1'0 ± 1'2	0'8 ± 1'0	1'0 ± 0'3	51	68	51	47	54 ± 8	41	107	51	36	59 ± 28
Media	1'1 ± 0'4	1'6 ± 0'4	1'0 ± 0'6	1'6 ± 0'7	1'3 ± 0'4	56 ± 16	67 ± 11	49 ± 21	74 ± 22	62 ± 14	61 ± 38	105 ± 45	51 ± 62	122 ± 90	82 ± 50

los años, en 833 de las 873 cepas inoculadas (95'4% de las cepas inoculadas). Como puede observarse todos los cultivares ensayados se mostraron sensibles en las condiciones del ensayo. En los datos obtenidos existió una gran variabilidad entre repeticiones, variedades, patrones y años, y las desviaciones típicas de la severidad de los síntomas, de la frecuencia media de enfermedad y, por lo tanto, la de los índices de sensibilidad medios fueron elevadas. Se observó una buena correlación entre severidad y frecuencia de la enfermedad, más fácilmente apreciable cuando se representan los valores como gráficos de barras (figuras 5.1. a 5.9).

En las figuras 5.1, 5.2 y 5.3 se representan los valores medios de la severidad de los síntomas, la frecuencia de la enfermedad y el índice de sensibilidad de todas las variedades en cada uno de los cuatro años en los que se realizaron las lecturas de los síntomas de necrosis bacteriana, independientemente del patrón y para el conjunto de las variedades (tabla 5.8). El último año (1991) fue en el que se alcanzaron los valores medios mayores en los tres índices calculados ($S=1'6$; $E=74\%$; $I=122$) y en 1990 los menores ($S=1$; $E=49\%$; $I=51$). En 1987 y 1988, años en los que se efectuaron las inoculaciones, se obtuvieron valores intermedios, superiores en 1988 con relación a 1987. Según el criterio de clasificación adoptado (apartado 5.2.5), los tres índices alcanzaron en 1991 valores que incluyen a la media de todas las variedades en la clase I (muy sensible) y como moderadamente sensibles en 1987 y 1990. En 1988 los índices de severidad y sensibilidad superaron los valores (1'5 y 100, respectivamente) por lo que clasificarían la media de las variedades como muy sensible, pero la frecuencia de enfermedad no alcanzó el 70% requerido para ello.

En las figuras 5.4, 5.5 y 5.6 se exponen los valores medios de los distintos índices de la enfermedad de cada año, en el conjunto de las variedades injertadas en cada uno de los tres patrones, y su media total en el periodo de estudio (tablas 5.5, 5.6 y 5.7). El patrón Rupestris de Lot (272 cepas estudiadas) se comportó como el que indujo mayor sensibilidad varietal, tanto en el análisis de la severidad, como de la frecuencia de la enfermedad y del índice de sensibilidad. Los otros dos patrones, R-110 (297 cepas estudiadas) y 41-B (304 cepas estudiadas), según la escala aplicada, indujeron una más moderada sensibilidad, con valores similares entre sí.

Figura 5.1.- Severidad de los síntomas de necrosis bacteriana durante los años del ensayo para el conjunto de variedades.

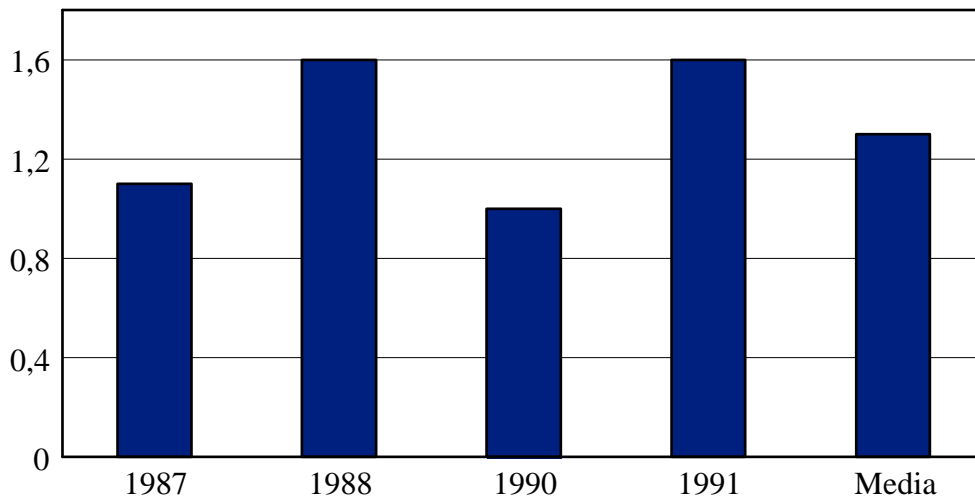


Figura 5.2.- Frecuencia de la necrosis bacteriana durante los años del ensayo para el conjunto de variedades.

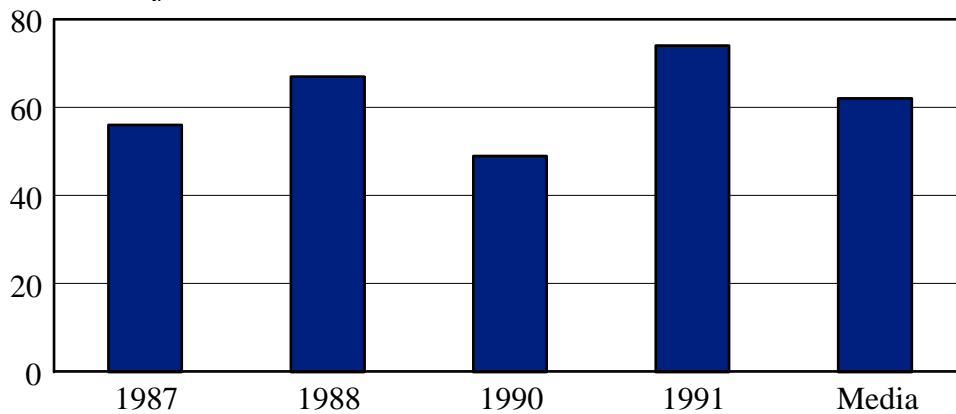


Figura 5.3.- Índice de sensibilidad a la necrosis bacteriana durante los años del ensayo para el conjunto de variedades.

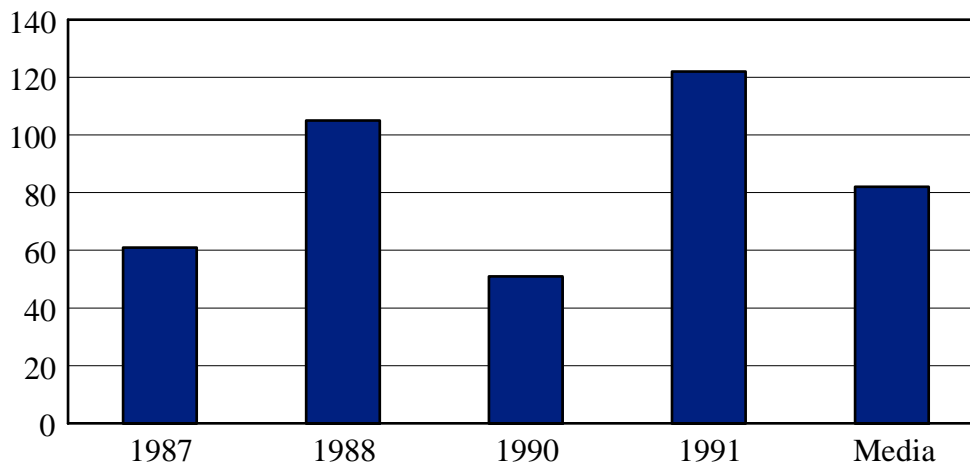


Figura 5.4.- Severidad de los síntomas de la necrosis bacteriana durante los años del ensayo, según los diferentes patrones en el conjunto de variedades.

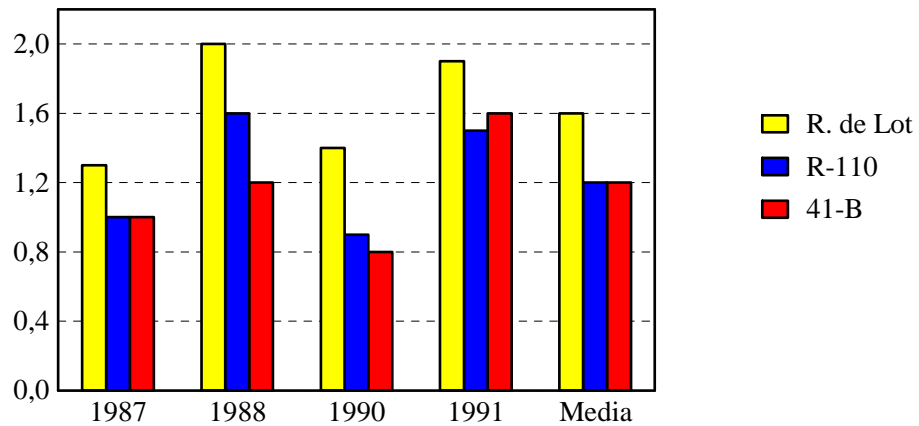


Figura 5.5.- Frecuencia de la necrosis bacteriana durante los años del ensayo, según los diferentes patrones en el conjunto de variedades.

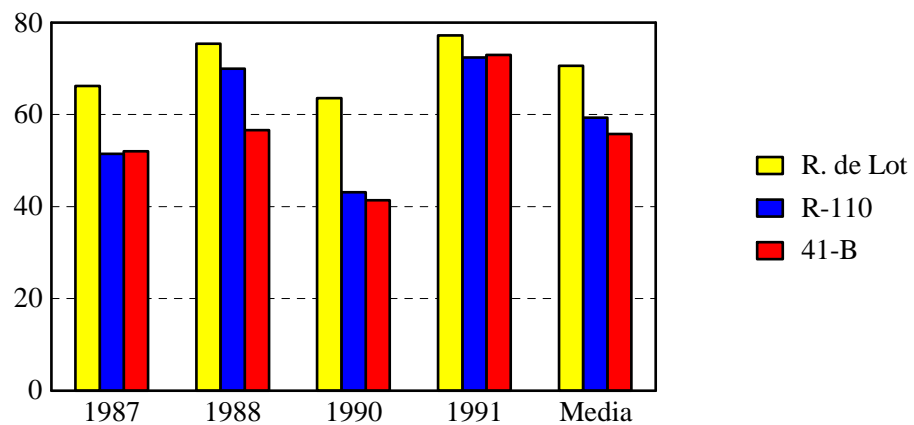


Figura 5.6.- Índice de sensibilidad a la necrosis bacteriana durante los años del ensayo, según los diferentes patrones en el conjunto de variedades.

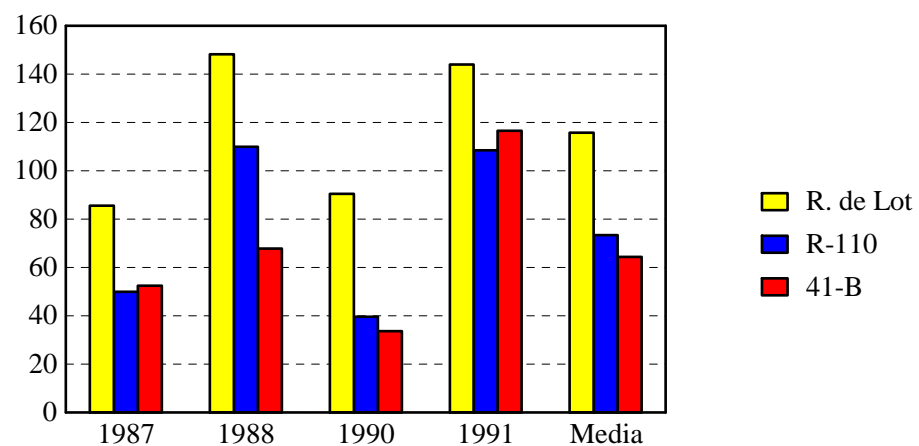


Figura 5.7.- Severidad de los síntomas de la necrosis bacteriana en 19 variedades españolas de vid (valores medios obtenidos con tres patrones en cuatro años).*

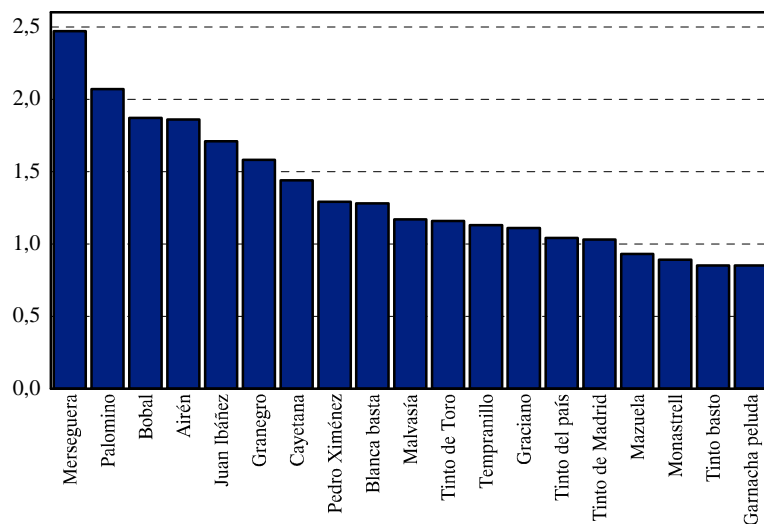


Figura 5.8.- Frecuencia de la necrosis bacteriana en 19 variedades españolas de vid (valores medios obtenidos con tres patrones en cuatro años).*

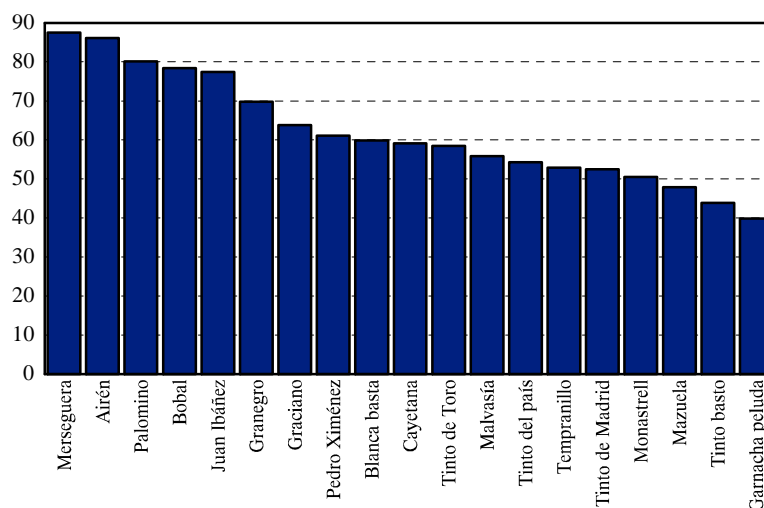
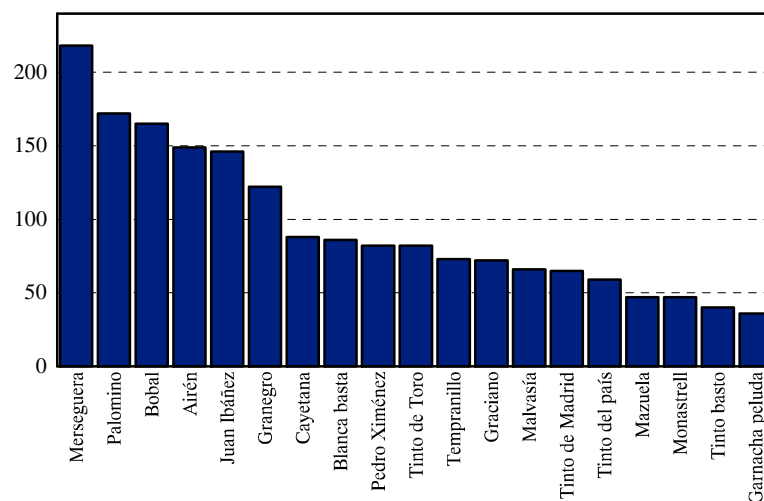


Figura 5.9.- Índice de sensibilidad a la necrosis bacteriana en 19 variedades españolas de vid (valores medios obtenidos con tres patrones en cuatro años).*



* Las variedades aparecen ordenadas según el valor del índice estudiado.

En las figuras 5.7, 5.8 y 5.9 aparecen las variedades ordenadas según el valor medio de los índices estudiados (de mayor a menor) alcanzados en los cuatro años de lecturas, independientemente del patrón sobre el que estuvieran injertadas (tabla 5.8). Estos valores fueron obtenidos de la observación de los síntomas en un mínimo de 33 y un máximo de 51 cepas de cada variedad. Las seis variedades más sensibles, en orden decreciente, fueron Merseguera, Palomino, Airén, Bobal, Juan Ibáñez y Granegro, que se clasificaron como de sensibilidad elevada (clase I). Cayetana, Blanca basta, Tinto de Toro, Pedro Ximénez, Tempranillo, Graciano, Malvasía, Tinto de Madrid, Tinto del país y Monastrell se clasificaron como de sensibilidad media (clase II) y Mazuela, Tinto basto y Garnacha peluda como menos sensibles (clase III). La frecuencia de enfermedad en las variedades Granegro (69'8) y Monastrell (50'5), se situó prácticamente en el límite de las clases I y II, y en el de las clases II y III, respectivamente, incluyéndose los valores de los otros dos índices en la clase I para Granegro y clase III para Monastrell, por lo que se han respetado estas últimas clases en la clasificación de esas dos variedades.

En las figuras 5.10 y 5.11 se señalan con tres colores, según la escala de sensibilidad adoptada, la clasificación obtenida para cada combinación variedad-patrón-año, así como los valores medios de cada variedad-patrón y variedad (figura 5.10), y variedad-año y variedad (figura 5.11), lo que permitió, de una forma global, detectar la influencia del patrón, año y variedad en la obtención de los valores medios, así como su variabilidad y la correlación entre severidad de los síntomas y frecuencia de la enfermedad.

Todas las variedades injertadas en Rupestris de Lot fueron clasificadas como clase I ó clase II. Con el patrón R-110, las variedades Malvasía, Tinto basto y Garnacha peluda fueron consideradas como poco sensibles (clase III), y con el patrón 41-B lo fueron Monastrell, Mazuela, Tinto basto y Garnacha peluda (figura 5.10).

Se observa que para un índice concreto en una combinación variedad/patrón pueden existir diferencias sustanciales en los distintos años, e incluso, que en algunos casos según el año, la misma variedad se puede clasificar en las tres clases de sensibilidad definidas. Los valores medios de los cuatro años fueron más regulares y lógicamente también lo son los valores medios del periodo estudiado, independientemente del patrón.

Figura 5.11.- Clasificación de la sensibilidad de 19 variedades españolas de vid según la severidad de los síntomas, su frecuencia y el índice de sensibilidad. Observaciones realizadas en los años 1987, 1988, 1990 y 1991.

	Severidad de los síntomas					Frecuencia de la enfermedad					Índice de sensibilidad					
	1987	1988	1990	1991	Media	1987	1988	1990	1991	Media	1987	1988	1990	1991	Media	
Merseguera	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	C L A S E I
Palomino	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	
Airén	Yellow	Red	Red	Red	Red	Yellow	Red	Red	Red	Red	Yellow	Red	Red	Red	Red	
Bobal	Yellow	Red	Red	Red	Red	Yellow	Red	Red	Red	Red	Yellow	Red	Red	Red	Red	
Juan Ibáñez	Red	Red	Blue	Red	Red	Red	Red	Blue	Red	Red	Red	Red	Blue	Red	Red	
Granegro	Red	Red	Blue	Red	Red	Red	Red	Blue	Red	Red	Red	Red	Blue	Red	Red	
Cayetana	Red	Red	Red	Blue	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Blue	Yellow	Yellow	Red	Yellow	Blue	Yellow	C L A S E II
Blanca basta	Blue	Red	Blue	Red	Yellow	Blue	Yellow	Blue	Red	Yellow	Blue	Red	Blue	Red	Yellow	
Tinto de Toro	Blue	Red	Blue	Red	Yellow	Blue	Red	Blue	Red	Yellow	Blue	Red	Blue	Red	Yellow	
Pedro Ximénez	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Blue	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Blue	Red	Yellow	Yellow	Yellow	
Tempranillo	Blue	Yellow	Blue	Red	Yellow	Blue	Yellow	Blue	Red	Yellow	Blue	Yellow	Blue	Red	Yellow	
Graciano	Blue	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Blue	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Blue	Red	Yellow	
Malvasía	Yellow	Yellow	Blue	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Blue	Yellow	Yellow	
Tinto de Madrid	Blue	Red	Blue	Red	Yellow	Blue	Yellow	Blue	Red	Yellow	Blue	Red	Blue	Red	Yellow	
Tinto del país	Blue	Yellow	Yellow	Blue	Yellow	Yellow	Yellow	Blue	Yellow	Yellow	Blue	Red	Yellow	Blue	Yellow	
Monastrell	Yellow	Yellow	Blue	Blue	Blue	Red	Yellow	Blue	Blue	Yellow	Yellow	Yellow	Blue	Blue	Blue	
Mazuela	Yellow	Yellow	Blue	Yellow	Blue	Yellow	Blue	Yellow	Blue	Yellow	Yellow	Blue	Yellow	Blue	Blue	C L A S E III
Tinto basto	Blue	Yellow	Blue	Blue	Blue	Blue	Yellow	Blue	Blue	Blue	Blue	Yellow	Blue	Blue	Blue	
Garnacha peluda	Blue	Yellow	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Yellow	Blue	Blue	Blue	

	Severidad de los síntomas	Frecuencia de la enfermedad	Índice de sensibilidad	Clase de sensibilidad
Red	$\geq 1'5$	≥ 70	≥ 100	I Muy sensible
Yellow	≥ 1 y $< 1'5$	≥ 50 y < 70	≥ 50 y < 100	II Moderadamente sensible
Blue	< 1	< 50	< 50	III Poco sensible

La variabilidad mayor se dio en las variedades clasificadas como medianamente sensibles, seguidas de las poco sensibles. Las más regulares fueron las clasificadas como muy sensibles.

5.4. DISCUSIÓN

Se logró con éxito la plantación e inoculación con *X. ampelinus* de 19 variedades de vid. El alto porcentaje (95'4%) de cepas que mostraron síntomas, al menos en un año, demostró que tanto el método de inoculación como la época y las cepas bacterianas seleccionados, fueron adecuadas al objetivo propuesto.

En general, la climatología no fue favorable para facilitar la manifestación de los síntomas y es posible que la necesidad de implantar en una misma parcela todas las variedades hiciera que las condiciones de cultivo de las mismas no fueran las idóneas para el normal comportamiento de una determinada variedad. Dado que los focos de la enfermedad detectados en otras zonas están muy localizados y tienen unas condiciones climáticas poco representativas de las condiciones de las grandes zonas del cultivo, no se ha considerado oportuno realizar otros estudios en paralelo con el de Tosos (Zaragoza). Tampoco se ha considerado conveniente realizar ningún ensayo de inoculación en zonas en las que *X. ampelinus* no hubiera sido identificada.

Se ha establecido, por primera vez, una escala de sensibilidad varietal y de influencia del portainjertos a la necrosis bacteriana de la vid en las condiciones de cultivo de Aragón. No obstante, debido a que la variabilidad de los resultados es un problema general de los estudios de sensibilidad varietal a enfermedades bacterianas, los resultados obtenidos en este ensayo no deben ser tomados como clasificación absoluta, sino como una tendencia de la sensibilidad de las variedades y patrones estudiados en las condiciones señaladas. Por ello, no se ha considerado oportuno analizar estadísticamente los datos, ni calcular diferencias significativas entre variedades, sino sólo clasificarlas en tres grupos, según su sensibilidad varietal.

En nuestro caso, es posible que la variabilidad de los datos obtenidos esté más condicionada por el año y por la propia sensibilidad de los patrones y variedades que por las diferencias de la inoculación. En dos años consecutivos se inocularon dos cepas diferentes de *X. ampelinus* de probado poder patógeno, en la época y con la técnica con la que se habían obtenido anteriormente mejores resultados (Ridé *et al.*, 1983; López *et al.*, 1984). Con ello se pretendía reducir, en la medida de lo posible, el efecto respuesta a la inoculación. Además, se relacionaron los tres criterios de clasificación, severidad de los síntomas, frecuencia de la enfermedad e índice de sensibilidad, lo que permitió limitar los problemas que pudieran haber surgido con inoculaciones muy irregulares.

Las diferencias de un año a otro, tanto en la severidad de los síntomas como en la frecuencia de la enfermedad, ya habían sido observadas en vides infectadas naturalmente (Ridé *et al.*, 1983; Fiori *et al.*, 1996) y en inoculaciones artificiales (Ridé *et al.*, 1983; López *et al.*, 1987d). Éste es el principal problema que plantean los ensayos de sensibilidad a *X. ampelinus* realizados en campo (López *et al.*, 1984; Peros *et al.*, 1995), ya que el desarrollo de la planta y de los síntomas depende de las condiciones climáticas. De los datos pluviométricos registrados en la estación meteorológica de Cariñena (Zaragoza) durante la realización de este ensayo de sensibilidad (tabla 5.2) sólo cabe destacar tres periodos (abril, mayo y junio de 1988; junio, julio, agosto y septiembre de 1990; y febrero, marzo y abril de 1991) que alcanzaron registros pluviométricos superiores a la media histórica mensual respectiva. Dichos periodos pudieran ser considerados como favorables para la manifestación de los síntomas de la necrosis bacteriana de la vid, pudiendo justificar, en parte, las diferencias observadas.

El hecho de que en 1991 se alcanzaran valores de los índices superiores a los de 1990 podría explicarse por la existencia de periodos de pluviometría elevada durante 1990 y 1991, que favorecieron la posterior manifestación de síntomas en 1991. Por contra, con anterioridad a 1990 se registraron periodos de escasez hídrica. De igual modo, estas circunstancias fueron más favorables para 1988 en relación a 1987. Además, en este caso, las diferencias pudieron incrementarse al añadir el efecto de una segunda inoculación realizada en 1988.

Las inoculaciones con *X. ampelinus*, realizadas en distintos patrones de vid cultivados en condiciones controladas en invernadero en Francia, permitieron agrupar a *Rupestris* de Lot,

R-110 y 41-B en una misma clase de sensibilidad, considerándolas tolerantes a la enfermedad (Ridé, 1996). La inducción de una mayor sensibilidad a *X. ampelinus* de las variedades que se injertan sobre Rupestris de Lot con respecto a las injertadas en R-110 y 41-B, había sido sugerida en la denominación de origen Cariñena durante el periodo 1978-1981, en el que las vides mostraron severos síntomas de la enfermedad (Gracia *et al.*, 1980; Sampayo *et al.*, 1981; López, 1983) y en Francia (Ridé *et al.*, 1983), pero no había sido demostrada experimentalmente. En nuestro ensayo comparativo, este hecho ha sido contrastado, ya que las 19 variedades se clasificaron en una clase de sensibilidad superior cuando estaban injertadas en Rupestris de Lot que cuando lo estaban en los otros patrones (figura 5.4, 5.5, 5.6 y 5.10). El patrón Rupestris de Lot no debería, pues, utilizarse en zonas afectadas por la necrosis bacteriana de la vid.

Los estudios anteriores con las variedades españolas habían sido realizados en plantaciones de pie directo (López *et al.*, 1987c), lo que podría dar lugar a diferencias en la sensibilidad comparando con los resultados de las variedades injertadas en patrones (Ridé *et al.*, 1983). A pesar de ello, el estudio comparativo de los resultados obtenidos no difiere sustancialmente, ya que, de las 16 variedades que fueron incluidas en ambos estudios, 11 de ellas se agruparon en la misma clase de sensibilidad: Airén, Graciano, Juan Ibáñez, Malvasía, Mazuela, Monastrell, Pedro Ximénez, Tempranillo, Tinto de Madrid, Tinto de Toro y Tinto del país. En este estudio se han comportado como muy sensibles las variedades Bobal, Granegro y Palomino, que estaban consideradas como moderadamente sensibles. Por el contrario, la variedad Garnacha peluda, considerada como medianamente sensible, se ha comportado como poco sensible. Las diferencias mayores entre los dos estudios se han dado en la variedad Merseguera, ya que ahora está clasificada inequívocamente como clase I, siendo la variedad que se ha mostrado como la más sensible de todas las ensayadas, mientras que anteriormente (López *et al.*, 1987c) estaba clasificada como poco sensible. Dado que en este ensayo se ha comportado de manera uniforme como muy sensible, se puede sospechar que, o bien se ha utilizado en este caso un clon distinto, de mayor sensibilidad que el del ensayo anterior, o bien esta variedad resulta ser más sensible tras ser injertada.

Las variedades Merseguera, Palomino, Airén, Bobal, Juan Ibáñez y Granegro, clasificadas como muy sensibles, algunas ocupan grandes áreas de cultivo de las regiones vitivinícolas andaluza, central y levantina, donde la necrosis bacteriana no está presente. Si *X.*

ampelinus fuera introducida en esas zonas de cultivo, podría causar, dependiendo de la climatología, graves pérdidas económicas, por lo que se deberían extremar las medidas preventivas para evitar la introducción de dicha bacteria.

5.5. CONCLUSIONES

- De los cuatro años objeto de estudio, 1991 se ha mostrado como el año más favorable al ataque de *X. ampelinus*.
- El patrón Rupestris de Lot ha conferido una mayor sensibilidad a las variedades injertadas sobre él. Los patrones R-110 y 41-B se han comportado de manera similar entre sí, confiriendo menos sensibilidad que Rupestris de Lot.
- Las 19 variedades objeto de este estudio han resultado ser sensibles a *X. ampelinus*.
- Las variedades Merseguera, Palomino, Airén, Bobal, Juan Ibáñez y Granegro han mostrado una elevada sensibilidad en las condiciones del ensayo, mientras que Mazuela, Tinto basto y Garnacha peluda han mostrado una baja sensibilidad.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

Xylophilus ampelinus (Panagopoulos) Willems *et al.* es una bacteria considerada de cuarentena, no sólo en Europa (lista A2 de OEPP) sino también en otras zonas (North American Plant Protection Organization [NAPPO] e Interafrican Phytosanitary Council [IAPSC]). Esta bacteria es el agente causal de la necrosis bacteriana de la vid, enfermedad grave, vascular y cíclica, muy influenciada por las condiciones meteorológicas y que provoca síntomas que pueden ser confundidos con los de otras enfermedades.

Dicha bacteria ha sido poco estudiada y es de difícil aislamiento, especialmente en primavera y verano. Esta es posiblemente la razón por la que hasta ahora sólo ha sido confirmada su identificación en Grecia, Francia, Italia, España y Sudáfrica. En España, esta bacteria ha causado importantes pérdidas económicas en Aragón y está también presente en Galicia y La Rioja.

La necrosis bacteriana de la vid carece de medios de lucha directa eficaces, pero, además, no se aplican métodos indirectos de control (selección sanitaria, certificación, etc.), ya que no existen técnicas de detección sensibles ni específicas de aplicación rutinaria, que serían imprescindibles para acometer el control de la enfermedad y prevenir su dispersión a nuevas zonas.

En esta Memoria de Tesis doctoral se ha pretendido resolver algunos de los problemas planteados en el control de la necrosis bacteriana de la vid y de ahí su marcada vertiente aplicada, que ha tratado de avanzar en el estado del conocimiento con una visión finalista.

En la Introducción se ha realizado una revisión bibliográfica, constatando la escasez de referencias, y detectando los objetivos a alcanzar. En la parte experimental, se ha procurado abordar aquellos aspectos que pudieran proporcionar resultados útiles para resolver los tres objetivos fundamentales de la Memoria: 1) Puesta a punto de un método fiable de detección de *X. ampelinus* en material vegetal en cualquier época del año o periodo vegetativo, 2) la evaluación del grado de infección por la bacteria de viñedos aragoneses y 3) el establecimiento de la sensibilidad de los principales cultivares españoles de vid a *X. ampelinus*.

La puesta a punto de un método sensible, sencillo, específico y capaz de ser utilizado rutinariamente para el diagnóstico y detección de *X. ampelinus*, se ha abordado en tres capítulos de la presente Memoria. El resultado final ha sido la normalización de la técnica inmunoenzimática ELISA-DASI sistema biotina/estreptoavidina (b/sa), utilizada con una mezcla de anticuerpos monoclonales específicos capaces de reaccionar con cualquier cepa de *X. ampelinus*. La técnica hace posible la detección inequívoca de 10^5 ufc/ml de la bacteria en macerados del material vegetal. Además, ELISA-DASI b/sa, combinada con el nuevo sistema de lavado interno de sarmientos, también desarrollado en esta Memoria de Tesis, ha permitido la detección, por primera vez, de antígenos de *X. ampelinus* en vides asintomáticas, incluso en reposo invernal. El sistema de lavado interno de sarmientos permite realizar rutinaria y semiautomáticamente la extracción de fluidos internos, gracias al uso de un sencillo instrumental ideado para ello.

El método desarrollado (técnica inmunoenzimática y sistema de lavado interno de sarmientos) hace posible una detección más fiable de *X. ampelinus* que los métodos hasta ahora propuestos por la OEPP, que eran el aislamiento en medio de cultivo, la inmunofluorescencia indirecta convencional y la observación visual de los síntomas característicos. El método ha sido propuesto a la industria y es internacionalmente comercializado por la empresa REAL-DURVIZ, con el protocolo establecido en la presente Tesis doctoral.

En los primeros capítulos también se ha puesto a punto y evaluado una variante de la técnica ELISA que no requiere la realización de extractos. El método, denominado inmunopresión-ELISA, se basa en el análisis serológico de improntas o huellas de secciones de sarmientos en membranas de nitrocelulosa y, aunque es menos sensible que el método ELISA-DASI propuesto, permite de forma rápida (tres horas) revelar muestras pre-impresas y confirmar, incluso en condiciones de campo, sintomatologías dudosas.

La utilización de estos métodos debiera generalizarse para controles sanitarios de la producción viverística e implantarse rutinariamente en los programas de certificación españoles, que hasta ahora sólo analizan virus y fitoplasmas.

El segundo objetivo fundamental de esta Memoria ha sido el análisis de la situación de la infección por *X. ampelinus* en las dos denominaciones de origen de Aragón que más han evolucionado en los últimos años y que son Campo de Borja y Somontano. Simultáneamente, se ha analizado la distribución espacial de la enfermedad en una viña afectada. Ambos aspectos parecen imprescindibles, no sólo para evaluar el grado de infección, sino para poder emitir recomendaciones al agricultor con intención de disminuir la dispersión de la enfermedad en zonas contaminadas o la introducción e instauración de la misma en nuevas áreas.

La enfermedad está presente en todas las comarcas vitivinícolas de Aragón y se han estimado porcentajes de infección del 9'5% de las cepas en Campo de Borja y del 2'7% en las nuevas zonas de expansión del cultivo del Somontano de Huesca, siendo ésta la primera cita en dicha zona. Toda nueva plantación debería efectuarse con material libre de *X. ampelinus* (previo análisis) o, al menos, proceder de zonas libre de la enfermedad.

En esta Memoria, se ha detectado, por primera vez en Aragón, *X. ampelinus* en sarmientos asintomáticos procedentes de viñas situadas en cotas inferiores a los 500 m de altitud, donde nunca se han observado síntomas de la enfermedad. Así pues, la ausencia de síntomas tampoco garantiza la sanidad de un material vegetal determinado. Se confirma la irregular distribución de *X. ampelinus* en cepas infectadas. En la toma de muestras, es necesario recolectar al menos un sarmiento de cada brazo (usualmente tres), para analizar el estado sanitario de una planta.

En la parcela afectada objeto del estudio de distribución espacial se ha observado que la bacteria se distribuía al azar en el interior de la plantación.

El tercer objetivo fundamental de la Tesis ha tratado de la sensibilidad a la enfermedad de variedades y portainjertos. A pesar de que los años de los ensayos hayan sufrido condiciones climáticas poco favorables para la expresión de síntomas de la enfermedad, se ha establecido, por vez primera, una escala de sensibilidad varietal así como la influencia de tres portainjertos en dicha sensibilidad a la necrosis bacteriana en las condiciones de cultivo de Aragón.

Las 19 variedades estudiadas han resultado ser susceptibles a *X. ampelinus*, confirmando la elevada sensibilidad de Merseguera, Palomino, Airén, Bobal, Juan Ibáñez y Granegro en los años del ensayo. Estas variedades ocupan, prácticamente como monocultivo, importantes áreas de viñedo español, donde se deberían extremar las medidas preventivas para impedir la introducción de *X. ampelinus*. Las variedades Mazuela, Tinto basto y Garnacha peluda se han mostraron como las menos sensibles, constituyendo una opción de interés para zonas infectadas. Las restantes variedades ensayadas han mostrado una moderada sensibilidad a la enfermedad.

Se ha demostrado que el patrón Rupestris de Lot induce mayor sensibilidad a las variedades, confirmando observaciones de otros países. Este patrón no debería utilizarse en zonas con incidencia de la enfermedad.

Esta Tesis ha procurado aportar datos de interés para evitar la introducción de la bacteria en nuevas áreas. *X. ampelinus* es una bacteria que puede poner en peligro a una viticultura moderna, como está ocurriendo en determinadas zonas de Francia, y para la cual ya existen métodos indirectos de análisis que deberían establecerse a través de la normativa fitosanitaria precisa.

Por todo ello, sería fundamental realizar controles rutinarios e incluir dentro de los programas de certificación a *X. ampelinus*. Se debería controlar la sanidad de las plantas importadas y aplicar sistemáticamente los métodos de diagnóstico propuestos, para evitar la dispersión de esta grave enfermedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFANADOR L., VICTORIA J.I., 1981. Specificity of ELISA to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* identification. Proc. 5th Int. Conf. Plant Path. Bact. Cali. 113-121.

ÁLVAREZ A.M., LOU K., 1985. Rapid identification of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by ELISA. *Plant Disease*, 69 (12), 1082-1086.

ARAMBURU J.M., LÓPEZ M.M., CAMBRA M., 1984. Detección de *Xanthomonas ampelina* mediante la técnica inmunoenzimática ELISA indirecta. Comunicaciones del III Congreso Nacional de Fitopatología, SEF. Puerto de la Cruz. 57.

ARAMBURU J.M., LÓPEZ M.M., GORRIS M.T., SALCEDO C., 1982. Caracteres bioquímicos y sensibilidad a bactericidas y fungicidas de *Xanthomonas ampelina*. Resúmenes del I Congreso Nacional de Fitopatología, SEF. Granada. 50.

BARAILLA R., 1983. La bouillie bordelaise. Rôle et efficacité dans la prévention contre la nécrose bactérienne. *Bulletin Technique des Pyrénées Orientales*, 106, 78-81.

BARZIC M.R., TRIGALET A., 1982. Détection de *Pseudomonas phaseolicola* (Burkh.) Dowson par la technique ELISA. *Agronomie*, 2 (4), 389-397.

BAZZI C., PIAZZA C., BURR T.S., 1987. Detection of *Agrobacterium tumefaciens* in grapevine cuttings. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 17 (1), 105-112.

BAZZI C., STEFANI E., PADOVAN F., MAZZUCCHI U., 1990. *Xylella fastidiosa* Wells et al. is not associated with "mal dell'esca" of grapevine in the Emilia-Romagna Region. *Phytopathological Mediterranean*, 29, 56-58.

BÉGUIN N., GUGERLI P., CAZELLES O., 1984. Détection d'infections latentes de jambe noire (*Erwinia carotovora* var. *atroseptica*) dans les tubercules de pomme de terre par le dosage immuno-enzymatique ELISA. *Rev. Suisse Agric.*, 16 (6), 321-324.

BERNARD P., FAURE A., 1983. Nécrose bactérienne de la vigne. Enquête dans le Narbonnais, 1978 à 1980. *Bulletin Technique des Pyrénées Orientales*, 106, 57-69.

BISHOP A.L., BURR T.J., MITTAK V.L., KATZ B.H., 1989. A monoclonal antibody specific to *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 and its utilization for indexing grapevine propagation material. *Phytopathology*, 79 (9), 995-998.

BRADBURY J.F., 1973. *Xanthomonas ampelina*. *Description of Pathogenic Fungi and Bacteria*, Commonwealth Mycological Institute. Kew. Set 38, n° 378.

CALZOLARI A., 1983. Mal nero della vite: conoscenze attuali. *Informatore Fitopatologico*, 10, 30-34.

CAMBRA M.A., 1993. Métodos simples de extracción de fluidos de vid utilizables para la detección de *Xylophilus ampelinus*. Resúmenes IV Reunión Científica de la Sociedad Española de Fitopatología, SEF. Santiago de Compostela. 11.

CAMBRA M., CAMARASA E., GORRIS M.T., GARNSEY S.M., CARBONELL E., 1991a. Comparison of different immunosorbent assays for citrus tristeza virus (CTV) using CTV-specific monoclonal and polyclonal antibodies. Proc. 11th Conference International Organization Citrus Virologists, IOCV. Riverside. 38-45.

CAMBRA M., CAMARASA E., GORRIS M.T., ROMÁN M.P., ASENSIO M., PÉREZ E., SERRA J., CAMBRA M.A., 1994. Detección de proteínas estructurales de virus mediante inmunopresión-ELISA y su uso en diagnóstico. *Investigación Agraria. Fuera de serie* 2, 221-230.

CAMBRA M., GORRIS M.T., CAMARASA E., ASENSIO M., 1991b. Detección y localización del virus de la tristeza (CTV) y del virus de la Sharka (PPV) mediante inmunopresión directa ELISA. Resúmenes III Reunión Científica de la Sociedad Española de Fitopatología, SEF. Zaragoza. 55.

CAMBRA M., GORRIS M.T., CAMARASA E., ASENSIO M., CAMBRA M.A., LÓPEZ M.M., 1992a. Diagnóstico y localización de virus y bacterias fitopatógenos mediante inmunopresión directa-ELISA utilizando anticuerpos monoclonales biotinilados. Resúmenes VI Congreso Latinoamericano de Fitopatología, SEF. Torremolinos. 184.

CAMBRA M., GORRIS M.T., CAMBRA M.A., LÓPEZ M.M., 1990. Diagnóstico serológico de la necrosis bacteriana de la vid. Resúmenes I Congreso Ibérico de Ciencias Hortícolas. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. Lisboa. 413.

CAMBRA M., GORRIS M.T., TERRADA M.E., 1996. Caracterización, diagnóstico y detección serológica de virus, 207-254. En: *Patología Vegetal*. G. Llácer, M.M. López, A. Trapero, A. Bello. Sociedad Española de Fitopatología. Valencia. 1.165 pp.

CAMBRA M., LÓPEZ M.M., 1978. Titration of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* antibodies by using enzyme labelled anti rabbit globulins (ELISA indirect method). Proc. 4th Int. Conf. Plant Path. Bact. Angers. 327-331.

CAMBRA M., LÓPEZ M.M., BOLINCHES J., ARAMBURU J.M., 1982. Titulación de antiseros de *Xanthomonas ampelina* y diagnóstico de la bacteria mediante inmunofluorescencia y técnicas inmunoenzimáticas. Resúmenes del I Congreso Nacional de Fitopatología, SEF. Granada. 25.

CAMBRA M.A., LÓPEZ M.M., GORRIS M.T. CAMBRA M., 1992b. Comparación de métodos inmunoenzimáticos de detección de *Xylophilus ampelinus*, causante de la necrosis bacteriana de la viña, utilizando anticuerpos monoclonales. Resúmenes VI Congreso Latinoamericano de Fitopatología, SEF. Torremolinos. 179.

CIVEROLO E.L., FAN F., 1982. *Xanthomonas campestris* pv. *citri* detection and identification by enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Disease*, 66 (3), 231-236.

CIVEROLO E.L., HELKIE C., 1981. Indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. Proc. 5th Int. Conf. Plant Path. Bact. Cali. 105-112.

CLARK M.F., ADAMS A.N., 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 34, 475-483.

COMUNIDAD DE MADRID, 1990. *Descripciones ampelográficas nacionales*. Monografías de Investigación y Experimentación Agraria. Comunidad de Madrid. Madrid. 250 pp.

COTHER E.J., VRUGGING H., 1980. Detection of viable and non-viable cells of *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* in inoculated tubers of var. Bintje with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Potato Res.*, 23, 133-135.

DE BOER S.H., 1990. Immunofluorescence for bacteria, 295-298. En: *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens*. HAMPTON R., BALL E., DE BOER S.H.. APS Press, St. Paul. Minnesota.

DE BOER S.H., McCANN M., 1989. Determination of population densities of *Corynebacterium sepedonicum* in potato stems during the growing season. *Phytopathology*, 79 (9), 946-951.

DE BOER S.H., WIECZOREK A., KUMMER A., 1988. An ELISA test for bacterial ring rot of potato with a new monoclonal antibody. *Plant Disease*, 72 (10), 874-878.

DE LEÓN A., 1987. Caracterización agroclimática de la provincia de Zaragoza. MAPA, Madrid. 195 pp.

DESACHE F., CANTAGREL R., 1987. Relations sol-vigne-parasite dans l'expression de la nécrose bactérienne de la vigne sur Ugni-blanc. Journées d'information sur la nécrose de la vigne. Pons.

EPPO/CABI, 1992. *Xylophilus ampelinus*, 852-855. En: *Quarantine Pests for Europe*.. Smith I.M., McNamara D.G., Scott P.R., Harris K.M., CAB International. Wallingford. 1032 pp.

ERASMUS H.D., MATTHEE F.N., LOUW H.A., 1974. A comparison between plant pathogenic species of *Pseudomonas*, *Xanthomonas* and *Erwinia* with special reference to the bacterium responsible for bacterial blight of vines. *Phytophylactica*, 6, 11-18.

FABRE F., 1983. La nécrose bactérienne en Vaucluse. *Bulletin Technique des Pyrénées Orientales*, 106, 70-73.

FIORI M., CARTA C., GARAU R., PROTA V.A., 1996. Further investigations on "mal nero" disease of grapevine in Sardinia. *Phytopathological Mediterranean*, 35, 13-18.

FRENCH W.J., CHRISTIE R.G., STASSI D.L., 1977. Recovery of rickettsialike bacteria by vacuum infiltration of peach tissues affected with phony disease. *Phytopathology*, 67, 945-948.

GALET P., 1977. *Les maladies et les parasites de la vigne*. vol. 1, 469-484. Imprimerie du Paysan du Midi. Montpellier. 871 pp.

GARCÍA A., LARA M., 1989. *La colección de vides del Rancho de la Merced. Catálogo de variedades viníferas y sus sinonimias*. Junta de Andalucía. Córdoba. 80 pp.

GAROVAGLIO S., CATTANEO A., 1879. Studi sulle dominanti malattie dei vitigni. II. Del Mal Nero. *Arch. Labor. Critt. Bot. Univ. Pavia*, 252-261.

GÓMEZ J., LÓPEZ M.M., 1986. *Necrosis bacteriana de la viña en Galicia*. Servicio Agrario de la Diputación Provincial de Pontevedra. Pontevedra. 12 pp.

GORRIS M.T., ALARCÓN B., LÓPEZ M.M., CAMBRA M., 1994. Characterization of monoclonal antibodies specific for *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and comparison of serological methods for its sensitive detection on potato tubers. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (6), 2076-2085.

GORRIS M.T., CAMBRA M., LÓPEZ M.M., 1989. Production of monoclonal antibodies specific to *Xylophilus ampelinus*. Proc. 7th Int. Conf. Plant Path. Bact. Budapest. 913-921.

GORRIS M.T., CAMBRA M., LLOP P., LÓPEZ M.M., LECOMTE P., CHARTIER R., PAULIN J.P., 1996. A sensitive and specific detection of *Erwinia amylovora* based on the ELISA-DASI enrichment method with monoclonal antibodies. *Acta Horticulturae*, 411, 41-45.

GOTTWALD T.R., AUBERT B., ZHAO XUE-YUAN, 1989. Preliminary analysis of citrus greening (Huanglungbin) epidemics in the People's Republic of China and French Reunion Island. *Phytopathology*, 79, 687-693.

GOTTWALD T.R., CAMBRA M., MORENO P., 1993. The use of serological assays to monitor spatial and temporal spread of citrus tristeza virus in symptomless trees in eastern Spain. Proc. 12th Conference International Organization Citrus Virologists, IOVC. Riverside. 51-61.

GOTTWALD T.R., CAMBRA M., MORENO P., CAMARASA E., PIQUER J., 1996. Spatial and Temporal Analysis of Citrus Tristeza Virus in Eastern Spain. *Phytopathology*, 86 (1), 45-55.

GOTTWALD T.R., McGUIRE S.M., GARRAN S., 1988. Asiatic citrus canker: Spatial and temporal spread in simulated new planting situations in Argentina. *Phytopathology*, 78, 739-745.

GOTTWALD T.R., RICHIE S.M., CAMPBELL C.L., 1992. LCOR2-Spatial correlation analysis software for the personal computer. *Plant Disease*, 76, 213-215.

GOTTWALD T.R., TIMMER L.W., McGUIRE R.G., 1991. Analysis of disease progress of citrus canker in nurseries in Argentina. *Phytopathology*, 79, 1276-1283.

GRACIA M., LÓPEZ M.M., SAMPAYO M., 1980. *La necrosis bacteriana de la vid*. Hoja divulgadora 14/80 HD. Ministerio de Agricultura. Madrid. 16 pp.

GRACIA M., LÓPEZ M.M., SAMPAYO M., 1988. Necrosis bacteriana (*X. ampelinus* Panagopoulos), 189-194. En: *Los parásitos de la vid, estrategia de lucha*. MAPA.-Mundi Prensa. Madrid. 276 pp.

GRASSO S., MOLLER W.J., REFATTI E., MAGNANO DI SAN LIO G., GRANATA G., 1979. The bacterium *Xanthomonas ampelina* as causal agent of a grape decline in Sicily. *Rivista di Patologia Vegetale, S. IV, 15*, 91-106.

HÉRITIER J., 1983. La nécrose bactérienne dans l' Aude. *Bulletin Technique des Pyrénées Orientales, 106*, 50-56.

HIDALGO L., 1993. *Tratado de viticultura general*. Mundi-Prensa. Madrid. 983 pp.

HOPKINS D.L., 1988. Production of diagnostic symptoms of blight in citrus inoculated with *Xylella fastidiosa*. *Plant Disease, 72* (5), 432-435.

HUDE R., SARRAZIN J.F., 1983. La nécrose bactérienne de la vigne dans les Charentes. *Bulletin Technique des Pyrénées Orientales, 106*, 74-77.

LECOMTE P., 1993. Shoot and blossom susceptibility to fire blight (*Erwinia amylovora*) of Asian pear cultivars. *Acta Horticulturae, 338*, 397-406.

LIN C.P., CHEN T.A., WELLS J.M., VAN DER ZWET T., 1987. Identification and detection of *Erwinia amylovora* with monoclonal antibodies. *Phytopathology* (2), 77, 376-380.

LIN N.S., SU Y.H., HSU H.T., 1990. Immunological detection of plant viruses and mycoplasma-like organisms by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. *Phytopathology, 80*, 824-828.

LÓPEZ M.M., 1983. La nécrose bactérienne de la vigne en Espagne. *Bulletin Technique des Pyrénées Orientales*, 106, 48-49.

LÓPEZ M.M., ARREGUI J.M., NAVARRO L., 1985. Nueva técnica de inoculación con *Xanthomonas ampelina* de plantas de viña cultivadas *in vitro* para el estudio de las relaciones huésped/parásito. Proc. II Congreso Nacional de Fitopatología (1983), Sociedad Española de Fitopatología. Vitoria. 45-50.

LÓPEZ M.M., CAMBRA M., ARAMBURU J.M., BOLINCHES J., 1987a. Problems of detecting phytopathogenic bacteria by ELISA. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 17, 113-117.

LÓPEZ M.M., CAMBRA M., BERNAT A., 1987b. Estudio comparativo de métodos de detección de *Xanthomonas ampelina*. Jornadas de Viticultura y Enología "Selección clonal y sanitaria". Grupo de Viticultura y Enología de la Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. Murcia. 95-100.

LÓPEZ M.M., GRACIA M., SAMPAYO M., 1980. Studies on *Xanthomonas ampelina* Panagopoulos in Spain. Proc. 5th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union. Patras. 56-57.

LÓPEZ M.M., GRACIA M., SAMPAYO M., 1987c. Current status of *Xanthomonas ampelina* in Spain and susceptibility of Spanish cultivars to bacterial necrosis. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 17, 231-236.

LÓPEZ M.M., GRACIA M., SAMPAYO M., ARREGUI J.M., NAVARRO L., 1987d. Sensibilidad de variedades españolas de vid a la necrosis bacteriana. Jornadas de Viticultura y Enología "Selección clonal y sanitaria". Grupo de Viticultura y Enología de la Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. Murcia. 101-106.

LÓPEZ M.M., SAMPAYO M., CAMBRA M., SALCEDO C., 1978. Detección en España de *Xanthomonas ampelina*, causante de la necrosis bacteriana de la viña. III Jornadas del Grupo de Fitopatología de la Sociedad Española de Microbiología, SEM. Valencia. 24.

LORENTE M., BARBACIL J., 1994. *Vinos de Aragón*. Ed. La Val de Onsera. Huesca. 231 pp.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y PESCA, 1981. *La necrosis bacteriana de la vid. Xanthomonas ampelina Panagopoulos*. Ministerio de Agricultura y Pesca. Madrid. 8 pp.

MARCELIN H., 1983. La maladie d' Oléron. *Bulletin Technique des Pyrénées Orientales*, 106, 5-7.

MARCELIN H., NOVOA D., 1983a. Essai de matériel de taille pneumatique auto-désinfectant. *Bulletin Technique des Pyrénées Orientales*, 106, 82-84.

MARCELIN H., NOVOA D., 1983b. Essais de l'action du cuivre. *Bulletin Technique des Pyrénées Orientales*, 106, 85-88.

MATTHEE F.N., HEYNS A.J., ERASMUS H.D., 1970. Present position of bacterial blight (Vlamsiekte) in South Africa. *The Deciduous Fruit Grower*, 20 (4), 81-84.

MODJESKA J.S., RAWLINGS J.O., 1983. Spatial correlation analysis of uniformity data. *Biometrics*, 39, 373-384.

MORISITA M., 1959. Measuring of the dispersion of individuals and analysis of the distributional patterns. *Mem. Fac. Sci. Kyushu Univ., Ser. E. Biol.*, 2, 215-235.

MORTIER G., 1985. Contribution à l'étude des relations sols-vigne-atmosphère dans le déterminisme de la nécrose bactérienne. Premières Journées d'Études sur les Maladies des Plantes. *ANPP*, 1, 327-334.

NOMÉ S.F., RAJU B.C., GOHEEN A.C., NYLAND G., DOCAMPO D., 1980. Enzyme-linked immunosorbent assay for Pierce's disease bacteria in plant tissues. *Phytopathology*, 70 (8), 746-749.

OEPP, 1984. *Xanthomonas ampelina* Panagopoulos 1969. EPPO Data sheets on quarantine organisms. List A2, n° 133. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 14, 39-43.

OEPP, 1990. EPPO quarantine procedures: *Xylophilus ampelinus*. Documento n° 90/2358.

OEPP, 1994. Certification scheme. Pathogen-tested material of grapevine varieties and rootstocks. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 24, 347-367.

OLIVEIRA M.L., 1970. Maladie bactérienne de la vigne. Situation actuelle. Perspectives d'extension de la maladie. Méthode de lutte. *Bulletin de l'O.I.V.*, 467, 16-18.

OSTLE B., 1972. *Statistic in Research. Basic Concepts and Techniques for Research Workers*. The Iowa State University Press, USA. 542-543.

PANAGOPOULOS C.G., 1969. The disease "Tsilik marasi" of grapevine: Its description and identification of the causal agent (*Xanthomonas ampelina* sp. nov.). *Ann. Inst. Phytopathological Benaki*, 9 (1), 59-81.

PANAGOPOULOS C.G., 1987. Recent research progress on *Xanthomonas ampelina*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 17, 225-230.

PANAGOPOULOS C.G., PSALLIDAS P.G., 1983. Développement de la nécrose bactérienne de la vigne en Grèce. *Bulletin Technique des Pyrénées Orientales*, 106, 46-47.

PEROS J.P., BERGER G., RIDÉ M., 1995. Effect of grapevine cultivar, strain of *Xylophilus ampelinus* and culture medium on *in vitro* development of bacterial necrosis. *Vitis*, 34 (3), 189-190.

PRUNIER J.P., RIDÉ M., LAFON R., BULIT J., 1970. La nécrose bactérienne de la vigne. *Cahiers de l'Académie d'Agriculture de France*, 975-982.

PSALLIDAS P.G., ARGYROPOULOU A., 1994. Effect of hot water treatment on *Xylophilus ampelinus* in dormant grape cuttings. Proc. 8th Int. Conf. Plant Path. Bact. (1992), Plant Pathogenic Bacteria. Versailles. 993-998.

RAVAZ L., BAILLEAU A., 1896. Traitement de la Maladie d'Oléron. *Revue de Viticulture*, 6, 149-150.

RIBÉREAU-GAYOU P., 1968. *Les composés phénoliques des végétaux*. Ed. Dunod. Paris. 227 pp.

RIDÉ M., 1984. La nécrose bactérienne. *Phytoma*, Novembre, 33-36.

RIDÉ M., 1985. La nécrose bactérienne. *Vititechnique*, 87, 12-21.

RIDÉ M., 1996. La nécrose bactérienne de la vigne: Données biologiques, épidémiologiques, bases d'une stratégie de lutte. *C.R. Académie d'Agriculture Française*, 82 (1), 31-50.

RIDÉ M., RAT B., RIDÉ S., NOVOA D., 1977a. Données nouvelles sur la biologie de *Xanthomonas ampelina* Panagopoulos, agent de la nécrose bactérienne de la vigne. *Ann. Phytopathologie*, 9, 87.

RIDÉ M., RIDÉ S., NOVOA D., 1983. Connaissances actuelles sur la nécrose bactérienne de la vigne. *Bulletin Technique des Pyrénées Orientales*, 106, 10-45.

RIDÉ M., RIDÉ S., RAT B., NOVOA D., 1977b. La nécrose bactérienne de la vigne. Maladie d'Oléron. Expérimentations préliminaires à une meilleure compréhension de la maladie. *Bulletin Technique Pyrénées Orientales*, 82, 6-28.

SAMPAYO M., GRACIA M., LÓPEZ M.M., 1981. Necrosis bacteriana de la vid. *Agricultura*, 592, 823-825.

SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M., CAMBRA M., 1987. *Técnicas Inmunoenzimáticas ELISA en patología animal y vegetal*. Serie Técnica nº 7. Ed. Office International des Épizooties e Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. París. 62 pp.

SCORTICHINI M., 1991. Aspetti sintomatologici, diagnostici, e di prevenzione della “malattia di Pierce”. *L’Informatore Agrario*, 20, 73-79.

SPERRY J.S., HOLBROOK N.M., ZIMMERMANN M.H., TYREE M.T., 1987. Spring filling of xylem vessels in wild grapevine. *Plant Physiol.*, 83, 414-417.

STEVENS W.A., TSIANTOS J., 1979. The use of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of *Corynebacterium michiganense* in tomatoes. *Microbios. lett.*, 10, 26-32.

TYREE M.T., EWERS F.W., 1991. The hydraulic architecture of trees and other woody plants. *New Phytol.*, 119, 345-360.

VAN DER PLANK J.E., 1963. *Plant Diseases: Epidemics and Control*. Academic Press. New York. 349 pp.

VRUGGING H., 1978. Enzyme linked immunosorbent assay in the serodiagnosis of plant pathogenic bacteria. Proc. 4th Int. Conf. Plant Path. Bact. Angers. 307-310.

WALTER B., 1991. Sélection de la vigne: le dépistage des maladies de la vigne transmissibles par les bois et plants. *Bulletin de l’OIV*, 727-728, 691-701.

WEAVER W.M., GUTHRIE J.M., 1978. Enzyme-linked immunospecific assay: application to the detection of seedborne bacteria. *Phytopathology News*, 12, 156.

WILLEMS A., GILLIS M., KERSTERS K., VAN DER BROECKE L., DE LEY J., 1987a. The taxonomic position of *Xanthomonas ampelina*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 17, 237-240.

WILLEMS A., GILLIS M., KERSTERS K., VAN DER BROECKE L., DE LEY J., 1987b. Transfer of *Xanthomonas ampelina* Panagopoulos 1969 to a new genus, *Xylophilus* gen. nov., as *Xylophilus ampelinus* (Panagopoulos 1969) comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37 (4), 422-430.

YUEN G.Y., ÁLVAREZ A.M., BENEDICT A.A., TROTTER K.J., 1987. Use of monoclonal antibodies to monitor the dissemination of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Phytopathology*, 77 (2), 366-370.