

NOTA

Presencia de bacterias en el xilema de cafetos (Rubiaceae: *Coffea arabica*) afectados por la enfermedad conocida como “Crespera”

Luis Vargas Cartagena¹, Ethel Sánchez^{2*}, Maribel Vargas², Arturo Solórzano¹,
Francisco Hernández², Haruo Iwasawa³ y Enrique Freer²

¹ Departamento de Protección de Cultivos, Ministerio de Agricultura y Ganadería; vargmora@racsa.co.cr

² Unidad de Microscopía Electrónica, Universidad de Costa Rica, Apdo 2060 San Pedro Montes de Oca, San José, Costa Rica. Fax 207-3182; ethels@cariari.ucr.ac.cr

³ Hokko Chemical Co.

* Correspondencia.

Recibido 13-III-2001. Corregido 21-VIII-2001. Aceptado 21-IX-2001.

Abstract: “Crespera” is an infectious disease of coffee plants that affects both the coffee production and the economy of the coffee producer countries. This disease affects morphologically the plant: long and narrow leaves with wavy borders and marginal necrosis; strong chlorosis results in drying of the leaf, and leads to bad conditions of the plant. The internodes are short, producing the appearance of multiple sprouts in the axial sprout, the flowers can turn greenish, and the plant can present branches with severe symptoms, and branches without apparent symptoms at the same time. As a result, the coffee bean production decreases strikingly. The aim of this work was to determine the occurrence of the possible causative agent in the coffee plants using transmission electron microscopy. Normal and infected plants were compared looking at the leaves, central vein, lateral veins and petiole. It was determined that xylematic vessels show the presence of gram negative bacilliform bacteria (of thick-wavy walls), with dimensions of 0.3-0.5 μm diameter and 1-4 μm , length. The control plants did not show bacteria in the xylem.

Key words: Coffee, crespera, Gram negative bacteria, xylem, ultrastructure, phytopathology.

El café (*Coffea arabica*) fue el primer cultivo explotado comercialmente a escala internacional en Costa Rica y en el siglo pasado fue la base de la economía de este país. Sin embargo, una amplia gama de enfermedades causan pérdidas económicas importantes. Una de éstas es conocida como “crespera”, que produce alteraciones en la morfología de las hojas de la planta, como bordes encrespados (ondulados), hojas alargadas y angostas con zonas de clorosis que evolucionan a necrosis y finalmente se secan. La planta no se desarrolla adecuadamente, los entrenudos son más cortos y ocurre un aumento en la proliferación de brotes en las yemas axilares, en ocasiones algunas de las partes florales pueden adquirir una coloración

verdosa; además, la aparición de los síntomas en la planta es irregular, porque se pueden encontrar ramas sin síntomas aparentes y otras con síntomas severos; sin embargo, la alteración más relevante es la disminución en la producción (Beretta *et al.* 1996, Meneguim *et al.* 2000). Esta enfermedad se ha asociado a la infección con *Xylella fastidiosa* (Beretta *et al.* 1996, Meneguim *et al.* 2000), una bacteria Gram negativa difícil de cultivar, que se localiza en los vasos del xilema de los haces vasculares (Hopkins 1989); la transmisión se efectúa por insectos que se alimentan de xilema de la planta (Meneguim *et al.* 2000).

Xylella fastidiosa fue descrita en 1978 como el agente causal de la enfermedad de

Pierce, en viñedos (Davis *et al.* 1978). Además, se le ha identificado en otros cultivos como la alfalfa, en donde causa “enanismo de la alfalfa”, en la caña de azúcar produce “enanismo de la soca”; también, causa “la enfermedad falsa del durazno”, “el chamusco foliar del almendro”, “la escaldadura foliar del ciruelo”, en los cítricos produce “la clorosis variegada” (Davis *et al.* 1978, Raju *et al.* 1986, Chang *et al.* 1993, Agrios 1995, De Lima *et al.* 1998, Timmer *et al.* 2000, Schaad *et al.* 2001). Beretta (1995), determinó la presencia de esta bacteria en el xilema de las plantas de café en Brasil.

En Costa Rica, todavía no se ha aislado *X. fastidiosa*; sin embargo, en las zonas cafetaleras altas del Valle Intermontano Central, específicamente en el área conocida como “Los Santos” se ha presentado un brote de una enfermedad que afecta a aproximadamente 800 hectáreas de cultivo y que clínicamente es similar a la “crespera”; lo que motivó el estudio ultraestructural de tejidos foliares de plantas afectadas, buscando el posible agente etiológico.

Se recolectaron ramas afectadas de cafetos en el distrito de San Juan Sur, Cantón Desamparados, San José y ramas de cafetos sanos del Cantón de Desamparados, Alajuela, Costa Rica. Se cortaron fragmentos de aproximadamente 3 mm² de hoja, vena central, venas laterales y peciolo. Los especímenes se fijaron con solución de 2.5% de glutaraldehído y 2% de paraformaldehído en amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.4 (Karnovsky 1965); se lavaron en el amortiguador, se posfijaron con tetraóxido de osmio (2%), se lavaron con agua destilada y se deshidrataron en una gradiente ascendente de alcohol etílico (30-100%), se infiltraron con resina Spurr y se polimerizaron a 70°C. Se hicieron cortes ultrafinos (70 nm), que se contrastaron con acetato de uranilo e hidróxido de plomo y se observaron con un microscopio electrónico de transmisión (Hitachi-7100, Japón).

En la Fig. 1-A. se observa una planta enferma, sus hojas presentan bordes encrespados (flechas). La Fig. 1-B. muestra un corte

transversal de una sección de un haz vascular del peciolo de planta control. Las flechas señalan vasos del xilema, notamos la ausencia de bacterias. La Fig. 1-C. corresponde a un corte transversal de una sección de un haz vascular de un peciolo de planta con síntomas. Los vasos del xilema presentan bacterias baciliformes (flechas); sin embargo, las células aledañas muestran un aspecto normal, que podría deberse a que la lesión aún no es tan severa como para alterar la morfología de las células circundantes. Hallazgos similares se realizaron en los haces vasculares de la vena central y venas laterales de las hojas de plantas afectadas. En los conglomerados de bacilos, algunos aparecen en corte longitudinal, lo que permitió evaluar sus dimensiones, que corresponden a 0.3 a 0.5 µm de diámetro, por 1 a 4 µm de longitud. A mayor aumento se observa la estructura de la pared bacteriana que muestra un aspecto típico de una bacteria Gram negativa, en las cuales es evidente la membrana externa, señalada por las flechas (Fig. 1-D). No se observaron otras estructuras bacterianas como flageolos o fimbrias.

Algunos de los síntomas presentes en estas plantas posiblemente se deban a la alteración en el funcionamiento del xilema, al estar obstruido por las células bacterianas. Además, según cita Agrios (1995), esta bacteria produce una o varias fitotoxinas que al parecer actúan en la producción de la necrosis foliar de las plantas hospederas infectadas. En muchas de las muestras observadas no todos los vasos del xilema se encontraban invadidos, esto podría deberse al estado de desarrollo de la enfermedad y del muestreo realizado.

Los síntomas expuestos son similares a los descritos por Beretta (1996) y Meneguim (2000) en los cultivos de café de Brasil, afectados por la *X. fastidiosa*.

Estos hallazgos sugieren que la infección encontrada en esta plantación está asociada con una bacteria Gram negativa, comparable con la del Mal de Pierce, cuyo patógeno causante se describe como una bacteria baciliforme, abundante en el xilema de las plantas y

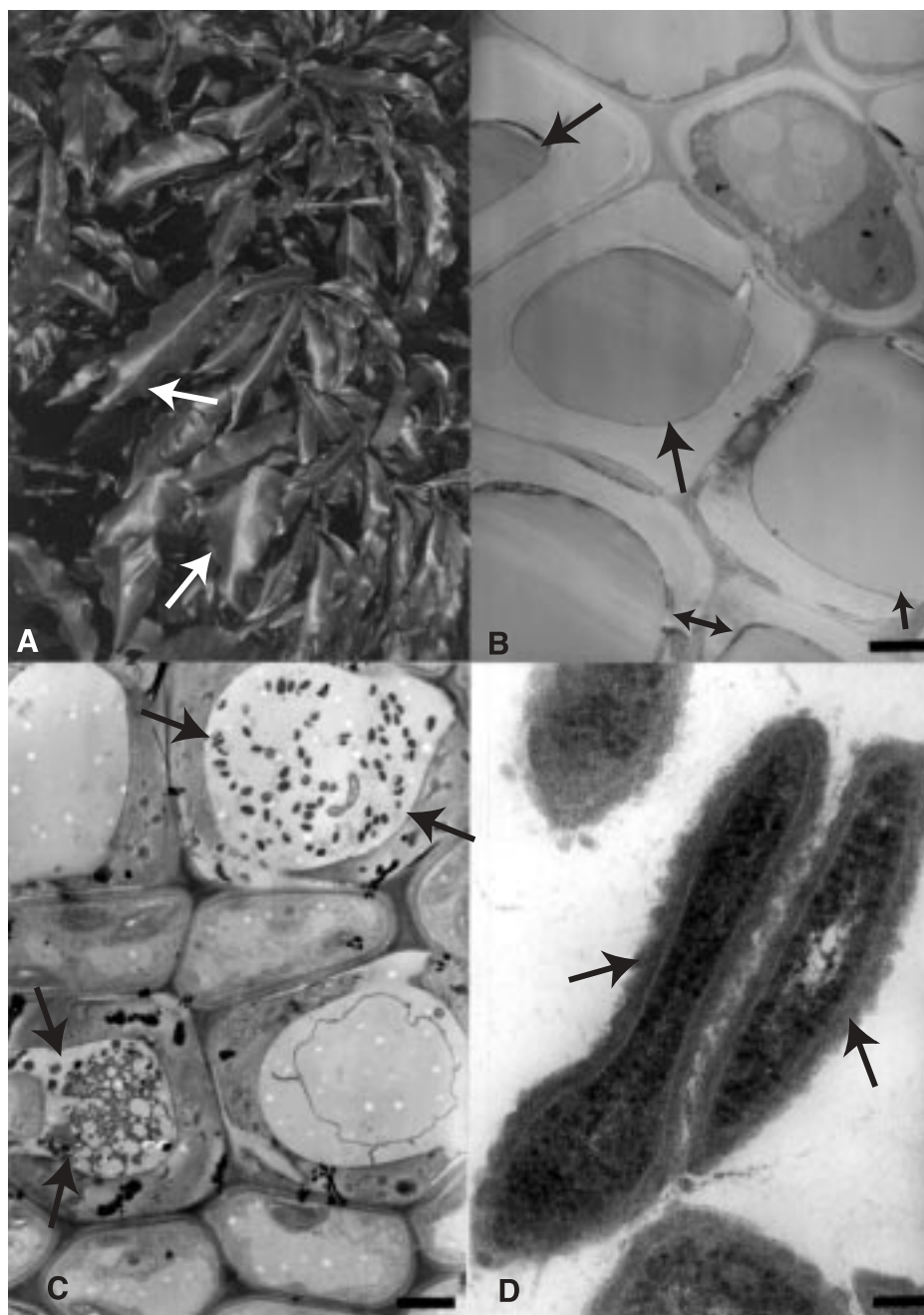


Fig. 1. A. Planta con síntomas. Se nota el encrespamiento en los bordes de las hojas (flechas). B. Planta control. Sección transversal de peciolo. Las flechas indican los vasos del xilema. Barra 2 μm . C. Planta con síntomas. Corte transversal de peciolo. El xilema presenta bacterias bacilares seccionadas en forma transversal y longitudinal (flechas). Barra 2.5 μm . D. Detalle de dos bacilos, se aprecia la estructura de la pared bacteriana tipo Gram negativa. Las flechas señalan la membrana externa. Barra 71.5 nm.

Fig. 1. A. Symptomatic plant. Showing leaves with wavy borders (arrows). B. Control plant. Transversal section of the petiole. Xylem vessels (arrows). Bar 2 μm . C. Symptomatic plant. Transversal section of the petiole. Presence of bacteria in xylem (arrows). Bar 2.5 μm . D. Ultrastructure of bacilli showing characteristic Gram negative cell envelope (arrows). Bar 71.5 nm.

con dimensiones de 0.3 a 0.4 μm de diámetro x 1.0 a 3.2 μm de largo, tiene una pared celular típicamente ondulada (Davis *et al.* 1978), como notamos en las micrografías presentadas en este estudio la forma de la célula, tamaño y ubicación de la bacteria en la planta de café son similares a la descripción realizada para el patógeno del Mal de Pierce.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo del personal de la Unidad de Microscopia Electrónica y Ricardo Jiménez. Además, el financiamiento brindado por la compañía Hokko Chemical Co.

RESUMEN

La "Crespera" es una enfermedad que afecta la planta de café reduciendo la producción del grano y afectando económicamente a los países productores de café. Esta enfermedad provoca alteraciones morfológicas tales como: hojas largas y angostas, con bordes ondulados y necrosis marginal y fuerte clorosis, la hoja se seca y cae provocando el decaimiento de la planta, los entrenudos se acortan; induce la aparición de brotes múltiples en las yemas axilares y las partes florales pueden adquirir un tono verde. En la misma planta puede presentarse ramas con síntomas severos y ramas sanas. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia del posible agente causante de la enfermedad en las plantas de café analizadas mediante el uso del microscopio electrónico de transmisión. Se estudió secciones de hoja, vena central, venas laterales y peciolo de plantas con síntomas severos y plantas control. Se determinó que los vasos del xilema presentaban abundantes bacterias baciliformes Gram negativas (de pared gruesa y ondulada) y sus dimensiones varían entre 0.3-0.5 μm de diámetro por 1-4 μm de largo. En contraste, las plantas control no manifestaron la presencia de estas bacterias en los vasos del xilema.

REFERENCIAS

- Agrios, G.N. 1995. Fitopatología. Limusa, S. A. Uthea, México. 838 p.
- Beretta, M.J., R. Harakava & C. Chagas M. 1996. First report of *Xylella fastidiosa* in coffee. Plant Dis. 80: 821.
- Chang, C.J., M. Garnier, L. Zrek, V. Rossetti & J.M. Bové. 1993. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. Microbiology 27: 137-142.
- Davis, J.M., A.H. Purcell & S.V. Thomson. 1978. Pierce's disease of grapevines: Isolation of the bacterium. Science 199: 75-77.
- De Lima, J.E.O., V.S. Miranda, J.S. Hartung, R.H. Bransky, A. Couthino, S.R. Roberto & E.F. Carlos. 1998. Coffee leaf scorch bacterium: Axenic culture, pathogenicity, and comparison with *Xylella fastidiosa* of citrus. Plant Dis. 82: 94-97.
- Hopkins, D.L. 1989. *Xylella fastidiosa*: Xylem-limited bacterial pathogen of plants. Annu. Rev. Phytopathol. 27: 271-290.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. J. Cell Biol. 27: 137A.
- Meneguim, A.M., L. Akemi-Kimura & R. Pereira-Leite, Jr. 2000. Levantamento da funa de homópteros vetores de *Xylella fastidiosa* em viveiros de mudas de cafeeiro. XIX Simposio Lationoamericano de Caficultura, Costa Rica. p. 303-311.
- Raju, B.C. & J.M. Wells. 1986. Diseases caused by fastidious xylem-limited bacteria and strategies for management. Plant Dis. 70: 182-186.
- Schaad, N.W., J.B. Jones & W. Chun. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. American Phytopathological Society, Minnesota, U.S.A. 373 p.
- Timmer, L.W., S.M. Gamsey & J.H. Graham. 2000. Compendium of citrus disease. APS Press. p. 50-51.