

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA



Instituto del Café de Costa Rica

**IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS ENDÓGENOS EN CICADÉLIDOS
Y ENDÓFITOS ASOCIADOS A LA CRESPERA DEL CAFÉ EN EL VALLE
CENTRAL OCCIDENTAL DE COSTA RICA.**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

Randall Chacón Cerdas

Cartago Agosto, 2008

IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS ENDÓGENOS EN CICADÉLIDOS Y ENDÓFITOS ASOCIADOS A LA CRESPERA DEL CAFÉ EN EL VALLE CENTRAL OCCIDENTAL DE COSTA RICA.

Randall Chacón Cerdas*

RESUMEN

Identificación de microorganismos asociados a Crespers del Café.

Se muestrearon hojas de bandolas intermedias de plantas sintomáticas para la enfermedad "Crespers del Café" e insectos cicadélidos de campo a partir de una finca infectada ubicada en Naranjo de Alajuela del Valle Central Occidental de Costa Rica. Las muestras de plantas se procesaron mediante tres protocolos de aislamientos de endófitos: A: desinfección con NaClO₄ al 10% (T1), 15% (T2) y 20% (T3), incubación a 31°C; B: desinfección con NaClO₄ 1%, 3,5% i.a (T1) y NaClO₄ 100% 1,0% i.a (T2) incubándose a 24°C y C: desinfección con NaClO₄ 1% y extracción con buffer PBS en dilución concentrada (T1), 10⁻¹ (T2) y 10⁻² (T3) incubación a 26°C. Los insectos se procesaron bajo un protocolo D: desinfección con Cloruro de Benzalconio al 2% de cabezas maceradas en 300µl del buffer PBS 1X (T1) y cuerpos sin disección en 600µl del buffer (T2) incubándose a 26°C. Se inocularon todos los aislamientos en medio BCYE. Las bacterias se identificaron mediante el sistema BIOLOG, DAS-ELISA y validación de algunas muestras para detección de *Xylella fastidiosa* mediante PCR utilizando los primers 272-1 y 272-2; los aislamientos fúngicos se identificaron mediante la presencia de estructuras de reproducción. El protocolo C mostró ser el más apto para la obtención de endófitos y el D permitió obtener alta diversidad en los aislamientos. Se obtuvieron 21 aislamientos bacterianos siendo el más abundante *Serratia marcescens* seguido de *Raoultella terrigena*, *Xylella fastidiosa* y *Enterobacter sp*; 13 aislamientos fúngicos incluyendo los géneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Paecilomyces*, *Beauveria* y *Pythium*. La temperatura de 28°C, y la incubación en oscuridad en medio BCYE por los 22 días permitió aislar *Xylella fastidiosa*. No hay certeza que los resultados obtenidos en la prueba serológica DAS-ELISA correspondieron a deficiencias de sensibilidad de la misma salvo un aislamiento (*Serratia marcescens*).

Evaluación de la patogenicidad de los aislamientos.

Se aplicaron pruebas en disco de hoja, tronco de café y con segmentos de pellets sobre láminas enteras para medir la patogenicidad cualitativa de los aislamientos inoculando soluciones de 2.0X10⁷ UFC/ml homogenizadas. La acumulación de cristales foliares ante la presencia de *Geobacillus spp* y *Staphylococcus cohnii*, y la proliferación de *Pythium spp* en las hojas, permitió discriminar su patogenicidad cualitativa.

* INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2008.

Bioensayos de microorganismos seleccionados para su correspondencia con la sintomatología de Crespera del Café.

El cicadélido C07 (más abundantes en campo) mostró ser un vector eficiente para la transmisión de *Xylella fastidiosa*. Generalmente las poblaciones más abundantes de cicadélidos colectados presentaron las concentraciones más altas de *Xylella fastidiosa*. El método de inoculación en pecíolos mostró mayor eficiencia (96.7%) para incorporar a *Xylella fastidiosa* que el método de puntura en entrenudo (66.7%). El periodo de observación de posibles síntomas de Crespera en los bioensayos con *Xylella fastidiosa*, *Geobacillus spp* y *Pseudomonas fluorescens* se consideró insuficiente. Se realizaron ensayos de infección con cicadélidos de campo sobre plantas de invernadero en condiciones de 23°C y 70% de humedad relativa por 15 días y se corroboró la incidencia del patógeno en los insectos luego del ensayo, así como la infección de *Xylella fastidiosa* mediante DAS-ELISA luego de 3 meses en las hojas jóvenes y maduras. Se emplearon dos métodos de infección mecánica para *Xylella fastidiosa*, *Geobacillus sp* y *Pseudomonas fluorescens* buscando reproducir los síntomas de Crespera. Se corroboró mediante DAS-ELISA la infección de *Xylella fastidiosa* luego de 3 meses de ensayo en hojas inoculadas y no inoculadas. En ambos ensayos de infección se utilizaron plantas de invernadero de dos meses de edad libres de *Xylella fastidiosa*. Se buscó relacionar los microorganismos endógenos en cicadélidos con los endófitos en plantas de café y la sintomatología de Crespera.

Palabras Clave: Crespera, endófitos, endógenos, *Xylella fastidiosa*, cicadélidos, bioensayo.

IDENTIFICATION OF ENDOGENS MICROORGANISMS IN CICADELIDS AND ENTOPHYTES ASSOCIATED TO COFFEE LEAF SCORCH “CRESPERA” IN THE OCCIDENTAL CENTRAL VALLEY OF COSTA RICA.

Randall Chacón Cerdas*

ABSTRACT

Identification of Coffee Leaf Scorch associated microorganism.

Leaves from medium branches of symptomatic “Coffee Leaf Scorch” (CLS) plants and cicadelids vector were collected from a cultivated ground area in Naranjo, Alajuela, Occidental Central Valley of Costa Rica. Three different endophytes isolation protocols were performed for plant samples. A: 10 (T1), 15 (T2) and 20% (T3) NaClO₄ 3,5% a.i disinfection, 31°C incubation; B: 1% NaClO₄ 3,5% a.i (T1) and 100% NaClO₄ 1,0% a.i (T2) disinfection, 24°C incubation and C: NaClO₄ 1% 3,5% a.i disinfection and PBS buffer extraction in concentrate solution (T1), 10⁻¹ (T2) and 10⁻² (T3) dilution, 26°C incubation. Protocol D was performed to ground cicadelids endogens microorganism isolation: 2% Quaternary ammonium disinfection for mashed cicadelid’s head in 300µl PBS1X buffer (T1) and non dissected bodies mashed in 600µl PBS1X buffer (T2), 26°C incubation. All isolations were inoculated in BCYE culture medium. BIOLOG® system, DAS-ELISA for *Xylella fastidiosa* detection and PCR amplification of 272-1 and 272-2 primers validation of some isolation were performed to bacteria’s identification. Fungi identity was determinate with reproduction structure guides. Protocol C showed the best conditions to isolated endophytes, protocol D showed the highest isolation diversity, 21 bacteria isolation were obtained, *Serratia marcescens* followed by *Raoultella terrigena*, *Xylella fastidiosa* and *Enterobacter sp* were the most frequent. Fungi reported 13 isolations including *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Paecilomyces*, *Beauveria* and *Pythium* genres. Darkness incubation in BCYE medium within 28°C was appropriated to *Xylella fastidiosa* grow after 22 days. There wasn’t certainly evidence that DAS-ELISA’s result represent sensitivity deficiencies. Except for *Serratia marcescens* isolation, there wasn’t plants microorganism correspondence with insects ones.

Pathogenic conditions of microorganism’s isolations.

Test of all microorganisms over leaves disc, branches segments and pellets pieces were performed to determine pathogenic qualitative condition of 2.0X10⁷ CFU/ml homogenized microorganism solution. Crystal accumulation in foliar superficies in *Geobacillus spp* and *Staphylococcus cohnii* pathogenic test and *Pythium spp* mycelia proliferation allowed their qualitative pathogenic determination.

* INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2008.

Bioassays of selected microorganisms for Coffee Leaf Scorch symptoms correspondence.

Vector infection test of cicadelids eating seedling innocuous plants to *Xylella fastidiosa* were developed into laboratory condition (23°C and 70% humidity) during 15 days. *Xylella fastidiosa* infection into cicadelids was corroborated with DAS-ELISA after assay time, mature and early leaves were analyzed for infection three month later. Two methods for mechanic infection of *Xylella fastidiosa*, *Geobacillus sp* and *Pseudomonas fluorescens* were applied to CLS symptoms induction. Inoculated and early leaves were analyzed for effective *Xylella fastidiosa* infection three month later by DAS-ELISA test. Seedling two months' innocuous plants to *Xylella fastidiosa* were used. This study search for some relation into endogens cicadelid's microorganism and symptomatic plants endophytes with CLS symptoms. The most abundant ground cicadelid (C7) was an effective vector to *Xylella fastidiosa* infection. The higher concentration of *Xylella fastidiosa* was usually found in the most abundant cicadelids populations. Petiole pierce method for *Xylella fastidiosa* mechanic infection was more effective (96.7%) than internode puncture (66.7%). The observation period in *Xylella fastidiosa*, *Geobacillus spp* and *Pseudomonas fluorescens* inoculated plants was not enough for CLS symptoms expression.

Key words: Coffee Leaf Scorch, endophytes, endogens, *Xylella fastidiosa*, cicadelids, bioassay.

**IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS ENDÓGENOS EN CICADÉLIDOS
Y ENDÓFITOS ASOCIADOS A LA CRESPERA DEL CAFÉ EN EL VALLE
CENTRAL OCCIDENTAL DE COSTA RICA.**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

Miembros del Tribunal

**M.Sc. Vladimir Villalba Velásquez
Profesor Asesor-ITCR**

**M.Sc. Miguel Barquero Miranda
Asesor- Empresa**

**M.Sc. Dora Flores Mora
Lectora**

DEDICATORIA

A DIOS, a mis padres y hermanos,
promotores de los éxitos de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

El autor desea dejar constancia de su agradecimiento a los siguientes organismos y personas, por su colaboración en el presente trabajo:

A la empresa CICAFFE por el apoyo logístico y financiero sin el cual no se hubiese llevado a cabo la investigación en cuestión.

Al M.Sc Miguel Barquero por su paciencia, consejos y guía en la empresa durante el trabajo de investigación.

Al Ing. Sebastian Fournier por su valiosa compañía y por fungir como facilitador en los ensayos del proyecto.

Al personal de los laboratorios de Fitopatología, Producción de Entomopatógenos y Química del CICAFFE por brindarme su ayuda en aspectos técnicos y de gestión.

Al profesor M.Sc Vladimir Villalba por su guía académica, profesional y humana durante mi formación estudiantil.

A la profesora M.Sc Dora Flores lectora de este proyecto por sus consejos, formación y ayuda a lo largo de las diferentes etapas de mi formación profesional.

Al personal de la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica que participaron como colaboradores y amigos durante toda la carrera.

El agradecimiento más sincero a DIOS; a mis padres Ricardo Chacón V y Norma Cerdas D; mis hermanos Kenneth y Bryan Chacón C; a mis familiares y amigos, quienes de alguna forma han influido en mi formación personal y profesional.

INDICE GENERAL

RESUMEN	2
ABSTRACT	4
ACREDITACIÓN	6
DEDICATORIA	7
AGRADECIMIENTOS	8
INDICE GENERAL	9
INDICE DE TABLAS	14
INDICE DE FIGURAS	16
INDICE DE APÉNDICES	19
INDICE DE ANEXOS	20
CAPÍTULO 1	21
INTRODUCCIÓN	21
CAPÍTULO 2	23
REVISIÓN DE LITERATURA	23
2.1 Caracteres Botánicos del Café (<i>Coffea arabica</i>).....	23
2.2 Plagas del café	24
2.3 Enfermedades del Café	25
2.4 Enfermedad “Crespera del Café”	26
2.5 <i>Xylella fastidiosa</i> (Wells et al., 1987).....	29
2.5.1 Mecanismo de acción	32
2.5.2 Métodos de transmisión.....	33
2.6 Técnicas de detección e identificación microbiana.....	36
2.6.1 Tinciones diferenciales y de estructuras	36
2.6.2 Cultivo en medios selectivos.....	37
2.6.3 Actividad enzimática producida e inducida	38
2.6.4 Cultivo en Agar TSI.....	39
2.6.5 Sistemas BIOLOG®.....	41
2.6.6 Métodos Serológicos de Identificación.....	43
2.6.6.1 Prueba ELISA.....	43
2.6.7 Métodos de Identificación Molecular.....	44

2.7 Microorganismos endófitos en plantas de café	47
2.8 Microorganismos endógenos en insectos vectores de <i>Xylella fastidiosa</i> ...	48
2.9 Bioensayos y pruebas de correspondencia Fitopatológica.....	49
CAPÍTULO 3.....	53
OBJETIVOS.....	53
3.1 Objetivo general	53
3.2 Objetivos Específicos.....	53
3.2.1 Identificación de microorganismos asociados a Crespera del Café.....	53
3.2.2 Evaluación de la patogenicidad de los aislamientos.....	53
3.2.3 Bioensayos de microorganismos seleccionados para su Correspondencia con la sintomatología de Crespera del Café.....	53
CAPÍTULO 4.....	54
METODOLOGÍA.....	54
IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS ASOCIADOS A CRESPERA DEL CAFÉ.....	54
4.1 Ubicación del Sitio de Muestreo	54
4.2 Muestreo de material vegetal en campo para aislamiento de microorganismos de posible asociación a la enfermedad Crespera del café. ...	55
4.3 Muestreo de cicadélidos en campo.....	55
4.4 Obtención de microorganismos endófitos a partir del material vegetal colectado y de endógenos a partir de cicadélidos.	55
4.4.1 Protocolo A (Experimental): Desinfección de material de campo con NaClO ₄ al 10, 15 y 20%.	56
4.4.2 Protocolo B (Variación CICAFFE): Desinfección de material NaClO ₄ 1% 3,5% i.a y NaClO ₄ 100% 1,0% i.a	57
4.4.3 Protocolo C (CIBCM-UCR): Variación del protocolo del CICAFFE por CIBCM.	57
4.4.4 Protocolo D (Insectos CICAFFE): Cloruro de Benzalconio al 2% i.a al 50%.....	59
4.5 Clasificación preliminar e identificación de microorganismos obtenidos.....	59
4.5.1 Aislamientos bacterianos	59
4.5.1.1 Identificación Bioquímica mediante el sistema BIOLOG	60
4.5.1.2 Detección e identificación serológica mediante DAS-ELISA.	60
4.5.1.3 Selección de colonias de <i>Xylella fastidiosa</i> a partir de crecimiento en placa y el método serológico DAS-ELISA.	61
4.5.1.4 identificación Molecular del aislamiento de <i>Xylella fastidiosa</i> y otras bacterias endófitas en café.....	63
a-Extracción de ADN y amplificación.....	63
4.5.2 Aislamientos fúngicos	64
EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE LOS AISLAMIENTOS.....	66

4.6 Bioensayos de patogenicidad de microorganismos aislados en laboratorio.....	66
4.6.1 Bioensayos en troncos y discos de hoja de los hongos y las bacterias aisladas.....	66
4.6.2 Bioensayo de Pellets de hongos sobre láminas enteras de hojas de café.....	69

BIOENSAYOS DE MICROORGANISMOS SELECCIONADOS PARA SU CORRESPONDENCIA CON LA SINTOMATOLOGÍA DE CRESPERA DEL CAFÉ..... 70

4.7 Bioensayos en invernadero.....	70
4.7.1 Selección de plantas de invernadero libres del patógeno <i>Xylella fastidiosa</i> para ensayos de infección mecánica y vectorial de bacterias aisladas.....	71
4.7.2 Determinación de la presencia de <i>Xylella fastidiosa</i> en el material vegetal de campo.....	71
4.7.3 Determinación de la presencia de <i>Xylella fastidiosa</i> en cicadélidos.....	73
4.8 Infección vectorial de plantas de invernadero en trampas con cicadélidos de campo en condiciones de laboratorio.....	73
4.9 Infección mecánica de <i>Xylella fastidiosa</i> en plantas de invernadero.....	75
4.10 Infección mecánica de <i>Geobacillus spp</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> en plantas de invernadero.....	76

CAPÍTULO 5.....77
RESULTADOS77

IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS ASOCIADOS A CRESPERA DEL CAFÉ..... 77

5.1 Muestreo de cicadélidos en campo.....	77
5.2 Obtención de microorganismos endófitos a partir del material vegetal colectado y de endógenos a partir de cicadélidos.....	78
5.2.1 Protocolo A (Experimental): Desinfección del material de campo con NaClO ₄ al 10, 15 y 20%.....	78
5.2.2 Protocolo B (Variación CICAPE): Desinfección de material NaClO ₄ 1% 3,5% i.a y NaClO ₄ 100% 1,0% i.a.....	80
5.2.3 Protocolo C (CIBCM-UCR): Variación del protocolo del CICAPE por CIBCM.....	81
5.2.4 Protocolo D (Insectos CICAPE): Cloruro de Benzalconio al 2% i.a al 50%.....	82
5.3 Clasificación preliminar e identificación de microorganismos obtenidos.....	84
5.3.1 Aislamientos bacterianos.....	84
5.3.1.1 Identificación Bioquímica mediante el sistema BIOLOG.....	86
5.3.1.2 Detección e identificación serológica mediante DAS-ELISA.....	86
5.3.1.3 Selección de colonias de <i>Xylella fastidiosa</i> a partir de crecimiento en placa y el método serológico DAS-ELISA.....	89

5.3.1.4 Identificación Molecular del aislamiento de <i>Xylella fastidiosa</i> y otras bacterias endófitas en café.....	89
5.3.2 Aislamientos fúngicos	90
EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE LOS AISLAMIENTOS.....	94
5.4 Bioensayos de patogenicidad de microorganismos aislados en laboratorio.	94
5.4.1 Bioensayos en troncos y discos de hoja de los hongos y las bacterias aisladas.....	94
5.4.2 Bioensayo de Pellets de hongos sobre láminas enteras de hojas de café.....	97
BIOENSAYOS DE MICROORGANISMOS SELECCIONADOS PARA SU CORRESPONDENCIA CON LA SINTOMATOLOGÍA DE CRESPERA DEL CAFÉ.....	99
5.5 Bioensayos en invernadero.....	99
5.5.1 Selección de plantas de invernadero libres del patógeno <i>Xylella fastidiosa</i> para ensayos de infección mecánica y vectorial de bacterias aisladas.....	99
5.5.2 Determinación de la presencia de <i>Xylella fastidiosa</i> en el material vegetal de campo.....	99
5.5.3 Determinación de la presencia de <i>Xylella fastidiosa</i> en cicadélidos ...	101
Infección vectorial de plantas de invernadero en trampas con cicadélidos de campo en condiciones de laboratorio.....	101
Infección mecánica de <i>Xylella fastidiosa</i> en plantas de invernadero.....	105
5.6 Infección mecánica de <i>Geobacillus spp</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> en plantas de invernadero.....	108
CAPÍTULO 6.....	111
DISCUSIÓN	111
IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS ASOCIADOS A CRESPERA DEL CAFÉ.....	111
6.1 Muestreo de cicadélidos en campo.....	111
6.2 Obtención de microorganismos endófitos a partir del material vegetal colectado y de endógenos a partir de cicadélidos.	112
6.3 Clasificación preliminar e identificación de microorganismos obtenidos....	114
6.3.1 Aislamientos bacterianos	114
6.3.1.1 Identificación Bioquímica mediante el sistema BIOLOG	114
6.3.1.2 Detección e identificación serológica mediante DAS-ELISA.	120
6.3.1.3 Selección de colonias de <i>Xylella fastidiosa</i> a partir de crecimiento en placa y el método serológico DAS-ELISA.	122
6.3.1.4. Identificación Molecular del aislamiento de <i>Xylella fastidiosa</i> y otras bacterias endófitas en café.....	123
6.3.2 Aislamientos fúngicos	124

EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE LOS AISLAMIENTOS.....	128
6.4 Bioensayos de patogenicidad de microorganismos aislados en laboratorio.	128
BIOENSAYOS DE MICROORGANISMOS SELECCIONADOS PARA SU CORRESPONDENCIA CON LA SINTOMATOLOGÍA DE CRESPERA DEL CAFÉ.....	130
6.5 Bioensayos en invernadero.....	130
6.5.1 Selección de plantas de invernadero libres del patógeno <i>Xylella fastidiosa</i> para ensayos de infección mecánica y vectorial de bacterias aisladas.....	130
6.5.2 Determinación de la presencia de <i>Xylella fastidiosa</i> en el material vegetal de campo.....	130
6.5.3 Determinación de la presencia de <i>Xylella fastidiosa</i> en cicadélidos....	132
6.6 Infección vectorial de plantas de invernadero en trampas con cicadélidos de campo en condiciones de laboratorio.....	133
6.7 Infección mecánica de <i>Xylella fastidiosa</i> en plantas de invernadero.....	136
6.8 Infección mecánica de <i>Geobacillus spp</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> en plantas de invernadero.....	141
CAPÍTULO 7.....	142
CONCLUSIONES	142
CAPÍTULO 8.....	144
RECOMENDACIONES	144
CAPÍTULO 9.....	145
BIBLIOGRAFÍA	145
CAPÍTULO 10.....	161
APÉNDICES	161
CAPÍTULO 11.....	175
ANEXOS.....	175

INDICE DE TABLAS

Núm.	Título	Pág.
4.1	Mapa de ubicación en un gel de agarosa para las muestras ensayadas según el protocolo del Laboratorio de Biología Molecular TICOFRUT para la detección de <i>Xylella fastidiosa</i> .	64
4.2	Tratamientos empleados en el bioensayo de <i>pellets</i> de hongos sobre láminas enteras de café según aislamiento codificado.	69
5.1	Porcentaje de oxidación, crecimiento bacteriano y fúngico presente en los explantes de café durante cuatro semanas de observación para los tratamientos ensayados según el Protocolo A (Experimental).	78
5.2	Colonias bacterianas y fúngicas presente en el exudado obtenido de los puntos aleatorios de contacto durante cuatro semanas de observación para los tratamientos ensayados según el Protocolo B (Variación CICAFFE).	80
5.3	Colonias bacterianas y fúngicas presente en las áreas de desplazamiento (rastros) de las diluciones microbiológicas empleadas según los tratamientos ensayados para el Protocolo C con el material vegetal de campo (CIBCM-UCR) durante cuatro semanas de observación.	81
5.4	Colonias bacterianas y fúngicas presente en las áreas de desplazamiento (rastros) de las diluciones microbiológicas empleadas según los tratamientos ensayados para el Protocolo D (Insectos CICAFFE) durante cuatro semanas de observación.	82
5.5	Resumen de la clasificación preliminar bacteriana según criterios morfológicos y algunas pruebas bioquímicas de diferenciación rápida para cada ID agrupado.	85
5.6	Identificación de los grupos ID bacterianos obtenidos según protocolos y tratamientos específicos durante los ensayos de aislamiento.	86
5.7	Valores obtenidos según los evaluadores estadístico para la discriminación de la incidencia de <i>Xylella fastidiosa</i> en crecimientos bacterianos conocidos a los 7 y 22 días de incubación.	87
5.8	Resumen de la prueba serológica DAS-ELISA aplacada a	87

	crecimientos bacterianos conocidos según evaluadores estadísticos y la absorbancia obtenida a 7 días de crecimiento.	
5.9	Resumen de la prueba serológica DAS-ELISA aplicada a crecimientos bacterianos conocidos según evaluadores estadísticos y la absorbancia obtenida a 22 días de crecimiento.	88
5.10	Absorbancia promedio y condición de incidencia para los aislamientos del posible patógeno <i>Xylella fastidiosa</i> según la prueba DAS-ELISA en placas de 22 días de incubación.	89
5.11	Resumen de la clasificación preliminar fúngica según criterios morfológicos de diferenciación rápida para cada ID agrupado.	91
5.12	Descripción morfológica de las levaduras aisladas ID 10 y 13.	92
5.13	Identificación de algunos grupos ID fúngicos mediante observación de estructuras reproductivas obtenidos según protocolos y tratamientos específicos durante los ensayos de aislamiento.	92
5.14	Resumen de los porcentajes de aparición de lesiones superficiales en los discos de hojas y tejido de tronco, producto de la inoculación de soluciones de los aislamientos bacterianos.	94
5.15	Resumen de los porcentajes de aparición de lesiones superficiales en los discos de hojas y tejido de tronco producto de la inoculación de soluciones de los aislamientos fúngicos.	97
5.16	Resumen de la limpieza del lote de plantas de café (<i>Coffea arabica</i>) para pruebas en invernadero según estadísticos discriminatorios y el porcentaje de limpieza del material.	99
5.17	Porcentaje de incidencia en la muestra de material vegetal de campo y de invernadero preliminar según los estadísticos de discriminación obtenidos (SD: 0.04 unidades).	100
5.18	Porcentaje de incidencia en la muestra de material vegetal de invernadero de infección vectorial según los estadísticos de discriminación obtenidos.	104
5.19	Porcentaje de incidencia de <i>Xylella fastidiosa</i> en la muestra de material vegetal según los estadísticos discriminativos para la prueba de infección mecánica mediante el protocolo Xf 1.	107
5.20	Porcentaje de incidencia de <i>Xylella fastidiosa</i> en la muestra de material vegetal según los estadísticos discriminativos para la prueba de infección mecánica mediante el protocolo Xf 2.	108

5.21	Promedio de la absorbancia de las muestras procesadas para la prueba DAS-ELISA en la determinación de la incidencia de <i>Xylella fastidiosa</i> en el ensayo de inoculación mecánica según protocolo Xf 1 y Xf 2.	108
6.1	Reportes e implicaciones de las bacterias aisladas según referencias bibliográficas.	118
6.2	Reportes e implicaciones de los hongos aislados según referencias bibliográficas.	126

INDICE DE FIGURAS

Núm.	Título	Pág.
2.1	Arbustos de café en periodo de fructificación y cosecha	23
2.2	Broca del café (<i>Hypothenemus hampei</i>) saliendo de grano maduro perforado.	24
2.3	Principales enfermedades que atacan el café.	25
2.4	Plantas de café afectadas con la sintomatología de "Crespera" reportada para Costa Rica.	27
2.5	Morfología y cromogénesis de colonias de <i>Xylella fastidiosa</i> . A. Forma abastionada y ornamentación superficial característica. B. Desarrollo de las colonias en medio selectivo.	30
2.6	Bacterias de la especie <i>Xylella fastidiosa</i> en los vasos del xilema de planta de cítricos infectada (10.000 X).	32
2.7	Insectos vectores reportados para Costa Rica	35
2.8	Ciclo de infección vectorial epidemiológico de la enfermedad causada por <i>X. fastidiosa</i> transmitida por Cicadélidos	36
2.9	Batería de tubos con resultados variados para la prueba de fermentación y crecimiento de bacterias en Agar TSI	41
2.10	Sistema de identificación BIOLOG.	42

2.11	Placa de microtitulación y control del Kit Agdia para la prueba de ELISA	44
2.12	Productos de la amplificación del ADN por RFLP-PCR de muestras de plantas infectadas con <i>Xylella fastidiosa</i> , muestras de cítricos (2-6), vid (7-15), la flecha indica la banda patrón de identificación. Marcador de 100pb (16).	45
2.13	Ciclo biológico típico de patógenos de fase epífita y endofítica.	50
2.14	Reacción de las plantas a diferentes patógenos	51
4.1	Diagrama de distribución de plantas de café para muestreo en parcela experimental. Naranjo de Alajuela, Costa Rica.	55
4.2	Diagrama de tipos de explante utilizados para la posible obtención de bacterias endófitas bajo la desinfección del protocolo A	56
4.3	Cámara húmeda de incubación para las pruebas de patogenicidad de los aislamientos bacterias. Distribución de material para ensayo	67
4.4	Cámara húmeda de incubación para las pruebas de patogenicidad de los aislamientos fúngicos. Distribución de material para ensayo.	68
4.5	Inoculación de <i>pellet</i> de hongos en análisis de patogenicidad	70
4.6	Síntomas considerados para la selección de material vegetal enfermo correspondiente con la “Crespera del Café”	72
4.7	Jaulas artesanales para el mantenimiento y evaluación de los cicadélidos del ensayo de infección vectorial en plantas de invernadero.	74
4.8	Detalle de las punturas realizadas para la inoculación de la solución bacteriana según los métodos en infección	75
5.1	Porcentajes poblacionales de cada grupo de cicadélidos colectados en campo.	78
5.2	Crecimiento microbiano a la tercera semana de observación según el protocolo de aislamiento A (Experimental).	79
5.3	Crecimiento microbiano a la tercera semana de observación según el protocolo de aislamiento B (Variación CICAFFE).	81
5.4	Crecimiento microbiano a la tercera semana de observación según el protocolo de aislamiento C (CIBCM-UCR)	82

5.5	Crecimiento microbiano a la tercera semana de observación según el protocolo de aislamiento D (Insectos CICAPE).	83
5.6	Patrones de bandas obtenidos mediante la migración del ADN de las muestras procesadas en un gel de agarosa al 2%.	90
5.7	Registro fotográfico del crecimiento de <i>pellets</i> a partir de cultivos líquidos de los aislamientos que no presentaron estructuras de reproducción en medio semisólido	93
5.8	Observaciones en discos de hojas para los ensayos de inoculación bacteriana en discos de hojas	95
5.9	Observaciones en discos de hojas para los ensayos de inoculación fúngica en discos de hojas	96
5.10	Tejidos inoculados con <i>pellets</i> de los hongos sobre láminas de hojas enteras de café luego de tres semanas de incubación.	98
5.11	Contaminación en testigos y ensayos de la prueba	98
5.12	Absorbancia promedio para el material vegetal de café analizado mediante la prueba DAS-ELISA y sus controles de prueba para la reacción fotocolorimétrica.	100
5.13	Absorbancia promedio para los extractos de cicadélidos analizados mediante la prueba DAS-ELISA y sus controles de prueba para la reacción fotocolorimétrica.	101
5.14	Porcentaje de sobrevivencia y mortalidad según sexo a los 8 días de observación del ensayo de infección vectorial.	102
5.15	Porcentaje de sobrevivencia y mortalidad según sexo a los 15 días de observación del ensayo de infección vectorial.	102
5.16	Individuos cicadélidos vivos a los 8 días de captura sobre plantas de café bajo condiciones de laboratorio.	103
5.17	Registro fotográfico de las plantas bajo ensayo de inoculación vectorial en invernadero	104
5.18	Registro fotográfico de la prueba de inoculación mecánica del aislamiento de <i>Xylella fastidiosa</i> en plantas de café en invernadero.	105
5.19	Lesión seca en lámina foliar de planta inoculada con el aislamiento de <i>Xylella fastidiosa</i> mediante el método Xf 1 luego de 2 meses de crecimiento.	106

5.20	Registro fotográfico de la prueba de inoculación mecánica del aislamiento de <i>Xylella fastidiosa</i> en plantas de café en invernadero	106
5.21	Alteraciones morfológicas ocasionales en las plantas de ensayo y los testigos de la prueba.	107
5.22	Registro fotográfico de la prueba de inoculación mecánica del aislamiento de <i>Pseudomonas fluorescens</i> en plantas de café en invernadero.	109
5.23	Registro fotográfico de la prueba de inoculación mecánica del aislamiento de <i>Geobacillus spp</i> en plantas de café en invernadero	110
5.24	Alteraciones morfológicas ocasionales en los ensayos Pf y Geo	110

INDICE DE APÉNDICES

Núm.	Título	Pág.
1	Detalle de inoculación en protocolo A de obtención de endófitos.	161
2	Detalle de inoculación en protocolo B de obtención de endófitos.	161
3	Detalle de inoculación en protocolo C de obtención de endófitos.	162
4	Registro fotográfico de las bacterias aisladas mediante los diferentes protocolos de extracción ensayados.	162
5	Registro fotográfico de hongos aislados mediante los diferentes protocolos de extracción ensayados. Aislamientos fúngicos no levaduriformes.	170
6	Registro fotográfico de hongos aislados mediante los diferentes protocolos de extracción ensayados. Aislamientos levaduriformes.	172

INDICE DE ANEXOS

Núm.	Título	Pág.
1	Reactivos para la elaboración del medio de cultivo Agar Triple Azúcar TSI (1L) y su nomenclatura de interpretación.	175
2	Clasificación según ID de insectos cicadélidos para evaluación de colectas. Documento Interno Centro de Investigación en Café de Costa Rica CICAFFE.	176
3	Reactivos para la elaboración del medio de cultivo BCYE (1L).	181
4	Preparación de solución de ensayo e interpretación de la Prueba de KOH.	181
5	Preparación de solución de ensayo e interpretación de la Prueba de Catalasa.	181
6	Aplicación e interpretación de la Prueba Tinción de Gram.	182
7	Reagent Set. DAS ELISA, Peroxidase Label. Agdia Inc. 2008 ² . Ficha Técnica del Protocolo de Detección para el Patógeno <i>Xylella fastidiosa</i> (m 17.3).	182
8	Reactivos para la elaboración de un litro de medio de cultivo Papa Dextrosa Acidificado (PDA).	187

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El café (*Coffea arabica*) es un arbusto perenne perteneciente a la familia de las Rubiaceas cuyo centro de origen se ubica en el país de Etiopía. El grano de este cultivo es uno de los principales productos de exportación en países como Colombia, Brasil, Costa Rica, Etiopía, Arabia y otros.

En nuestro país por mucho tiempo fue el monocultivo de mayor impacto económico desde la época de 1830, siendo la actividad agrícola que generaba más empleos, condición que disminuyó conforme se sustituían los cafetales por plantaciones de otros productos no tradicionales. Hoy en día luego de crisis internacionales y estrategias locales de diversificación del agro se ha dado una modernización de su mercado, implementándose el cultivo de calidad orgánica y bajo denominaciones de origen, estrategia comercial que ha conferido valor y prestigio al grano local (Pratt y Harner, 1997; Peters, 2008).

Aún ante los esfuerzos comerciales realizados para mantener a la caficultura como una actividad rentable, existen factores como la incidencia de enfermedades y plagas de difícil control que provocan la disminución de la disponibilidad de grano y almácigos de calidad para el productor nacional. Dentro del grupo de las enfermedades de mayor incidencia como la roya del café, “Chasparria”, “El mal del machete” y “Ojo de Gallo” se ha mantenido un particular interés en la enfermedad “Crespera del café” debido al aumento de su incidencia en las plantaciones, acción atribuida a la infección bacteriana de *Xylella fastidiosa* como producto de la diseminación vectorial por la alimentación de insectos cicadélidos que han convertido esta enfermedad en un problema para la producción.

No obstante aunque actualmente *Xylella fastidiosa* sigue considerándose el patógeno más asociado a la enfermedad en café existen incongruencias para afirmar esto con certeza, razón que ha incentivado el desarrollo de

investigaciones que señalan la posibilidad de nuevos agentes patógenos involucrados en la sintomatología de la enfermedad, implicando el rastreo de la diversidad de microorganismos en plantas enfermas (Galvis *et al.*, 2007), insectos vectores, las plantas espontáneas y vegetación segetal dentro del agroecosistema afectado (Shapland *et al.*, 2006), para lo cual se han utilizado marcadores moleculares, secuenciación y técnicas ELISA para la caracterización, separación y detección de patovares, fitomejoramiento en cultivares y monitoreo por área en campo de vectores (Álvarez *et al.*, 2004; Redak *et al.*, 2004), todas en busca de un manejo efectivo de la enfermedad.

Este trabajo se enfocó en la investigación de las poblaciones de microorganismos endógenos presentes en el material vegetal de campo obtenido a partir de plantas sintomáticas de la enfermedad “Crespera del café”, así como las poblaciones de endógenos asociados a los vectores cicadélidos presentes en el lugar de muestreo, procurando recopilar información concluyente de la relación de los obtenidos con el patógeno *Xylella fastidiosa* como el principal asociado a la enfermedad. Además se buscó mediante bioensayos de microorganismos recuperados a partir de plantas sintomáticas inducir y evidenciar la sintomatología de la enfermedad en plantas sanas y asociar la presencia de los aislamientos con la expresión de los síntomas.

Se espera que la información generada a partir de los aislamientos de microorganismos y los bioensayos dirigidos contribuya en el avance de una estrategia de biocontrol de la enfermedad en Costa Rica.

CAPÍTULO 2

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Caracteres Botánicos del Café (*Coffea arabica*)

El café se clasifica en la división Magnoliophyta, clase Dicotyledoneae dentro de la subclase Asteridae y el orden de los Rubiales. Se incluye en la familia de las Rubiaceas dentro del género *Coffea* (Monroig, 2002). Es un arbusto pequeño perenne leñoso (Infoagro, 2002) y cubierto con suber que desarrolla ramas ortotrópicas que originan plagiotrópicas o bandolas a partir de yemas axilares de las hojas del tallo (Zamora, 1998). Las hojas son pequeñas opuestas (12-15cm de largo por aprox 6cm de ancho) oval-elípticas de bordes acuminados con ondulaciones ocasionales (Infoagro, 2002). Presenta racimos de flores blancas-cremosas subsésiles (2-9 flores) en las axilas de las hojas. Es autógamo y mantiene cerca de tres ciclos de floración anuales entre los meses de marzo a mayo lo que permite obtener la mayor cosecha luego de seis meses de maduración del fruto (PROCAFE, 2006) (Figura 2.1).



Microsoft Office Picture Manager 2003

Figura 2.1. Arbustos de café en periodo de fructificación y cosecha. Fuente: Galería de Fotos "El CAFETAL" ICAFE 2008.

El fruto es tipo drupa de forma oblonga – elíptica de aproximadamente 1-1.7cm de largo que cambia de color verde hasta el color rojo cuando está madura, presenta dos semilla (8.5-12.7mm) que albergan cada embrión cilíndrico-hipicótilo. El sistema radical es pivotante (Zamora, 1998; PROCAFE, 2006).

2.2 Plagas del café

Dentro de las plagas que atacan el café se citan las palomillas (*Perileucoptera coffeella* Green en hojas, *Thlipteceras spp* y *Virachola spp* en raíces) (Cafeicultura, 2006), los nemátodos (*Meloidogyne spp* y *Pratylenchus spp* atacando las raíces) (Gamboa, 2008) y las escamas (*Pseudococcus spp*, *Coccus viridis*, *Saissetia hemisphaerica*, *Lepidosaphes beckii* e *Icerya purchasi*) que afectan las raíces (Infoagro, 2002); taladradores (*Xylotrechus quadripes*, *Apate spp* y *Bixadus tierricola*) y cortadores (*Feltia spp*, *Agrotis repleta*, *Laphyma frugiperda*, *Euxoa spp*, *Prodenia eridania* y *P. latisfalicia*) (Sayazo, 1999) que se alimentan del tallo y las bandolas, así como, los cortados y chupadores de hojas que perjudican el follaje y los perforadores del fruto como la broca (*Hypothenemus hampei*) la plaga de mayor incidencia y daño en la plantación de café (Fernández y Cordero, 2007) (Figura 2.2).

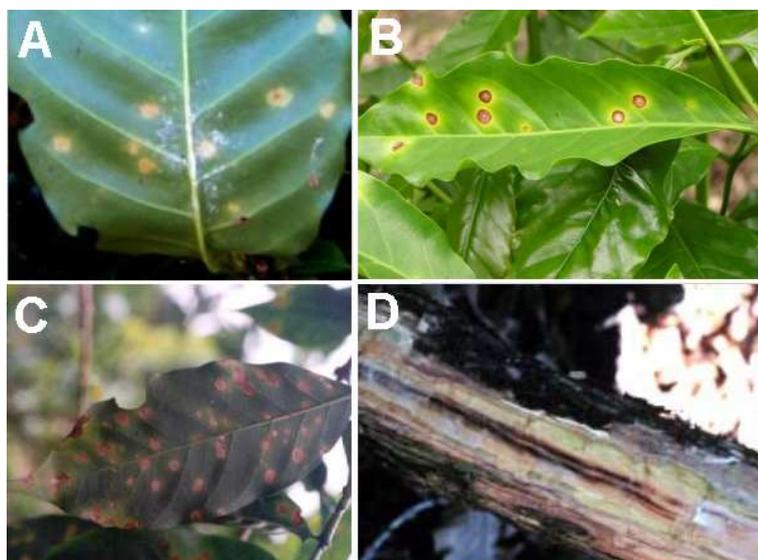


Microsoft Office Picture Manager 2003

Figura 2.2. Broca del café (*Hypothenemus hampei*) saliendo de grano maduro perforado. Fuente: CENICAFE, Información General, marzo 2008.

2.3 Enfermedades del Café

La enfermedad de mayor incidencia es la roya del café (*Hemileia vastatrix*) causando signos polvosos foliares (Figura 2.3.A), junto a esta se encuentra la “Chasparria” (*Cercospora coffeicola*) que ataca con manchas secas al follaje (Barquero, 2008) (Figura 2.3.B) y la enfermedad “Ojo de Gallo” (*Mycena citricolor*) característica del crecimiento de lesiones sinema (Campos, 1984; Finch y Finch, 1990) (Figura 2.3.C). Otra enfermedad como “El mal del machete” (*Ceratocystis fimbriata*) se produce en el tallo del cafeto al provocarse heridas mecánicas y el daño por insectos, la lesión asemeja un cáncer (Harrington, 2004) (Figura 2.3.D). Otro patógeno del tallo es *Fusarium xylorioides* que penetra por lesiones superficiales en las raíces y avanza en forma de traqueomicosis a través del sistema vascular (Cafeicultura, 2006). También se ve afectado por la enfermedad conocida como “Mal de Hilachas o Arañero” (*Pellicularia koleroaga*) (Campos, 1984). Otros hongos de menor incidencia y agresividad como algunas especies de *Rhizoctonia* (Castro y Rivillas, 2005) y *Helicobasidium* reportadas en lesiones radicales se presentan en plantaciones de manejo agronómico deficiente.



Microsoft Office Picture Manager 2003

Figura 2.3. Principales enfermedades que atacan el café. A. Roya del Café (*Hemileia vastatrix*) Fuente: Monroig, 2002. B. “Chasparria” (*Cercospora coffeicola*) Fuente: Scot, 2008. C. “Ojo de Gallo” (*Mycena citricolor*) Fuente: CENICAFE, 2008². D: “El mal del machete” (*Ceratocystis fimbriata*) Fuente: Harrington, 2004.

Otra enfermedad llamada “Podredumbre en collar” (*Rosellinia bunodes* y *Armillaria mellea*) ataca la raíz provocando síntomas de marchitamiento y clorosis en hojas. El hongo *Colletotrichum coffeanum* ataca los frutos del café causando la enfermedad “Antracnosis” (Sayazo, 1999). Otras enfermedades fúngicas como el “Mal Rosado” (*Corticium salmonicolor*) (Campos, 1984), la mancha circular de la hoja (*Sclerotium coffeanum*) y La quema o derrite (*Phoma costarricensis*) son de menor incidencia y geográficamente menos dispersas (Infoagro, 2002).

Otras enfermedades del tipo bacteriano reportadas son la “Mancha en hojas” causada por *Pseudomonas syringae* (Monroig, 2002) y la enfermedad de “Crespera del Café” asociada a *Xylella fastidiosa*. Estas enfermedades son comúnmente confundidas con deficiencias nutricionales y deformaciones propias de la ontogenia de las plantas en campo al presentar síntomas con ausencia de signos externos para su rápida identificación (Queiroz-Voltan *et al.*, 2005).

2.4 Enfermedad “Crespera del Café”

La sintomatología típica general asociada a esta enfermedad está relacionada a la atrofia de los tejidos vasculares en la plantas lo que causa el paso deficiente de agua y nutrientes y la consecuente deformación y enrollamiento de las hojas, atrofia de las ramas, presencia de flores anormales y frutos monospermos acompañados de marchites, decaimiento y defoliación progresiva, reportándose disminuciones en el rendimiento. Además en las ramas más afectadas se presenta disminución de la longitud de los entrenudos de las bandolas y muerte del brote apical provocando que se ramifiquen las ramas secundarias. Otro fenómeno importante es la transformación de las yemas florales en yemas foliares en las ramas plagiotrópicas donde en algunos casos se elimina completamente la floración (Galvis *et al.*, 2004). Los síntomas de esta enfermedad en café varían de acuerdo a la región, en Costa Rica se caracteriza por la deformación de las láminas foliares y el resalte de las venas secundarias en las hojas acompañadas de bifurcaciones ocasionales de la lámina (Figura 2.4), en Colombia se reporta como el principal síntoma el alargamiento de las hojas y el quemado y ondulado de los bordes evidenciándose los ápices de las

bandolas encrespadas mientras que Brasil reporta la quemadura de los bordes foliares, la ondulación de los mismos, entrenudos acortados y el alargamiento característico de las laminas, similares a deficiencias nutricionales (Barquero, 2007²).



Microsoft Office Picture Manager 2003

Figura 2.4. Plantas de café afectadas con la sintomatología de “Crespera” reportada para Costa Rica. Fuente: Barquero, 2007².

Según Chávez y colaboradores (2000) la enfermedad de “Crespera del Cafeto” fue reportada por primera vez en Colombia en la primera mitad del siglo XX, su nombre particular al parecer se atribuye al principal síntoma de evidente ondulación foliar. En nuestro país se reportó hasta la época de 1980 (Barquero, 2007²) alcanzando luego de veinte años una dispersión en 800 hectáreas en la zona de Los Santos y una mayor influencia dos años después cuando las zonas de Desamparados, León Cortés, Orosi, Juan Viñas, Zaherí, Curridabat, Aquirres, Atirro, Dota y Turrialba mostraron cafetales infectados con la enfermedad (Solórzano *et al.*, 2000).

Durante el primer periodo de aparición se relacionaron los síntomas con deficiencias nutricionales de posible origen en los suelos desgastados y sobre utilizados, sin embargo, dicha posición se rechazó luego de análisis de muestras (Rodríguez, 2002). Posteriormente se realizaron pruebas exploratorias empleando métodos de infección mecánica por injertos e intercambio de savia de plantas infectadas, además se realizaron búsquedas moleculares de partículas

viroides, amplificaciones del ADN de materiales en búsqueda de fitoplasmas y técnicas serológicas para detección de bacterias fastidiosas sin muchos éxitos ni resultados claros (Barquero, 2007²).

No fue sino hasta 1997 cuando las investigaciones en microscopía electrónica y marcadores moleculares se enfocaron en la posible incidencia de micoplasmas en tejido infectado, resultados similares a los propuestos dos años más tarde en Colombia al asociarse fuertemente con un fitoplasma (Galvis *et al.*, 2006), sin embargo, rápidamente se dirigió la atención a la bacteria *Xylella fastidiosa* que según Lopes y colaboradores (2003) presentaba una sintomatología muy similar en hojas de café y cítricos.

Una vez determinado el vector más probable para la enfermedad en nuestro país se enfocaron las investigaciones en el establecimiento de un protocolo de detección y de monitoreo del patógeno *Xylella fastidiosa* por parte del convenio ICAFE-CIBCM (Fournier, 2007) enfoque respaldado por análisis microscópicos de cafetos infectados provenientes de la zona de Los Santos, los cuales revelaron la presencia de bacterias de morfología particular a *Xylella fastidiosa* en los tejidos xilemáticos (Iwasawa *et al.*, 2001).

Luego el interés de los países afectados por conocer acerca de la dinámica de dispersión de la enfermedad llevó a la relación de la dinámica poblacional de insectos cicadélidos con la posibilidad de transmisión vectorial al encontrarse una alta presencia en plantaciones infectadas de vid, cítricos y alfalfa asociadas a enfermedades causadas por *Xylella fastidiosa* (Redak *et al.*, 2004). En Costa Rica a través de un convenio celebrado en 2001-2005 entre las instituciones ICAFE-CIBCM-INBio se realizaron identificaciones de individuos en plantaciones infectadas y se determinó la incidencia de la bacteria en los mismos luego de su identificación. Se reportaron trece especies de cicadélidos que presentaban en la mayoría de los casos resultados positivos de incidencia, siendo *Graphosephala permagna* y *Erythrogonia sonora* con un 50 y 25% de incidencia (Fournier, 2007).

No obstante la investigación avanzó con ciertas incongruencias en la correspondencia de la incidencia de la bacteria y la presencia de síntomas verdaderos de la enfermedad asociada, ya que para el año 2006 en un muestreo nacional de material sano y enfermo se encontró un 97.5% de incidencia de *Xylella fastidiosa* tanto en material asintomático como en plantas severamente afectadas desde los 800 hasta los 1800 msnsm empleando el método de detección DAS-ELISA (Barquero, 2007²).

En el año 2004 Galvin y sus colaboradores reportaron un fitoplasma que se asociaba de igual manera a la dispersión vectorial en insectos cicadélidos, el cual dos años más tarde se identificaría como un fitoplasma del grupo 16SrIII aislado de material colombiano (Galvis *et al.*, 2006).

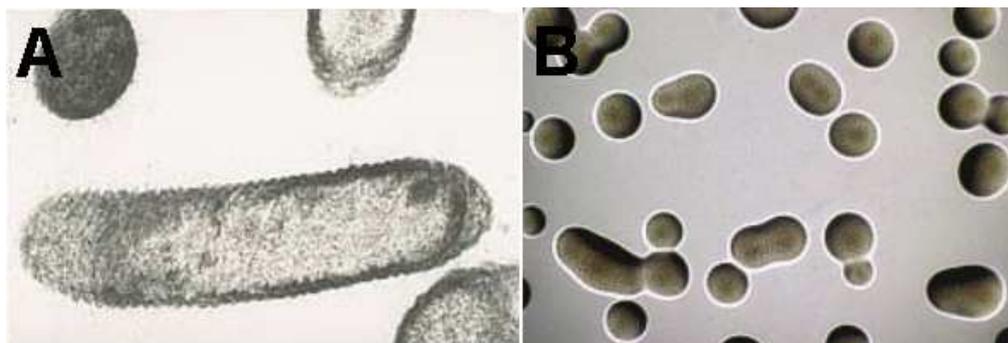
A nivel local se manejan medidas de control y prevención para tratar de disminuir el impacto de la enfermedad sobre los cafetales; por lo tanto ICAFE recomienda disminuir las poblaciones de posibles insectos vectores, eliminar los materiales vegetales contaminados, emplear semilla sana que provenga de un programa de certificación de viveros para disminuir la mezcla de materiales enfermos, así como, determinar cuarentenas sectoriales ante focos de alta incidencia entre otras (Fournier, 2007).

2.5 *Xylella fastidiosa* (Wells *et al.*, 1987)

Es el patógeno mayormente asociado a la enfermedad de Crespada en café, el cual se favorece de la variación de las condiciones climáticas que provoca una correspondiente variación de las poblaciones de sus vectores y del patrón de dispersión en campo (Scortichini, 2004). Además ocupa un amplio rango de hospederos (cerca de 28 familias de mono y dicotiledóneas) donde se incluyen malezas, árboles y arbustos frutales causando enfermedades de importancia económica como la perforación en la vid (PD Pierce's Disease) (Buskan y Walker, 2003), el enrollamiento de las hojas en la mora (MLS Mulberry Leaf Scorch) (Hernandez *et al.*, 2006¹) y en almendra (ALS Almond Mulberry Leaf Scorch) (Shapland *et al.*, 2006), la clorosis variegada en cítricos (CVC CCitrus Variegated

Chlorosis) (Laranjeira *et al.*, 2004), bacteriosis en caña (Hidalgo *et al.*, 1999) entre otras.

Xylella fastidiosa pertenece a la subdivisión Proteobacteria dentro de la división Gracilicutes de hábito limitado al xilema y de lento crecimiento en medios selectivos (Mariño, 2007). Es una bacteria gram negativa abastionada que mide aproximadamente 0.1-0.5µm x 1-5µm, no es formadora de esporas ni presenta flagelos (Bradbury, 1991) y se reproduce por medio de fisión binaria a 6.5-6.9 unidades de pH bajo 26-28°C (Rodríguez, 2005²; Mariño, 2007). Requiere oxígeno para su metabolismo y presenta en la pared celular acumulaciones de células con ondulaciones y fimbrias terminales. Su crecimiento en medio selectivo genera colonias generalmente amarillo blancuzcas (Gould y Lashomb, 2007) (Figura 2.5).



Microsoft Paint 5.1

Figura 2.5. Morfología y cromogénesis de colonias de *Xylella fastidiosa*. A. Forma abastionada y ornamentación superficial característica. B. Desarrollo de las colonias en medio selectivo. Fuente: Gould y Lashomb, 2007.

Según estudios moleculares de secuenciación de las regiones 16 y 23S se han diferenciados subespecies para *Xylella fastidiosa* dependiendo del hospedero y la patogenicidad diferencial, estas son: *X. fastidiosa* subsp. *piercei*, *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* y *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (Schaad *et al.*, 2004) no obstante se han reportado nuevas subespecies en *Morus alba*: *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* y *X. fastidiosa* subsp. *sandyi* (Hernandez *et al.*, 2006¹). Dentro de estas se diferencia *X. fastidiosa* subsp. *sandyi* por ser aislada principalmente de adelfa; *X.*

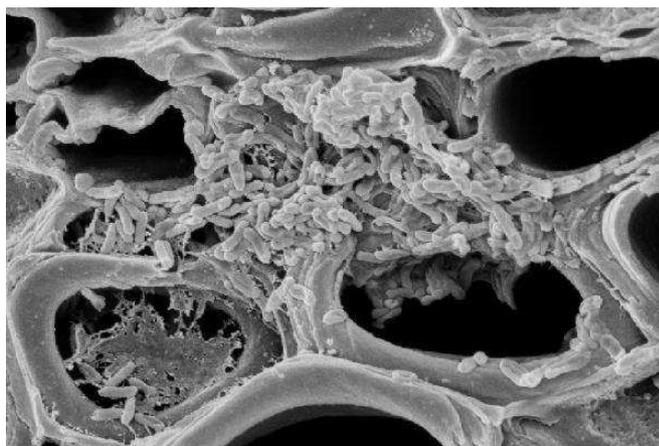
fastidiosa subsp.*fastidiosa* a partir de la vid y almendra la cual no infecta cítricos, adelfa o pera, mas si lo hace en materiales de alfalfa y trigo; *X. fastidiosa* subsp *multiplex* a partir de almendra las cuales no infectan la vid (Hernandez *et al.*, 2006²). En el caso del café se ve infectado por los patovares que infectan de igual manera los cítricos (Qin *et al.*, 2001). Actualmente corresponde a la primera bacteria patógena en cítricos que se ha secuenciado la totalidad del genoma descubriendo aspectos importantes de su interacción con el hospedero (Gould y Lashomb, 2007).

Al ser una bacteria de nutrición exigente y condiciones de crecimiento lento se han formulado diversos medios de crecimiento sintéticos para su mantenimiento en colecciones de laboratorio, entre estos se citan aquellos enriquecidos con elementos disponibles en el xilema como el medio BCYE, PD2, PD3 y CS20 en los cuales luego de 10-22 días bajo 28°C se aprecian colonias de 0.5-2.0mm de diámetro de margen entero y levemente convexas o bien se aprecian ocasionalmente circulares con margen ondulado y de elevación umbonada. En medios líquidos las colonias de la bacteria son apenas visibles a los 7 días manteniendo la temperatura a 27°C y agitación constante. Luego de 21 días las colonias alcanzan 0.35mm de diámetro. En otros medios la aparición de la bacteria luego del aislamiento es más lenta tal es el caso del medio PW en el cual dura cerca de 10-14 días para visualizarse su crecimiento; los medios que requieren una incubación más larga son CVC1 y CVC2 donde se desarrolla la bacteria luego de 25-30 días. Dichas condiciones varían de acuerdo al patovar aislado (Scortichini, 2004).

La distribución de este patógeno está asociada a la presencia de insectos vectores y plantas asintomáticas donde se mantienen latentes y en Centroamérica su distribución está relacionada principalmente a las plantas de café en Costa Rica, Nicaragua y El Salvador (EPPO/CABI, 1996; Mariño, 2008)

2.5.1 Mecanismo de acción

La bacteria es introducida a las plantas vectorialmente, principalmente por medio de los insectos chupadores que se han alimentado de plantas infectadas. Las células se alojan en primera instancia en los vasos del xilema donde se encargan de liberar exopolisacáridos de agregación que aglomeran las bacterias en constante reproducción y forman un biofilm de microcolonias el cual satura los vasos del xilema y provoca el colapso de las paredes de las células que forman dicho tejido conductor provocando la invasión proximal del tejido por el excesivo crecimiento de la goma fastidiosa (Figura 2.6). En este proceso median proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y sustancias húmicas (Rodríguez da Silva *et al.*, 2001) que colaboran en la interacción célula – célula y la degradación de las paredes celulares adyacentes (Gould y Lashomb, 2007).



Microsoft Office Picture Manager 2003

Figura 2.6. Bacterias de la especie *Xylella fastidiosa* en los vasos del xilema de planta de cítricos infectada (10.000 X). Fuente: Sharon, 2000 (Fotografía de W. Kitajima (ESALQ/USP/Brasil)).

Su mecanismo de síntesis de exopolisacáridos está dilucidado mediante la secuenciación completa de su genoma el cual comprime dos plásmidos adicionales al cromosoma circular que codifican genes de virulencia (Simpson *et al.*, 2000). Dentro de este se encuentran 22 genes que codifican para proteínas reguladoras y enzimas involucradas en la biosíntesis del polisacárido de

agregación, el cual según estudios de genética comparativa guarda un asombroso parecido al sistema genético presente en *Xanthomonas campestris* que es un fitopatógeno que dentro de su patogenicidad involucra la formación de gomas xantano mediante una naturaleza química muy similar (Rodríguez da Silva *et al.*, 2001).

Los síntomas son evidentes luego de que la bacteria ha alcanzado una colonización considerable reduciendo el flujo y reflujo de agua (Purcell, 2005) y el consecuente estrés hídrico y déficit nutricional reflejado en quemaduras secas de las hojas. Dicho evento puede tardar desde cinco meses en aparecer (Mariño, 2007) o bien desde 9-12 meses dependiendo de la especie que infecte (EPPO/CABI, 1996). La acumulación de la bacteria también varía según la especie de hospedero, observándose en algunos casos una diseminación sistemática y una colonización generalizada en la planta, en otros casos se localiza y se aloja únicamente en el sitio donde fue inoculada (Purcell y Hopkins, 1996; Krivanek y Walter, 2005) coexistiendo o eliminándose por efecto de interacción de endógenos localizados (Almeida y Purcell, 2003). Se estima que dicho comportamiento dentro de la planta se relaciona con los síntomas diferenciales (Purcell y Hopkins, 1996).

En café a nivel anatómico interno se han reportado deposiciones de gomas en los vasos del xilema del tejido del tallo, pecíolos y hojas observándose una mitosis anormal en el tejido floemático, xilemático y alteraciones externas morfológicas en la corteza de los tallos, los pecíolos y el mesófilo. Las células del mesófilo de las hojas presentan menor número de cloroplastos y altas concentraciones de cristales de oxalato de calcio sugiriendo la inducción de senescencia temprana relacionada al estrés provocado (Benetti *et al.*, 1998).

2.5.2 Métodos de transmisión

La transmisión de la bacteria se puede dar en al menos tres formas distintas: mediante injertos realizados con material contaminado, el daño mecánico

producto de labores agrícolas con herramientas o a través de insectos vectores que se alimentan de la savia donde se aloja la bacteria (Fournier, 2007).

Esta última forma de transmisión se considera la más rápida y de mayor importancia en la epidemiología de la enfermedad. Se le atribuye dicha transmisión a dos grupos de insectos Homopteros chupadores: los cicadélidos pertenecientes a la familia Cicadellidae y la subfamilia Cicadellinae (Tribus Cicadellini y Proconiini) y a los cercópidos incluidos en el familia Cercopidae, ambos conocidos como “saltahojas” (Redak *et al.*, 2004) por que la bacteria se aloja en las parte bucales (EPPO/CABI, 1996) y en la región del intestino externo o ectodermo donde puede ser transmitida a otra planta en una posterior alimentación sin necesidad de entrar en la hemolinfa del insecto (Hopkins, 1977).

En los cultivos de café tanto en Centroamérica como en Suramérica se encuentran asociados principalmente los individuos de las especies *B. xanthophis*, *D costalimai*, *H. ignorata* y *O. faciales* (Marucci *et al.*,1999; Marucci *et al.*,2001). En Costa Rica a través de la cooperación de las instituciones ICAFE-CIBCM-INBio se determinaron poblaciones de los insectos *Agrosoma placetis*, *Apogonalia stali*, *Chinaza bella*, *Dilobopterus hyalinatulus*, *Dilobopterus instratus*, *Erythrogonia areolata*, *Graphocephala permagna* (Figura 2.7. B), *Erythrogonia laeta*, *Erythrogonia sonora* (Figura 2.7. B), *Fusigonalia spp*, *Macunolla ventralis*, *Nielsonia spp* y *Scaphytopius spp* (Rodríguez, 2002). En total se consideran 39 especies dentro de 19 géneros en la subfamilia Cicadellinae como vectores de *Xylella fastidiosa* (Nielson, 1985).

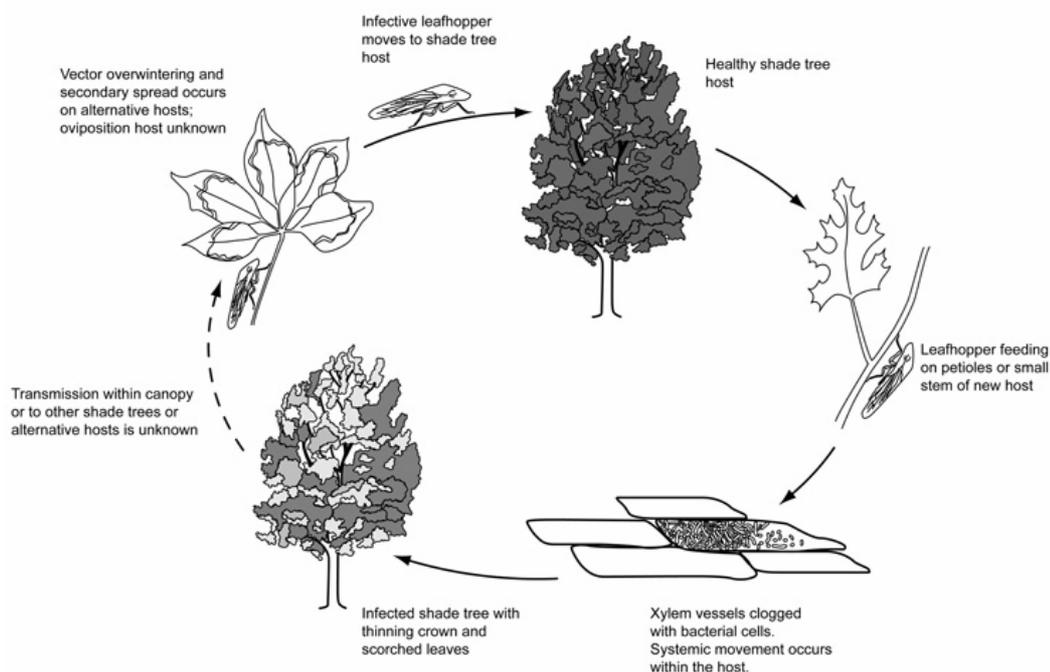


Figura 2.7. Insectos vectores reportados para Costa Rica. A. *Graphocephala permagna* B. *Erythrogonia sonora*. Fuente: Barquero, 2007².

Su mecanismo de transmisión se considera un modelo semipersistente debido a que la bacteria no se hereda de generación en generación ya que se aloja en las partes externas de los insectos que se han alimentado de plantas enfermas, los cuales una vez que mudan y pierden el exoesqueleto también pierden el biofilm de la bacteria que se alojó en la cutícula del ectodermo, esto aunado a la ausencia de evidencias de transmisión transovarial (Purcell y Finlay, 1979).

Luego de diez días de haber sido infectada una planta se ve un incremento del 50% del crecimiento bacteriano convirtiendo esa planta en un vector pasivo muy eficiente (Hill y Purcell, 1997); sin embargo, la eficiencia de la transmisión también estará determinada por aspectos como los cambios bioquímicos de la savia de los hospederos y la tensión en momentos del crecimiento de las mismas, ya que determinan la dinámica de visita diurna (Máxima actividad al medio día) y cambio estacional por el uso de los hospederos que hacen los insectos vectores (Andersen *et al.*, 1992).

Los requerimientos nutricionales son diferentes entre los estados adultos y las ninfas, no obstante, la frecuencia de alimentación es igualmente alta (Brodbeck *et al.*, 1995). La transmisión inicial en plantaciones se realiza principalmente interespecíficamente esto quiere decir que se reporta mayor transmisión de hospederos diferentes que entre los mismos hospederos al ser insectos altamente polípagos (Redak *et al.*, 2004) (Figura 2.8).



Microsoft Office Picture Manager 2003

Figura 2.8. Ciclo de infección vectorial epidemiológico de la enfermedad causada por *X. fastidiosa* transmitida por Cicadélidos. Fuente: Gould y Lashomb, 2007.

2.6 Técnicas de detección e identificación microbiana

Actualmente para la detección e identificación de microorganismos se han desarrollado protocolos específicos utilizando técnicas convencionales de cultivo en medios selectivos, pruebas bioquímicas de rápida discriminación, pruebas serológicas y moleculares de mayor selectividad y sensibilidad con el objetivo de dar un “diagnóstico fitopatológico” acertado y evocar los recursos disponibles hacia un control verdadero de la enfermedad.

2.6.1 Tinciones diferenciales y de estructuras

Dentro de las pruebas de discriminación rápidas se encuentran las tinciones diferenciales siendo la Tinción de Gram la más utilizada para una clasificación preliminar en Gram negativas y positivas según la estructura y grosor de la pared

bacteriana, esta tinción permite correlacionar propiedades de susceptibilidad a antibióticos, resistencia a sales biliares, tensión superficial, punto isoeléctrico y la presencia de endotoxinas. Esta técnica puede presentar algunas modificaciones con respecto a algunos microorganismos que presentan resultados variable (Gram variables) (Rodríguez *et al.*, 2005¹).

Otras tinciones son la Tinción de endosporas según la técnica de Shaeffer y Fulton con verde malaquita y safranina en la cual se promueve la penetración de colorantes en las gruesas capas de tejidos poco permeables y altamente deshidratados de estas estructuras refringentes usualmente más frecuentes en Gram positivos y de número variable por célula, permitiendo determinar la posición y forma característica para la identificación (Shalóm *et al.*, 2005). También se emplean tinciones como la Tinción de Flagelos mediante la Técnica de Kodaka, en la cual se evalúa el número y distribución de los flagelos en las células bacterianas luego de aplicar al cultivo un colorante que aumenta el diámetro de los flagelos facilitando su observación (Kodaka *et al.*, 1982). Se emplean tinciones de estructuras de reserva ocasionales tipo gránulos metacromáticos discriminando sobre la capacidad de producir estos gránulos en diferentes condiciones de cultivo artificial (Iañes, 1998).

2.6.2 Cultivo en medios selectivos

Otro método de determinar la presencia de microorganismos específicos es el cultivo en medio selectivo, en el cual se puede determinar además la movilidad de los cultivos puros, la sensibilidad a antibióticos, la presencia de enzimas específicas de hemólisis, la capacidad aerobia-facultativa-anaerobia de las bacterias y otras características de valor taxonómico. Aspectos como la consistencia del medio, la forma de rayado o vaciado de las colonias en dilución, el recipiente donde se crezcan, las diluciones seriadas empleadas, las velocidades de agitación y la cantidad de aireación ininterrumpida estrechan aún más las posibilidades de crecimiento determinando un método de identificación protocolario que puede llegar hasta discernir entre especies (Rodríguez *et al.*, 2005¹).

En el caso particular de *Xylella fastidiosa* considerada una bacteria limitada al xilema de sus hospederos y que presentan un lento crecimiento bajo condiciones sensibles de incubación, se han formulado diversos medios selectivos que permiten obtener cultivos puros de este microorganismo presentando variaciones en tiempo, morfología, cantidad de colonias y agresividad entre las subespecies recuperadas. Entre estos medios se encuentran el PD2 y PD3 especializados para aislamientos de subespecies que atacan la vid, CS20 y BCYE con disponibilidad para mayor variedad de hospederos, además están los medios PW, CVC1 y CVC2 que permiten aislar subespecies a partir de tejido de cítricos y SPW que es específico para aislamientos de muestras de naranja dulce (Scortichini, 2004).

2.6.3 Actividad enzimática producida e inducida

Otro método de rápida discriminación en la mayoría de los casos es la detección de la actividad enzimática bacteriana, la cual permite en conjunto con la elaboración de medios de cultivos selectivos, matrices líquidas de oxidación, cápsulas de aglutinación y otros elementos determinar la capacidad catalítica de las bacterias sobre determinados sustratos. Entre estas pruebas se encuentra la prueba de hidrólisis del almidón, sacarosa, caseína, celulosa, reducción de colorante (azul de metileno), prueba de oxidasa y catalasa, dentro de las pruebas más generales (Rodríguez *et al.*, 2005¹).

Existen pruebas bioquímicas enzimáticas más específicas para analizar bacterias Gram positivas entre ellas la prueba de coagulasa y la de aglutinación de látex para el género *Staphylococcus*; pruebas de sensibilidad a antibióticos para *Streptococcus*, entre otras (Rodríguez *et al.*, 2005¹). También se han desarrollado pruebas exclusivas para bacterias Gram negativas como el cultivo de colonias en agar Triple Azúcar-Hierro (TSH por sus siglas en inglés), Fermentación de Carbohidratos bajo ambientes anaerobios, Prueba de Oxidación-Fermentación (OF), Prueba de Hidrólisis de ONPG; Prueba Indol, rojo de metilo, Voges Proskauer y citrato (IMViC por sus siglas en inglés); Desaminación y

descarboxilación de aminoácidos; Reducción de Nitratos, entre otros (Rodríguez *et al.*, 2005¹).

2.6.4 Cultivo en Agar TSI

La fermentación de sustratos en Agar Triple Azúcar es comúnmente utilizado en conjunto con las pruebas generales anteriores como un discriminador bastante confiable. La prueba tiene su fundamento teórico en la fermentación de carbohidratos presentes en el medio de cultivo bajo condiciones de anaerobiosis diferenciadas, mientras el fundamento práctico describe la inoculación en picada en medio inclinado y el rayado superficial de las colonias para la interpretación de las reacciones por indicadores ácido-base presentes en el agar TSI.

Esta prueba requiere de cultivos inclinados donde el tubo exhiba un tercio de su volumen inclinado donde se establece una zona aerobia por difusión, mientras que la parte del fondo del agar se considera una zona anaerobia relativa, el tubo debe facilitar la oxigenación por difusión por medio de una tapa permeable. El medio contiene 0.1% de glucosa, 1% de lactosa, 1% de sacarosa, tiosulfato de Sodio y Sulfato ferroso como indicadores de sulfuro (H₂S) y rojo fenol como indicador de pH (Rollins y Joseph, 2000).

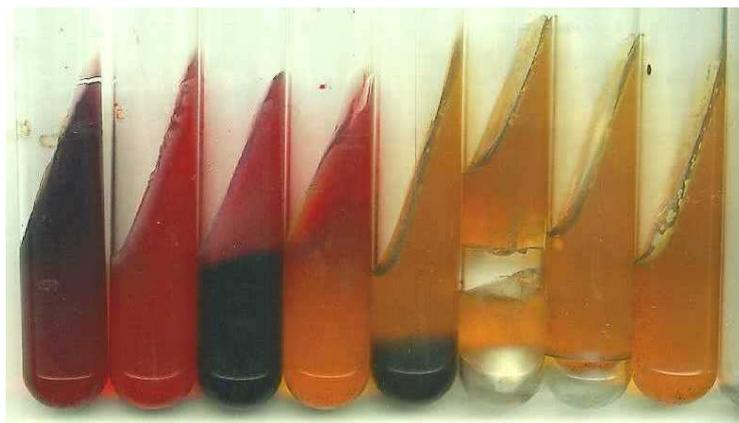
Esta prueba permite diferenciar bacterias que solo fermenten uno o varios tipos de carbohidratos, detectar la producción de gas producto de dichas fermentaciones, así como la presencia de H₂S debido a la reducción del tiosulfato, discriminar bacterias no fermentadoras y obtener inóculos para la detección de *beta* galactosidasa en la prueba de orto-nitro-fenil- galactósido (ONPG) (Rodríguez *et al.*, 2005¹).

Como se indicó anteriormente las reacciones se determinan por cambios de coloración en el medio así como la producción de gases (Figura 2.9). Por ejemplo, una bacteria fermentadora de solo glucosa en la región aerobia metabolizará oxidativamente mientras que en la región anaerobia lo hará de forma fermentadora. La primera condición implica poca o nula producción de

ácidos en la sección aerobia donde rápidamente se agota la glucosa y obliga a la bacteria a utilizar las peptonas disponibles provocando en su catálisis la liberación de productos alcalinos al medio aerobio lo que mantendrá un pH alcalino que provocará un cambio en el medio a color rojo; Por su parte la región anaerobia ante la ausencia de O_2 en cantidades adecuadas no facilitará la oxidación de las peptonas al acabarse la glucosa disponible y entonces prevalecerá el metabolismo fermentador que libera productos ácidos al medio provocando la coloración amarilla al virar el indicador (K/A) (Rollins y Joseph, 2000).

Otro caso a considerar en esta técnica es la posibilidad de ensayar bacterias que fermenten más de una azúcar lo que provocará que la acidificación acumulada en la región anaerobia sea excesiva y vire el color hacia amarillo aún en la regiones oxidativas donde se utilizaron las peptonas, esto debido a que las fuentes de energía sacarosa y lactosa se encuentran en una concentración superior a 10 veces que la glucosa (A/A). La producción de gas producto de las fermentaciones se evidencia por rupturas y burbujas en el medio (G), mientras que la formación de precipitados de sulfuro ferroso oscuros en el fondo del tubo producto de la reacción del H_2S con las sales de hierro del medio, se indica H_2S . Este H_2S se forma por la donación de átomos de azufre por parte del tiosulfato de sodio, la cisteína y la cistina presentes en el medio lo que propicia la reacción anterior en ambiente ácido, dicha evidencia no se aprecia generalmente en la región aerobia ya que este producto se volatiliza rápidamente en presencia de oxígeno (Rollins y Joseph, 2000).

Por su parte cuando las bacterias no son fermentadoras se utilizan las peptonas en la región aerobia oxidativamente y cambia dicha región a color rojo, mientras que la región anaerobia no vira de color ante la inactividad de la ruta fermentadora (reacción K/NC) (Rollins y Joseph, 2000). En el anexo 1 se presenta la formulación del medio de cultivo y los criterios de interpretación resumidos para la prueba.

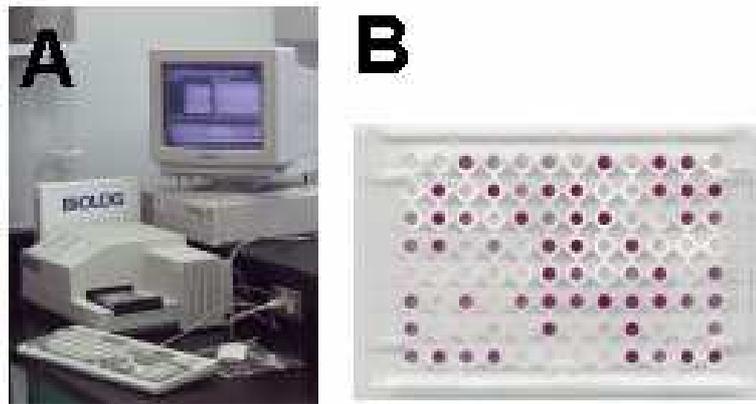


Microsoft Office Picture Manager 2003

Figura 2.9. Batería de tubos con resultados variados para la prueba de fermentación y crecimiento de bacterias en Agar TSI. Fuente: Fankhauser, 2001.

2.6.5 Sistemas BIOLOG®

El sistema BIOLOG es un sistema computarizado de alrededor 1400 registros bioquímicos para identificar aislados bacterianos aerobios, anaerobio y levaduras. Su fundamento se basa en utilización y oxidación de fuentes de carbono conocidas y sistematizadas que arrojan un perfil metabólico según el microorganismo expuesto a estas. El sistema cuenta con placas de microensayos con 96 fuentes de carbono en donde se incuban suspensiones puras y conocidas de los microorganismos desconocidos; del periodo de incubación depende la rapidez del desconocido para metabolizar las fuentes al punto que dicha acción pueda ser detectable por evidencias físicas de cambio de color en las fosas utilizadas. Los resultados o perfil obtenido luego de la incubación permiten acercar la probabilidad de identificación con un índice de similitud a microorganismos que asemejen dicho perfil con el desconocido (Garland, 1999) (Figura 2.10).



Microsoft Paint 5.1

Figura 2.10. Sistema de identificación BIOLOG. A. Sistema de Identificación Microbiana Biolog®. B. Placa Biolog® con resultados positivos (púrpura). Fuente: University of Guelph, 2008.

Las muestras que se deseen identificar deben ser purificadas y clasificadas según criterios quimiotáxicos comunes aplicando la Racción Gram, la Prueba de Catalasa, Oxidasa, descripción física de la colonia, morfología, cultivo en agar TSI, entre otros debido a existen reacciones específicas para microorganismos gram positivos, negativos y levaduras las cuales se deben aplicar correctamente para no incurrir en gastos de recursos o diagnósticos erróneos (Uribe, 2008ⁱⁱ).

El procedimiento convencional una vez agrupadas las muestras es la preparación de soluciones fluidas donde se suspenden las bacterias purificadas en la fase de crecimiento activo (15-18 horas). Las mismas se homogenizan mediante la determinación de un porciento de transmitancia a 590nm. Luego se inocula 150ul de cada suspensión en cada pozo de reacción de la microplaca y se incuban por 24 horas para posteriormente comparar los perfiles metabólicos con la base de datos computarizada (Mariño, 2007).

ⁱⁱ Dra. Lidieth Uribe. 2008. Comunicación Personal. Directora del Laboratorio de Microbiología Agrícola. Centro de Investigaciones Agronómicas. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. Consulta 30/06/2008.

2.6.6 Métodos Serológicos de Identificación

Se encuentran dentro de los métodos más específicos de identificación de patógenos, estas pruebas dependen de dos características: la especificidad o capacidad de los anticuerpos de reconocer un antígeno individual, y la sensibilidad o la capacidad de reconocer la más baja cantidad de antígeno que implican el uso de enzimas dentro de la cual se encuentra la prueba de ELISA (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay por sus siglas en inglés) (Madigan *et al.*, 2004).

2.6.6.1 Prueba ELISA

La sensibilidad de la prueba de ELISA está dada por la interacción del complejo enzima-sustrato que es capaz de detectar hasta 0.1ng de antígeno. Las enzimas más usadas son las B-galactosidasas, peroxidasa y la fosfatasa alcalina. Existen tres tipos principales de ELISA según la detección de antígeno, el anticuerpo o del complejo que forman los dos anteriores denominándose de forma correspondiente ELISA directo, Indirecto y doble sándwich de anticuerpo (DAS) (Madigan *et al.*, 2004), siendo este último tipo el más utilizado para detección de la bacteria *X. fastidiosa* (Hernández y Ochoa, 1996). Este tipo de prueba se realiza en soportes especializados de materiales de afinidad electroquímica específica donde se pipetea los antígenos y los anticuerpos de la prueba (Figura 2.11).

El protocolo DAS-ELISA se ha aplicado en la detección de patovares en cultivos de vid, durazno, ciruelas, cítricos, olmo, plantas de jardín, malezas, roble (Hernández y Ochoa, 1997) café (Barquero, 2007²) y otros cultivos de importancia comercial. En café se ha aplicado como herramienta de identificación sobre material sano y enfermo, en Costa Rica se ha empleado el protocolo DAS-ELISA para realizar investigaciones de detección en plantaciones de todo el área nacional desde el año 2002 y el mapeo de la presencia de la bacteria *X. fastidiosa*, así como, la elaboración de un método de evaluación de la

epidemiología de la “Crespera del Café” que combine la distribución de síntomas en las plantas con los niveles de severidad (Fournier, 2007).



Microsoft Office Picture Manager 2003

Figura 2.11. Placa de microtitulación y control del Kit Agdia para la prueba de ELISA. Fuente: Agdia, 2008¹.

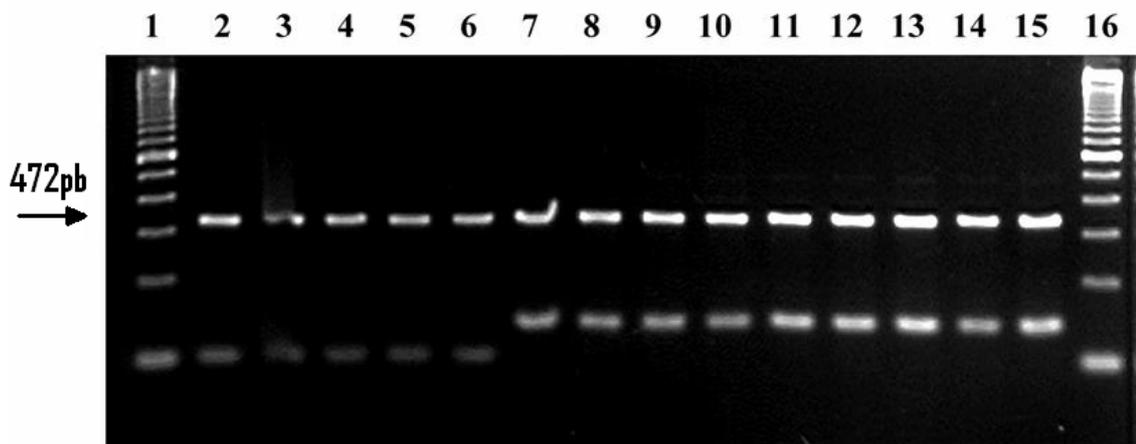
2.6.7 Métodos de Identificación Molecular

La necesidad de determinar con exactitud el agente causal de una enfermedad, poder diferenciar entre los niveles de virulencia o resistencia y el simple hecho de obtener modelos genéticos de comparación para análisis genómicos ha permitido el avance en las herramientas moleculares considerándose hoy en día los métodos más sensibles y confiables de identificación. Para el caso del patógeno *Xylella fastidiosa* se han desarrollado gran cantidad y variedad de marcadores moleculares mediante diversos procedimientos que analizan tanto ADN como ARN (Hernandez *et al.*, 2006¹).

La técnica más utilizada ha sido la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) la cual se ha empleado en conjunto con la amplificación de regiones delimitadas por diferentes primers en diferentes variantes como lo son: PCR anidada (Nested PCR) para la identificación de hospederos alternativos de *X.fastidiosa* (McElrone *et al.*, 1999), detección de la bacteria en insectos vectores empleando los

cebadores CVC1/272-2 y 272-1/272-2 corridos en electroforesis de gel de bromuro de etidio (ED-AGE), así como la relación de microorganismos fitoplasmas asociados a la enfermedad de “Crespera del cafeto” mediante los plásmidos P1, P7, P16F2, R16R2, FU5 y Ru3 (Galvis *et al.*, 2007).

Otra variante es la REP-PCR que amplifica las regiones paliandrómicas extragénicas repetidas empleando primers específicos REP1R-1 y REP2-1 (Qin *et al.*, 2001); ERIC-PCR que utiliza el mismo fundamento de la REP-PCR variando un solo cebador (ERIC) (Hernandez *et al.*, 2006¹) y RFLP-PCR que consiste en el ensayo de enzimas de restricción sobre el producto de las amplificaciones de primers conocidos, esta técnica se conoce como Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción y permite medir variabilidad entre los mismos patovares (Poehlman, 2005), específicamente se han aplicado los primers 272-1-int y 272-2-int junto con las enzimas de restricción MspI, HaeIII, RseI y CfoI para obtener regiones secuenciables de diferenciación (Figura 2.12) (Qin *et al.*, 2001).



Microsoft Paint 5.1

Figura 2.12. Productos de la amplificación del ADN por RFLP-PCR de muestras de plantas infectadas con *Xylella fastidiosa*, muestras de cítricos (2-6), vid (7-15), la flecha indica la banda patrón de identificación. Marcador de 100pb (16). Fuente: Qin *et al.*, 2001.

También se ha ensayado en *X. fastidiosa* los marcadores moleculares dominantes RAPD que permiten determinar el polimorfismo dentro de la especie

mediante la amplificación del ADN promovido por un solo primer de cadena corta y arbitraria asistido de la PCR (Poehlman, 2005). De forma específica se han empleado RAPD para la identificación rápida del patógeno mediante la discriminación de un patrón de bandas de peso 0.5kpb en cítricos empleando los marcadores independientes OPP6, OPP9, OPAX 5, OPAX 18, OPX 1 y OPX 4 (Lavaca *et al.*, 2001).

Otros métodos secuenciales sobre genes conservados se han aplicado para medir diversidad y encontrar diferencias entre la virulencia de los patógenos como la secuenciación del gen 16S rDNA y las regiones espaciadoras intergénicas de los genes 16S, 23S ISR (Hernandez *et al.*, 2006²), la secuenciación de los genes 16S rARN y el gen *gyr B* (codifica para la Beta-subunidad del péptido de una AND girasa) para medir la variabilidad entre la patogenicidad de las cepas aisladas de hospederos diferenciales y diseñar un marcador para la aplicación de PCR múltiplex (Rodrigues *et al.*, 2003), la comparación genómica entre bacterias del género *Xanthomonas* y *Xylella* en busca de similitud en los mecanismos de regulación de interacción planta-patógeno mediante la secuenciación de regiones ORF (Moreira *et al.*, 2004), así como la comparación de ADN homólogo mediante el análisis de locis de genes multicodificantes entre otros (Hernandez *et al.*, 2006²).

También en las comparaciones genómicas se han empleado los microsatélites como marcadores de genes importantes en la virulencia de diferentes cepas de *X. fastidiosa* (Koide *et al.*, 2004) estos marcadores corresponden con secuencias cortas repetitivas conocidas como *repeticiones de nucleótidos variables en tandem* dispersas a lo largo del genoma permitiendo estimar porcentajes de variación ínfimos y la inestabilidad genómica (Klug y Cummings, 1999). También se han utilizado electroforesis de ADN en campo pulsante (PFGE-DNA) aplicada a la determinación de patotipos en cultivos de la vid (Hendson *et al.*, 2001). Otras pruebas más generales de hibridación de ADN y ARN en membranas de nitrocelulosa, aplicación de sondas radioactivas en matrices de hibridación (Hibridación Souther y Northern) (Fournier, 2007) y el uso de isoenzimas (formas

múltiples de una sola proteína compleja) entre otros métodos aportan igualmente información importante en la determinación e identificación de un patógeno particular (Poehlman, 2005).

Sin duda la aplicación de la bioinformática aunada a estos marcadores moleculares ha permitido avanzar aún más en la epidemiología de las enfermedades causadas por *Xylella fastidiosa* empleando herramientas de alineación, comparación (BLAST y FAST) y reconstrucción-predicción de frecuencias funcionales (ERGO), así como el almacenamiento en bancos de genes (Bhattacharyya *et al.*, 2002). También la ingeniería genética ha permitido modificar patotipos de *Xylella fastidiosa* y obtener mutantes que permiten investigar las rutas metabólicas implicadas en la señalización e interacción extracelular de las bacterias y su control mediante la confección de plásmidos alelicos de intercambio tipo pKLN61 y pKLN62 (Newman *et al.*, 2004).

2.7 Microorganismos endófitos en plantas de café

Los estudios referentes a microorganismos endófitos en plantas de café han sido muy pocos, más las investigaciones apuntan a la agrupación benéfica de microorganismos especialmente bacterias que colonizan nichos internos en las plantas y que desarrollan una interacción simbiótica con estas (Lima *et al.*, 2005). Su papel dentro de las plantas aún es poco conocido; sin embargo, se le han asignado funciones benéficas en cuanto al combate de patógenos que luchan por el mismo nicho ecológico a través de competencia, antibiosis o estimulación de las defensas y crecimiento de los hospederos, aceleración de emergencia de raíces, aumento en la capacidad de absorción y asimilación de nutrientes. Estos endófitos no causan un daño visible a la planta y se pueden recuperar de los tejidos internos de esta considerándose una fuente potencial de biocontroladores (Arájúo *et al.*, 2002) implicando una fuente potencial para la bioprospección aplicada en la interacción planta-microorganismo aplicando las herramientas biotecnológicas hoy disponibles (Montesinos *et al.*, 2002)

Vega y sus colaboradores (2005) han reportado para la especie de *Coffea arabica* la incidencia de 87 aislamientos bacterianos agrupados dentro de 19 géneros obtenidos a partir de tejido de hojas, raíces, tallos y frutos en donde se incluyen los géneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia* y *Stenotrophomas* como los más abundantes, las cuales según Mariño (2007) se podrían encontrar en los mismos tejidos que *Xylella fastidiosa*.

Respecto a las poblaciones de hongos endófitos existen trabajos enfocados en la comparación de estas poblaciones con las de epífitos sobre las hojas de cafetos realizando comparaciones de la diversidad y correspondencia de microorganismos en ambos nichos; por ejemplo: Santamaría y Bayman (2005) aislaron en café 831 colonias y las agruparon en 131 morfoespecies, luego de la aplicación de análisis moleculares de secuenciación de ITS se determinaron los géneros de *Colletotrichum*, *Xylaria* y *Guignardia* dentro de los endófitos más abundantes contrastados los epífitos *Pestalotia* y *Botryosphaeria*.

2.8 Microorganismos endógenos en insectos vectores de *Xylella fastidiosa*

En investigaciones realizadas sobre poblaciones de insectos vectores en plantaciones de cítricos de Brasil infectadas con la enfermedad de CVC se lograron aislar 120 bacterias clasificadas en 40 holotipos mediante análisis de la secuencia del gen 16S encontrándose especies como *Sphingomonas asaccharolyca*, *Methylobacterium mesophilicum*, *Curtobacterium* sp. y *Curtobacterium flaccumfaciens* a partir de los tejidos macerados de cabezas de los vectores *Acrogonia* sp., *Dilobopterus costalimai*, *Oncometopia facialis* y *Bucephalogonia xanthophis*.

En este estudio se demostró además la capacidad de adquisición de bacterias endógenas por medio de la alimentación de los vectores en plantas inoculadas utilizando como modelos al vector *Bucephalogonia xanthophis* la bacteria *Methylobacterium mesophilicum* e inoculándola en plantas de *Catharantus*

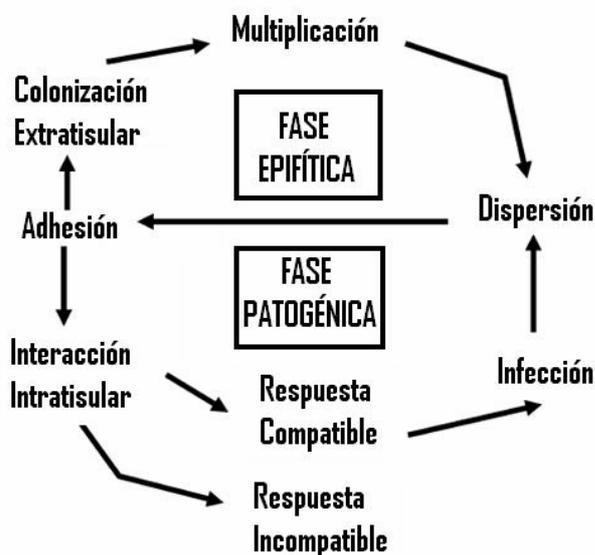
(Santos *et al.*, 2004). Otras investigaciones relacionadas han determinado la afinidad de colonización de los endófitos en las regiones del intestino posterior y medio de los insectos una vez asimilados, siendo en esta región más frecuentes que en las regiones anteriores del intestino donde se supone se debe generar una maquinaria diferente especializada para colonizar y alojarse (Redak *et al.*, 2004).

2.9 Bioensayos y pruebas de correspondencia Fitopatológica

Las plantas tanto en las superficies de las hojas como en los tejidos internos representan una fuente de alimento y de alojamiento para gran cantidad de microorganismos tanto benéficos como perjudiciales. La interacción de los microorganismos con las diferentes tejidos de la plantas se consigue de diferentes niveles de dependencia según exista un beneficio mutuo, ningún beneficio o algún nivel de perjuicio siendo el mayor interés de la ecología microbiana dilucidar uno de otro. Las plantas responden de diferentes maneras por vías constitutivas e inductivas ante la presencia de los patógenos ya sea de forma localizada o expansiva por los tejidos (Montesinos *et al.*, 2002). El mecanismo de respuesta está mediado por la activación de genes de defensa inducidos por el reconocimiento bioquímico-extracelular de polisacáridos de pared, proteínas constructivas o metabolitos y enzimas segregadas por los patógenos, produciendo enzimas, metabolitos y otros compuestos antimicrobianos en primera instancia. Luego la reacción intracelular generalmente desencadena la muerte programada de los tejidos invadidos en una reacción hipersensible que avanza hasta la necrosis de las células (Poehlman, 2005).

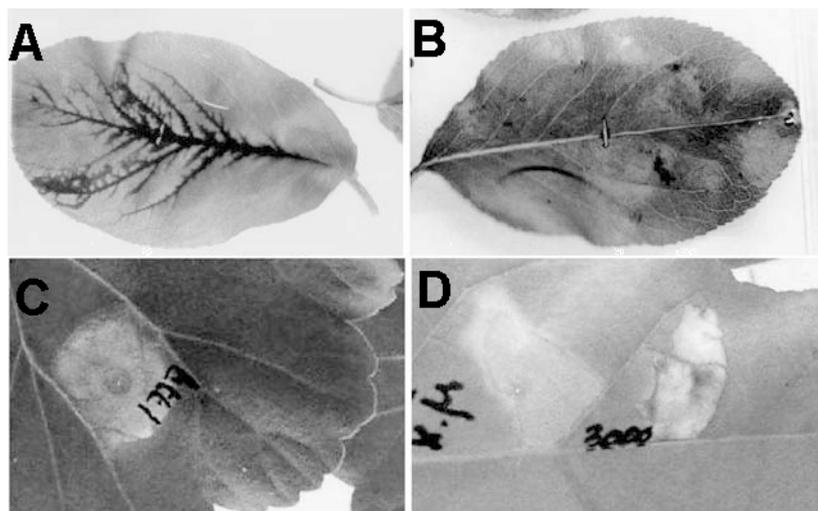
Con en base a estas reacciones se han desarrollado pruebas localizadas de infección por patógenos conocidos sobre diversos hospederos reportados o no para la sintomatología de enfermedades específicas. De esta manera se identifican los síntomas del patógeno en tejido susceptible y se diferencian de las evidencias mostradas en tejidos no susceptibles o no compatibles para la patogenicidad por medio de bioensayos en tejidos que permiten documentar la reacción hipersensible normal de los hospederos y contrastarla con la verdadera

infección inicial promovida por los patógenos en lo que se ha llamado Ciclo biológico típico de patógenos de fase “epifítica y endofítica” (Figura 2.13). En trabajos realizados para determinar este tipo de interacción en pera se determinó la formación de lesiones diferenciales cuando se daba compatibilidad (hospedero convencional), incompatibilidad (hospedero no asociado) o reacción neutral (aplicando bacterias no patogénicas sobre hospedero convencional), esto sobre hojas seleccionadas con inoculación dirigida y conocida (Figura 2.14). Este tipo de pruebas permite corroborar la patogenicidad de microorganismos sobre hospederos alternativos como el café (Montesinos *et al.*, 2002).



Microsoft Paint 5.1

Figura 2.13. Ciclo biológico típico de patógenos de fase epifítica y endofítica. Fuente: Montesinos *et al.*, 2002.



Microsoft Paint 5.1

Figura 2.14. Reacción de las plantas a diferentes patógenos. A. Infección y reacción compatible en plantas de pera inoculadas con *Pseudomonas syringae*. B. Reacción neutral de planta de pera ante *Peudomonas fluoescens* no patogénica. C. Reacción Hipersensible o incompatible provocada por *Pseudomonas syringae* en geranio y Tabaco (D). Fuente: Montesinos *et al.*, 2002.

Existen otros bioensayos aplicados a la dilucidación del agente causal de una patología, entre estos el más aplicado es el Ensayo de Koch, el cual se adaptó de la microbiología clínica humana y veterinaria a la fitopatología. Este bioensayo implica la asociación de un microorganismo con una etiología por la presencia constante del primero en los tejidos del segundo, lo cual permite suponer que la constante es la principal causa de la enfermedad y no una consecuencia de la misma. Sin embargo, para demostrar lo anterior el ensayo implica la inoculación del supuesto patógeno a organismos sanos en espera de obtener las mismas manifestaciones de la enfermedad en estudio y posteriormente recuperar el mismo microorganismo de estas plantas ahora enfermas e infectadas, guardando la particularidad de repetición de los mismos síntomas una vez que se hace crecer en medios artificiales y se reinocula (Madiga *et al.*, 2004)

Para aplicar este bioensayo en fitopatología es necesario complementar la información del laboratorio referente al posible patógeno con la huella de la enfermedad en campo, la edad de la plantación atacada, las partes más afectadas, el manejo reciente de la plantación, aún el más mínimo detalle, ya que

cuando se determinan patógenos muy específicos con características muy particulares como la especie, el estado fenológico e incluso la variedad de la planta pueden ser discriminantes. Es importante recordar que existen variaciones a los postulados de Koch dependiendo del tiempo de observación de la enfermedad el cual generalmente es de 20 días luego de la inoculación o la imposibilidad de aislar en medios selectivos el posible patógeno u otros (Villalba, 2007).

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Aislar y relacionar los microorganismos endógenos en cicadélidos con los endófitos en plantas de café y la sintomatología de Crespera.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Identificación de microorganismos asociados a Crespera del Café.

1. Aislar microorganismos endófitos de plantas de café de campo enfermas con “Crespera”
2. Aislar microorganismos endógenos en insectos cicadélidos asociados a plantas con Crespera.
3. Aislar *Xylella fastidiosa* en medio de cultivo artificial BCYE de plantas de café y de cicadélidos infectados utilizando diversos protocolos de extracción.
4. Identificar microorganismos recuperados de los protocolos de aislamiento y establecer una bacterioteca y micoteca de endófitos disponible para el CICAFFE.

3.2.2 Evaluación de la patogenicidad de los aislamientos.

1. Evaluar la patogenicidad cualitativa de los microorganismos aislados e identificados mediante bioensayos en discos de hoja y troncos de café en laboratorio.

3.2.3 Bioensayos de microorganismos seleccionados para su Correspondencia con la sintomatología de Crespera del Café.

1. Realizar bioensayos de infección vectorial en laboratorio con cicadélidos sobre plantas libres de *Xylella fastidiosa* para reproducir los síntomas de Crespera del Café por 3.5 meses.
2. Realizar bajo condiciones de invernadero bioensayos de infección con microorganismos seleccionados sobre plantas de café libres de *Xylella fastidiosa* con dos métodos de inoculación mecánica y determinar la aparición de signos y síntomas de la enfermedad “Crespera”.

CAPÍTULO 4

METODOLOGÍA

IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS ASOCIADOS A CRESPERA DEL CAFÉ.

4.1 Ubicación del Sitio de Muestreo

Las plantas seleccionadas para los ensayos se tomaron de una finca dedicada al cultivo del café (*Coffea arabica*) variedad Caturra que se encuentra ubicada en el distrito de Cirrú del cantón de Naranjo de la provincia de Alajuela, referenciada 10° 07' 183" latitud norte y 84° 22' 003" longitud oeste, Costa Rica. Se escogieron 100 plantas con diversos niveles de presencia de síntomas, las cuales determinaron un cuadrante de 10x10 plantas para el muestreo de material vegetal y captura de cicadélidos. La edad de la plantación osciló entre 15-20 años de establecimiento. Las plantas se rotularon en campo según el diagrama de la figura 4.1.

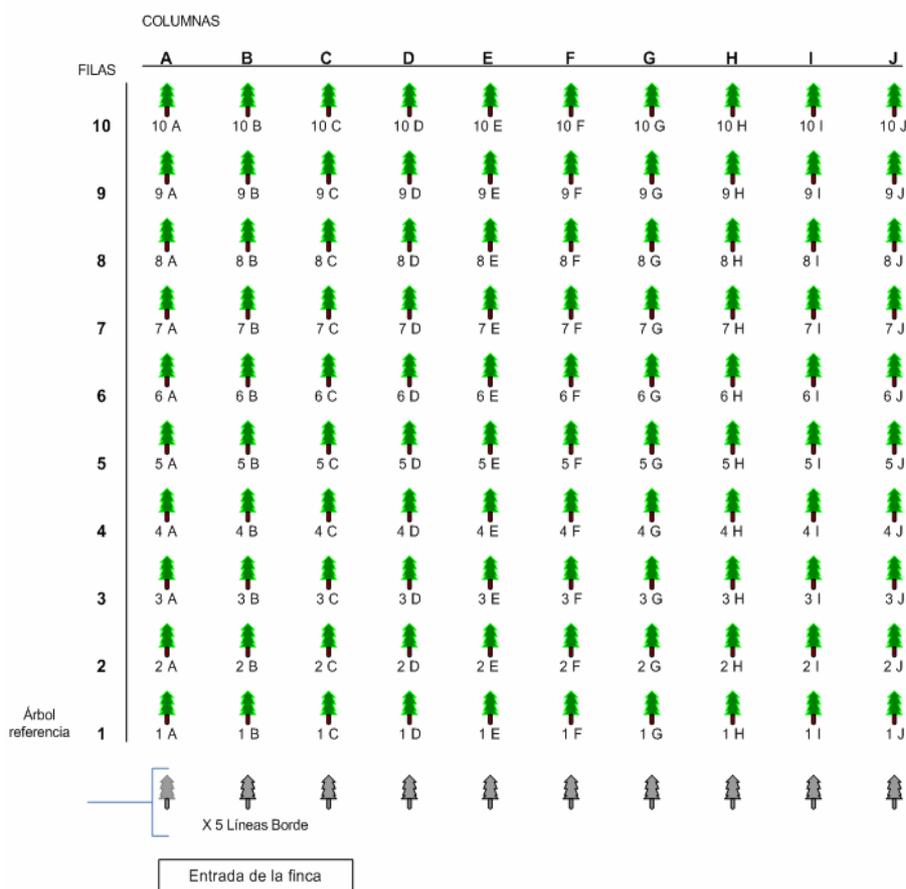


Figura 4.1. Diagrama de distribución de plantas de café para muestreo en parcela experimental. Naranjo de Alajuela, Costa Rica. ⁱⁱⁱ

4.2 Muestreo de material vegetal en campo para aislamiento de microorganismos de posible asociación a la enfermedad Crespeta del café.

Se seleccionaron cuatro plantas aleatorias dentro de la parcela de ensayos y se documentaron según la distribución espacial como 1-A, 4-E, 6-E y 1J. Las muestras se colectaron empleando una tijera podadora de puntas previamente desinfectada con alcohol de 96%. Se tomaron segmentos apicales de ramilletes de bandólas superiores sintomáticas y se transportaron al laboratorio en bolsas de papel individuales.

4.3 Muestreo de cicadélidos en campo.

Se realizó la colecta de insectos cicadélidos en las plantas rotuladas y los bordes de la parcela determinada. Se emplearon viales de vidrio con tapa y se aplicó exposición mecánica rápida de los insectos hacia la boca de los tubos. Se realizó un conteo de los diferentes especímenes obtenidos y se determinaron las poblaciones más abundantes en el sitio según la clasificación propuesta por el CICAFFE (Véase anexo 2 “Clasificación según código de colectas de cicadélidos”).

4.4 Obtención de microorganismos endófitos a partir del material vegetal colectado y de endógenos a partir de cicadélidos.

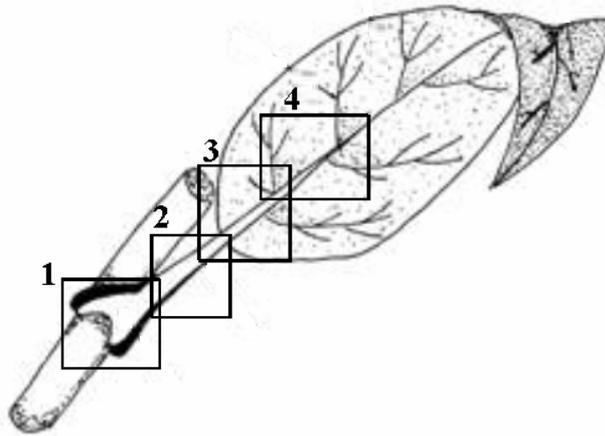
Se emplearon tres protocolos de desinfección e inoculación en medio selectivo BCYE (Véase composición y formulación en el anexo 3) diferenciados como protocolo A, B y C para el material vegetal y un único protocolo para la obtención de endófitos a partir de cicadélidos. Se realizaron observaciones del crecimiento microbiano durante cuatro semanas considerando la factibilidad de obtener

ⁱⁱⁱ El diagrama respondió a una referencia de nomenclatura para el muestreo y ubicación de plantas. La ubicación real de las mismas es asimétrica en dimensión (X;Y) pero cumple la función de instrumento de planeación de muestreo.

aislamientos de microorganismos de lento crecimiento y de baja densidad poblacional asociados muchas veces al hábito de los endófitos. A continuación se detallan los diferentes métodos de inoculación y los tratamientos de desinfección empleados en cada uno de los protocolos.

4.4.1 Protocolo A (Experimental): Desinfección de material de campo con NaClO_4 al 10, 15 y 20%.

Se tomaron hojas de las muestras seleccionadas y se desinfectaron superficialmente con alcohol al 96%. Se cortaron tejidos de las láminas y parte del entrenudo en cuatro secciones según se muestra en el diagrama de la figura 4.2.



Microsoft Paint 5.1

Figura 4.2. Diagrama de tipos de explante utilizados para la posible obtención de bacterias endófitas bajo la desinfección del protocolo A. 1: sección entrenudo + base del pecíolo, 2: pecíolo central, 3: pecíolo superior + base de la hoja y 4: Vena central y segmento de lámina central.

Los explantes resultantes se colocaron en alcohol al 96% por dos minutos y luego se lavaron con agua destilada por dos minutos. Posteriormente se separaron los tejidos en tres grupos combinados de forma equitativa entre tipo y número de explantes. Cada grupo se sometió a una desinfección diferente en diluciones de NaClO_4 al 10%, 15% y 20% (3,5% i.a por dos minutos) correspondiendo con los tratamientos 1, 2 y 3 de este protocolo. Luego se realizaron dos lavados con agua destilada por dos minutos a cada grupo y se inocularon en el medio de cultivo selectivo BCYE.

En cada placa Petri se inocularon 16 explantes (3 del tipo 1 y 2; 5 del tipo 4 y 3) de aproximadamente 0.5cm de longitud (véase apéndice 1). Se evaluó además la oxidación del material en consideración como un factor de inhibición del crecimiento bacteriano. Se inocularon dos repeticiones por tratamiento (concentración de desinfectante) y se incubaron a 30-31°C por cuatro semanas. Se utilizó una placa control inoculando el agua destilada estéril utilizada en el último lavado del tejido.

4.4.2 Protocolo B (Variación CICAPE): Desinfección de material NaClO₄ 1% 3,5% i.a y NaClO₄ 100% 1,0% i.a

Se cortaron segmentos tipo 1 a partir de hojas de las bandolas de las plantas seleccionadas y se desinfectaron superficialmente en una solución de NaClO₄ 1% 3,5% i.a (Tratamiento 1) y NaClO₄ 100% 1,0% i.a (Tratamiento 2) de forma diferenciada por dos minutos según cada tratamiento. Luego se colocaron en alcohol de 70% por dos minutos y se realizaron tres lavados con agua destilada estéril por un minuto cada uno. Los segmentos se cortaron sobre láminas de papel absorbente estéril eliminando los tejidos dañados por el desinfectante y dejando segmentos de 0.5cm de longitud disponibles.

Se realizaron cortes en los tejidos y se presionó fuertemente dicho entrenudo con un alicate de puntas forradas en papel aluminio estéril depositando la savia resultante en el medio de cultivo selectivo BCYE. Se colocaron 10 puntos de savia aleatorios por placa en duplicado (véase apéndice 2), se incubaron a 24°C en la oscuridad por cuatro semanas. Se utilizó una placa control inoculando el agua destilada estéril.

4.4.3 Protocolo C (CIBCM-UCR): Variación del protocolo del CICAPE por CIBCM.

Se tomaron pecíolos y parte de la vena central de las muestras utilizando tijeras desinfectadas a la llama. Se recuperaron seis segmentos por cada muestra de 0.1g/ explante promedio. Los extremos de los tejidos seleccionados se taparon con plástico parafilm. Luego en una cabina de flujo laminar estéril se sumergieron

en una solución de Hipoclorito de sodio al 1% a partir de una solución concentrada de ingrediente activo al 3.5% por dos minutos. Transcurrido este periodo se trasladaron a una solución de alcohol etílico al 70% por dos minutos y posteriormente se realizaron dos lavados con agua destilada estéril por dos minutos cada uno. Los explantes se trasladaron a una placa de petri estéril y se les eliminó el segmento cubierto con parafilm. Los segmentos resultantes se cortaron en pequeños pedazos con un bisturí de hoja número 20 y se depositaron en un mortero donde se agregaron tres mililitros de amortiguador PBS 1X y se maceraron con un pistilo estéril. El buffer PBS 1X se formuló mezclando en 1000ml de agua destilada 8.0g de Cloruro de Sodio, 1.15g de Fosfato de Sodio Dibásico (Anhidro), 0.2g de Fosfato de Potasio Monobásico (Anhidro), 0.2g de Cloruro de Potasio ajustando el pH a 7.4 unidades. Se autoclavó a 121°C por 15min y se almacenó luego a temperatura ambiente.

Luego del macerado se tomaron 100µl de la solución y se depositaron en un tubo eppendorf con 900µl de agua destilada estéril para la obtención de dilución 10^{-1} y de esta anterior se tomaron 100µl para constituir la segunda dilución (10^{-2}) en un volumen de 900µl de agua destilada estéril. Utilizando una micropipeta se colocó un volumen de 25µl de la solución: Concentrada, 10^{-1} y 10^{-2} (correspondientes a los tratamientos 1, 2 y 3) sobre placas de medio de cultivo BCYE rotulando con círculos el lugar donde se colocó la gota la cual se hizo deslizar hasta dejar una estela por el medio esperando el crecimiento de endófitos sin que la solución tocara la orilla de la placa (véase apéndice 3). También se realizó la extracción de microorganismos endógenos a partir de una vitroplanta de café (*Coffea arabica*) obtenida de una colección comercial empleada como almácigo utilizando este protocolo. Se utilizó una placa control inoculada con agua destilada estéril. Las placas se incubaron a 26°C en un cuarto oscuro de 80% de humedad relativa por cuatro semanas. Se ensayó por duplicado.

4.4.4 Protocolo D (Insectos CICAPE): Cloruro de Benzalconio al 2% i.a al 50%

Se seleccionaron cicadélidos C7 colectados de la parcela experimental y se colocaron en una malla pequeña de tela de organiza, se sumergieron en una solución de Cloruro de Benzalconio al 2% a partir de una solución concentrada al 50% por un minuto. Posteriormente se realizó un lavado con agua destilada estéril sumergiendo repetidas veces la malla. Se repitió el lavado en Cloruro de Benzalconio y el lavado en agua destilada estéril dejando secar la malla por una hora al flujo de aire. Una vez secas las muestras se agruparon en tríos de individuos colectados y se procedió a disectar la cabeza de un grupo y se maceró en 300µl del buffer PBS 1X (Tratamiento 1). Otro grupo se maceró sin disección en 600µl del buffer PBS 1X (Tratamiento 2).

Los macerados anteriores se inocularon en placas de medio BCYE utilizando el método del rastro de la gota depositando 25µl de la solución concentrada y deslizando la misma por el medio sin que tocara la orilla. Las placas de este ensayo se incubaron a 26°C en un cuarto oscuro de 80% de humedad relativa.

4.5 Clasificación preliminar e identificación de microorganismos obtenidos

4.5.1 Aislamientos bacterianos

Las colonias extraídas mediante los cuatro protocolos de aislamiento se caracterizaron morfológicamente de acuerdo a la forma colonial, el tipo de superficie, elevación del crecimiento, tipo de borde y estructura interna de las colonias, cantidad del crecimiento a 3 días, la consistencia, posible cromogénesis y esporulación en el caso de los bacilos Gram positivos. Además se incluyeron algunas características bioquímicas de diferenciación como la prueba de catalasa, KOH, Reacción de Gram (Véase anexos 4, 5 y 6 para aplicación de las pruebas según Villalba 2007) y Metabolismo de azúcares en agar TSI (Rodríguez, 2005) para Enterobacterias Gram negativas (Véase anexo 1 para elaboración e interpretación de resultados en agar TSI).

4.5.1.1 Identificación Bioquímica mediante el sistema BIOLOG

La caracterización preliminar anterior agrupó los aislamientos obtenidos según conjuntos de placas nombradas como ID 1-21, los cuales se identificaron posteriormente mediante el sistema BIOLOG. Este análisis se realizó en el laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la Universidad de Costa Rica.

Las reacciones se efectuaron en agar TSI (véase anexo 1, para su formulación) en el cual se subcultivo cada cepa en identificación durante un periodo de incubación variable de 2-15 días según el crecimiento de cada bacteria. Luego de obtener el crecimiento moderado-abundante se realizaron observaciones morfológicas de las colonias, se corroboró al microscopio la pureza y se realizaron pruebas de Gram de comprobación. En el caso de las bacterias Gram positivas se determinó la presencia o ausencia de esporas así como la presencia de la enzima catalasa mediante la reacción bioquímica rápida. En el caso de las bacterias Gram negativas se comprobó la particularidad entérica o no entérica en agar TSI para su posterior identificación bioquímica. Cada muestra previamente estudiada fue disuelta a partir de un cultivo puro y fresco y se inoculó en los 95 pozos de las placas de microtítulo para la detección en sistema BIOLOG. La reacción se incubó de seis horas a 15 días según el crecimiento bacteriano realizándose observaciones diarias para la identificación. El resultado de las fuentes de carbono metabolizadas por la bacteria se introdujo en la base de datos del equipo de análisis mediante el sistema BIOLOG MICROLOG 1 donde se comparó la identidad de la bacteria según el record de una base de datos digital.

5.5.1.2 Detección e identificación serológica mediante DAS-ELISA.

Se aplicó el protocolo Reagent Set, Peroxidase Label de Agdia, Inc m 17.3 (Véase documento en anexo 7) empleado para la detección de *Xylella fastidiosa* para determinar la posible incidencia de este patógeno en algún aislamiento, así como, descartar reacciones cruzadas con algún posible endófito que se acumule en

hábitats comunes con *Xylella fastidiosa* o bien la posibilidad de encontrar a *X. fastidiosa* creciendo en cultivos en placa junto con otros microorganismos que le enmascaren físicamente. Se realizaron modificaciones en la fase de obtención y prepararon de las muestras según se indica a continuación.

Se sometieron a esta prueba las bacterias codificadas y agrupados previamente como ID 1-20 (exceptuando ID-6 y 17 que no mostraron condiciones de prueba). Las muestras se prepararon a partir de diluciones de los aislamientos ID luego de 7 y 22 días de crecimiento. Se utilizó un volumen de 500µl de agua destilada estéril donde se mezcló una asada de la colonia pura obtenida con asa bacteriológica estéril para cada aislamiento. Luego se realizó un conteo de UFC/ml utilizando un hematocitómetro de profundidad 0.1mm (Reichert Brig-Line®) con factor de multiplicación igual a 50000 y se consideraron dichos conteos como diluciones concentradas de los aislamientos.

A partir de las diluciones concentradas se prepararon diluciones estándares de concentración igual a 2.0×10^7 UFC/ml consideradas como concentraciones de ensayo diluidas en Buffer de Extracción General (GEB) aportado por el kit de prueba. El volumen de cada dilución de ensayo fue de 500µl. Se determinó e interpretó la absorbancia de cada aislamiento ensayado mediante el análisis 3 sigma aplicado a la prueba serológica contrastado con los controles de *Xylella fastidiosa* aportados por el Kit de detección.

4.5.1.3 Selección de colonias de *Xylella fastidiosa* a partir de crecimiento en placa y el método serológico DAS-ELISA.

A partir de los resultados obtenidos en el ensayo serológico de detección se aplicaron criterios morfológicos de discriminación previa del posible crecimiento de *Xylella fastidiosa* en medio selectivo para distinguir los posibles aislamientos puros de los que presentaron absorbancias positivas y no correspondieron a las características morfológicas y de crecimiento reportadas para esta especie.

De esta manera se seleccionaron placas que mostraron poco o nulo crecimiento microbiano durante un periodo aproximado de 22 días resultantes del ensayo del protocolo C y que además presentaron posterior a este periodo una aparición leve de colonias blanco traslúcidas (morfológicamente similares a la descripción del crecimiento en placa de la bacteria *Xylella fastidiosa* según EPPO/CABI, 1996; Leite *et al.*, 2003). Estas se sometieron a pruebas rápidas de discriminación preliminar para el análisis posterior de los posibles aislamientos mediante el método DAS-ELISA. Dichas pruebas fueron la Reacción de Gram, la prueba de catalasa y la observación de la forma bastonada celular con movilidad de las bacterias en hematocitómetro Reichert Brig.-Line® profundidad 0.1mm.

Para la detección serológica se siguieron las especificaciones descritas anteriormente para el protocolo Reagent Set, Peroxidase Label de Agdia, Inc m 17.3 (Véase documento en anexo 7) a excepción de la preparación y concentración de las muestras. Las muestras se prepararon a partir de una solución concentrada de bacterias obtenida mediante la dilución de dos asadas de la colonia en 500µl de agua destilada estéril homogenizada con breve exposición al vortex. Se determinó la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml) para cada dilución concentrada y se preparó una dilución de concentración estándar de 2.0×10^7 UFC/ml para cada muestra empleado 500µl del Buffer de Extracción General (GEB) recomendado para la prueba.

Se determinó la presencia de *Xylella fastidiosa* a partir de las colonias muestreadas en las placas que superaron los análisis preliminares anteriores y se seleccionaron las mismas para mantener una colección a corto plazo de la bacteria aislada. Se interpretaron los resultados según el análisis 3 sigma aplicado a la prueba serológica.

4.5.1.4 identificación Molecular del aislamiento de *Xylella fastidiosa* y otras bacterias endófitas en café.

Posterior a la identificación según las características serológicas de *Xylella fastidiosa* se realizó una determinación molecular de la pureza de este aislamiento y de dos aislamientos de endófitos que mostraron resultados positivos para la presencia de absorbancia pero que no correspondían a sus características morfológicas y de crecimiento. Los aislamientos ensayados que podrían corresponder a un falso positivo en la prueba serológica fueron previamente identificados según el método BIOLOG como *Serratia marcescens* que presentó valores positivos desde los siete días de incubación para la prueba DAS-ELISA y *Enterobacter spp* que presentó dicha condición a los 22 días de incubación. Además se aplicó esta prueba para tres de muestras de las plantas seleccionadas para la obtención de endófitos en plantas, así como a un individuo cicadélido C7 representante de la población más abundante muestreada.

a-Extracción de ADN y amplificación

La extracción, amplificación y análisis del ADN de las muestras se llevó a cabo en los laboratorios de Biología Molecular de la empresa Ticofrut en Santa Clara de San Carlos, provincia de Alajuela como parte de una colaboración de servicios interinstitucional.

Para la extracción de las muestras se utilizó el protocolo interno del laboratorio de Biología Molecular Ticofrut con base en buffer CTAB (N-Cetyl-N,N,N-Trimethylammium Bromure) + 0,2% de betamercaptoetanol. En el caso de las muestras de plantas de campo se ensayó tanto el tejido de la vena central como el de pecíolo de hoja, estos se lavaron con agua y se secaron. Se tomaron 0.5g de cada tipo de tejido y se maceraron en bolsas con malla adicionando 3ml del buffer de extracción. El extracto resultante se colocó en tubos eppendorf de 2 ml de capacidad estériles identificándose como extracto de análisis.

A partir de las placas donde crecían las bacterias ensayadas se tomaron dos asadas utilizando un asa bacteriológica estéril las cuales se disolvieron en 2ml del buffer de extracción. El insecto C7 se maceró en 2ml del mismo buffer empleando un micropistilo en un tubo eppendorf de 2ml de capacidad.

Para la amplificación del ADN de *Xylella fastidiosa* se utilizó el programa de PCR desarrollado por la empresa TICOFRUT. Se utilizaron los primers 272-1 int (forward) y 272-2 int (reverse) específicos. El programa de amplificación fue de 3 horas luego de las cuales se colocaron las muestras en un gel de agarosa al 2%. La tabla 4.1 muestra el mapa de ubicación para la prueba.

Tabla 1. Mapa de ubicación en un gel de agarosa para las muestras ensayadas según el protocolo del Laboratorio de Biología Molecular TICOFRUT para la detección de *Xylella fastidiosa*.

Pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Muestra	Marcador Molecular Fast Ruler	Control Xf aislado de <i>Vitis sp</i>	Cicadélido C 07	Xf CICAPE	Placa <i>Enterobacter spp</i>	Placa <i>Serratia marcescens</i>	peciolo Planta 1-A	Vena central Planta 1-A	Marcador Molecular Fast Ruler	Control Xf aislado de <i>Vitis sp</i>	peciolo Planta 1-J	Vena central Planta 1-J	peciolo Planta 6-E	Vena central Planta 6-E	Control negativo (H ₂ O)

Microsoft Office Excell 2003

La migración del ADN se llevó a cabo en una cámara para electroforesis regulada a 100 voltios durante 45 minutos.

4.5.2 Aislamientos fúngicos

Las primeras obtenciones fúngicas a partir de los protocolos de aislamiento ensayados tanto para el material vegetal como en cicadélidos se cultivaron en medio selectivo BCYE seguidamente se reinocularon para purificar la colonia en Papa Dextrosa Agar (PDA) acidificado a 5.5 unidades de pH (Véase anexo 8 para

su formulación). Se incubaron en esta etapa a 22°C en un cuarto oscuro de 67% de HR y se realizaron aislamientos mensuales durante cuatro meses para renovar los cultivos y eliminar las placas no útiles.

Los aislamientos fúngicos totales obtenidos se clasificaron preliminarmente mediante la observación directa al microscopio de luz con el objetivo de 40X utilizando varias técnicas rápidas de fijación en cinta adhesiva, raspado del agar y fijación en gota con azul de metileno y en agua destilada. Se agruparon según las características morfológicas en diferentes ID 1-13 los cuales se identificaron empleando la observación directa de sus estructuras reproductivas y comparándolas con los parámetros de identificación según el manual de reconocimiento de Finch y Finch (1990). Además se empleó la guía de diagnóstico de Cock y Lévesque (2004) y OEPP/EPPO (2004) para identificación detallada de especies de *Pythium* y *Phytophthora* ante la sospecha de su incidencia.

En el caso de las levaduras se determinó preliminarmente su condición mediante observación directa al microscopio de luz con el objetivo de 10X empleando colorantes no diferenciales como el azul de metileno para visualizar las paredes gruesas y el contraste adecuado para discernir la gemación característica de sus células. A partir de las colonias obtenidas se confeccionó una tabla resumen de las principales características morfológicas de clasificación preliminar como: forma colonia, el tipo de superficie, elevación del crecimiento, tipo de borde y estructura interna de las colonias, cantidad del crecimiento a 3 días, la consistencia y posible cromogénesis (Rodríguez, 2005; Villalba, 2007).

Los aislamientos que no presentaron la formación de estructuras de reproducción ni de cuerpos fructíferos para la identificación se cultivaron en medio de cultivo líquido preparado mediante la mezcla de 0.2 gramos de extracto de levadura y 0.7 gramos de sacarosa disueltos en 50ml de agua destilada estéril a un pH de 6.0 unidades. La misma se esterilizó autoclavándose por 20min a 121°C y se inoculó en cámara de flujo laminar utilizando un asa micológica para obtener micelio de

los hongos identificados como ID 2, 3, y 11 para promover la producción de estructuras de clasificación en los mismos. Se realizó la observación de la producción de posibles estructuras de reproducción luego de cinco días de incubación y se registró la formación de *pellets* bajo agitación mecánica en shaker artesanal.

EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE LOS AISLAMIENTOS.

4.6 Bioensayos de patogenicidad de microorganismos aislados en laboratorio.

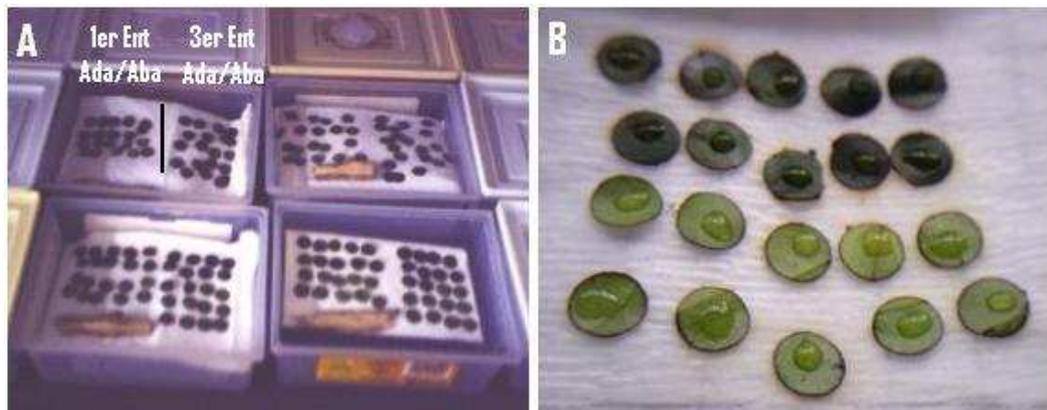
4.6.1 Bioensayos en troncos y discos de hoja de los hongos y las bacterias aisladas.

Los microorganismos aislados mediante los protocolos de obtención de endófitos detallados previamente fueron ensayados en discos de hoja y troncos de plantas de café (*Coffea arabica*) variedad Caturra de dos años de edad para determinar algún efecto de patogenicidad cualitativo.

En el caso de los bioensayos para bacterias se utilizaron hojas superficialmente sanas del primer y tercer entrenudo provenientes de bandólas de altura media (1.5m), se llevaron al laboratorio y se obtuvieron círculos de 0.8cm de diámetro de hojas superficialmente limpias. Además se obtuvieron segmentos de tallo de 4cm de longitud y 1cm de diámetro descortezados en 0.5cm aproximadamente en su longitud y ensayados para las bacterias.

Los bioensayos de las bacterias se confeccionaron en cajas plásticas emuladoras de cámara húmeda, donde se colocó un cedazo de hierro interior de soporte donde se dispusieron sobre una servilleta de papel limpia 40 discos de hoja distribuidos de la siguiente manera: 10 discos adaxiales y 10 discos abaxiales de las hojas del primer entrenudo, así como 10 discos adaxiales y 10 discos abaxiales de las hojas del tercer entrenudo. Además se colocó un trozo de tallo de 4cm de longitud X 1cm de diámetro descortezados en 0.5cm. La cámara húmeda

contenía 10ml de agua en el fondo. Se inoculó cada círculo de hoja y cada trozo de tallo con una microgota de 10µl de una solución bacteriana de 2.0×10^7 UFC/ml en agua destilada estéril (Figura 4.3). Dicha solución se obtuvo luego de la observación y conteo de las células bacterianas en el microscopio (40X) utilizando un hematocitómetro Reichert Bright.-Line® de profundidad 0.1mm, lo que permitió a partir de la solución concentrada preliminar obtener los homogenizados a la concentración indicada. Se montó además dos testigos empleando el agua destilada estéril. Los discos de las hojas al igual que los tallos se observaron al estereoscopio (4X) para comparar con el testigo la posible reacción hipersensible o la reacción necrótica en caso de la presencia de algún signo patológico. Las observaciones se realizaron cuatro días después de la inoculación.

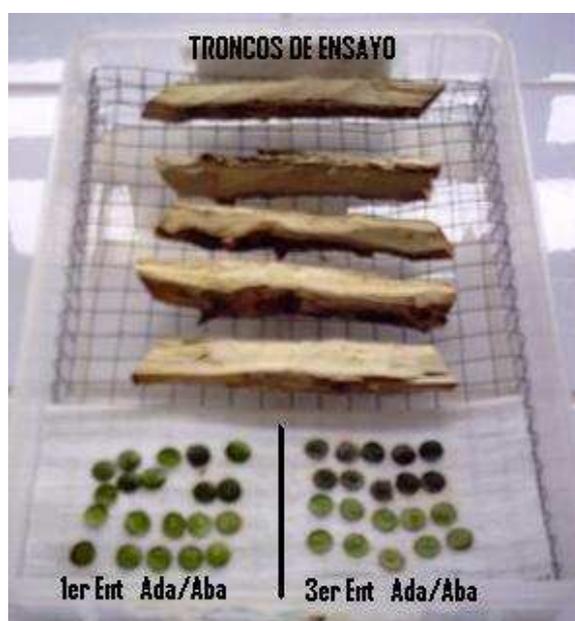


Microsoft Paint 5.1

Figura 4.3. Cámara húmeda de incubación para las pruebas de patogenicidad de los aislamientos bacterias. Distribución de material para ensayo. A. Cámaras húmedas en incubación con material de ensayo: 1er Ent: Discos de hojas del primer entrenudo; 3er Ent: Discos de hojas del tercer entrenudo; Ada/Aba: Región Adaxial / Región Abaxial según colocación en la cámara húmeda. B. Microgotas en disco de hojas.

En el caso de los hongos se colocó un cedazo de hierro interior de soporte donde se dispusieron sobre una servilleta de papel limpia 40 discos de hoja distribuidos de la siguiente manera: 10 discos adaxiales y 10 discos abaxiales de las hojas del primer entrenudo, así como 10 discos adaxiales y 10 discos abaxiales de las hojas del tercer entrenudo. Se emplearon 5 tallos ortotrópicos seleccionados de las mismas plantas muestreadas de aproximadamente 15cm de longitud x 1.5cm de diámetro, a los cuales se les eliminó una franja de la corteza de

aproximadamente 0.5cm continuo. Ambos tejidos se dispusieron en una cámara húmeda soportados por un cedazo estéril y con 50ml de agua en el fondo. La inoculación consistió en una gota de 10 μ l de una solución de esporas o bien de micelio suspendido en agua destilada estéril homogenizada con la técnica de conteo en hematocitómetro. La gota se colocó en la región central de cada explante. Se ensayó un control con agua de inoculación (Figura 4.4). La observación de las posibles lesiones se realizó luego de cuatro días de incubación al estereoscopio (2X). Ambos bioensayos se realizaron en un cuarto de temperatura controlada a 21°C y humedad relativa del 79-80%.



Microsoft Paint 5.1

Figura 4.4. Cámara húmeda de incubación para las pruebas de patogenicidad de los aislamientos fúngicos. Distribución de material para ensayo. 1er Ent: Discos de hojas del primer entrenudo; 3er Ent: Discos de hojas del tercer entrenudo; Ada/Aba: Región Adaxial / Región Abaxial según colocación en la cámara húmeda.

Para ambos ensayos tanto el de bacterias como el de hongos se reportó el porcentaje de discos y troncos lesionados así como también la condición positiva o negativa general.

4.6.2 Bioensayo de Pellets de hongos sobre láminas enteras de hojas de café.

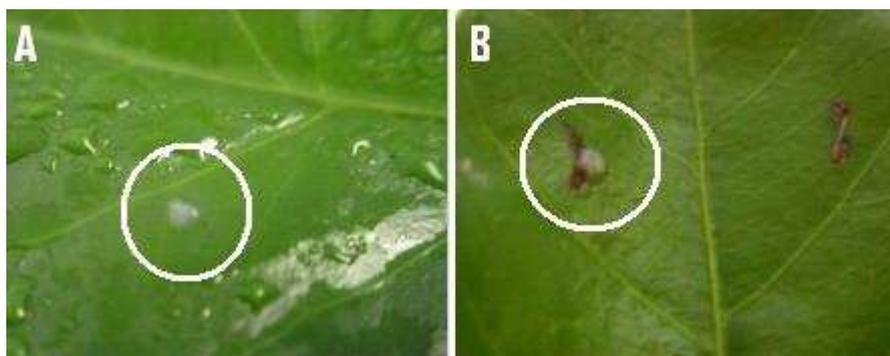
A partir del crecimiento de micelio en forma de *pellets* producto de la incubación en medio líquido de los hongos codificados ID 2, 3 y 11 que no exhibieron la producción de estructuras de reproducción se estableció un ensayo de patogenicidad sobre láminas totales limpias de hojas de café (*Coffea arabica*) variedad Caturra de dos años de edad. Se tomaron hojas enteras del primer entrenudo de bandólas intermedias y se limpiaron superficialmente con alcohol al 96% y agua destilada estéril utilizando una toalla de papel limpia. Se utilizaron cuatro láminas similares por cada hongo ensayado. Dos láminas se inocularon con seis pequeños segmentos de *pellet* sobre la lámina en seis puntos equidistantes (un segmento por punto) (T1) y dos se inocularon sobre seis puntos marcados con heridas producidas por un bisturí de hoja 11 estéril (T2). Se utilizó un control general. La tabla 4.2 muestra los tratamientos totales empleados. La figura 4.5 indica los tejidos vegetales inoculados con ambos tipos de tratamiento.

Tabla 4.2. Tratamientos empleados en el bioensayo de pellets de hongos sobre láminas enteras de café según aislamiento codificado.

Código Aislamiento	Tratamientos	
	T1	T2
ID 2	H2-T1	H2-T2
ID 3	H3-T1	H3-T2
ID 11	H11-T1	H11-T2
Control	C-T1	C-T2

Microsoft Office Excell 2003

Las plantas se mantuvieron en una cámara de temperatura controlada a 22°C y humedad relativa al 100% controlada por el riego de aspersion de microgotas. Se realizaron observaciones semanales durante tres semanas comparando las reacciones foliares de los tratamiento con el testigo.



Microsoft Paint 5.1

Figura 4.5. Inoculación de pellet de hongos en análisis de patogenicidad. A. T1 sin heridas. B. T2 inoculación sobre heridas. El círculo denota en ambos casos la inoculación.

BIOENSAYOS DE MICROORGANISMOS SELECCIONADOS PARA SU CORRESPONDENCIA CON LA SINTOMATOLOGÍA DE CRESPERA DEL CAFÉ.

4.7 Bioensayos en invernadero

Se seleccionaron las bacterias aisladas *Xylella fastidiosa*, *Geobacillus spp* y *Pseudomonas fluorescens* para ensayarse mediante infección mecánica dirigida sobre plantas de invernadero y comprobar la posible correspondencia de los anteriores con la sintomatología de la enfermedad de “Crespera en Café”. La selección de los aislamientos se realizó debido a la relación de *Xylella fastidiosa* con la enfermedad, la evidencia de reacción defensiva en discos de hojas frente a la bacteria *Geobacillus spp* y la asociación de *Pseudomonas fluorescens* con una reacción hipersensible particular. Además se ensayó un método de infección vectorial exponiendo cicadélidos en contacto con plantas sanas de invernadero libres de *Xylella fastidiosa*.

Para llevar a cabo los ensayos se seleccionaron plantas libres de la bacteria *Xylella fastidiosa* mediante la prueba serológica DAS-ELISA y se corroboró la presencia del patógeno en una muestra del 10% de las plantas de la parcela experimental con el foco de la enfermedad de “Crespera” y en insectos

cicadélidos de las poblaciones en campo, así como sobre los individuos resultantes luego del ensayo de infección vectorial.

4.7.1 Selección de plantas de invernadero libres del patógeno *Xylella fastidiosa* para ensayos de infección mecánica y vectorial de bacterias aisladas.

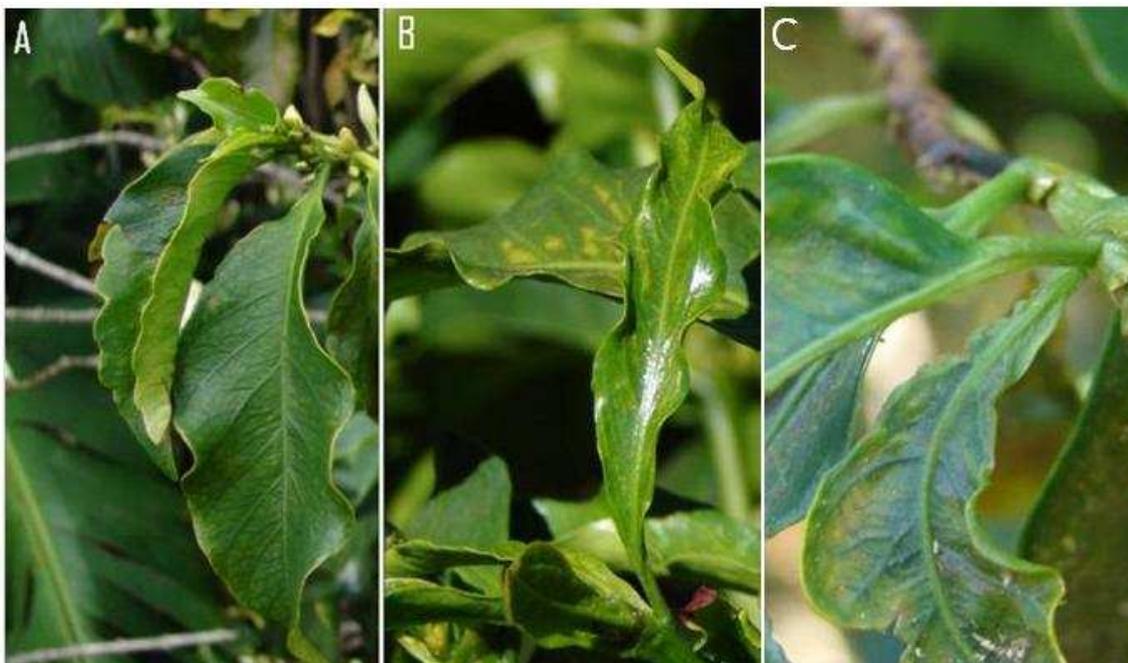
Se obtuvieron 50 plantas de almácigo de café (*Coffea arabica*) variedad Caturra de dos meses de edad provenientes del invernadero del ICAFE ubicado en el cantón de Grecia, provincia de Alajuela, Costa Rica. Se rotularon numéricamente para la obtención de muestras de hojas del tercer entrenudo desarrollado en el momento de establecimiento en el invernadero del CICAPE, ubicado en San Pedro de Barva, Heredia, Costa Rica. La temperatura inicial correspondió a 20.0°C y 73.8% de Humedad Relativa (Datos estación meteorológica CICAPE, San Pedro de Barva, Heredia Costa Rica. Resumen Meteorológico Mensual, Abril de 2008). Se mantuvo una frecuencia de riego diaria de 30min con dos repeticiones.

Se determinó la longitud promedio, el número de hojas y el número de entrenudos de las plantas de almácigo de café para estimar grupos homogéneos de plantas para ensayos. Al igual que las muestras de material vegetal obtenidas de la parcela de campo en estudio, las muestras de hoja obtenidas en este ensayo se procesaron mediante el protocolo Reagent Set, Peroxidase Label de Agdia, Inc m 17.3 (Véase documento en Anexo 7). Se reportó el porcentaje de limpieza del lote según los valores discriminatorios para la absorbancia y el valor de los mismos en la prueba.

4.7.2 Determinación de la presencia de *Xylella fastidiosa* en el material vegetal de campo.

Se realizó un muestreo del 10% de las plantas seleccionadas en campo dentro del tipo de análisis “Z con puntos críticos centrales”, se ubicaron 10 plantas y se identificaron bajo la nomenclatura Fila-Columna (Figura 4.1), estas fueron: 1-A, 2-A (Aleatoria), 10-A, 6-C, 4-E, 6-E, 8-E, 6G, 1-J y 10-J. Se tomaron segmentos

apicales de ramilletes de bandólas superiores sintomáticas, se utilizó una tijera podadora de puntas desinfectadas previamente con alcohol al 96% entre cada muestra y se transportaron al laboratorio en bolsas de papel individuales. La figura 4.6 muestra los síntomas principales considerados:



Microsoft Paint 5.1

Figura 4.6. Síntomas considerados para la selección de material vegetal enfermo correspondiente con la “Crespera del Café”. A. Vena secundaria resaltada, espacios intervenales acuchardados y venas más cercanas entre sí. B. Hojas parcial o totalmente deformadas, bordes irregulares y reducidos de manera que se pierde la simetría normal de las hojas jóvenes y maduras. C. Textura más coriácea al tacto con clorosis más acentuada en hojas jóvenes y deformaciones tempranas. Fotos cortesía Ing. Sebastián Fournier, 2008. CICAFAE - ICAFE.

Además se consideraron alteraciones morfológicas y del desarrollo normal de la planta como:

- Presencia de hojas bifurcadas que asemejan dos láminas foliares diferentes.
- Bandólas atrofiadas, formación de un ramillete de hojas deformadas en el ápice de la bandóla y disminución considerable de hojas en las partes proximales de la misma a la planta.
- Disminución de fructificación.

Las muestras se procesaron en el laboratorio de fitopatología del CICAPE donde se seleccionaron tres hojas de los segmentos apicales de los ramilletes colectados por planta y se extrajo el pecíolo de cada una de ellas. Se analizaron tres plantas de café variedad Caturra crecidas en invernadero con dos meses de edad identificadas como I-1, I-2 e I3 de las cuales se tomaron dos hojas por planta. Se mantuvieron en una cámara de crecimiento en el invernadero de investigación del CICAPE a una temperatura promedio de 19.8°C y a una humedad relativa de 63.4% durante 3.5 meses. Se reportó el promedio de incidencia de la bacteria *Xylella fastidiosa* según las muestras tomadas así como las absorbancias promedio generadas y su comparación con los controles de la prueba serológica DAS ELISA (Anexo 7).

4.7.3 Determinación de la presencia de *Xylella fastidiosa* en cicadélidos.

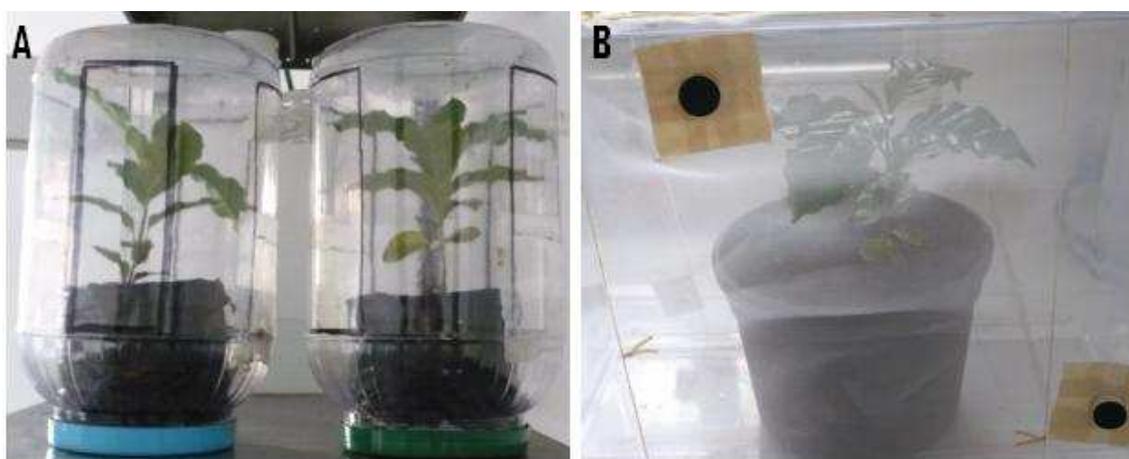
Al igual que el caso de las muestras de material vegetal, las muestras de cicadélidos seleccionadas según abundancia de poblaciones en el sitio de colectas se procesaron de acuerdo al protocolo Reagent Set, Peroxidase Label de Agdia, Inc m 17.3 (Véase documento en Anexo 7) a excepción de la preparación de las muestras la cual correspondió a un ajuste de masas para la relación de gramos de muestra y volumen de amortiguadores de la prueba. Se determinó el porcentaje de incidencia de la bacteria *Xylella fastidiosa* por código de clasificación y se reportó la absorbancia promedio en cada caso como indicador de la concentración variable entre grupos.

4.8 Infección vectorial de plantas de invernadero en trampas con cicadélidos de campo en condiciones de laboratorio.

Se seleccionaron tres plantas de dos meses de edad aclimatadas en invernadero. Se determinó la ausencia de *Xylella fastidiosa* mediante el protocolo Reagent Set, Peroxidase Label de Agdia, Inc m 17.3 (Véase documento en Anexo 7). Se colectaron 30 individuos cicadélidos codificados C7 en igual proporciones machos:hembras en la parcela experimental ubicada en Naranja de Alajuela

utilizando captura manual mediante viales de vidrio. La temperatura registrada durante la captura fue de 23°C y esta se realizó entre las 10:00am hasta las 12:00md.

Se colocaron el mismo días (4-6 horas luego de la captura) en jaulas artesanales de plástico y malla de organza con una planta de café (*Coffea arabica*) por jaula (Figura 4.7). Cada jaula albergó cinco parejas de cicadélidos a una temperatura de 23°C con humedad relativa del 70%.



Microsoft Paint 5.1

Figura 4.7. Jaulas artesanales para el mantenimiento y evaluación de los cicadélidos del ensayo de infección vectorial en plantas de invernadero. A. Jaula Redonda. B. Jaula Rectangular.

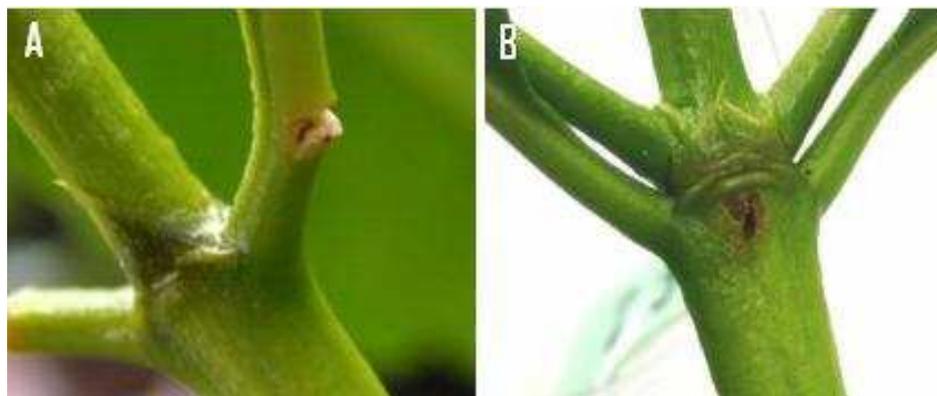
Se realizaron dos observaciones semanales para determinar la sobrevivencia total según el tipo de jaula y la sobrevivencia por sexos al final de 15 días de observación. Se corroboró la incidencia de la bacteria *X. fastidiosa* en los cadáveres y los insectos sobrevivientes recuperados en diferentes momentos de la observación. Se empleó el método detallado anteriormente en la sección “Determinación de la incidencia de *Xylella fastidiosa* en cicadélidos”. Se realizaron observaciones de posibles síntomas asociados a la enfermedad “Crespera en café” durante 1.5 y tres meses de ensayo en las plantas.

Se determinó la infección de las plantas expuestas luego de tres meses de crecimiento en invernadero mediante la prueba serológica DAS-ELISA. Se

muestreó una hoja del tercer y el último par de hojas (6-7 entrenudo) en sentido apical-radical de cada planta ensayada y se procesó según la metodología previamente descrita para el protocolo Reagent Set, Peroxidase Label de Agdia, Inc m 17.3. Se reportaron las absorbancias promedio y la incidencia según la prueba serológica.

4.9 Infección mecánica de *Xylella fastidiosa* en plantas de invernadero.

Se seleccionaron diez plantas aclimatadas en invernadero libres de la incidencia de *Xylella fastidiosa*. Se inocularon mecánicamente mediante dos métodos de inoculación: A: en la parte abaxial de los pecíolos de las hojas del segundo, tercer y cuarto entrenudo desarrollado sentido apical-radical con una incisión por pecíolo y B: en la región posterior del cuarto, quinto y sexto entrenudo desarrollado en sentido apical-radical con dos incisiones por entrenudo (Figura 4.8).



Microsoft Paint 5.1

Figura 4.8. Detalle de las punturas realizadas para la inoculación de la solución bacteriana según los métodos en infección. A. Puntura en pecíolos. B. Puntura en región intermedia del entrenudo.

En ambos métodos se utilizó un volumen de inóculo de 0.5µl a una concentración de 2.0×10^7 UFC/ml de células de *Xylella fastidiosa* en agua estéril obtenida de la mezcla de dos asadas de la colonia del aislamiento *Xf*-CICAFE y homogenizada por conteo en hematocitómetro. Se infectó colocando una microgota en el lugar deseado y se produjo una herida traspasando la gota y luego el tejido vegetal con

una aguja entomológica 00 promoviendo una herida en forma de cuña con abertura superior u opuesta al descenso de la gota y manteniéndose en esta incisión hasta su absorción. La inoculación se realizó a una temperatura aproximada de 30°C y a una alta humedad relativa (superior a 90%). Las plantas inoculadas se rotularon según el método empleado como: A: Xf 1 y B: Xf 2. Se seleccionaron diez plantas aleatorias como control, las cuales no se dañaron mecánicamente. Se mantuvo un promedio de 20.0°C y 73.8% de humedad relativa por tres meses.

Las plantas se mantuvieron en observación durante tres meses esperando observar síntomas de la enfermedad de “Crespera en Café” observado en campo, Al finalizar dicho periodo se obtuvieron muestras de hoja de cada sitio inoculado más una muestra de hoja nueva producida luego de la inoculación. Se evaluó serológicamente mediante el protocolo Reagent Set, Peroxidase Label de Agdia, Inc m 17.3 (Véase documento en Anexo 7) la infección positiva de cada tratamiento y se estimó el porcentaje de éxito para cada protocolo empleado así como la absorbancia promedio luego de dos meses de inoculación en plantas de almácigo de café.

4.10 Infección mecánica de *Geobacillus spp* y *Pseudomonas fluorescens* en plantas de invernadero.

Se tomaron 20 plantas de café (*Coffea arabica*) variedad Caturra previamente analizadas y libres de *Xylella fastidiosa*. Al igual que la inoculación mecánica de plantas con el aislamiento de Xf-CICAFE se aplicaron dos métodos para la inoculación de los aislamientos de *Geobacillus spp* y *Pseudomonas fluorescens* aisladas previamente. Se utilizó un volumen de 0.5µl una solución homogenizada de 2.0X10⁷ UFC/ml de cada bacteria en agua estéril empleado una micropipeta. Se realizaron observaciones semanales de las posibles lesiones y síntomas relacionados por cuatro semanas. Las plantas se rotularon como Geo 1 y Geo 2 en el caso de las inoculadas con la solución de *Geobacillus spp* de forma correspondiente al protocolo de infección mencionado anteriormente.

La nomenclatura de la inoculación con *Pseudomonas fluorescens* siguió el mismo esquema Pf 1 y Pf 2. Se utilizaron tres testigos los cuales consistieron en plantas libres de *Xylella fastidiosa* agrupadas en grupos de tres para un total de nueve plantas. Un testigo se inoculó con agua estéril para la formulación de las soluciones bacterianas según el protocolo 1 (C1), otro según el protocolo 2 (C2) y el tercer trío de plantas no fue inoculado. Las plantas se inocularon a una temperatura aproximada de 30°C y se mantuvieron a una temperatura de crecimiento promedio de 20.0°C y 73.8% de humedad relativa por un mes e tiempo. El riego se aplicó por aspersión dos veces al día durante 30 minutos cada intervención.

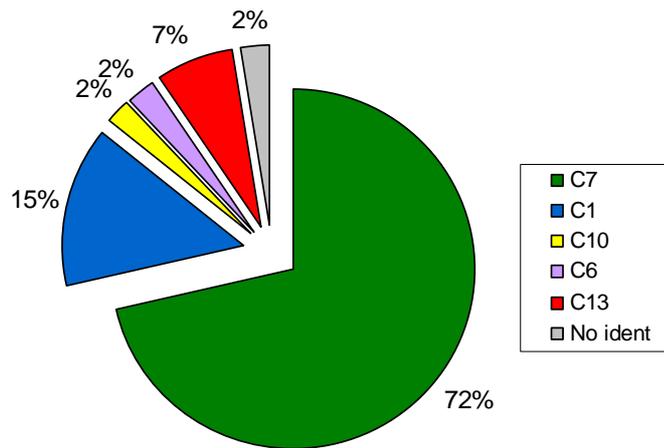
CAPÍTULO 5

RESULTADOS

IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS ASOCIADOS A CRESPERA DEL CAFÉ.

5.1 Muestreo de cicadélidos en campo.

A partir de las capturas en campo se obtuvieron seis grupos de individuos cicadélidos, cinco de ellos se codificaron según la guía de observación del CICAPE como C7, C1, C13, C6 y C10, los individuos fuera de la base de información de este Centro se agruparon como “No identificados”. La figura 5.1 presenta los porcentajes poblacionales que presentó cada agrupación.



Microft Office Excell 2003

Figura 5.1. Porcentajes poblacionales de cada grupo de cicadélidos colectados en campo.

5.2 Obtención de microorganismos endófitos a partir del material vegetal colectado y de endógenos a partir de cicadélidos.

5.2.1 Protocolo A (Experimental): Desinfección del material de campo con NaClO₄ al 10, 15 y 20%.

La tabla 5.1 muestra el número de colonias bacterianas y fúngicas presentes en cada tipo de tejido analizado según cada tratamiento, así como los porcentajes de oxidación obtenida en los explantes luego de cuatro semanas de incubación de las placas inoculadas bajo el protocolo A.

Tabla 5.1. Porcentaje de oxidación, crecimiento bacteriano y fúngico presente en los explantes de café durante cuatro semanas de observación para los tratamientos ensayados según el Protocolo A (Experimental).^{iv}

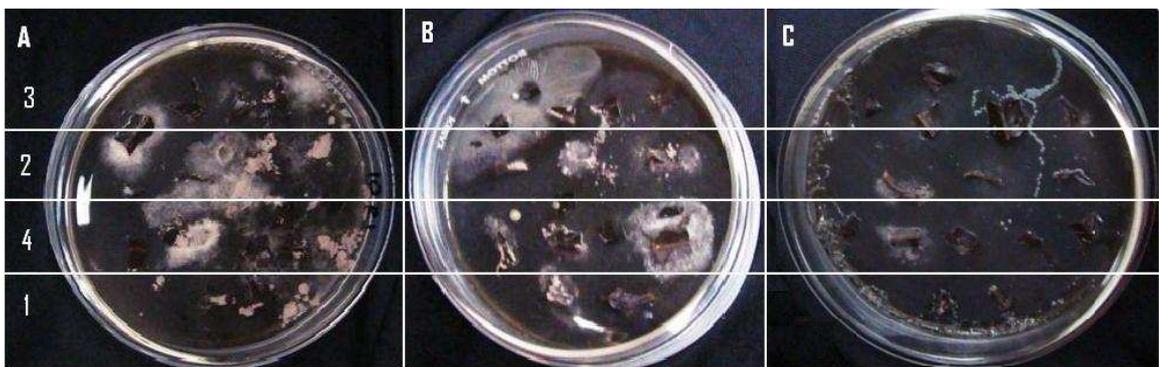
^{iv} Interpretése la condición "Inc: Incontable" según las determinaciones en los hongos como el recubrimiento del 100% de la placa por una o varias colonias fúngicas, situación que para efectos de la determinación de la posibilidad de aislar de forma pura las bacterias de lento crecimiento asociadas al hábito de sistemas vasculares en la planta como *Xylella fastidiosa* imposibilita dicho evento, al igual que el crecimiento de bacterias en el 100% de la placa de forma temprana.

Tratamiento	Variable	Semana			
		1	2	3	4
T1 (NaClO ₄ 10%)	CB/explante	Inc	Inc	Inc	Inc
	CF/explante	7	14	Inc	Inc
	% O/explante	100	100	100	100
T2 (NaClO ₄ 15%)	CB/explante	Inc	Inc	Inc	Inc
	CF/explante	2	3	Inc	Inc
	% O/explante	100	100	100	100
T3 (NaClO ₄ 20%)	CB/explante	Inc	Inc	Inc	Inc
	CF/explante	1	3	3	3
	% O/explante	100	100	100	100
Control (H ₂ Ode)	CB	0	0	0	3
	CF	2	2	2	2

CB: Colonias Bacterinas; CF: Colonias Fúngicas; %O: % Oxidación; Inc: Incontables

Microsoft Office Excell 2003

La figura 5.2 muestra la evidencia física de contaminación determinada a la tercera semana de observación considerando una colonización incontable para el aislamiento de bacterias de lento crecimiento asociadas al hábito de *Xylella fastidiosa*.



Microsoft Paint 5.1

Figura 5.2. Crecimiento microbiano a la tercera semana de observación según el protocolo de aislamiento A (Experimental). A. Tratamiento 1 (10% NaClO₄ i.a 3.5%). B. Tratamiento 2 (15% NaClO₄ i.a 3.5%). C. Tratamiento 3 (20% NaClO₄ i.a 3.5%).

5.2.2 Protocolo B (Variación CICAPE): Desinfección de material NaClO₄ 1% 3,5% i.a y NaClO₄ 100% 1,0% i.a

La tabla 5.2 muestra el número de colonias bacterianas y fúngicas presentes en cada tratamiento analizado luego de cuatro semanas de incubación de las placas inoculadas bajo el protocolo B.

Tabla 5.2. Colonias bacterianas y fúngicas presente en el exudado obtenido de los puntos aleatorios de contacto durante cuatro semanas de observación para los tratamientos ensayados según el Protocolo B (Variación CICAPE).

Tratamiento	Variable	Semana			
		1	2	3	4
T1 (NaClO ₄ 1% i.a 3,5%)	CB/punto	6	6	Inc	Inc
	CF/punto	2	2	2	Inc
T2 (NaClO ₄ 100% i.a 1%)	CB/punto	Inc	Inc	Inc	Inc
	CF/punto	0	0	0	0
Control (H ₂ Ode)	CB/punto	0	0	0	0
	CF/punto	0	0	0	0

CB: Colonias Bacterinas; CF: Colonias Fúngicas; Inc: Incontables

Microsoft Office Excell 2003

La figura 5.3 muestra la evidencia física de contaminación determinada a la tercera semana de observación considerando una colonización bacteriana incontable para el para el aislamiento de bacterias de lento crecimiento asociadas al hábito de *Xylella fastidiosa*. Se observó poco crecimiento fúngico.

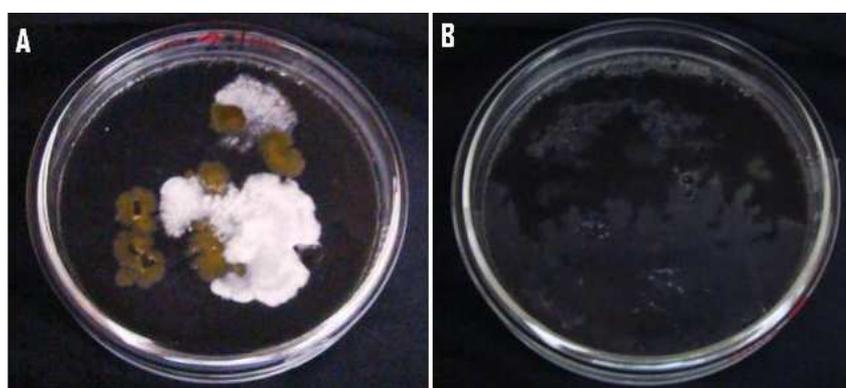


Figura 5.3. Crecimiento microbiano a la tercera semana de observación según el protocolo de aislamiento B (Variación CICAPE). A. Tratamiento 1 (1% NaClO₄ i.a 3.5%). B. Tratamiento 2 (100% NaClO₄ i.a 1.0%).

5.2.3 Protocolo C (CIBCM-UCR): Variación del protocolo del CICAPE por CIBCM.

La tabla 5.3 muestra el número de colonias bacterianas y fúngicas presentes en cada tratamiento analizado luego de cuatro semanas de incubación de las placas inoculadas bajo el protocolo C.

Tabla 5.3. Colonias bacterianas y fúngicas presente en las áreas de desplazamiento (rastros) de las diluciones microbiológicas empleadas según los tratamientos ensayados para el Protocolo C con el material vegetal de campo (CIBCM-UCR) durante cuatro semanas de observación.

Tratamiento	Variable	Semana			
		1	2	3	4
T1 (Dilución concentrada)	CB/rastro	43	Inc	Inc	Inc
	CF/rastro	3	3	3	3
T2 (Dilución 10-1)	CB/rastro	17	Inc	Inc	Inc
	CF/rastro	2	2	2	2
T3 (Dilución 10-2)	CB/rastro	3	70	Inc	Inc
	CF/rastro	0	0	0	0
Control (H ₂ Ode)	CB/rastro	0	0	0	0
	CF/rastro	0	0	0	0

CB: Colonias Bacterinas; CF: Colonias Fúngicas; Inc: Incontables

Microsoft Office Excell 2003

La figura 5.4 muestra la evidencia física de crecimiento microbiano determinado a la tercera semana de observación, sin embargo mediante este protocolo se obtuvieron colonias bacterianas que crecieron a un periodo de tiempo cercano a 22 días y presentaron similitudes morfológicas y de crecimiento en medio artificial reportadas para bacterias de lento crecimiento asociadas al hábito de *Xylella fastidiosa*.



Microsoft Paint 5.1

Figura 5.4. Crecimiento microbiano a la tercera semana de observación según el protocolo de aislamiento C (CIBCM-UCR). A. Placa inoculada según T1 (Dilución Concentrada), T2 (10^{-1}) y T3 (10^{-2}). B. Colonias aisladas de aparente morfología y crecimiento correspondiente a *Xylella fastidiosa* o bacteria asociada a su hábito.

Respecto a los resultados obtenidos de la extracción de microorganismos a partir de tejido de vitroplantas de café, se reportó a la primera semana de observación colonias incontables bacterianas de las cuales se diferenciaron posteriormente en identificación morfológica y bioquímica para su identificación. No se reportaron crecimientos fúngicos en las placas ensayadas.

5.2.4 Protocolo D (Insectos CICAFFE): Cloruro de Benzalconio al 2% i.a al 50%

La tabla 5.4 muestra el número de colonias bacterianas y fúngicas presentes en cada tratamiento analizado luego de cuatro semanas de incubación de las placas inoculadas bajo el protocolo D.

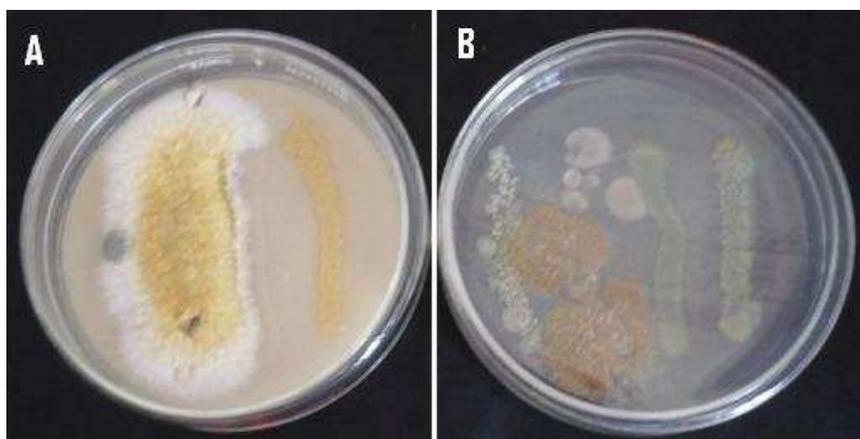
Tabla 5.4. Colonias bacterianas y fúngicas presente en las áreas de desplazamiento (rastros) de las diluciones microbiológicas empleadas según los tratamientos ensayados para el Protocolo D (Insectos CICAFFE) durante cuatro semanas de observación.

Tratamiento	Variable	Semana			
		1	2	3	4
T1 (Macerado Cabezas)	CB/rastro	18	42	Inc	Inc
	CF/rastro	3	3	3	3
T2 (Macerado de Cuerpo)	CB/rastro	98	Inc	Inc	Inc
	CF/rastro	4	14	14	Inc
Control (H ₂ Ode)	CB/rastro	0	0	0	0
	CF/rastro	0	0	0	0

CB: Colonias Bacterinas; CF: Colonias Fúngicas; Inc: Incontables

Microsoft Office Excell 2003

La figura 5.5 muestra la evidencia física de contaminación determinada a la tercera semana de observación, se evidencia el crecimiento fúngico considerable en las placas del tratamiento 1 evitando evaluar la totalidad de los rastros inoculados. Por su parte las placas del tratamiento 2 presentan un crecimiento bacteriano considerable y denso así como levaduras que tapizan la superficie de análisis dificultando la obtención de microorganismos de lento crecimiento.



Microsoft Paint 5.1

Figura 5.5. Crecimiento microbiano a la tercera semana de observación según el protocolo de aislamiento D (Insectos CICAPE). A. Placa inoculada según T1 (Dilución concentrada del macerado de cabezas de cicadélidos). B. Placa inoculada según T2 (Dilución concentrada del macerado de cuerpos de cicadélidos).

5.3 Clasificación preliminar e identificación de microorganismos obtenidos

5.3.1 Aislamientos bacterianos

La caracterización morfológica de las colonias bacterianas y la aplicación de las pruebas bioquímicas de Catalasa, KOH, Reacción de Gram y metabolismo de azúcares en TSI permitieron clasificar a partir de los crecimientos de la extracción, a los grupos de microorganismos según nomenclatura ID dentro de una clasificación preliminar de las bacterias obtenidas. A continuación la tabla 5.5 muestra la clasificación preliminar de grupos de aislamientos según ID para bacterias obtenidas.

Tabla 5.5. Resumen de la clasificación preliminar bacteriana según criterios morfológicos y algunas pruebas bioquímicas de diferenciación rápida para cada ID agrupado.

ID	Forma Colonial	Superficie	Elevación	Borde	Estructura Interna	Cantidad a 3 días (22-24°C)	Consistencia	Cromogénesis	Catalasa	Gram/KOH	Forma celular	TSI
1	Ameboidal	Lisa	Levantada levemente convexa	Lobulado	Transparente	Abundante	Viscosa	No, Blanca-amarilla en YDC, Blanco transparente en BCYE y PDA	+	-/+	Bacilo	A/A
2	Circular	Lisa	Levantada levemente convexa	Entero	Transparente	Escaso	Mantecosa	Rojo intenso brillante en PDA y BCYE	+	+/-	Bacilo esporulado	----
3	Circular	Lisa	Convexa	Erosionado	Transparente	Escasa	Mantecosa	Amarillo-Naranja tenue en BCYE	+	-/+	Bacilo	A/A
4	Circular	Lisa	Pulvinada	Entero	Opaca	Moderada	Mantecosa	Amarillo opaco en YDC	+	-/+	Bacilo	K/K
5	Circular	Lisa	Convexa	Entero	Opaca	Moderada	Mantecosa	Naranja tenue en YDC	+	-/+	Bacilo	A/A
6*	Circular	Lisa	Levantada levemente convexa	Entero	Opaca	Escasa	Mantecosa	Amarilla opaca en BCYE	+	-/+	Bacilo	A/A
7	Circular	Lisa	Levantada levemente convexa	Entero	Transparente	Escasa	Mantecosa	No, Blanca en BCYE	+	+/-	Cocos	----
8	Circular	Lisa	Convexa	Erosionado	Transparente	Escasa	Mantecosa	Amarilla tenue de borde transparente en BCYE	+	-/+	Bacilo	A/A
9	Irregular	Lisa	Levantada levemente convexa	Ondulado	Transparente	Moderada	Mantecosa	No, Blanca semi transparente en BCYE	+	-/+	Bacilo	A/A
10	Circular	Lisa	Convexa	Erosionado	Transparente	Moderada	Mantecosa	Amarilla opaca en BCYE	+	-/+	Bacilo	A/A
11	Festonada	Rugosa	Pulvinada	Ondulado	Toscamente granulada	Escasa	Mantecosa	Crema en tonalidades creciente concéntrica en BCYE	+	+/-	Bacilo esporulado	----
12	Circular	Lisa	Convexa	Entero	Opaca	Moderada	Mantecosa	Amarill-crema opaca en BCYE y YDC	+	-/+	Bacilo/oxidasa+	K/K
13	Circular	Lisa	Convexa	Erosionado	Transparente	Abundante	Mantecosa	Amarilla opaca semi-transparente	+	-/+	Bacilo	A/A
14	Irregular	Rugosa	Difusa o plana	Entero	Filamentosa granulada	Abundante	Membranosa	No, blanca en BCYE	+	+/-	Bacilo esporulado	----
15	Irregular	Lisa	Levantada levemente convexa	Entero	Opaca	Moderado	Mantecosa	Café claro en BCYE	-	+/-	Bacilo	----
16	Circular	Lisa	Levantada levemente convexa	Erosionado	Transparente	Moderada	Mantecosa	Amarillo-naranja intenso en PDA	+	-/+	Bacilo	A/A
17*	Circular	Lisa	Convexa	Entero	Opaca	Moderada	Mantecosa	Naranja tenue en YDC	+	-/+	Bacilo	A/A
18	Circular	Lisa	Levantada levemente convexa	Entero	Opaca	Moderada	Mantecosa	Naranja intenso en YDC	-	+/-	Cocos	----
19	Irregular	Rugosa	Pulvinada	Erulado	Opaca	Moderada	Quebradizo	Naranja intenso en YDC	+	+/-	Bacilo esporulado	----
20	Rizoide	Lisa	Plana	Lobulado	Opaca	Escasa	Mantecosa	Blanco cremoso en BCYE	+	+/-	Cocos	----
21	Circular	Lisa	Levantada levemente convexa	Entero	Transparente	Escaso	Mantecosa	No, transparente en BCYE	-	-/+	Bacilo aparente movilidad	No ensayado
22 (Cont)	Circular	Lisa	Levantada levemente convexa	Entero	Opaca	Abundante	Mantecosa	No, blanca en PDA y BCYE	-	+/-	Bacilo	No ensayado

A/A: Fermentación de Sucrosa/lactosa y Glucosa; K/K: No fermentación de carbohidratos utilización de peptona; (Cont): Contaminación; * Aislamiento de vitroplanta

El registro fotográfico de la colección bacteriana obtenida se presenta en el apéndice 4 donde se indicó el microorganismo y su objetivo de observación.

5.3.1.1 Identificación Bioquímica mediante el sistema BIOLOG

En la tabla 5.6 se presenta la identificación de los aislamientos bacterianos agrupados preliminarmente según los criterios morfológicos y bioquímicos ID 1-21 e identificados mediante el sistema BIOLOG (ID 1-20) y la prueba serológica ELISA (ID-21). Se muestra además el tratamiento y protocolo específico que permitió la obtención de cada bacteria aislada.

Tabla 5.6. Identificación de los grupos ID bacterianos obtenidos según protocolos y tratamientos específicos durante los ensayos de aislamiento.

ID	Identificación	Protocolo A			Protocolo B		Protocolo C			Protocolo D	
		T1	T2	T3	T1	T2	T1	T2	T3	T1	T2
1	<i>Serratia marcescens</i>	x	x	x			x	x	x	x	
2	<i>Geobacillus spp</i>				x				x		
3	<i>Enterobacter spp</i>					x					
4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>									x	x
5	<i>Raoultella terrigena</i>										x
6	<i>Raoultella planticola</i>							x			
7	<i>Staphylococcus sciuri</i>									x	x
8	<i>Enterobacter spp</i>					x	x				
9	<i>Serratia marcescens</i>	x									
10	<i>Enterobacter aerogenes</i>					x					
11	<i>Bacillus spp</i>	x									
12	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>										x
13	<i>Klebsiella spp</i>									x	x
14	<i>Bacillus amyloquefaciens</i>				x	x					
15	<i>Camobacterium mobilis</i>										x
16	<i>Phantoea spp</i>		x								
17	<i>Raoultella terrigena</i>						x	x	x		
18	<i>Streptococcus sobrinus</i>		x								
19	<i>Bacillus spp</i>										x
20	<i>Staphylococcus cohnii</i>					x					
21	<i>Xylella fastidiosa</i>						x	x	x		

Microsoft Office Excell 2003

5.3.1.2 Detección e identificación serológica mediante DAS-ELISA.

Las placas de los aislamientos determinados para la prueba de sensibilidad del protocolo para la prueba DAS-ELISA se agruparon según las absorbancias registradas y la condición resultante positiva (+) o negativa (-) según los

estadísticos de discriminación para la prueba. La tabla 5.7 resume los valores empleados como criterios de discriminación para cada prueba según el tiempo de determinación de 7 y 22 días de crecimiento bacteriano en placa.

Tabla 5.7. Valores obtenidos según los evaluadores estadístico para la discriminación de la incidencia de *Xylella fastidiosa* en crecimientos bacterianos conocidos a los 7 y 22 días de incubación.

Evaluador	Absorbancia evaluador (nm)	
	7 días	22 días
1S	0,164	0,120
2S	0,179	0,139
3S	0,202	0,158

Microsoft Office Excell 2003

Los valores de los controles negativos para la prueba serológica a los 7 días de incubación fue de 0.157nm con una desviación estándar de 0.008 unidades, mientras que para la determinación a los 22 días dichos valores fueron 0.101nm y 0.019 unidades respectivamente. Las tablas 5.8 y 5.9 resumen la absorbancia promedio según microorganismo y la condición de incidencia según cada prueba.

Tabla 5.8. Resumen de la prueba serológica DAS-ELISA aplicada a crecimientos bacterianos conocidos según evaluadores estadísticos y la absorbancia obtenida a 7 días de crecimiento.

ID	Microorganismo	Abs promedio (nm)	Condición según evaluador		
			1S	2S	3S
1	<i>Serratia marcescens</i>	0,180	+	+	-
2	<i>Geobacillus spp</i>	0,071	-	-	-
3	<i>Enterobacter spp</i>	0,071	-	-	-
4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,082	-	-	-
5	<i>Raoultella terrigena</i>	0,206	+	+	+
7	<i>Staphylococcus sciuri</i>	0,108	-	-	-
8	<i>Enterobacter spp</i>	0,071	-	-	-

9	<i>Serratia marcenses</i>	0,180	-	-	-
10	<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,160	-	-	-
11	<i>Bacillus spp</i>	0,116	-	-	-
	<i>Sphingomonas</i>				
12	<i>paucimobilis</i>	0,049	-	-	-
13	<i>klebsiella spp</i>	0,178	+	-	-
14	<i>Bacillus amyloquefaciens</i>	0,094	-	-	-
15	<i>Carnobacterium mobili</i>	0,077	-	-	-
16	<i>Phantoea spp</i>	0,132	-	-	-
18	<i>Streptococcus sobrinus</i>	0,035	-	-	-
19	<i>Bacillus spp</i>	0,036	-	-	-
20	<i>Staphylococcus cohnii</i>	0,033	-	-	-

Microsoft Office Excell 2003

Tabla 5.9. Resumen de la prueba serológica DAS-ELISA aplicada a crecimientos bacterianos conocidos según evaluadores estadísticos y la absorbancia obtenida a 22 días de crecimiento.

ID	Microorganismo	Abs promedio (nm)	Condición según evaluador		
			1S	2S	3S
1	<i>Serratia marcenses</i>	0,206	+	+	+
2	<i>Geobacillus spp</i>	0,068	-	-	-
3	<i>Enterobacter spp</i>	0,212	+	+	+
	<i>Pseudomonas</i>				
4	<i>fluorescens</i>	0,084	-	-	-
5	<i>Raoultella terrigena</i>	0,195	+	+	+
7	<i>Staphylococcus sciuri</i>	0,072	-	-	-
8	<i>Enterobacter spp</i>	0,264	+	+	+
9	<i>Serratia marcenses</i>	0,200	+	+	+
10	<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,180	+	+	+
11	<i>Bacillus spp</i>	0,059	-	-	-
	<i>Sphingomonas</i>				
12	<i>paucimobilis</i>	0,074	-	-	-
13	<i>klebsiella spp</i>	0,229	+	+	+
14	<i>Bacillus amyloquefaciens</i>	0,087	-	-	-

15	<i>Carnobacterium mobili</i>	0,076	-	-	-
16	<i>Phantoea spp</i>	0,201	+	+	+
18	<i>Streptococcus sobrinus</i>	0,068	-	-	-
19	<i>Bacillus spp</i>	0,086	-	-	-
20	<i>Staphylococcus cohnii</i>	0,065	-	-	-

Microsoft Office Excell 2003

5.3.1.3 Selección de colonias de *Xylella fastidiosa* a partir de crecimiento en placa y el método serológico DAS-ELISA.

Las posibles colonias amarillo blancuzcas seleccionadas de las placas con crecimiento cercano a los 22 días después de la incubación en medio BCYE a 28°C que fueron obtenidas mediante el protocolo de obtención C se subcultivaron en medio BCYE y se identificaron como ID-21 (Xf-CICAFE 21-1; 21-2; 21-3 y 21-4) luego de 22 días de incubación y se ensayaron para la prueba serológica DAS-ELISA mostrando una correspondencia con el patógeno *Xylella fastidiosa* en un 100% según los discriminativos estadísticos del ensayo cuyos valores fueron de 0.120, 0.139 y 0.158 nm de forma correspondiente para 1, 2 y 3S. El valor para el control negativo fue de 0.101nm con una desviación estándar de 0.019 unidades. La tabla 5.10 muestra las absorbancias promedio para cada aislamiento y la incidencia positiva según el discriminador estadístico.

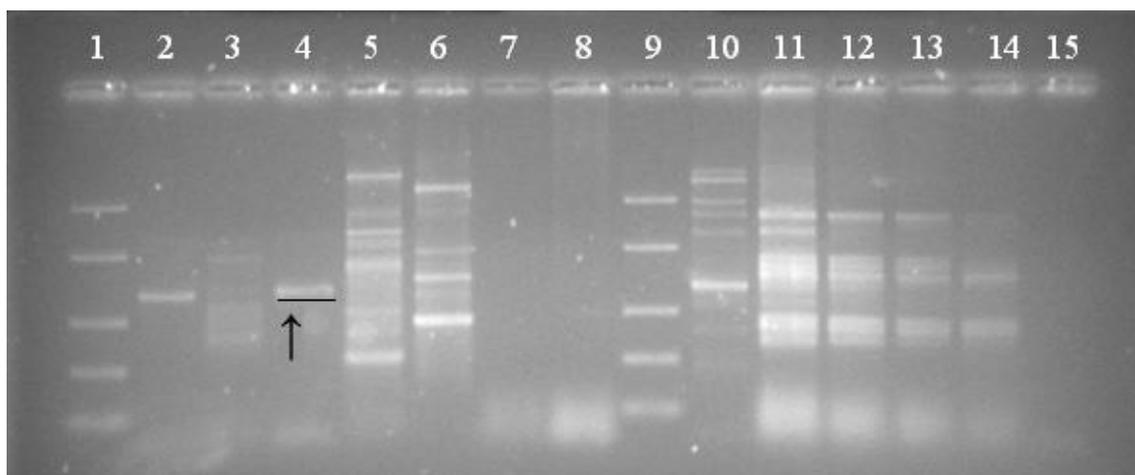
Tabla 5.10. Absorbancia promedio y condición de incidencia para los aislamientos del posible patógeno *Xylella fastidiosa* según la prueba DAS-ELISA en placas de 22 días de incubación.

ID	Abs promedio (nm)	Condición según evaluador		
		1S	2S	3S
Xf-CICAFE 21-1	2,531	+	+	+
Xf-CICAFE 21-2	2,263	+	+	+
Xf-CICAFE 21-3	2,081	+	+	+
Xf-CICAFE 21-4	0,681	+	+	+

Microsoft Office Excell 2003

5.3.1.4 Identificación Molecular del aislamiento de *Xylella fastidiosa* y otras bacterias endófitas en café.

A partir de la migración del ADN de las muestras ensayadas se obtuvieron diferentes patrones de bandas los cuales se presentan a continuación en la Figura 5.6.



Microsoft Paint 5.1

Figura 5.6. Patrones de bandas obtenidos mediante la migración del ADN de las muestras procesadas en un gel de agarosa al 2%. La flecha indica la muestra correspondiente al aislamiento de *Xylella fastidiosa* de café (0.5kpb aprox) (Xf-CICAFE).

5.3.2 Aislamientos fúngicos

A partir de las observaciones macro y microscópicas se determinó la agrupación de los aislamiento fúngicos en códigos (Tabla 5.11).

Tabla 5.11. Resumen de la clasificación preliminar fúngica según criterios morfológicos de diferenciación rápida para cada ID agrupado.

ID	Forma colonial	Cantidad a 3 días	Color	Tipo micelio	Sistema de Hifas	Tipo de hifas Generativas	Unidades de reproducción	Observaciones
1	Micelial	Moderado	Grisáceo	Vegetativo, Aéreo y Reproductor	Trimítico	Septadas	Zoosporas	Posibles esporangios intercalarios y citogenes.
2	Filamentosa	Moderado	Blanco cremoso de estrías grises	Vegetativo y Aéreo	Dimítico de hifas esqueléticas	Septadas	No encontradas	Ramificaciones primarias de hifas generativas levemente curvas en su origen.
3	Filamentosa	Moderado	Grisáceo-negro concéntrico	Vegetativo y Aéreo	Monomítico	Septadas	No encontradas	Ramificaciones primarias de hifas generativas levemente curvas en su origen y doble ramificación ocasional.
4	Micelial	Moderado	Verde oscuro	Vegetativo, Aéreo y Reproductor	Monomítico	Septadas	Conidias	No observaciones adicionales
5	Micelial	Escaso	Gris uniforme	Vegetativo, Aéreo y Reproductor	Monomítico	Septadas	Conidias	Crecimiento centrípeto como en ciclos.
6	Micelial	Escaso	Rosado intenso	Vegetativo, Aéreo y Reproductor	Monolítico	Septadas	Conidias	No observaciones adicionales
7	Micelial	Escaso	Gris uniforme	Vegetativo, Aéreo y Reproductor	Monomítico	Septadas	Conidias	No observaciones adicionales
8	Micelial	Moderado	Blanco uniforme	Vegetativo, Aéreo y Reproductor	Trimítico	Septadas	Conidias	Las colonias pigmentan el medio de color amarillo tenue en su área correspondiente.
9	Filamentoso	Abundante	Marrón Tenue	Vegetativo, Aéreo y Reproductor	Trimítico	Septadas	Zoosporas	Posibles esporangios intercalarios y citogenes.
11	Filamentoso	Moderado	Blanco uniforme	Vegetativo y Aéreo	Monomítico	Septadas	No encontradas	No observaciones adicionales
12	Micelial	Moderado	Amarillo Tenue	Vegetativo, Aéreo y Reproductor	Monomítico	Septadas	Conidias	No observaciones adicionales

Microsoft Office Excell 2003

Nota: Considérese la condición de crecimiento adjetiva escasa, moderada y abundante según el crecimiento alcance menos del 50% de la placa, más del 50 y menos del 100% para el segundo caso y la totalidad del área de la placa para la tercera condición.

La tabla 5.12 muestra la descripción morfológica de las colonias de las levaduras aisladas correspondientes a los aislamientos fúngicos ID 10 e ID 13.

Tabla 5.12. Descripción morfológica de las levaduras aisladas ID 10 y 13.

ID	Forma Colonial	Superficie	Elevación	Borde	Estructura Interna	Cantidad a 3 días (22-24°C)	Consistencia	Cromogénesis
10	Circular	Lisa	Convexa	Entero	Opaca	Abundante	Mantecosa	Rosada en YDC
13	Circular	Lisa	Convexa	Entero	Opaca	Moderada	Mantecosa	Amarilla intenso en BCYE

Microsoft Office Excell 2003

En la tabla 5.13 se presenta la identificación de algunos aislamientos fúngicos agrupados preliminarmente según los criterios morfológicos anteriores presentados en las tablas 5.11 y 5.12. Se muestra además el tratamiento y protocolo específico que permitió la obtención de cada hongo y levadura aislada.

Tabla 5.13. Identificación de algunos grupos ID fúngicos mediante observación de estructuras reproductivas obtenidos según protocolos y tratamientos específicos durante los ensayos de aislamiento.

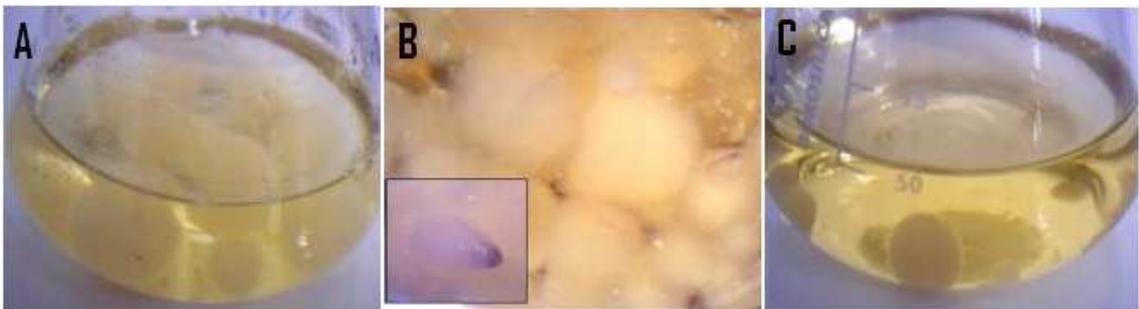
ID	Identificación	Protocolo A			Protocolo B		Protocolo C			Protocolo D	
		T1	T2	T3	T1	T2	T1	T2	T3	T1	T2
1	<i>Pythium spp</i>		x								
2	No identificado						x				
3	No identificado						x				
4	<i>Aspergillus spp</i>										x
5	<i>Cladosporium spp</i>										x
6	<i>Paecilomyces spp</i>										x
7	<i>Cladosporium spp</i>									x	
8	<i>Beauveria spp</i>							x			
9	<i>Pythium spp</i>						x				
10	Levadura No identificada										x
11	No identificado				x						
12	<i>Aspergillus spp</i>							x			
13	Levadura No identificada						x				

Microsoft Office Excell 2003

En el apéndice 5 se presenta el registro fotográfico del crecimiento macroscópico en placa, la forma colonial y tipo del micelio y las estructuras de reproducción encontradas para cada aislamiento fúngico reportado anteriormente. Las levaduras se registraron en el apéndice 6 donde se muestra su morfología colonial.

Dentro de las contaminaciones reportadas según los protocolos de aislamiento se encontró la incidencia del hongo *Penicillium spp*, *Beauveria bassiana*, *Verticillium spp* y aparentemente *Scopulariopsis spp*.

Los aislamientos ID 2, 3 y 11 que no presentaron estructuras de reproducción sexuales o asexuales generaron crecimientos ordenados de micelio en el medio líquido tipo *pellets*. Para ID 2 y 3 se obtuvo producción abundante de este tipo de estructuras las cuales se observaron bastante ramificadas luego de una acumulación central de micelio ligeramente denso. Particularmente para ID 3 se observaron ocasionalmente pellets alargados con pigmentación negra en su ápice (Figura 5.7 B); sin embargo, no se pudo determinar su identidad según las observaciones microscópicas realizadas. En el caso de ID 11 el *pellet* generado fue en menor cantidad que los anteriores cultivos presentando además una morfología más compacta y densa, así como mayormente *pellets* pequeños. La figura 5.7 muestra el registro fotográfico de las observaciones.



Microsoft Paint 5.1

Figura 5.7. Crecimiento de pellets a partir de cultivos líquidos de los aislamientos que no presentaron estructuras de reproducción en medio semisólido. A. Aislamiento ID 2. B. Aislamiento ID 3 (recuadro muestra estructura alargado particular de micelio). C. Aislamiento ID 11.

EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE LOS AISLAMIENTOS.

5.4 Bioensayos de patogenicidad de microorganismos aislados en laboratorio.

5.4.1 Bioensayos en troncos y discos de hoja de los hongos y las bacterias aisladas.

En los tejidos ensayados con las diluciones de los aislamientos bacterianos ID 1, 6, 9, 17 y 19 no se observaron lesiones centrales aparentes en ningún caso, solo en la periferia de los discos producto del corte. En los aislamientos restantes se presentaron reacciones hipersensibles a nivel superficial las cuales se consideraron producto de la degradación normal del tejido ensayado (Figura 5.8 A) al encontrarse dichos rasgos en los controles ensayados y que las lesiones se fusionaban a la periferia oxidada y necrosada por la herida del molde en los discos de hojas (Figura 5.8 B), mientras que ningún aislamiento provocó heridas o proliferación sobre el tejido de tronco (-) (Tabla 5.14).

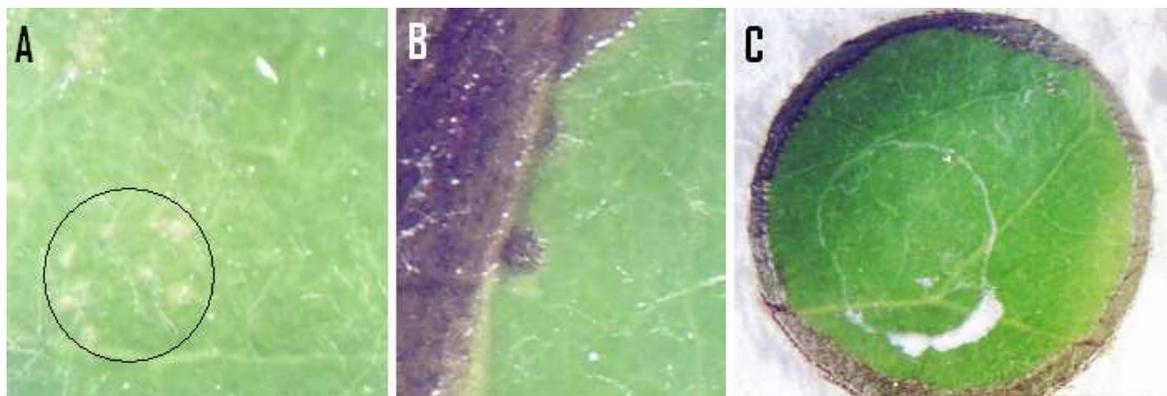
Tabla 5.14. Resumen de los porcentajes de aparición de lesiones superficiales en los discos de hojas y tejido de tronco, producto de la inoculación de soluciones de los aislamientos bacterianos.

ID	Microorganismo	Tejido 1er par de hojas		Tejido 3er par de hojas		Prueba en tronco(+/-)
		Adaxial	Abaxial	Adaxial	Abaxial	
1	<i>Serratia marcescens</i>	0%	0%	0%	0%	-
2	<i>Geobacillus spp</i>	20%	0%	0%	0%	-
3	<i>Enterobacter spp</i>	10%	0%	0%	40%	-
	<i>Pseudomonas</i>					
4	<i>fluorescens</i>	0%	0%	0%	40%	-
5	<i>Raoultella terrigena</i>	0%	0%	0%	10%	-
6	<i>Raoultella planticola</i>	0%	0%	0%	0%	-
7	<i>Staphylococcus sciuri</i>	0%	0%	10%	0%	-
8	<i>Enterobacter spp</i>	0%	10%	20%	10%	-
9	<i>Serratia marcescens</i>	0%	0%	0%	0%	-

10	<i>Enterobacter aerogenes</i>	0%	30%	10%	10%	-
11	<i>Bacillus spp</i>	20%	0%	0%	0%	-
	<i>Sphingomonas</i>					
12	<i>paucimobilis</i>	0%	20%	0%	0%	-
13	<i>klebsiella spp</i>	20%	90%	10%	20%	-
14	<i>Bacillus amyloquefaciens</i>	50%	30%	20%	0%	-
15	<i>Carnobacterium mobili</i>	20%	30%	0%	0%	-
16	<i>Phantoea spp</i>	10%	0%	10%	0%	-
17	<i>Raoultella terrigena</i>	0%	0%	0%	0%	-
18	<i>Streptococcus sobrinus</i>	20%	10%	0%	0%	-
19	<i>Bacillus spp</i>	0%	0%	0%	0%	-
20	<i>Staphylococcus cohnii</i>	0%	10%	70%	100%	-
	Control	30%	20%	10%	20%	-

Microsoft Office Excell 2003

Sin embargo, en los aislamientos ID 2 y 20 se presentaron acumulaciones de un material cristalino correspondiente al lugar de inoculación con la solución bacterina (Figura 5.8, C).

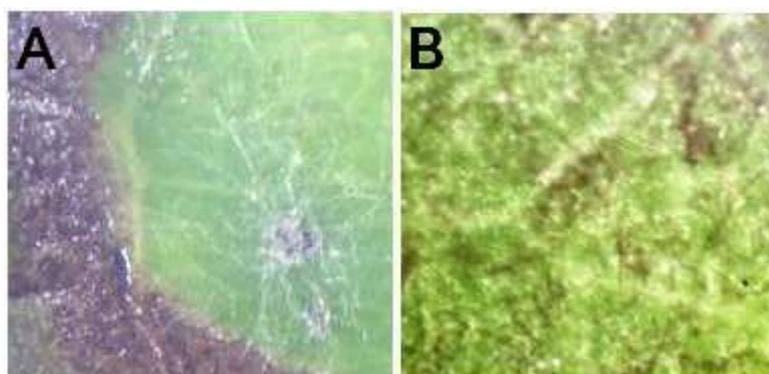


Microsoft Paint 5.1

Figura 5.8. Observaciones en discos de hojas para los ensayos de inoculación bacteriana en discos de hojas. A. Signos de reacción hipersensible en el área de los discos inoculados (denotación de clorosis puntual). B. Lesiones superficiales en el área inoculada que se fusionaron a la periferia necrosada presentes en la mayoría de los ensayos. C. Acumulación de material cristalino en la inoculación de los aislamientos bacterianos ID 2 y 20.

Referente al ensayo de patogenicidad en hongos filamentosos y levaduras aisladas no se presentó lesión en ningún caso para los tejidos de tronco. En los

ensayos en discos de hojas solo el aislamiento ID 9 presentó un crecimiento de micelio en la superficie inoculada (Figura 5.9, B) los demás aislamientos presentaron colonización por contaminación del ensayo sobre la gota inoculada (Figura 5.9, A), donde se observó micelio extendiéndose desde la periferia hasta la gota o bien no se presentó ningún signo, dicho crecimiento también se presentó en el tratamiento control. La contaminación resultante del ensayo fue *Furasium spp* y *Cercospora spp*.



Microsoft Paint 5.1

Figura 5.9. Observaciones en discos de hojas para los ensayos de inoculación fúngica en discos de hojas. A. Colonización de hongo contaminante en los ensayos de discos de hoja sobre heridas mecánicas. B. Crecimiento micelial en discos de hojas del aislamiento de *Phytium spp* (ID 9).

En el caso de las levaduras ID 10y 13 al igual que en las pruebas de discos de hojas de las bacterias se observaron lesiones centrales que se fusionaron con la periferia necrosada del tejido correspondientes a las lesiones encontradas en el control. Los tejidos de tronco no presentaron colonización o crecimiento aparente. La tabla 5.15 resume en porcentajes los datos generales obtenidos según las lesiones encontradas en el material de ensayo.

Tabla 5.15. Resumen de los porcentajes de aparición de lesiones superficiales en los discos de hojas y tejido de tronco producto de la inoculación de soluciones de los aislamientos fúngicos.

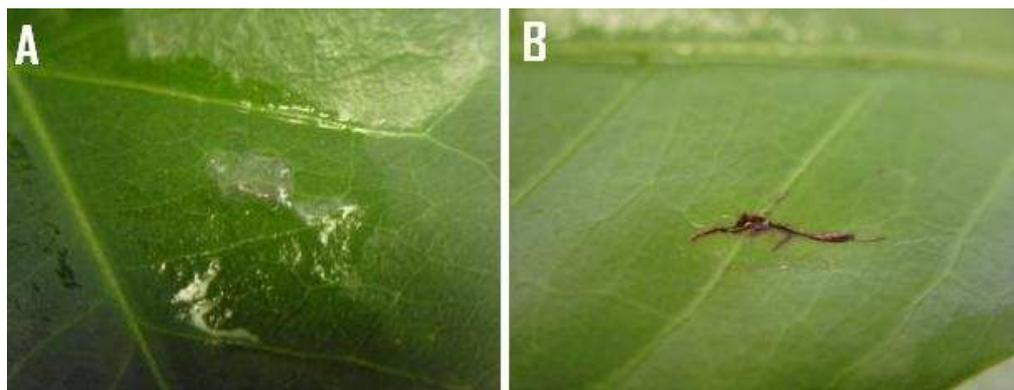
ID real	Microorganismo	Tejido 1er par de hojas		Tejido 3er par de hojas		Prueba en tronco
		Adaxial	Abaxial	Adaxial	Abaxial	
1	<i>Pythium spp</i>	0%	0%	0%	0%	0%
2	No identificado	0%	0%	0%	0%	0%
3	No identificado	0%	0%	0%	0%	0%
4	<i>Aspergillus spp</i>	0%	0%	0%	0%	0%
5	<i>Cladosporium spp</i>	0%	0%	0%	0%	0%
6	<i>Paecilomyces spp</i>	0%	0%	0%	0%	0%
7	<i>Cladosporium spp</i>	0%	0%	0%	0%	0%
8	<i>Beauveria spp</i>	0%	0%	0%	0%	0%
9	<i>Pythium spp</i>	80%	100%	100%	100%	0%
11	No identificado	0%	0%	0%	0%	0%
12	<i>Aspergillus spp</i>	0%	0%	0%	0%	0%
	Control hongos	0%	0%	0%	0%	0%
10	Levadura No identificada	30%	10%	60%	40%	0%
13	Levadura No identificada	10%	0%	0%	40%	0%
	Control levaduras	30%	20%	10%	20%	0%

Microsoft Office Excell 2003

5.4.2 Bioensayo de Pellets de hongos sobre láminas enteras de hojas de café.

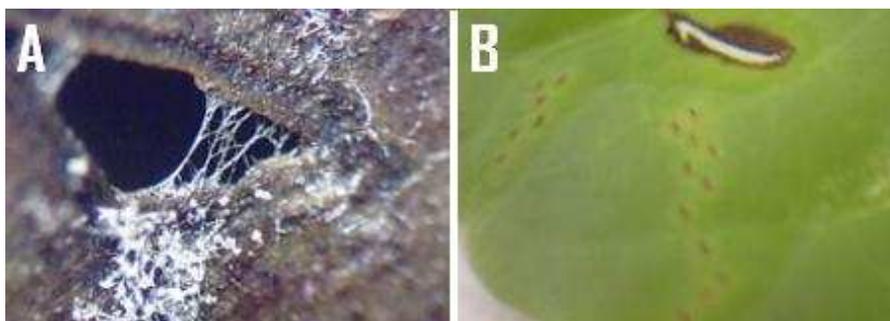
No se presentó reacción positiva del crecimiento de los micelios de los hongos cultivados en matrices líquidas inoculados en forma de pellets sobre las hojas seleccionadas para ningún tratamiento (Figura 5.10). En todos los tejidos inoculados mediante el tratamiento 2 que implicó heridas foliares se presentó oxidación del tejido del corte y exudación amarillenta. Además el control 2

presentó una pudrición acelerada de las hojas con expansión de las regiones necróticas desde las heridas donde hubo proliferación de un hongo saprófito no identificado y se obtuvo contaminación por el hongo *Mycena citricolor* en el ensayo H2-T2 (Figura 5.10). El control 1 no presentó lesiones durante la prueba. A continuación las figuras 5.10 y 5.11 muestran algunos registros fotográficos de la prueba.



Microsoft Paint 5.1

Figura 5.10. Tejidos inoculados con pellets de los hongos sobre láminas de hojas enteras de café luego de tres semanas de incubación. A. Pellet sin crecimiento sobre lámina foliar del tratamiento 1 sin (heridas). B. Heridas cicatrizadas sin crecimiento fúngico sobre láminas foliares del tratamiento 2 (con heridas).



Microsoft Paint 5.1

Figura 5.11. Contaminación en testigos y ensayos de la prueba. A. Tejido necrosado de la herida del control del tratamiento 2 invadido por hongo saprófito no identificado. B. Sinemas iniciales de *Mycena citricolor* sobre láminas del tratamiento H2-T2.

BIOENSAYOS DE MICROORGANISMOS SELECCIONADOS PARA SU CORRESPONDENCIA CON LA SINTOMATOLOGÍA DE CRESPERA DEL CAFÉ.

5.5 Bioensayos en invernadero

5.5.1 Selección de plantas de invernadero libres del patógeno *Xylella fastidiosa* para ensayos de infección mecánica y vectorial de bacterias aisladas.

Las plantas de invernadero presentaron una carga foliar de 12.4 hojas promedio por planta, la altura promedio fue 8.6cm a partir del sustrato y hasta el ápice caulinar. Cada planta presentó 7.2 entre nudos promedio a la hora de la infección. Se consideró un desarrollo adecuado de las plantas acorde al programa de crecimiento del material.

La prueba serológica presentó para los valores de discriminación porcentajes de 6, 2 y 0% de incidencia del patógeno en el lote. La absorbancia del promedio de los controles negativos para la prueba fue de 0.041nm mientras que la desviación estándar de estos datos 0.031nm. El promedio de las muestras fue de 0.029nm. La tabla 5.16 muestra las absorbancias de los discriminadores y los porcentajes de limpieza del material según estos anteriores.

Tabla 5.16. Resumen de la limpieza del lote de plantas de café (*Coffea arabica*) para pruebas en invernadero según discriminatorios y el porcentaje de limpieza del material.

Parámetro	Valor (nm)	% Limpieza del lote
1SD	0,071	94%
2SD	0,102	98%
3SD	0,163	100%

Microsoft Office Excell 2003

5.5.2 Determinación de la presencia de *Xylella fastidiosa* en el material vegetal de campo.

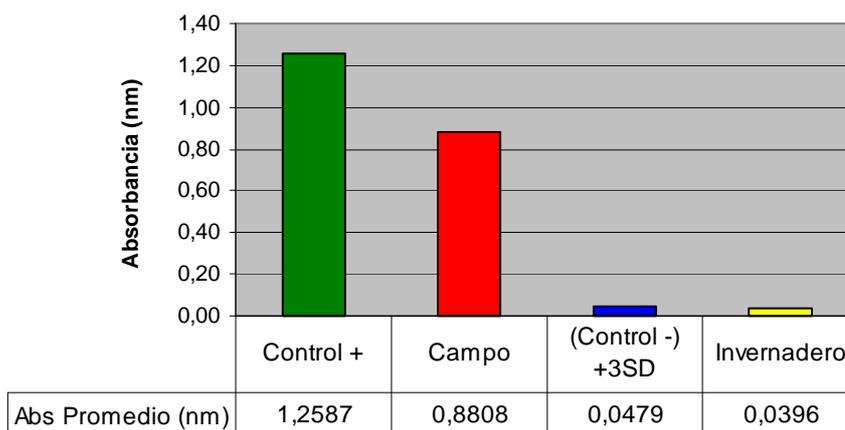
A partir de la interpretación de las absorbancias generadas en la prueba serológica se agruparon los datos del evaluador estadístico según 1, 2 y 3 desviaciones estándar para la discriminación de la incidencia de *X. fastidiosa* y su porcentaje en la muestra de campo y de invernadero (Tabla 5.17).

Tabla 5.17. Porcentaje de incidencia en la muestra de material vegetal de campo y de invernadero preliminar según los de discriminación obtenidos (SD: 0.04 unidades).

Parámetro	Valor (nm)	% de Incidencia según material	
		Plantas de campo	Plantas Invernadero
1SD	0,052	100%	0%
2SD	0,056	90%	0%
3SD	0,060	90%	0%

Microsoft Office Excell 2003

A continuación la figura 5.12 muestra el promedio de la absorbancia de las muestras de invernadero, campo y controles.



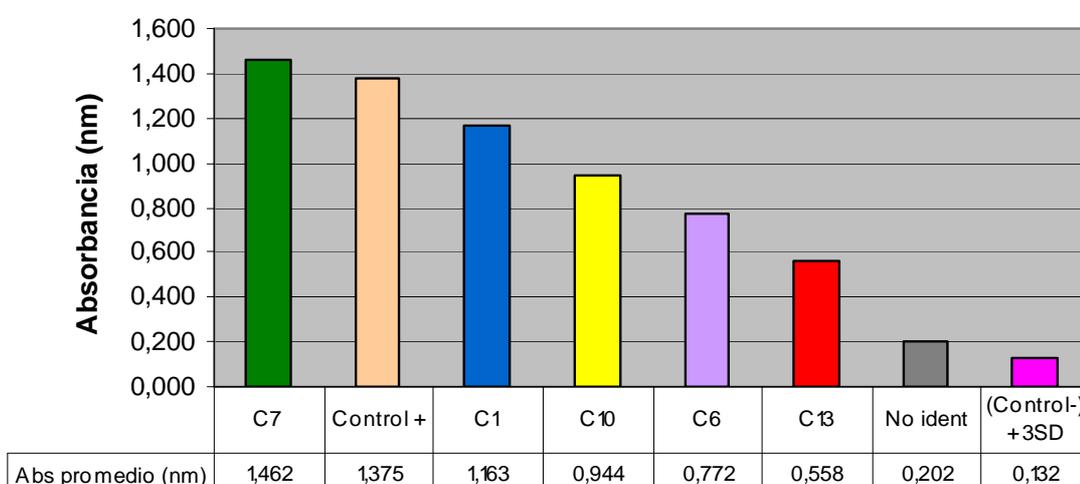
Muestras y Controles

Microsoft Office Excell 2003

Figura 5.12. Absorbancia promedio para el material vegetal de café analizado mediante la prueba DAS-ELISA y sus controles de prueba para la reacción fotocolorimétrica.

5.5.3 Determinación de la presencia de *Xylella fastidiosa* en cicadélidos

Se obtuvieron absorbancias promedio superiores a los evaluadores según 1, 2 y 3 desviaciones estándares sobre el valor de los controles negativos de la prueba para un 100% de incidencia de la bacteria *Xylella fastidiosa* en los grupos colectados. La figura 5.13 muestra las absorbancias promedio de las muestras y los controles ensayados.



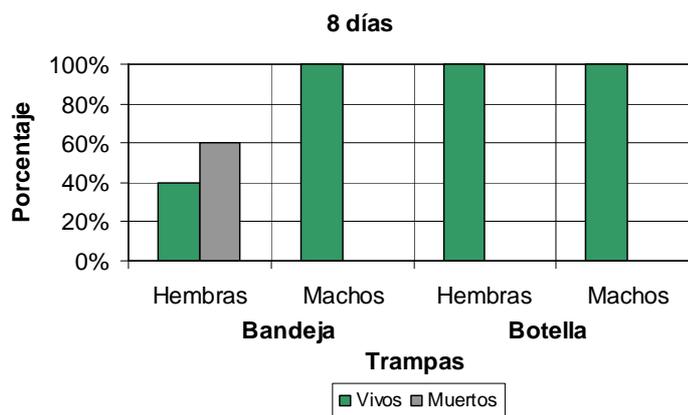
Código de Cicadélidos y Controles de Prueba

Microsoft Office Excell 2003

Figura 5.13. Absorbancia promedio para los extractos de cicadélidos analizados mediante la prueba DAS-ELISA y sus controles de prueba para la reacción fotocolorimétrica.

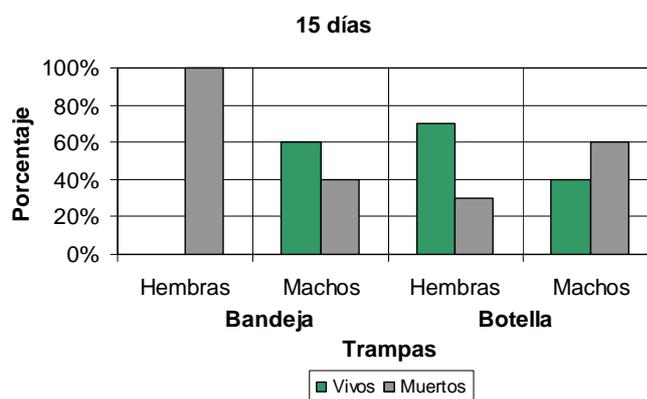
Infección vectorial de plantas de invernadero en trampas con cicadélidos de campo en condiciones de laboratorio.

Se determinó la inocuidad de las plantas para la prueba obteniendo un 100% de limpieza del material para los discriminatorios. Los insectos se mantuvieron vivos en la mayoría de los casos durante 15 días. La mortalidad promedio varió según el sexo. Las figuras 5.14 y 5.15 muestran los valores de sobrevivencia según sexo para los cicadélidos expuestos.



Microsoft Office Excell 2003

Figura 5.14. Porcentaje de sobrevivencia y mortalidad según sexo a los 8 días de observación del ensayo de infección vectorial.



Microsoft Office Excell 2003

Figura 5.15. Porcentaje de sobrevivencia y mortalidad según sexo a los 15 días de observación del ensayo de infección vectorial.

La figura 5.16 muestra individuos vivos luego de 8 días de captura en jaulas de infección. Nótese la disposición de los mismos sobre los pecíolos, la vena central y la región del entrenudo de las hojas apicales.



Microsoft Office Picture Manager 2003

Figura 5.16. Individuos cicadélidos vivos a los 8 días de captura sobre plantas de café bajo condiciones de laboratorio.

La prueba serológica DAS-ELISA aplicada a los cadáveres de los cicadélidos recuperados en los distintos momentos de la observación, así como, a los individuos sobrevivientes luego del periodo de 15 días de ensayo permitió corroborar la presencia de la bacteria *Xylella fastidiosa* en el 100% de los individuos expuestos como vehículo de infección vectorial a las plantas tanto en jaula tipo bandeja como botella, esto al compararlos con los valores discriminatorios 1S (0.074nm), 2S (0.081nm) y 3S (0.088nm).

La absorbancia del control negativo de la prueba fue de 0.067nm y la desviación estándar 0.007nm. El promedio general de la absorbancia para los individuos muertos fue de 1.012nm y para los vivos 1.677nm, valores determinados a los 15 días luego del ensayo.

Luego de 1.5 meses de crecimiento posterior a la infección, las plantas presentaron un aparente desarrollo raquítico evidenciado por poca carga foliar y amarillamiento en las hojas maduras. A los 3 meses de crecimiento se evidenció una leve recuperación en el vigor de las plantas al eliminar las hojas bajas necrosadas y la disminución de este síntoma en las hojas jóvenes. También a este punto presentaron deformaciones leves en las hojas jóvenes y síntomas de clorosis en hojas intermedias y bajas con manchas secas foliares (Figura 5.17).



Microsoft Paint 5.1

Figura 5.17. Plantas bajo ensayo de inoculación vectorial en invernadero. A. Material evaluado a 1.5 mese. B. Material evaluado a 3.0 mese. C. Láminas jóvenes deformadas observadas a 3.0 meses. D. Clorosis y quemaduras foliares en hojas maduras (Estado inicial en recuadro).

Después de tres meses las plantas presentaron una incidencia del 100% de la bacteria en hojas jóvenes del tercer entrenudo con una absorbancia promedio de 0.588nm, mientras que en las hojas maduras del último entrenudo se presentó solo un 33.33% de incidencia bajo el parámetro discriminador 1S con una absorbancia promedio de 0194nm. La tabla 5.18 muestra las absorbancias según cada evaluador estadístico, así como los porcentajes de incidencia.

Tabla 5.18. Porcentaje de incidencia en la muestra de material vegetal de invernadero de infección vectorial según los valores de discriminación obtenidos.

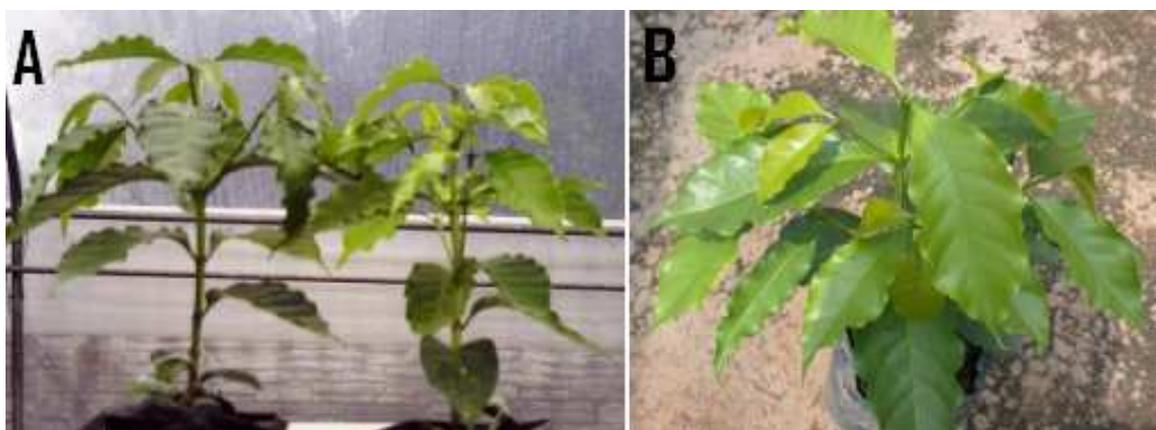
Parámetro	Valor (nm)	% Incidencia según tejido	
		Entrenudo joven (3)	Último Entrenudo (6-7)
1SD	0,189	100,0%	33,3%
2SD	0,219	100,0%	0,0%
3SD	0,249	100,0%	0,0%

Microsoft Office Excell 2003

La infección al parecer no fue total; sin embargo, se consideró un 100% de infección general en las plantas ensayadas al corroborarse la efectividad de infección vectorial.

Infección mecánica de *Xylella fastidiosa* en plantas de invernadero.

Luego de dos meses de crecimiento en invernadero no se observaron síntomas considerables asociados a la enfermedad de “Crespera en café” en las plantas ensayadas bajo el método de inoculación mecánica Xf 2 (Figura 5.18).



Microsoft Paint 5.1

Figura 5.18. Prueba de inoculación mecánica del aislamiento de *Xylella fastidiosa* en plantas de café en invernadero. A. Vástago de plantas tratamiento Xf 2. B. Carga foliar de plantas tratamiento Xf 2.

En el caso del protocolo Xf 1 se observó en una planta la aparición de una lesión foliar correspondiente a la infección sobre el pecíolo de una hoja del cuarto entrenudo (Figura 5.19) con similitud a las reportadas como síntomas de dicha enfermedad. Sin embargo, en el resto de las plantas no se observó alguna alteración importante (Figura 5.20).



Microsoft Paint 5.1

Figura 5.19. Lesión seca en lámina foliar de planta inoculada con el aislamiento de *Xylella fastidiosa* mediante el método Xf 1 luego de 2 meses de crecimiento.



Microsoft Paint 5.1

Figura 5.20. Prueba de inoculación mecánica del aislamiento de *Xylella fastidiosa* en plantas de café en invernadero. A. Vástago de plantas tratamiento Xf 1. B. Carga foliar de plantas tratamiento Xf 1.

El testigo presentó deformaciones foliares que se repitieron en algunas plantas para ambos ensayos (Figura 5.21).



Microsoft Paint 5.1

Figura 5.21. Alteraciones morfológicas ocasionales en las plantas de ensayo y los testigos de la prueba.

La prueba serológica DAS-ELISA mostró la efectividad del tratamiento Xf 1 para la infección de la bacteria *Xylella fastidiosa* en plantas de café de dos meses de edad en condiciones de invernadero reportando una efectividad total acumulada sobre los tejidos muestreados del 96.7% mientras que para el método Xf 2 la efectividad fue del 66.7%. Las tablas 5.19 y 5.20 muestran el detalle de los porcentajes individuales y los valores discriminativos de la prueba. La absorbancia promedio de los controles negativos fue de 0.146 y 0.169 nm para la prueba correspondiente a Xf1 y Xf2 con una desviación estándar de 0.003 y 0.020 unidades de forma respectiva. La tabla 5.21 muestra la absorbancia promedio por muestra de tejido según el entrenado de selección-infección.

Tabla 5.19. Porcentaje de incidencia de *Xylella fastidiosa* en la muestra de material vegetal según los valores discriminativos para la prueba de infección mecánica mediante el protocolo Xf 1.

Parámetro	Valor (nm)	% Incidencia según entrenado			
		No inoculado	2do	3ero	4to
1SD	0,149	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
2SD	0,152	100,0%	80,0%	100,0%	100,0%
3SD	0,155	100,0%	80,0%	100,0%	100,0%
% Promedios		100,0%	86,7%	100,0%	100,0%

% Infección total **96,7%**

Microsoft Office Excell 2003

Tabla 5.20. Porcentaje de incidencia de *Xylella fastidiosa* en la muestra de material vegetal según los estadísticos discriminativos para la prueba de infección mecánica mediante el protocolo Xf 2.

Parámetro	Valor (nm)	% Incidencia según entrenado			
		No inoculado	4to	5to	6to
1SD	0,189	80,0%	80,0%	100,0%	80,0%
2SD	0,208	60,0%	80,0%	80,0%	60,0%
3SD	0,228	40,0%	40,0%	60,0%	40,0%
% Particular Infección		60,0%	66,7%	80,0%	60,0%
% Infección total		66,7%			

Microsoft Office Excell 2003

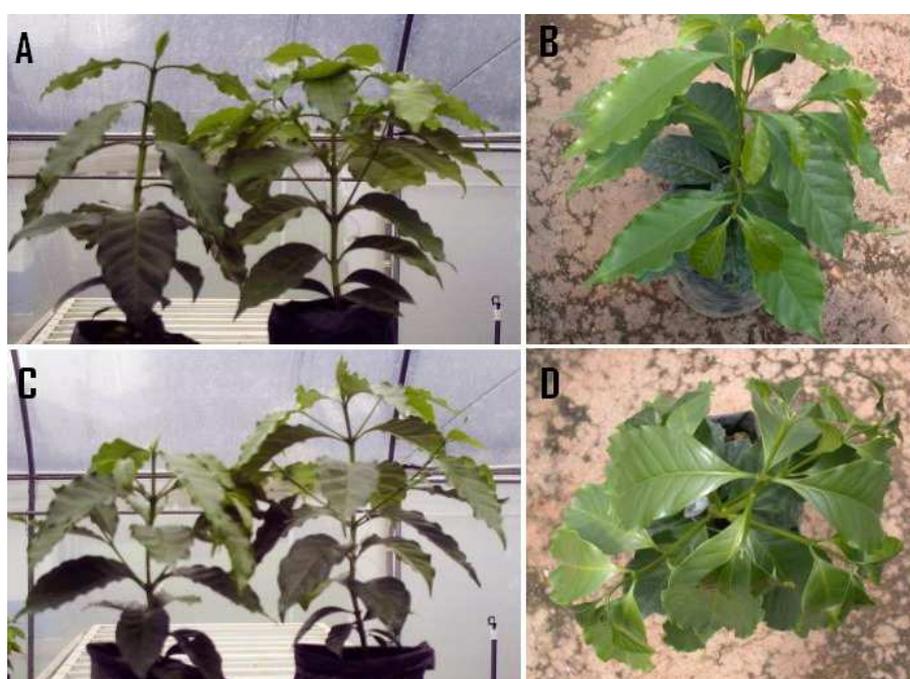
Tabla 5.21. Promedio de la absorbancia de las muestras procesadas para la prueba DAS-ELISA en la determinación de la incidencia de *Xylella fastidiosa* en el ensayo de inoculación mecánica según protocolo Xf 1 y Xf 2.

Material según entrenado	Promedio de absorbancia (nm) según infección	
	Xf 1	Xf 2
No inoculado	0,202	0,204
Entrenado 2	0,205	
Entrenado 3	0,238	
Entrenado 4	0,208	0,223
Entrenado 5		0,277
Entrenado 6		0,215

Microsoft Office Excell 2003

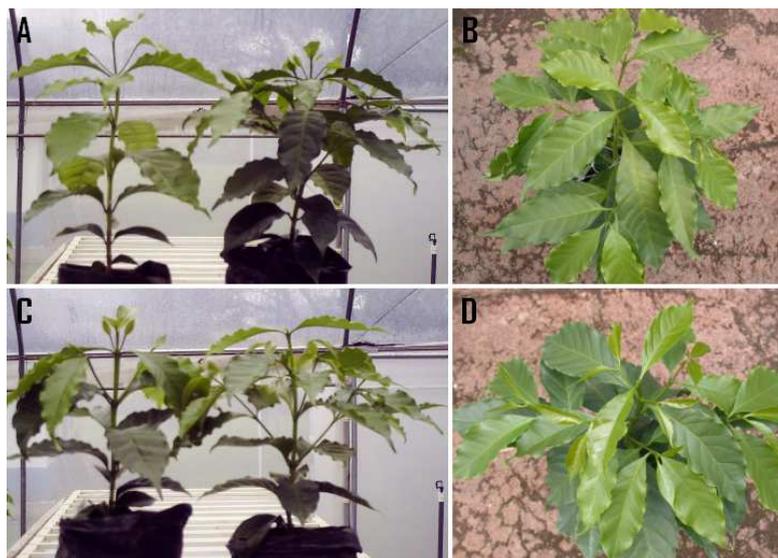
5.6 Infección mecánica de *Geobacillus spp* y *Pseudomonas fluorescens* en plantas de invernadero.

Las plantas inoculadas con la dilución de la bacteria *Geobacillus spp* no presentaron síntomas o signos correspondientes a los reportados para la enfermedad de “Crespera en Café” durante el periodo de observación en ningún tratamiento empleado. De esta misma forma se considero la ausencia de síntomas en las plantas inoculadas para ambos tratamiento con el aislamiento de *Pseudomonas fluorescens*. Las figuras 5.22 y 5.23 muestran el registro fotográfico para los tratamientos empleados según los aislamientos Pf 1 - Pf2 y Geo 1 y Geo 2 de forma correspondiente.



Microsoft Paint 5.1

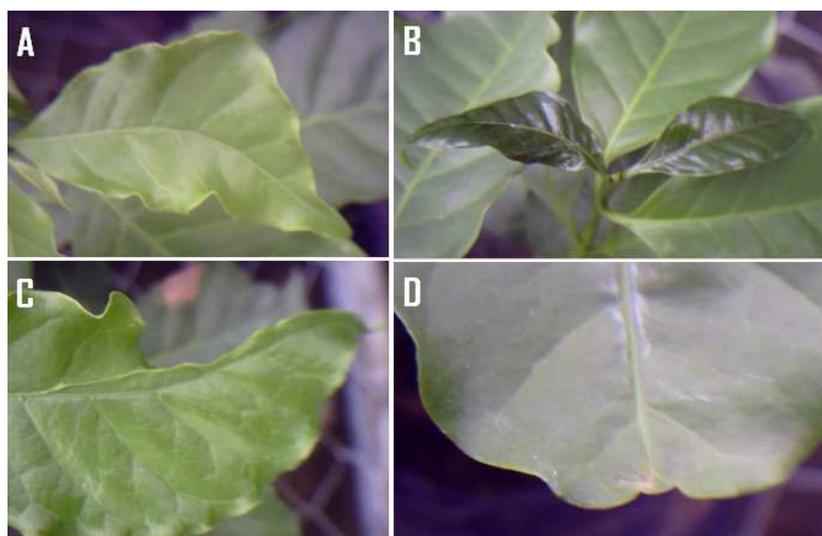
Figura 5.22. Prueba de inoculación mecánica del aislamiento de *Pseudomonas fluorescens* en plantas de café en invernadero. A Vástago de plantas tratamiento Pf 1. B Carga foliar de plantas tratamiento Pf 1. C. Vástago de plantas tratamiento Pf 2. D. Carga foliar de plantas tratamiento Pf 2.



Microsoft Paint 5.1

Figura 5.23. Prueba de inoculación mecánica del aislamiento de *Geobacillus spp* en plantas de café en invernadero. A Vástago de plantas tratamiento Geo 1. B Carga foliar de plantas tratamiento Geo 1. C. Vástago de plantas tratamiento Geo 2. D. Carga foliar de plantas tratamiento Geo 2.

Se presentaron algunas alteraciones morfológicas ocasionales en las plantas ensayadas según los tratamientos Geo 1 y Pf 2, sin embargo dichas alteraciones repitieron en los testigos de la prueba. La figura 5.24 muestra el registro de dichas alteraciones.



Microsoft Paint 5.1

Figura 5.24. Alteraciones morfológicas ocasionales en los ensayos Pf y Geo. A. Ápice de folios disminuido en Geo 1. B. Hojas jóvenes acucharadas y más alargadas en Pf 2. C. Deformación parcial en Control 1. D. Lámina de hojas maduras engrosada y ápice disminuido en Geo 1.

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN

IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS ASOCIADOS A CRESPERA DEL CAFÉ.

6.1 Muestreo de cicadélidos en campo.

Las poblaciones de los insectos vectores presentan variaciones importantes en las diferentes épocas del año debido a diversos factores ambientales y de la ontogenia de sus hospederos, así como, producto de las variaciones normales de población en las diferentes etapas de su ciclo de vida, lo que posiblemente influyó en el número de obtenciones de C7 (cicadélido más abundante colectado en campo) durante la colecta. Se considera que los factores ambientales son los más condicionantes para la densidad y geodistribución poblacional de las especies (Farias *et al.*, 2003). Los cicadélidos por su parte se han relacionado cuidadosamente con la temperatura del ambiente que frecuentan, aunque no siempre se cumple la norma de que a mayor temperatura mayor abundancia de las poblaciones, estas generalmente prefieren las temperaturas desde 23-27°C para alimentarse y al parecer reproducirse coincidiendo con ciclos fenológicos de sus hospederos, densidad que desciende cuando las temperaturas son muy altas o muy bajas (Hidalgo *et al.*, 1999; Redak *et al.*, 2004).

También el factor intrínseco en la biología de los cicadélidos puede ser un elemento que afecte la frecuencia de los insectos en determinada época del año, ya que variaciones ambientales pueden alterar los ciclos biológicos de reproducción de las especies y desajustar el patrón de frecuencia, encontrándose que insectos no completan su ciclo de vida en un hospedero particular y emigren de este en ciertas condiciones afectando su densidad (Galvis *et al.*, 2006).

La escogencia del mejor hospedero es otro factor poblacional que diferencia la abundancia general de vectores en un agroecosistema de la abundancia sobre un

cultivo determinado que corresponde únicamente a un elemento dentro del mismo, de esta manera la frecuencia de los insectos se verá condicionada por los momentos más favorables para la alimentación entre los hospederos siendo posible no determinar las especies totales presentes en un lugar por el cambio de hospederos. Este aumento en la diversidad de la población condicionado por la presencia de este tipo de vegetación agrega entropía poblacional y diferencia la equitatividad y riqueza de especies en momentos determinados del ciclo del cultivo (Hidalgo *et al.*, 1999).

6.2 Obtención de microorganismos endófitos a partir del material vegetal colectado y de endógenos a partir de cicadélidos.

Respecto al protocolo A de desinfección es posible que factores como la baja concentración del desinfectante, el poco tiempo de exposición al mismo o bien la alta población de epífitos (evidente en la contaminación de los controles) en los materiales ensayados fueran la causa de las altas poblaciones de bacterias y hongos que colonizaron rápidamente en las placas de ensayo dificultando el crecimiento y recuperación de microorganismos de lento crecimiento (Echeverri *et al.*, 2007), asociados al hábito endófito o de patógenos como *Xylella fastidiosa* siendo estos el objetivo de la aplicación del protocolo, lo anterior se generalizó en los tres tratamientos ensayados con igual crecimiento bacteriano incontable pero diferente incidencia fúngica siendo el T3 el que presentó menor crecimiento fúngico por la mayor concentración de desinfectante empleada. Otro factor uniformado en los tres tratamientos y que no favoreció el aislamiento esperado fue la oxidación total de los materiales empleados, los cuales segregaron fenoles al medio y se aceleró la oxidación de sus tejidos al encontrarse en un ambiente de 100% de humedad relativa (Figura 5.2).

En cuanto al protocolo B se determinó una disminución en el crecimiento fúngico en las placas ensayadas y que además la desinfección aplicada resultó eficiente para eliminar posibles epífitos en los dos tratamientos ensayados; sin embargo, el crecimiento bacteriano acelerado fue abundante a partir de la segunda semana de

incubación alcanzando inclusive cerca del 100% de la placa antes del periodo de recuperación esperado para los microorganismos de lento crecimiento. El tratamiento 1 presentó considerable crecimiento fúngico mientras que el tratamiento 2 no favoreció la presencia de hongos posiblemente por la concentración mayor del desinfectante (Figura 5.3).

El protocolo C también mostró ser efectivo eliminando epífitos, aunque presentó crecimiento bacteriano considerable en los tres tratamientos el crecimiento fúngico general, fue el menor de los protocolos ensayados para la recuperación a partir de tejidos de planta lo que permitió observar la totalidad de la zona inoculada durante las cuatro semanas de observación y facilitó la recuperación de microorganismos en los periodos de incubación esperados. Esta condición se mantuvo en los tres tratamientos favoreciéndose conforme se aumentó la concentración del desinfectante permitiendo recuperar colonias morfológicamente similares a *Xylella fastidiosa* en periodos correspondientes de incubación (Figura 5.4). En el ensayo de extracción de material de vitroplantas donde se aplicó este protocolo C se corroboró la ventaja que ofrece para la proliferación de endófitos y microorganismos de lento crecimiento al no obtenerse crecimiento fúngico y eliminar epífitos por la inocuidad de los controles. Factores como la estabilización de poblaciones bacterianas por medio de la extracción del buffer PBS 1X permiten disponer de bacterias que generalmente cuesta mucho obtenerlas en extracciones con soluciones acuosas básicas.

Los resultados mostrados en el protocolo D permiten considerar que es adecuado para eliminar epífitos al presentar nula contaminación de los controles. La alta proliferación de bacterias en ambos tratamientos ensayados, así como la colonización expansiva de los hongos obtenidos son factores que no favorecen el objetivo de la aplicación del protocolo ya que no permiten visualizar el área total inoculada como en los protocolos A y B de obtención en plantas. De esta manera los microorganismos que crecen lentamente en medios selectivos se ven enmascarados por el crecimiento fúngico principalmente y la obtención de cultivos puros de estos se dificulta (Figura 5.5). Esto posiblemente se deba a que el

tiempo de desinfección, la acción no efectiva contra esporas, la concentración del ingrediente activo o bien su acción generalista (Echeverri *et al.*, 2007) eliminara poblaciones de interés.

6.3 Clasificación preliminar e identificación de microorganismos obtenidos

6.3.1 Aislamientos bacterianos

La obtención de microorganismos a partir de los protocolos particulares y la descripción de propiedades físicas, bioquímicas y del crecimiento permiten asociar la factibilidad de recuperarlos empleando diferentes tipos de desinfecciones y de técnicas de aislamiento lo que se convierte en una información valiosa para la documentación de las bibliotecas microbiológicas, así como, el definir los protocolos más adecuados para aislar bacterias u hongos de rápido o lento crecimiento diferencial, o bien para obtener mayor diversidad, cantidad de poblaciones o solo un microorganismo objetivo.

6.3.1.1 Identificación Bioquímica mediante el sistema BIOLOG

Respecto a los aislamientos microbianos encontramos bacterias (Tabla 5.6) que son más abundantes y que permiten ser obtenidas bajo diferentes protocolos de desinfección del material, esto posiblemente a que son microorganismos tolerantes a diferentes desinfecciones, de rápido y abundante crecimiento que colonizan gran parte de los tejidos muestreados y aprovechan de forma más rápida los nutrientes característicos de fases *lag* cortas y fases *log* rápidas y pronunciadas (Madigan *et al.*, 2004) como el caso de *Serratia marcescens* que se logró obtener en todos los tratamientos del Protocolo A y C contabilizando seis aislamientos. Sin embargo, esta posición de resistencia relativa a la desinfección se cuestiona en la ausencia de aislamiento mediante algún tratamiento del protocolo B el cual empleó el mismo desinfectante y concentraciones más bajas de su ingrediente activo, por lo cual se estima que la presencia de la bacteria no está asociada al 100% de las muestras y bien puede ser igualmente transmitida por vectores apoyándose esta posición al obtenerle mediante el tratamiento 1 del

protocolo D en la cabeza del insecto de un aislamiento de idénticas características preliminares.

Los aislamientos que correspondieron a la segunda mayor abundancia en el ensayo total correspondieron a una cepa de *Raoultella terrigena* ID 17 y a *Xylella fastidiosa* ambas con tres aislamientos (uno por cada tratamiento del protocolo C) lo que permite suponer que independientemente de la dilución del extracto obtenido del macerado de los tejidos (H_2PO_4 al 1% 3.5% i.a) la desinfección es favorable para el crecimiento de ambas bacterias las cuales son de moderado y lento crecimiento en medio selectivo. Otra bacteria que presentó esta dependencia al protocolo fue *Bacillus amyloquefasciens* ya que solo se recuperó de ambos tratamientos en el protocolo B no influyendo la concentración diferencial sino el método de inoculación en medio selectivo (Orozco *et al.*, 2004).

Por su parte otras bacterias menos frecuentes en los aislamientos (2 aislamientos generales) del tejido de plantas como *Geobacillus spp* y una cepa de *Enterobacter spp* ID 8 no guardan una relación tan estrecha con el protocolo ni con la desinfección de forma respectiva ya que en el caso de *Geobacillus spp* fue obtenida mediante el tratamiento 1 del protocolo B y el tratamiento 3 del protocolo C ambos con la misma concentración de desinfectante y de diferente inoculación en medio selectivo, mientras que la cepa de *Enterobacter spp* obtenidas mediante estos mismos protocolos diferentes y a diferentes concentraciones del desinfectante (T2 Protocolo B y T1 Protocolo C).

Se observó que algunos aislamientos (*Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus sciuri* y *Klebsiella spp*) se obtuvieron únicamente de insectos cicadélidos, encontrándose presentes posiblemente tanto en su aparato bucal como en los tejidos del intestino. Esta condición permite suponer que estas bacterias encuentran algún tipo de barrera para ser transmitidas a las plantas (Aráujo *et al.*, 2002), las cuales no presentaron aislamientos de estos microorganismos o bien los protocolos ensayados para los tejidos vegetales no favorecieron su obtención como se propuso anteriormente.

Dicha restricción a hospederos y de forma exclusiva a un tejido se muestra en los aislamientos de *Raoultella terrigena* ID 5, *Sphingomonas paucimobilis*, *Carnobacterium mobili* y una cepa de *Bacillus spp* ID 19 las cuales se obtuvieron únicamente mediante el T2 del Protocolo D. Sin embargo, al compararse con la ausencia de los mismos en las cabezas de los cicadélidos muestreados hace pensar que son microorganismos asociados simbiotes al interior del insecto (Grijalva y Giraldo, 2006) y de poca o nula transmisión a las plantas a excepción tal vez de *Raoultella terrigena* de la cual se obtuvo una cepa de diferentes características morfológicas mediante el protocolo C.

Por su parte bacterias aún menos abundantes y consideradas más dependientes de ambos factores (tratamiento y protocolo) se verán de igual forma afectadas por características de rápido o lento crecimiento que exhiban y la proliferación de otros microorganismos simbiotes o perjudiciales para su colonización que acumulen desechos tóxicos durante su fase de crecimiento o que metabolicen más eficientemente los nutrientes disponibles en el medio (Madigan *et al.*, 2004). Los aislamientos *Enterobacter spp* ID 3, *Enterobacter aerogenes* y *Staphylococcus cohnii* (T2 Protocolo B); *Serratia marcenses* ID 9 y *Bacillus spp* ID 11 (T1 Protocolo A); *Phantoea spp* y *Streptococcus sobrinus* (T2 Protocolo A) y *Raoultella planticola* (T2 Protocolo C) exhiben posiblemente esta situación de dependencia más estrecha.

La particularidad de encontrar más variedad y cantidad de aislamientos bacterianos mediante el protocolo D que en los protocolos de obtención en plantas es asociada al hábito de alimentación de los cicadélidos los cuales son comúnmente frecuentadores de hospederos alternativos y presentan migraciones estacionales en busca de alimento y hábitats adecuados de reproducción lo que permite mayor contacto con la microfauna y una interacción mayor con las poblaciones de microorganismos que viven en su interior implicados o no en su metabolismo alimenticio (Buskan y Walker, 2003). Si bien es cierto la colonización en el intestino posterior y medio de los insectos por parte de microorganismos es

más amplia que la colonización permitida en el aparato bucal y el intestino posterior donde se alojan patógenos que se transmiten mediante hábitos no persistentes (Purcell y Finlay, 1979) lo que podría explicar la mayor cantidad y diversidad encontradas mediante el T2 del protocolo D cuando los aislamientos no se repiten en los tejidos de la boca y el cuerpo.

Por su parte es común encontrar menor diversidad de microorganismos en las plantas que en sus vectores, ya que las plantas poseen relaciones bioquímicas entre endófitos que funcionan como controladores biológicos de poblaciones de microorganismos epífitos y muchas veces corresponden con la principal barrera de entrada a enfermedades en las plantas (Aráujo *et al.*, 2002), de esta misma forma el metabolismo de la planta que permite un mínimo desplazamiento espacial estrecha aún más la relación entre sus insectos visitantes.

Otro punto importante es la relación de bacterias Gram positivas y Gram negativas. En este ensayo se encontraron más bacterias Gram negativas totales (13) que positivas (8), siendo la población particular en insectos de 5 Gram negativas y 3 Gram positivas mientras que en los tejidos de las hojas en las plantas 9 y 4 aislamientos respectivamente. Estas relaciones corresponden con las reportadas anteriormente por Vega y colaboradores (2005) donde se reportaron para este tejido 4 y 3 aislamientos de forma respectiva y mayor cantidad de aislamientos en general para los granos, las hojas y las plantas de semilleros. En cuantificaciones de microorganismos en cicadélidos se ha reportado mayor cantidad de aislamientos en el cuerpo que en la cabeza en correspondencia a los resultados obtenidos en este ensayo, según Mariño (2007) en las cabezas tratadas con desinfectantes se han cuantificado mayor cantidad de gram positivos pero en el cuerpo mayor cantidad de negativos dando un balance de abundancia de gram negativos en los vectores.

Aunque la mayoría de patógenos de las plantas se caracterizan por ser Gram negativos dicha relación no representa una relación directa de alta abundancia de patógenos en los tejidos ya que solo un 12.5% corresponde generalmente a

organismos verdaderamente perjudiciales (Sossa-Moss *et al.*, 1997). Respecto a los Gram positivos son considerados mayormente organismos benéficos, neutrales y pocas veces patógenos en contradicción con los Gram negativos que además se encuentran mayormente en insectos característicos por ser vectores de enfermedades.

Dentro de los aislamientos que se identificaron en este ensayo mediante los métodos bioquímico, molecular y serológico solo tres son fitopatógenos reportados (*Serratia marcescens*, *Xylella fastidiosa* y *Pantoea spp*), tres se reportan como agentes utilizados en la industria (*Bacillus amyloquefaciens*, *Carnobacterium mobili* y *Geobacillus spp*), cuatro más como implicadas en biocontrol o bioremediación (*Pseudomonas fluorescens*, *Raoultella terricon*, *Enterobacter spp* y *Raoultella platicola*) y las restantes de importancia clínica al ser patógenos del ser humano. La tabla 6.1 a continuación resume la información reportada para los aislamientos.

Tabla 6.1. Reportes e implicaciones de las bacterias aisladas según referencias bibliográficas.

ID	Identificación	Implicaciones o reportes	Referencia(s)
1 y 9	<i>Serratia marcescens</i>	Fitopatógena en cebolla y lechuga	Escobar <i>et al.</i> , 2001
		Agente causal de Endofitias endógenas en humanos	Sánchez <i>et al.</i> , 2003
		Presente en microflora de intestinos de algunos insectos y vertebrados, abundante en suelo y agua	Madigan <i>et al.</i> , 2004
2	<i>Geobacillus spp</i>	Degradadora de Hidrocarburos y fuente de proteínas termoestables	Nazina <i>et al.</i> , 2001; Nazina <i>et al.</i> , 2004
3 y 8	<i>Enterobacter spp</i>	Necesaria para adhesión de proteínas cry en biocontrol de <i>Bacillus thuringiensis</i> en lepidópteros Endógeno en larvas de lepidópteros	Broderick <i>et al.</i> , 2006
4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Controlador biológico de la pudrición anillada de la papa Rhizobacteria promotora del crecimiento PGPR	De la Cruz <i>et al.</i> , 1992 Perotti <i>et al.</i> , 2005

5 y 17	<i>Raoultella terrigena</i>	Biocontrol de <i>Phytophthora cactorum</i> y de <i>P. fragariae</i> en las raíces de fresa	Jayamani, 2006
6	<i>Raoultella planticola</i>	Degradadora de herbicidas en suelos intoxicados Responsable de la intoxicación por histamina en cerdos	Zharikova <i>et al.</i> , 2006 Kanki <i>et al.</i> , 2002
7	<i>Staphylococcus sciurii</i>	Causal de afecciones cutáneas en cerdos Septicemias en humanos Resistente a meticilina, penicilina y clindamicina en obtenciones humanas	Chen <i>et al.</i> , 2007 Stepanovic <i>et al.</i> , 2005 Couto <i>et al.</i> , 2000
10	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Infecciones cutáneas Infecciones urinarias en animales de sangre caliente	Madigan <i>et al.</i> , 2004
11 y 19	<i>Bacillus spp</i>	Endófito asociado a semillas y raíces en cafetos	Vega <i>et al.</i> , 2005
12	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Causa de Osteomielitis Presente en agua, suelo e instrumentos hospitalarios Causal de Endoftlamitis posoperatoria	Araujo <i>et al.</i> , 2000 Adams <i>et al.</i> , 2006
13	<i>Klebsiella spp</i>	Bacteria hospitalaria resistente a antibioticos por alta producción de beta-lactamasas Causal de Diarreas	Cuéllar <i>et al.</i> , 2005 Albarado <i>et al.</i> , 2007
14	<i>Bacillus amyloquefacies</i>	Fuente de enzimas de restricción BamHI Fuente de coadyudantes en la elaboración de preparados enzimáticos	Roberts <i>et al.</i> , 1977 FAO/OMS, 2007
15	<i>Carnobacterium mobile</i>	Bacteria heterofermentadora de ácido lactico de incidencia ambiental	Scarpellini <i>et al.</i> , 2002
16	<i>Phantoea spp</i>	Patógena en algodón transmitida por coleópteros Infecciones sistemáticas en neonatos por contaminación de soluciones parentales	Bell <i>et al.</i> , 2005 Van Rostenberghe <i>et al.</i> , 2006
18	<i>Streptococcus sobrinus</i>	Integrante de la microfauna de la boca en humanos Causal de la caries dental tradicional	Gibbons <i>et al.</i> , 1986 Igarisha <i>et al.</i> , 2000
20	<i>Staphylococcus cohilii</i>	Formadora de la microflora comensal de la piel y mucosas en humanos Infecciones sistémicas en inmunosuprimidos	Álvarez <i>et al.</i> , 2006

21	<i>Xylella fastidiosa</i>	Causal de Pierce's Disease en Vid	Buskan y Walker, 2003
		Enrollamiento de las hojas en almendra	Shapland <i>et al.</i> , 2006
		Enrollamiento de las hojas en la mora	Hernandez <i>et al.</i> , 2006 ¹
		La clorosis variegada en cítricos	Laranjeira <i>et al.</i> , 2004
		Bacteriosis en caña	Hidalgo <i>et al.</i> , 1999
		Enrollamiento foliar en la adelfa	Bextine y Miller, 2004
		Crespera en café	Hill y Purcell, 1995
		El enanismo de la alfalfa, la marchites de la playera, la falsa enfermedad del melocotón, la quemazón de la hoja en la pera, olmo, ciruela, roble y sicomoro	Mariño, 2007

Microsoft Office Excell 2003

6.3.1.2 Detección e identificación serológica mediante DAS-ELISA.

En relación a los análisis serológicos y los resultados obtenidos en la identificación de bacterias de interés mediante la técnica DAS-ELISA utilizada, se presume de la posibilidad de encontrar concentraciones detectables de la bacteria *Xylella fastidiosa* creciendo en conjunto con las colonias de otros microorganismos que enmascaren físicamente su presencia (Palomo, 2000; Caballero y Vega, 2000), esto debido a que luego de 10-22 días se puede esperar la visualización de las colonias en el medio de cultivo BCYE (Scortichini, 2004) pero al ser de lento crecimiento y de una apariencia poco perceptible se enmascaren por las bacterias que metabolizan y crecen más rápidamente resultando en absorbancias positivas en cultivos de microorganismos aparentemente puros y que no corresponden al patógeno determinado por el Kit, esto cuando se han incubado por alrededor de 22 días a una temperatura de crecimiento adecuada para *Xylella fastidiosa*. Esta posición respaldaría los resultados positivos para la prueba serológica obtenidos en los aislamientos ID 3, 8, 9, 10, 13 y 16 a los 22 días de incubación (Tabla 5.9) y permitiría suponer que el crecimiento de *Xylella fastidiosa* no se inhibe totalmente en presencia de estos o bien puede haber una relación de dependencia entre algún producto celular de los endófitos y el crecimiento del patógeno.

Por otra parte en los resultados obtenidos en algunos aislamientos a los siete días de incubación (ID 1, 5 y 7) donde también se consideraron pruebas positivas para la determinación de *Xylella fastidiosa* se piensa que la característica de alta sensibilidad de las pruebas (detectan 0.1ng de antígeno con 0.0008µg de anticuerpo) puede ser el factor que permita determinar aún cantidades ínfimas de este patógeno que se arrastraran en el subcultivo de aislamientos donde la bacteria había alcanzado una concentración moderada enmascarada y que concentraciones ínfimas puedan incrementar con el tiempo y ser más perceptibles (Madigan *et al.*, 2004). Esto en correspondencia con los resultados positivos para estos aislamientos a los 22 días en los tres discriminantes estadísticos. Donde al parecer los microorganismos no inhiben el crecimiento de *Xylella fastidiosa*, o bien el rápido crecimiento del patógeno de condiciones más limitadas se potencie ante la presencia de metabolitos provenientes de otros microorganismos que alteren la cinética microbiana al disponer nutrientes de una forma más accesible como en el caso de las relaciones simbióticas de algunas bacterias promotoras del crecimiento en plantas (Delgadillo *et al.*, 2001; Madigan *et al.*, 2004).

Contrastando los resultados positivos solo a los 22 días de incubación se presume que el crecimiento de *Xylella fastidiosa* puede estar presente en cantidades no detectables o mantenerse inhibido durante un periodo por parte de metabolitos segregados por los microorganismos que lo acompañan durante determinadas fases de la cinética microbiana y que no lo llegan a eliminar, y potenciarse luego por la ausencia de este o la presencia de otros metabolitos que le favorezcan creciendo en cantidades detectables luego de este evento y por ello ser detectados luego de 22 días estando siempre presentes en la placa. No obstante, dicha posición de la influencia del crecimiento debe ser validada y existe alta posibilidad de que la prueba serológica se vea influenciada por las sustancias que difunden desde los microorganismos hacia el medio donde se desarrollan (pigmentos difusibles, antibióticos, sales) cambiando en determinados pasos de la prueba la afinidad química de los reactivos y los soportes implicando falsos

positivos en la detección (Carone, 2003). Otros autores además reportan frecuentes falsos positivos en protocolos DAS-ELISA debido a factores bioquímicos de adhesión y alteración de las relaciones entre antígeno anticuerpo, la alteración de las absorbancias según periodos de incubación y poca sensibilidad en determinaciones donde intervienen mucha materia orgánica (Rodríguez et al., 2002; Conci, 2004). En el caso particular del aislamiento ID 1 (positiva a los 7 y 22 días) que correspondió a la misma identificación de especie que ID 10 (negativa en ambos tiempos) se piensa que la ausencia de la determinación justifica la posibilidad de contaminación ocasional de los aislamientos con otros microorganismos menos perceptibles y que al menos en este aislamiento no existe la dependencia del microorganismos de rápido crecimiento por el más limitado (Palomo, 2000).

6.3.1.3 Selección de colonias de *Xylella fastidiosa* a partir de crecimiento en placa y el método serológico DAS-ELISA.

Los crecimientos bacterianos que correspondieron a las características reportadas para el patógeno *Xylella fastidiosa* en medio de cultivo semisólido BCYE presentaron todos una determinación positiva para la prueba serológica, reportando la mayoría absorbancias promedio superiores a 2.000nm considerándose una concentración alta de bacterias, la diferencia de absorbancia referente al caso de Xf-CICAFE 21-4 que presentó un crecimiento moderado al igual que los demás aislamientos y con características morfológicas correspondientes pero una absorbancia promedio más de dos veces inferior es el resultado de la inadecuada adhesión de los anticuerpos al soporte, la contaminación en el pozo de lectura que alteró la determinación, o bien una posible contaminación en la placa de crecimiento que bajara la cantidad real de bacterias en la muestra y la sensibilidad se viera afectada por la menor concentración de antígeno (Rodríguez et al., 2002). Sin embargo, el ensayo permitió determinar las características morfológicas de las colonias que

posiblemente se encontraron creciendo de forma pura y por ende su concentración es mayor reflejada en las altas absorbancias.

6.3.1.4. Identificación Molecular del aislamiento de *Xylella fastidiosa* y otras bacterias endófitas en café.

A partir de la migración del ADN de las muestras ensayadas se obtuvieron diferentes patrones de bandas determinando entre estos la pureza y la identidad del aislamiento de la bacteria *Xylella fastidiosa* (Xf-CICAFE) al presentarse una sola banda de peso molecular aproximado a 500pb correspondiente al control positivo de *X. fastidiosa* aislado de *Vitis sp* (472 pb), según Qin y colaboradores (2001), la diversidad genética entre los patotipos que infectan los cultivos de la vid, cítricos, café, mora y roble no muestran diferencias secuenciales considerables.

De esta misma forma se observó que para la muestra del cicadélido no se obtuvo un patrón claro para determinar la posible presencia del patógeno dentro de este, misma situación que se apreció en los pozos 7 y 8 correspondientes a la migración de una muestra vegetal 1A de pecíolo y vena central donde al parecer se degradó parcialmente el ADN. Las muestras vegetales 1J y 6E mostraron patrones muy similares y al parecer una degradación parcial en los ADN de menor peso molecular no pudiéndose determinar con claridad la incidencia del patógeno en estas. Esto posiblemente por incompatibilidad del protocolo para la extracción del ADN bacteriano del material vegetal de café (Madriz y Peraza, 2007) ya que dicho protocolo se estandarizó para cítricos.

Las muestras de los crecimientos de las bacterias *Enterobacter spp* y *Serratia marcenses* que correspondieron a los pozos de ensayo 5 y 6 de forma respectiva tampoco permitieron determinar con claridad la presencia de la bacteria *Xylella fastidiosa* creciendo en conjunto con las colonias bacterianas, aunque en la migración para el pozo 6 se observó una banda tenue al nivel del control positivo aislado de *Vitis sp* la degradación contigua no permite determinar la identificación,

(Figura 5.6) posiblemente los factores de compatibilidad del protocolo, la baja concentración del ADN de *Xylella fastidiosa*, el manejo de las muestras o la contaminación de los aislamientos sean factores influyentes en este caso (Madriz y Peraza, 2007).

6.3.2 Aislamientos fúngicos

En el caso de la obtención de hongos y levaduras de igual condición endófito en los tejidos vegetales (entrenudo y pecíolo) y endógenos en los cicadélidos se reportó mayor diversidad de aislamiento mediante el protocolo D a partir de los tejidos de los cicadélidos donde solo se reportó un aislamiento para los tejidos de la cabeza (*Cladosporium spp*) y cuatro para el cuerpo entero del insecto (*Aspergillus spp*, *Cladosporium spp*, *Paecilomyces spp* y una levadura no identificada ID 10) que para los protocolos singulares en tejidos vegetales.

En el caso de los hongos recuperados del material vegetal se presentó una alta dependencia del protocolo y del tratamiento de desinfección empleados particularmente a excepción de los microorganismos *Beauveria spp* y *Aspergillus spp* recuperados por medio del T2 del protocolo C y de dos aislamientos no identificados y una cepa de *Pythium spp* obtenidas mediante el tratamiento 3 del mismo protocolo, ya que el resto de aislamientos se recuperó únicamente bajo una concentración de desinfección específica y un protocolo particular (Tabla 5.13).

Las poblaciones de hongos generalmente son más exigentes en cuanto a la colonización y alimentación en sus hospederos aún cuando no son microorganismos patógenos lo que dificulta muchas veces encontrar toda la diversidad y cantidad de estos como potenciales endógenos. En trabajos realizados en hojas de café (*Coffea arabica*) se han reportado que las poblaciones son altamente diversas aún entre sitios próximos de un mismo tejido donde se ha comprobado la inhibición de las poblaciones vecinas que se han encontrado ocupando el hábito epífita como endófito en diferentes momentos (Santamaría y Bayman, 2005). Se cree que la razón anterior puede ser junto con la aplicación de

un medio selectivo generalmente no empleado para el crecimiento normal de hongos lo que provocó el fenómeno de selectividad según protocolo y tratamiento que se observó.

En el caso de los hongos asociados al insecto no se descarta que la alimentación sea el mecanismo de adquisición de los mismos al encontrarse ampliamente distribuidos en cultivos como epífitos, endógenos y como agentes ambientales (Santamaría y Bayman, 2005). Además de guardar estrechas relaciones entre la alimentación de los insectos y la colonización de los diversos tejidos de las plantas, un ejemplo de estas relaciones son las levaduras (*Candida fermentati* y *Pichia burtonii*) asociadas comúnmente a perforadores del grano en café (Vega et al., 2003).

Estas relaciones pueden ser de dos tipos: mutualista en donde el hongo facilita una fuente extra de nutrientes al insecto mientras que le proporcionan un hábitat o bien puede ser una relación de control del hongo sobre los insectos. Dichas relaciones se encuentran ampliamente distribuidas en los miembros de los órdenes Coleóptero, Díptera, Homóptera, Himenóptera e Isóptera principalmente con Ascomicetos de los géneros *Beauveria*, *Metarhizium*, *Fusarium* y otros como *Ophiostoma*, *Ceratocystis*, *Saccharomyces* (Blackwell y Vega, 2004).

De los aislamientos obtenidos en este ensayo se han reportado anteriormente los géneros *Beauveria*, *Cladosporium*, *Paecilomyces* como endófitos de diversos tejidos de café los cuales junto con otras obtenciones del género *Acremonium* y *Clonostachys* se han incorporado en programas de control biológico (Vega, 2007). De los ID identificados todos a excepción de *Paecilomyces spp* y *Beauveria spp* representan problemas en enfermedades de algunas plantas de importancia económica. La tabla 6.2 a continuación resume las implicaciones y las referencias relacionadas a cada aislamiento identificado.

Tabla 6.2. Reportes e implicaciones de los hongos aislados según referencias bibliográficas.

ID	Identificación	Implicaciones o reportes	Referencia(s)
1 y 9	<i>Pythium spp</i>	Causal del mal de talluelo en café	Winston <i>et al.</i> , 2005
		Problemas en almácigos de caña de azúcar, clavel, coco, frijol, maíz, piña, remolacha, repollo, tabaco, tomate y otros.	Finch y Finch, 1990
		Daños en las raíces de muchas plantas en almácigos	Martin y Loper, 1999
4 y 12	<i>Aspergillus spp</i>	Pudriciones en granos de café	Perrone <i>et al.</i> , 2007
		Pudrición en la fibra del algodón, manchado en granos de arroz, pudrición del fruto en cítricos, tomate y maní; pudrición del grano de maíz y sorgo y pudrición negra de la cebolla y otros.	Finch y Finch, 1990
5y 7	<i>Cladosporium spp</i>	Manchas foliares en cafetos de aclimatación en invernadero	Dawka, 1985
		Ataque secundario de la hoja en cítricos, roña del durazno, moho de la hoja y pudrición terminal en el fruto de tomate	Finch y Finch, 1990
4	<i>Paecilomyces spp</i>	Entomopatógeno de amplio espectro en el cultivo de la manzana y otros cultivos	Mercadier <i>et al.</i> , 2002 ; Bueno y van Lentenen, 2002
		Biocontrolador de nemátodos <i>Meloidogyne</i> en almácigos de café	Giraldo <i>et al.</i> , 1998; Cadena y Gaitan, 2006
8	<i>Beauveria spp</i>	Entomopatógeno de amplio espectro	Bueno y van Lentenen, 2002
		Control de nemátodos en nudos radicales de café	Cadena y Gaitan, 2006
		Efecto biocontrolador sobre broca del café	Bernal <i>et al.</i> , 1995; Barquero, 2007; Psada <i>et al.</i> , 2007

Respecto a la ausencia de estructuras de reproducción en los aislamientos no identificados se estima la posibilidad de incompatibilidad de las condiciones de crecimiento para promover las rutas bioquímicas que implican la generación de los esporangios y las esporas respectivas o bien los cuerpos fructíferos que colaboran en la identificación, ya que estas estructuras se ven influenciadas por los factores físicos como la temperatura, la humedad, la radiación; factores biológicos como la dependencia de hospederos en el caso de algunos tipos de micorrizas, la presencia de antagonistas que limiten su desarrollo; la inhibición bioquímica del micelio reproductivo en medios artificiales y otros (Madigan *et al.*, 2004). Según investigaciones enfocadas en la composición adecuada en los medios de cultivo para la nutrición idónea y la obtención de altas tasas de producción de esporas, el factor determinante es para la gran mayoría de hongos la alta concentración de carbono, así como la relación C/N de la solución los que permiten determinar con mayor relación el tiempo en que aparecen los mayores rendimientos reproductivos para hongos utilizados como biocontroladores, los cuales muestran condiciones de crecimiento relativamente más exigentes debido a que se aplican en altas concentraciones de unidades infectivas (Vega *et al.*, 2003²).

El ensayo en medio de cultivo líquido para el crecimiento de estos hongos (al parecer vegetativos-aéreos) y la producción de organizaciones de micelio en masa concéntrica de reproducción vegetativa tipo pellets en ausencia de estructuras de identificación muestran que al igual que en el medio semisólido no se proporcionaron las condiciones idóneas para la generación del micelio reproductivo o bien se inhibieron las mismas mediante las condiciones aplicadas en este ensayo (Vega *et al.*, 2003²). Aún así se logró determinar diferencias morfológicas entre la producción de pellets entre estos hongos, las cuales se consideran variaciones ontogénicas propias de cada microorganismo ya que el volumen y el tipo de medio de cultivo, las condiciones físicas de incubación, la velocidad de agitación, el recipiente, el pH, y el inóculo fueron estándares (Ardila y Arguello, 1993).

EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE LOS AISLAMIENTOS.

6.4 Bioensayos de patogenicidad de microorganismos aislados en laboratorio.

Según Sossa-Moss y colaboradores (1997) un fitopatógeno se puede diferenciar claramente de un saprófito por la inducción de la reacción hipersensible necrótica en menos de 24 horas en tejidos vivos cuando se inocula de forma dirigida, ya que los saprófitos son incapaces de producir la necrosis característica y en su lugar evidencian ninguna o una mínima reacción hipersensible en los tejidos ensayados.

En los ensayos dirigidos sobre el tejido de los troncos de café tanto para las bacterias como para los hongos no se presentó evidencia de lesiones que permitiesen determinar la capacidad de los microorganismos de afectar este tejido in vivo ni tampoco el crecimiento sobre el tejido, esto posiblemente por las características de dureza y la madurez del tejido leñoso el cual mantiene alta concentración de lignina, proteína para la cual pocos patógenos tienen un mecanismo de degradación agresivo (Martínez *et al.*, 2002).

En los tejidos de hoja ensayados con diluciones bacterianas se observaron reacciones hipersensibles no necróticas tanto en el tejido abaxial como adaxial luego de 92 horas de incubación en la mayoría de los ensayos e inclusive en los controles, considerándose una reacción de muerte celular normal en los tejidos de las hojas y no producto de la acción del mecanismo de invasión de los microorganismos ensayados sobre este. Esto posiblemente por que el tejido cortado aún en condiciones de alta humedad relativa y ensayado a bajas temperaturas mantiene actividad enzimática y al carecer de una fuente de nutrientes va limitando su metabolismo celular, y se acumulan reguladores del crecimiento como el etileno producto de la descomposición de los tejidos y que en ausencia de auxinas que regulan su concentración alcanza niveles para inducir la progresiva muerte de las células (Flores, 1999), además la lesión del corte de los

explantes induce la muerte celular de las células vecinas y por ende una degradación progresiva del tejido alcanzando la fusión del área necrótica de la periferia con los puntos amarillentos en el centro de los tejidos (Figura 5.8 A y B).

La reacción hipersensible es considerada una respuesta defensiva de las plantas que conlleva generalmente a la muerte celular, sin embargo, en otros casos las defensas sistémicas de las plantas funcionan con mecanismos de secreción de sustancias inhibitoras de algunos patógenos como en el caso de las interacciones entre las bacterias *Geobacillus spp* y *Staphylococcus cohnii* las cuales en esta prueba exhibieron una acumulación de cristales salinos en el área correspondiente a la inoculación de la gota de la solución bacteriana (Figura 5.8 C), este tipo de reacciones se ha visto en bioensayos con hongos como *Mycena citricolor* agente causal de la enfermedad de “Ojo de Gallo” en café, el cual segrega ácido oxálico sobre el lugar de colonización y este es neutralizado por la planta (en algunos materiales aparentemente resistentes) precipitándolo en cristales mediante un mecanismo extracelular (Borbón *et al.*, 1997). Un caso interesante es que la acumulación de cristales en este ensayo no exhibió una correspondencia con regiones necróticas en los tejidos y se presenta en ambos lados de la lámina foliar.

En el caso de los hongos ensayados se determinó la colonización del hongo *Pythium spp* ID9 a partir de la identificación del micelio sobre los discos de las hojas tanto en la parte abaxial como en el haz de la hoja lo que permite suponer la invasión y la alimentación del mismo en los tejidos vegetales considerándose un potencial patógeno, esta condición no se repitió para ningún otro aislamiento fúngico encontrándose más bien contaminación de epífitos que se potenciaron con las condiciones de incubación del bioensayo.

La ausencia general de lesiones y de evidencias para determinar la patogenicidad cualitativa de los aislamientos se asocia con las diferencias entre la vigorosidad de las hojas, la ausencia de condiciones idóneas para la patogenicidad de los mismos, la estimulación de oportunistas que contaminaron las determinaciones,

así como la posibilidad de incorporar muy poco inóculo (Sossa-Moss *et al.*, 1997), la acumulación de reguladores del crecimiento (Flores, 1999) y de sustancias elicitoras en forma diferencial en los tejidos por estimulación de la maquinaria genética de las defensas sistemáticas de las plantas (Grennan, 2006), la presencia diferencial de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) y de antioxidantes (Amirsadeghi *et al.*, 2006), la interacción de patógenos avirulentos con materiales resistentes y las combinaciones incompatibles de los genes de avirulencia con los defensivos de las plantas de donde se tomaron los tejidos (Ottado *et al.*, 2007), entre otros factores que influyen las relaciones planta-microorganismos. Para el caso de los ensayos de pellets sobre las láminas enteras de las hojas se contemplan los mismos factores anteriores para la ausencia de crecimiento del micelio vegetativo.

BIOENSAYOS DE MICROORGANISMOS SELECCIONADOS PARA SU CORRESPONDENCIA CON LA SINTOMATOLOGÍA DE CRESPERA DEL CAFÉ.

6.5 Bioensayos en invernadero

6.5.1 Selección de plantas de invernadero libres del patógeno *Xylella fastidiosa* para ensayos de infección mecánica y vectorial de bacterias aisladas.

La determinación de la inocuidad de las plantas para el patógeno *Xylella fastidiosa* permitió contar con material para el ensayo de infección mecánica y vectorial de los diferentes aislamientos microbianos, condición necesaria para discriminar resultados finales y controlar la variable “microorganismos inoculado” en el ensayo.

6.5.2 Determinación de la presencia de *Xylella fastidiosa* en el material vegetal de campo.

La investigación referente a la distribución de *Xylella fastidiosa* en los diferentes hospederos permite localizar las mayores concentraciones de la bacteria en las

regiones medias y superiores de las plantas producto de una distribución sistémica en la mayoría de los casos desde el punto de inóculo del patógeno y su posterior rastreo por medio de diferentes técnicas (Benetti *et al.*, 2005). En café se ha reportado la mayor incidencia de la bacteria en los tejidos maduros de los nudos más antiguos de estos estratos mencionados, reportándose valores de absorbancia que van desde 0.4000-1.6500nm principalmente en plantas sintomáticas pero con ocurrencia en plantas asintomática (Fournier, 2007). Debido a esto se escogió el tejido del entrenudo, pecíolo y vena central de lámina foliar de las bandolas de los estratos superiores e intermedios para la detección de la bacteria en materiales de campo e invernadero.

Los valores obtenidos en el monitoreo de la presencia de *X. fastidiosa* en las plantas de café de la parcela experimental de campo (0.8808nm) se encuentran entre el intervalo reportado por Fournier (2007) (0.8000-1.2000nm) para los estratos de transición inferiores-medios todos igualmente positivos para la incidencia de la bacteria en las plantas muestreadas para el discriminante 1S, sin embargo para los discriminadores 2S y 3S solo el 90% de las muestras se consideraron infectadas por la desviación estándar de los datos convirtiendo el 10% en una planta no infectada pero muy próxima al valor límite aún cuando todas las muestras provenían de plantas sintomáticas, esto anterior según Benetti y colaboradores (2005) se aprecia en plantas infectadas bajo una misma condición climática que se diferencian entre sintomáticas y asintomáticas por efecto del genotipo, considerándose también que diferentes patotipos de la bacteria infectan de forma diferencial los hospederos en diferentes concentraciones celulares.

Por otra parte la ausencia de la bacteria en las plantas de invernadero ensayadas según la prueba serológica con respecto a las plantas de campo permite suponer que factores naturales como los insectos vectores (que presentan gran cantidad de hospederos en los alrededores) a los que se encontraron expuestas estas últimas aunado a un manejo agronómico deficiente y la posibilidad de la transmisión de la bacteria por medio de podas con herramientas contaminadas

podieron ser el vehículo de infección en campo, mismas condiciones ausentes en las plantas de invernadero con ambiente semicontrolado (Redak *et al.*, 2004).

6.5.3 Determinación de la presencia de *Xylella fastidiosa* en cicadélidos.

Por su parte un resultado obtenido de 100% de incidencia de la bacteria *Xylella fastidiosa* en las poblaciones de cicadélidos y un 90-100% de la incidencia en plantas de campo en este ensayo también permite relacionar el comportamiento poblacional con la frecuencia de visita de hospederos objetivos como el café y suponer la posible transmisión eficiente de plantas de café infectadas a sanas por efecto de la actividad de los vectores o bien de forma interespecífica entre la vegetación circundante, de manera que ello indica que corresponden a uno de los principales medios de diseminación de la enfermedad en campo (Santos *et al.*, 2004). No obstante no todos los individuos se caracterizan por ser buenos vectores para la transmisión del patógeno *Xylella fastidiosa* ya que dicha cualidad está condicionada por la afinidad de colonización de la bacteria en el aparato bucal de los cicadélidos lo cual no es generalizado ni constata aún entre una misma especie (Redak *et al.*, 2004), además de la frecuencia de alimentación a partir de plantas infectadas y de el estado juvenil o senil de los vectores (Brodbeck *et al.*, 1995) que pierden la capacidad de infectar cada vez que generan una exúbia (EPPO/CABI, 1996).

Esto se refleja en las diferencias de absorbancias encontradas en la prueba serológica en las diferentes poblaciones de cicadélidos, las cuales a excepción de C7, C1 y NI no siguieron un patrón de abundancia y alta concentración endógena de la bacteria, lo que ha permitido suponer que no necesariamente se requieren de altas poblaciones de vectores para promover la enfermedad sino de vectores eficientes entendiéndose por eficientes aquellos vectores que presentan alta concentración de *X. fastidiosa* en su intestino anterior, dicha situación se evidencia al comparar la baja concentración de la bacteria en C13 (7% poblacional) con la alta concentración en C10 (2% poblacional) más de tres veces menos abundante esta última pero posiblemente más efectiva al infectar.

Poblaciones de microorganismos endógenos en los intestinos de los vectores pueden reducir la abundancia de *X. fastidiosa* al competir por un nicho o bien favorecerse por la alta exclusividad en una especie (Redak *et al.*, 2004). También la imposibilidad de generar polisacáridos de adhesión o la inactivación de genes que permiten la adhesión de los biofilms bacterianos fuertemente a las paredes de la cutícula de los insectos son factores que se determinan el éxito de la bacteria en el interior de sus vectores (Hopkins, 1977; Newman *et al.*, 2004).

6.6 Infección vectorial de plantas de invernadero en trampas con cicadélidos de campo en condiciones de laboratorio.

La sobrevivencia de los insectos está determinada principalmente por las condiciones ambientales donde se desarrollan en conjunto con la disponibilidad de alimento, factores que permiten estimar la longevidad de las diferentes etapas del ciclo de vida de los mismos cuando están en condiciones idóneas para las especies en particular. Existe preferencia además por el lugar de alimentación de los insectos según su hábito y capacidad alimenticia. Muchos insectos dependen de momentos fenológicos de las plantas, de la secreción de sustancias en estas, de estímulos fotosensibles, la temperatura y la humedad que determinan su ritmo de alimentación diurno (Gillot, 1980).

En este ensayo la obtención de individuos vivos luego de 15 días de cautiverio permite estimar que las condiciones proporcionadas fueron adecuadas para el desarrollo y alimentación de los insectos, situación requerida para evaluar la función vectorial de los mismos. En investigaciones realizadas por Segnini y Montagne (1986) sobre poblaciones de cicadélidos de *Empoasca kraemeri* mantenidos en condiciones de laboratorio (25°C, 50-70%HR y criados sobre hojas de frijoles jóvenes) se reportó una longevidad promedio de los adultos de 42.40-26.72 días sin diferencias estadísticas significativas entre los sexos, en este ensayo se presentan valores de sobrevivencia a los 15 días superiores para los machos cuando se crían en bandejas plásticas de mayor espacio y una sobrevivencia mayor para las hembras cuando se estiman en botellas de cría,

según Angarita y colaboradores (2007) el método de cría (incluyendo los recipientes) en insectos puede influir en la mortalidad de los mismos cuando se aplican o no factores de controlador sobre ellos. Sin embargo, en el caso de la población de edad desconocida empleada en esta investigación se considera que el factor determinante en la sobrevivencia fue la diferencia de madurez de las hembras y los machos, así como posiblemente factores de estrés diferenciales en los diferentes métodos de cría y al momento de la captura.

Referente a la determinación de la presencia de la bacteria *Xylella fastidiosa* en los cuerpos de individuos vivos y muertos recuperados de las jaulas de cría se estima que la diferencia entre la absorbancia inferior para los individuos muertos es producto del cese de la interacción de la señal bioquímica entre las células de la cutícula del aparato bucal e intestino anterior de los insectos con las bacterias y su exopolisacárido de adhesión (Newman *et al.*, 2004), además de la muerte progresiva del biofilm ante la escasez del alimento dentro del insecto, cuyo proceso de descomposición ha sido activado. Sin embargo, las absorbancias reportadas en ambos casos son altas y representan la capacidad de la bacteria de mantenerse en el interior del insecto por hasta ocho días en concentraciones infectivas detectables aún luego de que el insecto deje de alimentarse.

Estas altas concentraciones dentro de los insectos permiten suponer una adecuada actividad de transmisión vectorial y una posible infección en los hospederos de café del ensayo. En cuanto a los síntomas observados al mes y medio en las plantas no se tiene certeza de que fueron producto del proceso de aclimatación en condiciones de invernadero que aumentaron la temperatura y disminuyeron la humedad relativa del ambiente proporcionando estrés hídrico (Salisbury y Ross, 1992) o bien por efecto de algún patógeno, y más bien no se descarta el efecto de una visita masiva de insectos chupadores que tienen la capacidad de ingerir cien veces su volumen corporal en sabia de sus hospederos (Redak *et al.*, 2004).

Estos síntomas de estrés hídrico comúnmente son generalizados en la carga foliar de la planta, en este ensayo solo se acentuaron en las hojas bajas donde según McElrone y Forseth (2004) se presentan de forma diferenciada los efectos de la colonización de los vasos del xilema por parte de *Xylella fastidiosa*, en estudios realizados por estos investigadores en hospederos alternativos del patógeno determinaron la diferencia que existe en la disminución de la fotosíntesis producto del estrés hídrico provocado por la transpiración excesiva y la pérdida de agua vía estomática a diferencia de la disminución de la tasa fotosintética producto del bloqueo por *Xylella fastidiosa* donde los efectos en las hojas bajas se acompañan de acumulaciones excesivas de CO₂ en las mismas y se progresa a la senescencia foliar por pérdidas no estomáticas. No obstante, al cabo de tres meses las plantas mostraron menos quemaduras en las hojas y una mayor carga foliar producto posiblemente del acondicionamiento a las condiciones climáticas del invernadero o bien de una baja concentración del patógeno que expresa síntomas solo ante condiciones extremas de estrés y en etapas del crecimiento específicas como lo proponen Feil y colaboradores (2003) apuntando más hacia una asociación de condiciones de estrés y deficiencias nutricionales de elementos inmóviles.

Otro punto importante en este ensayo de infección vectorial es la detección del patógeno en diferentes lugares de las plantas infectadas, ya que los resultados mediante la prueba DAS-ELISA muestran incongruencias con la correspondencia de los síntomas en las partes bajas de las plantas donde se dieron aparentemente los rasgos iniciales de un posible estrés causado por un patógeno. Las absorbancias en los tejidos jóvenes de las plantas indican que la incidencia de la bacteria es mucho mayor y frecuente en un 100% de las determinaciones a diferencia de los tejidos tomados de los entrenudos más leñosos (33.33% para solo una determinación) en contradicción con resultados de investigaciones que determinan la menor detección del patógeno en tejidos jóvenes donde el sistema vascular es más incipiente (Buzcan y Walker, 2004).

La alimentación de los cicadélidos es particular en los tejidos en crecimiento y por ende en el más joven, lo que puede justificar la mayor concentración de bacteria en las muestras tomadas del entrenudo 3. Existen investigaciones que proponen la traslocación del patógeno cuando se inocula en tejidos jóvenes hacia los tejidos maduros y la mayor concentración en estos últimos (Buzcan y Walker, 2004); sin embargo, en este ensayo el patógeno parece ser poco translocado cuando se infecta por medio de vectores y no de forma dirigida. Estas características de translocación y de colonización varían con respecto a los hospederos (Alves *et al.*, 2004) y ello puede ser el resultado del comportamiento en esta etiología, además del tiempo de incubación del patógeno, el cual se estima que alcanza concentraciones sintomáticas en café luego de 8 meses de incubación (EPPO/CABI, 1996).

Se observaron además síntomas de deformación en las láminas foliares de algunas plantas, las cuales correspondían a hojas nuevas producidas luego del periodo de infección de los vectores y que correspondían a las regiones jóvenes de mayor absorbancia para la detección del patógeno lo cual guarda más correlación con un posible síntoma de *Xylella fastidiosa* que las quemaduras foliares de las hojas bajas detalladas anteriormente.

6.7 Infección mecánica de *Xylella fastidiosa* en plantas de invernadero.

La principal razón que se estima para la ausencia de síntomas confiables y más generalizados de la infección de *Xylella fastidiosa* en las plantas ensayadas para ambos métodos de inoculación mecánica, al igual que lo propuesto para la infección vectorial, es el periodo de incubación del patógeno con respecto al hospedero de café, para el cual se estima que al menos ocho meses tarda la bacteria en alcanzar cantidades infectivas sintomáticas (EPPO/CABI, 1996). Este patrón varía según el hospedero donde se inocule, Hill y Purcell (1997) realizaron investigaciones encontrando en plantas de vid que la bacteria se puede reproducir a partir de un inóculo inicial de 5×10^5 UFC/g alcanzando al cabo de 25 días 5×10^8 UFC/g y convirtiéndose en una planta de transmisión potencial, esta condición se

alcanza en hospederos de mora a los 22 días y en gramíneas a los 25. Otros investigadores han propuesto una infección más lenta donde se requieren al menos diez semanas para detectar síntomas en vid y 14 semanas para apreciar el cuadro típico de quema y encrespamiento foliar, aún cuando a las dos semanas de inoculado el material sea factible detectar al patógeno (Buzcan y Walker, 2004).

Respecto a los valores de absorbancias generados en este ensayo en las muestras de tejidos para ambos métodos de inoculación (valores de 0.202nm a 0.277nm) se consideran concentraciones bacterianas bajas en comparación con el inóculo inicial de 2.0×10^7 UFC/ml (valores mayores a 2.000nm) y que posiblemente estas plantas infectadas no se comporten a este periodo luego de la inoculación como eficientes mecanismos de propagación para la bacteria, esto como el producto de la variación entre diferentes hospederos que guarda el patógeno y de una tasa de reproducción más lenta.

El crecimiento de *Xylella fastidiosa* está relacionado con la colonización e invasión de tejidos adyacentes al inóculo y la formación del biofilm característico que afecta el transporte a través del xilema debido a la división anormal de los tejidos vasculares y en la corteza del pecíolo, tallo y mesófilo, reduciendo el número de cloroplastos y aumentando la acumulación de cristales de oxalato de calcio en estas últimas, a estos niveles de invasión es cuando se permiten ver los síntomas de las patologías (Benetti *et al.*, 1998). Según Alves y colaboradores (2004) el porcentaje de colonización es variable en los hospederos y en investigaciones realizadas en patrones de colonización de melocotón, cítricos y café se determinó que la relación de los síntomas expresados si guardan, al menos para el cultivo del café, una relación de aumento en el tiempo, ellos reportaron que la presencia de la bacteria en plantas con síntomas poco perceptibles es de 26% de colonización en los tejidos y alcanza una sintomatología severa cuando sobrepasa un 51.6% de la colonización. No obstante, esta condición no se mantiene constante entre los materiales que se ensayan ya que se han

encontrado concentraciones detectables en plantas asintomáticas (Fournier, 2007).

Otro factor que influye en la sintomatología y severidad de la enfermedad es la época de inoculación, la cual regula inclusive la recuperación de tejidos infectados. En ensayos establecidos para *in vivo* se ha demostrado que las plantas que se inoculan con *Xylella fastidiosa* ya sea vectorialmente o de forma artificial en los meses de crecimiento temprano de las plantas (abril-mayo) no se recuperan luego de una sintomatología severa temprana de la enfermedad, mientras que las plantas que se inoculan una vez superada la etapa tardía de crecimiento (junio-agosto) son recuperables hasta en un 100% (Feil *et al.*, 2003).

Se ha argumentado además que la expresión de los síntomas de la enfermedad corresponde muchas veces con las condiciones edafoclimáticas de las zonas afectadas funcionando como un detonante o un retardador de los síntomas severos, respecto a esto Benetti y colaboradores (2005) determinaron que en dos condiciones climáticas diferentes para el cultivo del café en Brasil la expresión de síntomas severos se presenta siempre que la planta enfrenta condiciones de estrés hídrico sin diferencias significativas en el nivel de ataque según sitio, evidenciándose la tolerancia bacteriana a diferentes climas. En esta misma investigación se detectaron diferencias por los lugares de preferencia de la bacteria dentro de la planta prefiriendo las venas centrales y el pecíolo en un sitio y el tallo y el pecíolo en el otro, observándose además que la bacteria no causa síntomas aéreos cuando coloniza las raíces en condiciones edafoclimáticas diferenciadas, de esta manera se determinó que es más influyente el lugar de colonización de la bacteria en la planta para la expresión de síntomas que las condiciones edafoclimáticas en si.

Respecto a los resultados de esta investigación y considerando los factores anteriores se estima que la aparición esporádica de un posible síntoma de la bacteria *Xylella fastidiosa* (Figura 5.19) reportado para plantas de café en Brasil (Barquero, 2007²) mediante Xf1 permite suponer un posible efecto del método de

inoculación sobre esta evidencia al comparar los datos de la efectividad de los métodos para infectar los tejidos. De esta forma la presencia de *Xylella fastidiosa* en cantidades detectables en un 96.7% de las muestras analizadas para el Xf1 contra un 66.7% para Xf2 muestran que el tejido del pecíolo de las hojas de los entrenudos intermedios y sus condiciones morfológica son más favorables para la rápida colonización del patógeno, condiciones que no se comparten con los tejidos más esclerotizados de las regiones intermedias del entrenudo en el tallo contempladas en el protocolo Xf2, resultados que concuerdan con la distribución mayor del patógeno en estas regiones de la planta que en el tallo (Krivanek y Walker, 2005) y que respaldan en la posición anterior de preferencia por sitios de colonización (Benetti *et al.*, 2005).

Por otra parte la aparición de deformaciones en las láminas de hojas nuevas con bordes ondulados y levemente alargadas (Figura 5.21) correspondientes a la sintomatología reportada para Brasil, se descartan como posibles síntomas del patógeno ya que estas mismas deformaciones se observaron en los controles de la prueba, los cuales fueron inocuos para *Xylella fastidiosa*. Dichas malformaciones en el material se consideran producto del ambiente donde se desarrollan, así como el producto de la ontogenia y la posible invasión de otros patógenos virales característicos de ese tipo de malformaciones (Salisbury y Ross, 1992).

Un aspecto importante de esta prueba es la absorbancia reportada en tejidos generados a partir del crecimiento posterior a la inoculación de las plantas, se considera que los valores positivos son producto de la traslocación de la bacteria por efecto de la potencial hídrico de la planta que permite llevar de forma sistémica las células bacterianas tanto de tejidos jóvenes a maduros como de estos últimos a jóvenes (Buzcan y Walker, 2004). En el caso de este ensayo solo se pudo medir con certeza la traslocación de tejidos maduros a jóvenes más no se descarta que la translocación general sea el resultado de encontrar cantidades proporcionales en tejidos maduros inoculados y en jóvenes no inoculados.

Según Krivanek y Walker (2005) la translocación bacteriana se puede comportar de forma diferente en tejidos resistentes y susceptibles inoculados artificialmente, mediante sus investigaciones realizadas en plantas de vid lograron determinar que luego de 12 meses en los materiales resistentes hay más concentración bacteriana en las hojas que en el tallo mientras que en materiales susceptibles la invasión sistémica es alta en ambas partes y esto es la diferencia entre las sintomáticas y asintomáticas infectadas.

Relacionado a esto también se considera que las diferencias obtenidas en la absorbancia para los tejidos muestreados bajo un mismo método Xf1 o Xf2 son causa de la penetración heterogénea y parcial de la gota de inóculo, posición que según Buzcan y Walker (2004) tiene relación con la morfología y madures diferencial del lugar donde se inocule, ellos consideran que los tallos más suaves son más difíciles de inocular que aquellos tejidos más leñosos y maduros; sin embargo, en ambos tipos una vez inoculada al menos una pequeña concentración de bacteria se establece el patógeno en cantidades detectables. En ensayos realizados sobre plantas de vid se demostró la afinidad de colonización por lugares más específicos de las plantas como el segundo y tercer entrenudo localizados a distancias de 20-25cm del inóculo inicial (Buzcan y Walker, 2004), lo que además de exponer la translocación ya comentada de la bacteria en la planta permite suponer que las diferencias mostradas en las absorbancias entre sitios de la misma planta en este ensayo con hospederos de café es producto de la afinidad propuesta.

También un elemento que influye en la determinación de las cantidades en plantas infectadas es el tipo de muestra que se utilice para detectar el patógeno, en ensayos realizados por Bextine y Miller (2004) determinaron que en tejidos igualmente infectados las muestras de savia exhiben mayores absorbancias (más del doble) para la detección de *Xylella fastidiosa* que las muestras de tejido macerado tanto en vid como en adelfa en plantas asintomáticas.

6.8 Infección mecánica de *Geobacillus spp* y *Pseudomonas fluorescens* en plantas de invernadero.

La ausencia de sintomatología de la enfermedad de “Crespera” reportada para café en las plantas ensayadas permite suponer que factores como el poco tiempo de incubación de las bacterias para alcanzar las concentraciones sintomáticas (Hill y Purcell, 1997), las condiciones ambientales (Benetti *et al.*, 2005), el poco éxito de los protocolos para incorporar los posibles patógenos en las plantas (Buzcan y Walker, 2004) así como la posible inocuidad de los microorganismos ensayados son factores que intervienen en los resultados mostrados en esta prueba los cuales no son concluyentes ni excluyentes al nivel del tiempo en que se evaluó (Figura 5.22 y 5.23).

Al igual que en las malformaciones presentadas en el ensayo de inoculación de *Xylella fastidiosa* en las plantas inoculadas con *Geobacillus spp* y *Pseudomonas fluorescens* (Figura 5.24) se repitieron dichos síntomas en los controles de la prueba por lo que se consideran el efecto de la expresión del ambiente y el genotipo de las plantas que influyen la ontogenia normalizada, sin descartar la posibilidad de infección viral que provoque los síntomas (Salisbury y Ross, 1992).

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

El protocolo C a diferencia del A y B mostró ser el más apto para la obtención de endófitos y microorganismos asociados de lento crecimiento y de baja densidad en los tejidos, el protocolo D para la obtención de microorganismos a partir de cicadélidos permitió obtener alta diversidad en los aislamientos.

La temperatura de 28°C y la incubación en ausencia de luz para los aislamientos de *Xylella fastidiosa* en BCYE, mostraron ser adecuados para obtener el crecimiento moderado a los 22 días de inoculación del patógeno mayormente asociado a la enfermedad de “Crespera”.

Xylella fastidiosa se puede mezclar en cultivos de endófitos que crecen más rápidamente y cuya morfología colonial es más evidente que la del patógeno.

Las pruebas bioquímicas preliminares en agar TSI contribuyeron con el patrón metabólico de la prueba BIOLOG para dirigir con mayor exactitud la identificación de microorganismos bacterianos en cultivos puros.

Salvo el aislamiento *Serratia marcescens* ID 1, que se encontró tanto en cicadélidos como en plantas, el resto de los microorganismos no correspondieron entre si, suponiendo una barrera biológica de penetración en las plantas para la mayoría de microorganismos endógenos en cicadélidos.

No hay certeza que los resultados obtenidos en la prueba serológica DAS-ELISA correspondieron a deficiencias en la sensibilidad de la misma, sin embargo se debe acompañar dicha prueba con la validación mediante PCR para asegurar la identidad de los aislamientos.

La acumulación de cristales foliares ante la presencia de *Geobacillus spp* y *Staphylococcus cohnii*, así como, la proliferación de *Pythium spp* ID9 en las hojas,

permitió discriminar la patogenicidad cualitativa de estos microorganismos. La contaminación de los ensayos distorsionó el efecto real de los microorganismos al igual que la madurez diferencial y el estado fisiológico del tejido.

Los cicadélidos C07 mostraron ser un vector eficiente para la transmisión del patógeno *Xylella fastidiosa* en tejidos jóvenes de plantas de café cuando se mantuvieron en laboratorio a 23°C y 70% de humedad relativa.

Generalmente las poblaciones más abundantes de cicadélidos colectados presentaron las concentraciones más altas de *Xylella fastidiosa*.

El método de inoculación mecánica en pecíolos de hojas intermedias, mostró ser más adecuado para incorporar a *Xylella fastidiosa* en cantidades detectables en las plantas que el método de puntura en la región del entrenudo. Ambos métodos determinaron la capacidad de la bacteria de translocarse dentro de la planta.

El periodo de observación para la producción de posibles síntomas de la enfermedad “Crespera en café” en los bioensayos de infección con el patógeno *Xylella fastidiosa* y los endófitos *Geobacillus spp* y *Pseudomonas fluorescens* se consideró insuficiente.

CAPÍTULO 8

RECOMENDACIONES

Combinar protocolos de aislamiento de endófitos, medios de cultivo más estándares y condiciones de incubación variables para acumular mayor número obtenciones y evaluar la relación que pueden tener estos con la enfermedad de “Crespera en Café”.

Aplicar técnicas moleculares de mayor especificidad y confianza que las pruebas bioquímicas para la identificación de endófitos y patógenos a nivel de especie, para mantener una base de datos microbiana más específica.

Mantener bioensayos de los endófitos obtenidos sobre material vegetal a diferentes condiciones ambientales para determinar la posible estimulación patogénica estacional de las obtenciones.

Enfocar investigaciones en los aislamientos diferenciales de microorganismos en plantas y cicadélidos, considerando a los primeros como posibles barreras biológicas de entrada y control biológico de otras especies potenciales fitopatógenos presentes en los segundos.

Realizar investigaciones enfocadas en la capacidad metabólica de *Xylella fastidiosa* de convivir por mecanismos sintróficos o mutualista con endófitos para avanzar en su biocontrol.

Mantener en observación las plantas asintomáticas en las cuales se detectó *Xylella fastidiosa* ante el posible crecimiento reducido y lento metabolismo de este patógeno, antes de alcanzar cantidades infectivas sintomáticas.

Ensayar diferentes combinaciones y cultivos puros de microorganismos en conjunto con el patógeno *Xylella fastidiosa* para dilucidar una posible interacción o la acción singular en hospederos seleccionados.

CAPÍTULO 9

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, W; Habib, M; Berrigton, A; Koerner, R y Steel, D. 2006. Postoperative endophthalmitis caused by *Sphingomonas paucimobilis*. En: *Journal of Cataract & Refractive Surgery* 32 (7): 1238-1240.
- Agdia, 2008¹. AGDIA TESTING SERVICE GUIDE. <<http://www.agdia.com/testing/>> Consultado 13/07/2008.
- Agdia, 2008². Reagent Set. DAS ELISA, Peroxidase Label. Agdia Incorporated. Ficha Técnica del Protocolo de Detección para el Patógeno *Xylella fastidiosa* (m 17.3). <<http://www.agdia.com/doc/m17.3.pdf>> (Consultado 14/07/2008).
- Albarado, L; Flores, E; Mendoza, G; Mundarain, T. 2007. Asociación de *Klebsiella spp.*, con síndrome diarreico agudo en niños de 0 a 2 años de edad. En: *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo* 11 (3): 7-12.
- Almeida, R. y Purcell, A. 2003. Transmission of *Xylella fastidiosa* to grapevines by *Homalodisca coagulata* (Hemiptera: Cicadellidae). En: *J. of Econ. Entomol.* 96 (2): 264-271.
- Álvarez, E; Llano, G; Loke, Jy Mejia, J. 2004. Applying Biotechnology Tools to Improve Control Diseases of Some Tropical Crops. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) Cali, Colombia. En: *Fitopatología Colombiana* 28 (2): 93-97.
- Álvarez, M; Linares, P; Bailador, A; Suárez, P y Olcoz, J. 2006. Bacteriemia por *Staphylococcus cohnii* asociado a colecistitis aguda. En: *An. Med. Interna (Madrid). Cartas al director* 23 (1): 51-52.
- Alves, E; Marucci, C; Lopes, J y Leite, B. 2004. Leaf symptoms on plum, coffee and citrus and the relationship with the extent of xylem vessels colonized by *Xylella fastidiosa*. En: *J. Phytopathology* 152: 291-297.
- Amirsadeghi, S; Robson, C; McDonald, A y Vanlerberghe, G. 2006. Changes in plant mitochondrial electron transport alter cellular levels of reactive oxygen species and susceptibility to cell death signaling molecules. En: *Plant Cell Physiol* 47 (11): 1509-1519.
- Andersen, P; Brodbeck, B y Mizell, R. 1992. Feeding of the Leafhopper *Homalodisca coagulata* in relation to xylem fluid chemistry and tension. En: *J. Insect. Physiol* 38: 611-612.
- Angarita, M; Díaz, A y Escobar, M. 2007. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii* Y DOS EXTRACTOS (AJO-AJI Y AJO) SOBRE EL CONTROL DE MOSCA BLANCA *Trialeurodes vaporariorum* EN EL CULTIVO DE LA HABICHUELA *Phaseolus vulgaris* EN PIEDECUESTA Y SANTA BARBARA, SANTANDER. Trabajo de Tesis. Universidad Francisco de Paula Santander:

- Ingeniería de Producción Biotecnológica. San José de Cúcuta, Colombia. <<http://www.cdmb.gov.co/ciaga/moscablancaprueba.pdf>> Consultado 25/07/2008.
- Araújo, O; Vidal, F; Tapiola, J y Richard, C. 2000. Osteomielitis por *Sphingomonas paucimobilis*. En: *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 18 (5): 247.
- Araújo, W; Marcon, J; Maccheroni, W; Elvas, J; Vourde, J y Azevedo, J. 2002. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. En: *Appl. Environ. Microbiol* 68 (10): 4906-4914.
- Ardila, D y Arguello, M. 1993. Producción de pellets del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* en condiciones de birreactor. En: Universidad de América. Facultad de Ingeniería Química, Santafé de Bogotá (Colombia) 369 p. <<http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IscScript=GREYLIT.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expression=mfn=003725>> Consultado 24/07/2008
- Avallone, S; Brillouet, J; Guyot, B; Olguin, E; Guiraud, J. 2002. Involvement of pectolytic micro-organisms in coffee fermentation. En: *International journal of food science & technology* 37 (2): 191-198.
- Barquero, M. 2007¹ Cafetaleros urgen renovar plantaciones. Nota Periodística. La Nación, San José Costa Rica. Febrero 19 de 2007.
- Barquero, M. 2007². Situación actual del conocimiento de la "Crespera" del café. Instituto del Café de Costa Rica. En: *Boletín Informativo CICAPE* 2007. 10 p.
- Barquero, M. 2007³. La producción de *Beauveria bassiana* para el combate de la broca. Ponencia 11. En: I Simposio Nacional de Caficultura. Instituto del Café de Costra Rica. (2007 Heredia, Costa Rica) s.p.
- Barquero, M. 2008. La enfermedad en las plantas y su relación con la nutrición mineral. Instituto del Café de Costa Rica. En: *Revista Informativa I*: 6-8.
- Bell, A; Lopez, J; Esquivel, J; Medrano, E y Mauney, J. 2005. Isolation of cotton seed-rotting *Pantoea spp.* from stink bugs and plant bugs. En: Proceedings of the Beltwide Cotton Conferences (New Orleans, Louisiana, January 4-7, 2005): s.p. <http://arsserv0.tamu.edu/research/publications/publications.htm?SEQ_NO_115=176993&pf=1> Consultado 18/07/2008.
- Benetti, R; Paradela, O; Carvalho, M y Irineu, J. 1998. Aspectos Estruturais de Caffeiro Infectado com *Xylella fastidiosa*. En: *Bragantia* 57(1): 1-14.
- Benetti, R; Perosin, L; Paradela, O; Varvalho, M; Irineu, J y Fazuoli, L. 2005. Efeito da *Xylella fastidiosa* em cafeeiros em diferentes regiões edafoclimáticas. En: *Bragantia, Campinas* 64(1): 89-100.
- Bernal, M; Bustillo, A; Chaves, C y Benavides, M 1999. Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) populations emerging from fallen coffee fruits on the soil. En: *Revista Colombiana de Entomologia* 25 (1-2): 11-16.

- Bextine, B y Miller, T. 2004. Comparison of Whole-Tissue and Xylem Fluid Collection Techniques to Detect *Xylella fastidiosa* in Grapevine and Oleander. En: *Plant Disease* 88 (6): 600-604.
- Bhattacharyya, A; Stilwagen, S; Ivanova, N; D'Souza, M; Bernal, A; Lykidis, A; Kapatral, V; Anderson, I; Larsen, N, Los, T; Reznik, G; Selkov, E, Walunas, T; Feil, H; Feil, W; Purcell, A; Lassez, J; Hawkins, T; Haselkorn, R; Overbeek, R; Predki, P y Kyrpides, N. 2002. Whole-genome comparative analysis of three phytopathogenic *Xylella fastidiosa* strains. En: *PNAS* 99 (19): 12403-12408.
- Blackwell, M y Vega, F. 2004. Seven wonders of the insect-fungus world. En: Vega, F y Blackwell, M. Ed. INSECT-FUNGAL ASSOCIATIONS: Ecology and Evolution. Oxford University Press. Nueva York, USA: 352.
- Borbón, O; Mora, O; Cisneros, B; Obando, J; Rodríguez, G; Alpízar, J y Arias, J. 1997. ESTUDIOS DE CONTROL QUIMICO Y MANEJO DEL OJO DE GALLO (*Mycena citrilo*). En: Memoria Resultados y Avances de Investigación 1997. CICAFA – ICAFE. <<http://www.infoagro.go.cr/Agricola/tecnologia/cafe97/cafe6.htm>> Consultado 25/07/2008.
- Bradbury, J.F., 1991. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. En: CAB 1049. International, Wallingford, UK. s.p
- Brodbeck, B; Andersen, P y Mizell, R. 1995. Differential Utilization on Nutrients During Development by the Xylophagous *Homalodiscxa coagulate*. En: *Entomol. Exp. Appl* 75: 530-535.
- Broderick, N; Raffa, K y Handelsman, J. 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. En: *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (41): 15196-15199.
- Bueno, V y van Lenteren, J. 2002. THE POPULARITY OF AUGMENTATIVE BIOLOGICAL CONTROL IN LATIN AMERICA: HISTORY AND STATE OF AFFAIRS. En: First International Symposium on Biological Control of Arthropods. SDA Forest Service, Forest Health Technology Enterprise Team. (2002 Honolulu, Hawaii, USA). <<http://www.bugwood.org/arthropod/>> Consultado 21/07/2008
- Buzcan, N y Walker, M. 2004. Effect of Tissue on the Inoculation and Detection of *Xylella fastidiosa* in the Grapevine. En: *Turk J Agric For* 28: 341-342.
- Caballero, E y Vega, S. 2000. Manual de Colección y Transporte de Muestra Microbiológica. Complejo Hospitalario Metropolitano Dr. Arnulfo Arias Madrid, C.S.S. República de Panamá. <<http://www.monografias.com/trabajos5/mumicro/mumicro.shtml?relacionados>> Consultado 20/07/2008.
- Cadena, G y Gaitán, A. 2006. Las enfermedades del café: logros y desafíos para la caficultura colombiana del siglo XXI. En: Experiencias. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* (Costa Rica) (77): 89-93.

- Cafeicultura. 2006. Coffe Plant Diseases. En: *Cafeicultura a Revista do Agronegócio Café*. Versión digital <<http://www.revistacafeicultura.com.br/index.php?tipo=ler&mat=6583>> Consultado 08/07/2008.
- Campos, E. 1984. El "Ojo de Gallo", la "Enfermedad Rosada" y el "Mal de Hilachas" son enfermedades que deben combatirse en esta época. En: *Noticiero del Café* 20 (234): p 4.
- Carone, M. 2003. Bacterias Fitopatógenas. INISAV. Instituto en investigaciones de sanidad vegetal. Ed. Centro de información y documentación de sanidad vegetal (CIDISAV). Ciudad de la Habana, Cuba.
- Castro, A y Rivillas, C. 2005. Bioregulación de *Rhizoctonia solani* en Germinadores de Café. En: *Boletín CENICAFÉ* 336. <<http://www.cenicafe.org/modules.php?name=News&file=article&sid=652>> Consultado 08/07/2008.
- CENICAFE. 2008¹. En una década esperan obtener variedad de café que sea resistente a la broca. En: *Información General*. Marzo de 2008. <<http://www.cenicafe.org/modules.php?name=News&file=article&sid=1593>> Consultado 13/07/2008.
- CENICAFE. 2008². Enfermedades y Disturbios del Café. ENFERMEDADES QUE ATACAN.<http://www.cenicafe.org/modules.php?name=Enfermedades_y_Disturbios_del_Cafe&lite=0> Consultado 13/07/2008.
- Chávez, V; Obando, J y Rodríguez, C. 2000. Crespada del café en Costa Rica asociado a la presencia de *Xylella fastidiosa* Wells *et al.*. Centro de Investigación en Café de Costa Rica (CICAFE). En: *Boletín Informativo*: p 11.
- Chen, S; Wang, Y; Chen, F; Yang, H; Gan, M y Zheng, S. 2007. A Highly Pathogenic Strain of *Staphylococcus sciuri* Caused Fatal Exudative Epidermitis in Piglets. En: *PLoS ONE* 2 (1):p 147.
- CICAFE. 2008. Datos estación meteorológica CICAFE, San Pedro de Barva, Heredia Costa Rica. Resumen Meteorológico Mensual. Marzo, Abril y Mayo de 2008. Documento institucional interno.
- Cock, A y Lévesque, A. 2004. New Species of *Pythium* and *Phytophthora*. En: *Studies in Mycology* 50: 481-487.
- Conci, V. 2004. Obtención de plantas libres de virus. En: *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal* VIII-Capítulo 5. INTA Ediciones 2004: 303-312. <http://www.inta.gov.ar/ediciones/2004/biotec/parte8_cap5.pdf> Consultado 20/07/2008.
- Couto, I; Santos, I; Sá-Leão, R y de Lencastre, H. 2000. Molecular Characterization of *Staphylococcus sciuri* Strains Isolated from Humans. En: *Journal of Clinical Microbiology* 38 (3): 1136-1143.
- Cuéllar, L; Vicente, W y Silva, M. 2005. Cepas de *E. coli* y *Klebsiella spp.* Productoras de betalactamasas de espectro extendido en aislamientos clínicos de infecciones

- intrahospitalarias en un Hospital Oncológico, en Perú. En: XII Congreso de la Asociación Panamericana de Infectología. VI Congreso Venezolano de Infectología. II Simposio Latinoamericano y del Caribe de Infecciones de Transmisión Sexual. (2005 Caracas, Venezuela). <<http://caibco.ucv.ve/caibco/CAIBCO/Vitae/VitaeVeintidos/Congreso/ArchivosPDF/codigo84.pdf>> Consultado 18/07/2008
- Dakwa, J. 1985. A survey of coffee diseases in Ghana.. En: COLLOQUE Scientifique International sur le Café, 11. (1985, Lomé, Togo). Editado en París (Francia), ASIC: 655-657.
- De la Cruz, A; Poplawsky, A Wiese, M. 1992. "Biological Suppression of Potato Ring Rot by Fluorescent Pseudomonads". En: *Applied & Environmental Microbiology* 58 (6): 1986-1991.
- Delgadillo, R; Virgen, G; Tabares, F; Olalde, V. 2001. Bacterias promotoras del crecimiento de plantas: agro-biotecnología. En: *Avance y Perspectivas* 20: 395-400.
- Echeverría, L; Cifuentes, G; Granados, J; Arias, J y Fernández, C. 2007. Cinética de desinfección para cinco desinfectantes usados en la industria farmacéutica. En: *Rev. Cub. Farm* 41 (2). <http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol41_2_07/far06207.html> Consultado 17/07/2008
- EPPO/CABI. 1996. *Xylella fastidiosa*. Data Sheets on Quarantine Pest for the UE. En: EPPO Quarantine Pest. CAB INTERNATIONAL (1996, Wallingford, UK): 1-10.
- Escobar, M; Carbonel, G; Beriam, L; Siquiera, W y Yano, T. 2001. Cytotoxin production in phytopathogenic and entomopathogenic *Serratia marcescens*. En: *Revista Latinoamericana de Microbiología* 43 (4): 165-170.
- Fankhauser, D. 2001. TRIPLE SUGAR IRONAGAR AND ITS USE. University of Cincinnati Clermont Collage. <http://biology.clc.uc.edu/Fankhauser/Labs/Microbiology/Triple_Sugar_Iron/TSI_Use.htm> Consultado 13/07/2008.
- FAO. 2001. *Coffea arábica* <<http://www.fao.org/ag/AGA/AGAP/FRG/afri/es/Data/540.htm>> 14/04/2008.
- FAO/OMS. 2007. INVENTARIO DE COADYUVANTES DE ELABORACIÓN (ICE), LISTA ACTUALIZADA. PROGRAMA CONJUNTO FAO/OMS SOBRE NORMAS ALIMENTARIAS. COMITÉ DEL CODEX SOBRE ADITIVOS ALIMENTARIOS. <http://www.cacia.org/documentos/codex/fa39_14sInventariodecoadyuvantes.pdf> Consultado 18/07/2008.
- Farias, P; Roberto, S; Lopes, J y Perecin, D. 2003 . Geostatistical Characterization of the Spatial Distribution of *Xylella fastidiosa* Sharpshooter Vector on Citrus. En: *Neotropical Entomology* 33 (1): 13-20.
- Feil, H; Feil, W y Purcell, A. 2003. Effects of date inoculation on the within-plant movement of *Xylella fastidiosa* and persistence of Pierce's Disease within field grapevines. En: *Phytopathology* 93 (2): 244-251.

- Fernández, S y Cordero, J. Biología de la Broca del Café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleóptea: Curculionidae: Scotynae) en Condiciones de Laboratorio. En: *Bioagro* 19 (1): 35-40.
- Finch, H y Finch, A. 1990. Los hongos comunes que atacan cultivos en América Latina. 2da Ed. Editorial Trillas. México, D.F. 189p.
- Flores, E. 1999. La planta: Estructura y Función. Volumen I y II. Libro Universitario Regional. Cartago Costa Rica. 884p.
- Fournier, S. 2007. Dinámica de la Sintomatología de Crespada del Café y su Relación con la Presencia de la Bacteria *Xylella fastidiosa* (Wells *et al*). Informe de Trabajo Final de Graduación. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 70p.
- Fundecitrus. 2004. Clorose Variegada dos Citros – CVC. <<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cvc.html>> Consultado 13/07/2008.
- Galvis, A; Galvis, G; Gaitán, A y Martínez, G. 2004. La Crespada del Cafeto: Búsqueda de Vectores Potenciales. Virología. Universidad de Caldas, Manizales, Colombia. En: *Boletín Fitotecnia* 088:1-4.
- Galvis, C; Leguizamón, J; Gaitán, A Mejía, J; Álvarez, E y Arroyave, J. 2007. Detection and Identification of a 16SrIII-related phytoplasma associated with coffee crispiness disease in Colombia. En: *Plant Dis.* 91: 248-252.
- Gamboa, A. 2008. Regional Los Santos coordina actividades técnicas. Instituto del Café de Costa Rica. En: *Revista Informativa I*:13-14.
- Garland, J. 1999. Potential and limitations of BIOLOG for microbial community analysis. methods of microbial community análisis microbial biosystems: new frontiers proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology Bell CR, Brylinsky M, Johnson-Green P(ed) Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada. s.p.
- Gibbons, R; Cohen, L y Hay, D. 1986. Strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* attach to different pellicle receptors. En: *Infect Immun* 52 (2): 555-561.
- Gillot, C. 1980. Food Uptake and Utilization. Entomology. Ed. Plenum Press. New York, USA: 439-441.
- Giraldo, M; Leguizamón, J y Córdoba, B. 1998. Evaluation of *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson for the control of *Meloidogyne* in coffee nurseries (*Coffea arabica*) variety Caturra. En: *Fitopatología Colombiana* 21 (2):104-117.
- González, P; Souza, P; Wickert, E; Donadio, L. 2002. Avaliação da resistencia à *Xylella fastidiosa* em germoplasma de tangerina e híbridos introduzidos da Itália e Córsega. En: *Rev. Bra. Fruct., Jaboticabal-SP.* 24 (2): 579-582.

- Gonzalez, A. 1997. "Diagnostico de la Competitividad de la Industria del Cafe de Costa Rica." En: INCAE (Executive Director of Juan Viñas Estate and Consultant to INCAE). San José, Costa Rica. s.p
- Gould, A y Lashomb, J. 2007. Bacterial leaf scorch (BLS) of shade trees. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2007-0403-07. En: *The American Phytopathological Society*. <<http://www.apsnet.org/LessonPlantPath/Top.html>> Consultado 04/07/2008
- Grennan, A: 2006. Plant Response to Bacterial Pathogens. Overlap between Innate and Gene-for-Gene Defense Response. En: *Plant Physiology* 142: 809-811.
- Grijalva, O y Giraldo, G. 2006. Simbiosis bacteriana en insectos. En: *Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle* 7 (2): 24-40.
- Harrington, T. 2004. Diseases Causes by *Ceratocystis*. National Science Fundation Iowa, USA. En: *Crop Protection Compendium* 2004. <<http://www.public.iastate.edu/~tcharrin/CABInfo.html>> Consultado 08/07/2008
- He, C; Li, W; Ayres, A; Harturg, J; Miranda, V y Texeira, D. 2000. Distribution of *Xylella fastidiosa* in citrus rootstocks and transmission of citrus variegated clorosis between sweet orange plants through natural root grafos. En: *Plant Disease* 84: 622-626.
- Hendson, M; Purcell, H; Chen, D; Smart, C; Guilhabert, M y Kirkpatrick, B. 2001. Genetic Diversity of Pierce's Disease Strains and Others Pathotypes of *Xylella fastidiosa*. En: *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 895-903.
- Hernández, L y Ochoa, F. 1996. Detección de *Xylella fastidiosa* Wells *et al.* Por ELISA-DAS en Vid (*Vitis vinifera* L) y malezas en viñedos del municipio Mara, estado Zulia, Venezuela. En: *Rev. Fac. Agron (LUZ)* 14: 297-306.
- Hernandez, R; Costa, H, Dumenyo, C y Cooksey, D. 2006¹. Differentiation of Strains of *Xylella fastidiosa* Infecting Grape, Almond, and Oleander Using a Multiprimer PCR Assay. En: *Plant Disease* 90:1382-1388.
- Hernandez, R; Pinckard, T; Costa, H y Cooksey, D. 2006². Discovery and Characterization of *Xylella fastidiosa* Strains in Souther California Causing Mulberry Leaf Scorch. En: *Plant Disease* 90: 1143-1144.
- Hidalgo, M; Rodríguez, R; Ricardo, N y Ferras, H. 1999. Dinámica poblacional de cicadélidos (Homoptera: Cicadellidae) en un agroecosistema cañero de Cuba. En: *Bio. Trop* 47(3). s.p.
- Hill, B y Purcell, H. 1997. Populations of *Xylella fastidiosa* in Plants Required for Transmission by an Efficient Vector. En: *Phytopathology* 87 (12): 1197-1201.

- Hill, B. y Purcell, A. 1995. Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grapevine and four other plants. En: *Phytopathology* 85: 1368-1372.
- Hopkins, D. 1977. Diseases caused by leafhopper-borne, Rickettsia-like bacteria. En: *Annu. Rev. Phytopathol* 17: 271-294.
- lañes, E. 1998. Citoplasma. Inclusiones Citoplasmáticas. Hipertextos del área de biología. <http://fai.unne.edu.ar/biologia/microgeneral/micro-ianez/08_micro.htm> Consultado 13/06/2008.
- ICAFFE. 2008. Galería de Fotos, “El Cafetal”. <http://www.icafe.go.cr/cafe_online/galerias/cafetal.html> Consultado 13/07/2008.
- ICAFFE. Instituto del Café de Costa Rica. 2008¹. Informe sobre la participación del cultivo del café en la economía costarricense. Documento Interno ICAFFE (2008, San José C, R) <http://www.icafe.go.cr/sector_cafetalero/estadsticas/estadisticas.html> Consultado 03/07/2008.
- ICAFFE. Instituto del Café de Costa Rica. 2008². Informe sobre producción, producción por país, importaciones, consumo y precios ICO del Café. Documento Interno ICAFFE (2008, San José C, R) <http://www.icafe.go.cr/sector_cafetalero/estadsticas/estadisticas.html> Consultado 03/07/2008.
- ICAFFE. Instituto del Café de Costa Rica. 2008³. Página de información principal. Misión del ICAFFE. <<http://www.icafe.go.cr/icafe/icafe.html>> Consultado 03/07/2008.
- Igarisha, T; Yamamoto, A y Goto, N. 2000. PCR for detection and identificaction of *Streptococcus sobrinus*. En: *J. Med. Microbiol* 49: 1069-1074.
- Infoagro. 2002. Cultivo del Café. Generalidades y Caracteres Botánicos. <<http://www.abcagro.com/herbaceos/industriales/cafe.asp>> Consultado 03/07/2008
- Iwazawa, H; Vargas, A; Solórzano, A y Sánchez, E. 2001. Microscopio electrónica de transmisión del agente causal de la crespeta (*Xylella fastidiosa*) en el cultivo del café. Instituto del Café de Costa Rica. En: *Boletín Informativo*: 133-138.
- Jayamani, A. 2006. Studies on the antagonistic effect of rhizobacteria against soilborne *Phytophthora* species on strawberry. Tesis de doctorado. Salem, India Universidad de Hannover.. 129 p.
- Kanki, M; Yoda,T; Tsukamoto, T y Shibata, T. 2002. *Klebsiella pneumoniae* Produces No Histamine: *Raoultella planticola* and *Raoultella ornithinolytica* Strains Are Histamine Producers. En: *Appl Environ Microbiol* 68 (7): 3462–3466.
- Klug, W y Cummings, M. 1999. Conceptos de Genética. 5ta. Ed. Prentice Hall Iberia. Madrid, España.p. 641.
- Kodaka, H; Armfield, A; Lombard, G y Dowell, V. 1982. Practical procedure for demonstrating bacterial flagella. En: *J. Clin. Microbiol* 16: 948-952.

- Koide, T; Zaini, P; Moreira, L; Vencio, R; Matsukuma, A; Durham, A; texeira, D; El-Dorry, H; Monteiro, P; da Siva, A; Verjovski, S; da Silva, A. M y Gomes, S. 204. DNA Microarray-Based Genome Comparison of a Pathogenic and a Nonpathogenic Strain of *Xylella fastidiosa* Delineates Genes Important for Bacterial Virulence. En: *Journal of Bacteriology* 186(16): 5442-5549.
- Krivanek, A y Walker, M. 2005. *Vitis* Resistance to Pierce's Disease Is Characterized by Differential *Xylella fastidiosa* Population in Stem and Leaves. En: *Phytopathology* 95 (1): 44-52.
- Laranjeira, F; Bergamín, A; Amorim, L y Gottwald, T. 2004. Dinámica Espacial de Clorosis Variegada de los Cítricos en Tres Regiones del Estado de Sao Paulo. En: *Fitopatol. Bras.* 29(1): 56-58.
- Lavaca, P; Araújo, W; Maccheroni, E y Azevedo, J. 2001. RADP profile and antibiotic susceptibility of *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus variegated chlorosis. En: *Letters in Applied Microbiology* 33: 302-306.
- Leite, B; Craig, P y Ishida, M. 2003. Colony aggregation and biofilm formation in xylem chemistry-based media for *Xylella fastidiosa*. Elsevier B.V En: *FEMS Microbiol. Letters* 230 (2004): 283-290.
- Lenicov, A; Paradell, S; de Coll, O y Agostini, J. 1999. Cicadélidos asociados a citrus afectados por clorosis variegada (CVC) en la república Argentina (Insecta: Homoptera: Cicadellidae). En: *Rev. Soc. Entomol. Argen* 58: 211-25.
- Lima, A., Quecine, M; Fungaro, M; Andreote, F; Maccheroni, J; Araújo, W; Silva-Filho, m; Pizzirani, A y Azevedo, J. 2005. Molecular characterization of beta-1-4-endoglucanasa from an endophytic *Bacillus pumilus* strain. En: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68 (1): 57-65.
- Lopes, S; Marcussi, S; Torres, S; Souza, V; Fagan, C; França, S; F; Fernández, N y Lopes, J. 2003. Weeds as alternative host of the citrus, coffee and plum strains of *Xylella fastidiosa* in Brazil. En: *Plant Disease*. 87: 544-549.
- Madigan, M; Martinko, J y Parker, J. 2004. Brock. Biología de los Microorganismos. Décima Edición. Editorial Pearson Education, S.A. Madrid, España. p. 12-15.
- Madriz, K y Peraza, J. 2007. Extracción de ADN de alto peso molecular a partir de material vegetal macerado. Manual de laboratorio de Biología Molecular. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Escuela de Biología. p 11.
- Mariño, Y. 2007. Identificación de bacterias em cicadélidos vectores potenciales de *Xylella fastidiosa* Wells *et al*, que se alimentan del tejido vascular de plantas de café *Coffea arábica* L en tres localidades de Puerto Rico. Tesis de Maestría. Universidad de Puerto Rico. 1-160 p.
- Martin, F y Loper, J. 1999. Soilborne Plant Diseases Caused by *Pythium* spp.: Ecology, Epidemiology, and Prospects for Biological Control. En: *Critical Review in Plant Sciences* 18 (2): 111-181.

- Martínez, A; Carcaño, M y López, L. 2002. Biological Activity in an Altitudinal Soil Transept of La Malinche, Tlaxcala. En: *Terra Latinoamericana* 20 (002): 141-146.
- Marucci, R; Cavichioli, R y Zucchi, R. 1999. A key to five sharpshooter leafhoppers (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellinae) vectors of the citrus variegated chlorosis (CVC9). En: *An. Soc. Entomol. Bras.* 28: 439-446.
- Marucci, R; Giustolin, T; Miranda, M; Ferraz, P y Lopes, J. 2001. Sharpshooter transmission of a coffee strain of *Xylella fastidiosa* to coffee seedlings. En: *Phytopathol. Bras.* 26. p 277.
- McElrone, A y Forseth, I. 2004. Photosynthetic Response of a Temperature Lina to *Xylella fastidiosa* Infection and Water Stress. En: *J. Phytopathology* 152: 9-20.
- McElrone, A; Serald, J y Pooler, M. 1999. Identification of Alternative Host of *Xylella fastidiosa* in the Washington, D.C., Area Using nested PCR. En: *Journal of Arboriculture* 25(5): 258-263.
- Mercadier, G; Saethre, M-G y Vega, F. 2002. First report of the fungal entomopathogen *Paecilomyces* in Norway. En: *Norw. J. Entomol* 40: 71-73
- Monroig, M. 2002. ECOS del Café. Información Técnica. <<http://academic.uprm.edu/mmonroig/id4.htm>> Consultado 03/07/2008.
- Montero, V. 2006. Manual de Prácticas de Laboratorio de Microbiología Aplicada. Ingeniería en Biotecnología. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costra Rica. p 3.
- Montesinos, E; Bonaterra, A; Badosa, E; Francés, J; Alemany, J; Llorente, L y Moragrega, C. 2002. Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. En: *Int. Microbiol* 5: 169-175.
- Moreira, L; de Souza, R; Almeida, N; Setabul, J; Oliveira, J; Furlan, L; Ferro, J y da Silva, A. 2004. Comparative Genomics Analices of Citrus-Associated Bacteria. En: *Annu. Rev. Phytopathol* 42: 163-184.
- Nazina TN, Tourova TP, Poltarau AB, Novikova EV, Grigoryan AA, Ivanova AE, 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen.nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. En: *Int J Syst Evolut Microbiol* 51: 433-46.
- Nazina, T; Lebedeva, E; Poltarau, A; Tourova, T; Grigoryan, A; Sokolova, D; Lysenko, A y Osipov, G. 2004. *Geobacillus gargensis* sp. nov., a novel thermophile from a hot spring, and the reclassification of *Bacillus vulcani* as *Geobacillus vulcani* comb. nov. En: *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 2019-2024.

- Newman, K; Almeida, R; Purcell, A y Lindow, S. 2004. Cell-Cell signaling control Xylella fastidiosa interactions with bot insects and plants. En: *PNAS* 101 (6): 1737-1742.
- Nielson, M. 1985. Leafhopper systematics. En: *The Leafhoppers and Planthopper*, ed Nault, N y Rodríguez, J. New York: Wiley. p 11-39.
- OPPO/EPPO. 2004. *Phytophthora cinnamomi*. Diagnostic protocols for regulated pest. European and Mediterranean Plant Protection Organization. En: *OEPP/EPPO Bulletin* 34:201-207.
- Orozco, F; Medina, M y Sarria, P. 2004. Aislamiento y evaluación de microorganismos endófitos de aliso (*Alnus acuminata* var. *Acuminata*). En: *Livestock Research for Rural Development* 17 (1). <<http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd17/1/oroz17010.htm>> Consultado 18/07/2008.
- Ottado, J; Orellano, E; Daurelio, L; Dunger, G; Tondo, M.L; Relling, V y Sansevich, A. 2007. Interacción planta- patógeno en la cancrrosis de los cítricos. IBR- Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario- UNR-CONICET. <<http://www.grupobiotecnologia.com.ar/pdf/dia0407.pdf>> Consultado 25/07/2008.
- Palomo, J. 2000. BACTERIOSIS DE CUARENTENA DEL CULTIVO DE LA PATATA EN EUROPA. En: Pascualena J, Ritter E. (Ed) 2000. Libro de Actas del Congreso Iberoamericano de Investigación y Desarrollo en Patata. Vitoria-Gastéis, España. p. 461-471.
- Perotti, E; Menéndez, E; Gaia, O y Pidello, A. 2005. Supervivencia de *Pseudomonas fluorescens* en suelos con diferente contenido de materia orgánica. En: *Revista Argentina de Microbiología* 37: 105-105.
- Perrone, G; Susca, A; Cozzi, G; Ehrlich, K; Varga, J; Frisvad, J; Meijer, M; Noonim, P; Mahakarnchanakul, W y Samson, R. 2007. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. En: *Stud Mycol* 59(1): 53-66.
- Peters, R. 2008. Denominaciones de Origen Brunca, West Valley, Central Valley, Guanacaste, Orosi, Turrialba y Tres Ríos. INSTITUTO DEL CAFÉ DE COSTA RICA. San José, Costa Rica. CIRCULAR N° 1393 <http://www.icafe.go.cr/icafe/circulares_2008.html> Consultado 20/07/2008
- Poehlman, J. 2005. Mejoramiento Genético de las Cosechas. Las Herramientas del Fitomejorador. Marcadores Moleculares. 2ª. Ed. Limusa Wiley. México, D.F. p.164-167.
- Posada, F; Aime, C; Peterson, S; Rehner, S y Vega, F. 2007. Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). En: *Mycological Research* 111: 7 4 8 - 7 5 7.
- Pratt, L y Harner, C. 1997. Sustainability Analysis of the Coffee Industri in Costa Rica. Centro Latinoamericano para la Competitividad y el Desarrollo Sostenible del INCAE. En: *CEN* 761:1-33.

- PROCAFE. 2006. Aspectos Botánicos. Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café. <<http://www.procafe.com.sv>> Consultado 03/07/2008.
- Purcell, A y Finlay, A. 1979. Evidence for noncirculative transmission of Pierce's disease bacterium by sharpshooter leafhoppers. En: *Phytopathology* 69: 393-395.
- Purcell, A. y D. Hopkins. 1996. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. En: *Ann. Rev. of Phytopa.* 34: 131-151.
- Purcell, A., 2005. A scientific and community Internet resource on plant disease caused by the bacterium *Xylella fastidiosa*. <<http://www.cnr.berkeley.edu/xylella/>>. Consultado 30/04/2007
- Qin, X; Miranda, V; Machado, M; Lemos, E y Hartung, J. 2001. An Evaluation of the Genetic Diversity of *Xylella fastidiosa* Isolated from Diseased Citrus and Coffee in Sao Paulo, Brazil. En: *Bacteriology* 91: 599-605.
- Queiroz-Voltan, R; Perosin, L; Paradela, O; Carvalho, M; Irineu, J y Fazuoli, L. 2005. Efeito da *Xylella fastidiosa* em Cafeeiros em Diferentes Regioes Edafoclimáticas. En: *Bragantia, Campinas* 64 (1): 89-91.
- Redak, R; Purcell, A; Lopes, J; Blua, M; Mizell, R y Andersen, P. 2004. The Biology of Xylem Fluid-Feeding Insect Vector of *Xylella fastidiosa* and Their Relation to Disease Epidemiology. En: *Annu. Rev. Entomol.* 2004. 49: 243-270.
- Roberts, R; Wilson, G y Young, F. 1977. Recognition sequence of specific endonuclease *Bam*HI from *Bacillus amyloliquefaciens* H. En: *Nature* 265: 82 - 84.
- Rodrigues da Silva, F; Vettore, A; Kemper, E; Leite, A y Arruda, P. 2001. Fastidian gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. En: *FEMS Microbiology Letters* 203: 165-171.
- Rodríguez, C. 2002. *Xylella fastidiosa* (Wells et al., 1987) como patógeno del café en los países tropicales. Centro de Investigación en Café de Costa Rica, Heredia, Costa Rica. En: *Boletín Informativo*. p. 11.
- Rodríguez, E. 2005¹. Bacteriología General: Principios y Prácticas de Laboratorio. Editorial UCR. San José, Costa Rica. p 476.
- Rodriguez, J; Silva-Stenico, M; Gomes, J; Lopes, J y Tsai, S. 2003. Detection and Diversity of *Xylella fastidiosa* in Field-Collected Plant and Insect Samples by Using 16S RNA and *gyrB* Sequences. En: *Applied and Environmental Microbiology*, 2003:4249 - 4255.
- Rodríguez, K; Maldonado, Y; Murcia, L; Huertas, W; Vásquez, M; Zambrano, A; Rivero, R y García, C. 2002. EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS DEL SUELO EN PAPA (Rhizoctonia, Rosellinia y Spongospora). En: <<http://www.redepapa.org/maldonado.pdf>> Consultado 20/07/2008.
- Rodríguez, M., 2005². *Xylella fastidiosa* (Wells et al., 1987) patógeno del café en los países tropicales. CICAPE. <<http://apep-cr.tripod.com/Public/xylella.htm>>. Consultado 20/07/2008.

- Rollins, D & Joseph, S. 2000. Pathogenic Microbiology. Triple Sugar Iron Agar. Explanation of TSI Reactions. Summary of Possible TSI Reactions. University of Maryland. En: BSCI 424. <<http://life.umd.edu/classroom/bsci424>> (25/05/2008).
- Salisbury, F y Roos, C. 1992. Fisiología Vegetal. Editorial Iberoamericana S.A de C.V. México, D.F. p 82,83, 141, 604.
- Sánchez, A; Flández, P y Fernández, G. 2003. Endoftalmítis endógena por *Serratia marcescens* diagnosticada por PCR. En: Arch Soc Esp Oftalmol 78 (5): 281-283.
- Santamaría, Y y Bayman, P. 2005. Fungal Epiphytes and Endophytes of Coffee Leaves (*Coffea arabica*). En: Microbial Ecology 50: 1-8.
- Santos, C; Lopes, J; Araújo, W y Azevedo, J. 2004. Estudio molecular y biológico de la interacción entre bacterias endofíticas e insectos vectores (Insecta, Cicadellinae), de *Xylella fastidiosa*, el agente causal de la clorosis variegada de los *Citrus*. En: V Encuentro Larionamericano y del Caribe de Biotecnología Agrícola (Redbio). (2004, Republica Dominicana).s.p.
- Sayago, M. 1999. Control Fitosanitario en el Cultivo del Café. En: FONAIAP Divulga 62. Versión Digital <http://www.ceniap.gov.ve/pbd/RevistasTecnicas/FonaiapDivulga/fd_n61.htm> Consultado 08/07/2008.
- Scarpellini, M; Mora, D; Colombo, S y Franzetti, L. 2002. Development of Genus/Species-Specific PCR Analysis for Identification of Carnobacterium Strains. En: Current Microbiology 45 (1): 24-29.
- Schaad, N., E. Postnikova, G. Lacy, M. Fatmi y J. Chang. 2004. *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. Piercei, subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. multiplex subsp.nov., and *X. fastidiosa* subsp. Pauca subsp. En: Syst Appl Microbiol 27 (3): 290-300.
- Scortichini, M. 2004. Diagnostic protocols for regulated pest. *Xylella fastidiosa*. Istituto Sperimentale per la Fruticultura, Rome (IT). En: OEPP/EPPO, Bulletin 34: 187-192
- Scot, C. 2008. Cercospora Leaf Spot and Berry Blotch of Coffee. En: Plant Disease of the week 2. <<http://www.ctahr.hawaii.edu/nelsons/coffee/leafspot3.JPG>> Consultado 13/07/2008.
- Segnini, A y Moltagne, A. 1986. BIOLOGIA Y ECOLOGIA POBLACIONAL DE *Empoasca kraemeri* Ross y Moore (HOMOPTERA: CICADELLIDAE) EN CARAOTA (*Phaseolus vulgaris*),II. CICLO DE VIDA, LONGEVIDAD, FECUNDIDAD Y SOBREVIVENCIA DE *E. kraemeri* BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO. En: Agronomía Tropical 34 (4-6):15-27
- Shalóm, F; Olivera, R; Pitkowsky, M t Rapoport, A. 2005. Características macro y microscópicas del desarrollo bacteriano. Trabajo Práctico 2. Escuela de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de San Martín, Argentina. p 1-4.

- Shapland, E; Daane, K; Yokota, G t Wistrom, C. 2006. Ground Vegetation Survey for *Xylella fastidiosa* in California Almond Orchards. The American Phytopatology Society. En: *Plant Disease* 90 (7): 905-909.
- Sharon, G. 2000. Genome of bacteria *Xylella fastidiosa*, a threat to fruit and nut crops, is sequenced. Scanning electron micrograph of the bacterium *Xylella fastidiosa*, causal agent of the citrus variegated chlorosis, present in the xylem vessel of infected sweet orange leaf (ca. X10,000). Photo by E. W. Kitajima (ESALQ/USP/Brazil).
<http://www.genomenewsnetwork.org/articles/07_00/sequencingof_bugs.shtml>
Consultado 14/07/2008.
- Simpson, A; Reinach, F; Arruda, P; Abreu, F; Acencio, M; Alvarenga, R; Alves, L; Araya, J; Baptista, C; Barros, M; Bonaccorsi, E; Bordin, S; Bove, J; Briones, M; Bueno, M; Camargo, L; Carraro, D; Carrer, H; Colauto, N; Colombo, C; Costa, F, Costa, m; Costa-Neto, C; Coutinho, L; Cristofani, M; Dias-Nieto, E; Docena, C; El Dorry, H; Facincani, A; Ferreira, A; Ferreira, V; Ferro, J; Fraga, J; Franca, S; Franco, M; Frohme, M; Burlan, L; Garnier, M; Goldman, G; Goldman, M; Gomes, S; Gruber, A; Ho, P; Hoheisel, J; Junqueira, M; Kemper, E; Kitajima, J; Krieger, J; Kuramae, E; Laigret, F; Lambais, M; Leite, L; Lemos, E; Lemos, M; Lopes, S; Lopes, C; Machado, J; Machado, M, Madeira, A; Madeira, H; Marino, C; Marques, M; Martins, E; Martins, E.M; Matsukuma, A; Menck, C; Miracca, E; Miyaki, C; Monteiro-Vitorello, C; Moon, D, Nagai, M; Nascimento, A; Netto, L; Nahni, J; Nobrega, F, Nunes, L; Oliveira, M; de Oliveira, M; de Oliveira, R; Palmerieri, D; Paris, A; Peixoto, B; Pereira, J; Pesquero, J; Quaggio, R; Roberto, P; Rodrigues, V; Rosa, A; de Rosa, V; de Sa, R; Santelli, R; Kawasaki, H; da Silva, A; da Silva, F; da Silva, A. M; Silva, J, da Silveira, J; Silvestre, M; Siquiera, W; de Souza, A; de Souza, A. A; Terenzi, M; Truffi, D; Tsai, S; Tsuhako, M; Vallada, H, Van Sluys, M; Verjovski-Almeida, S; Vettore, A; Zago, M; Zatz, M; Meidanis, J y Setúbal, J. 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. En: *Nature* 406: 151-157.
- Solórzano, A; León, R y Garbanzo, M. 2000. Determinación del agente causal y evaluación en la producción causado por la Crespeta en el cultivo de café (*Coffea arabica*) en la zona de Los Santos, Costa Rica. Instituto del Café de Costa Rica. En: Boletín Informativo ICAFE. p 128-132.
- Sossa-Moss, C; Perdomo, F; Brathwaite, C y Salazar, J. 1997. Manual de técnicas para el diagnóstico de las enfermedades de las plantas. Diagnóstico Fitosanitario II. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Agencia de Cooperación Técnica IICA/México. p 15-98.
- Stepanovic, S; Dakic, I; Morrison, D; Hauschild, T; Jezjek, P; Petra, P; Martel, A; Vukovic, D; Shittu, A y Devriese, L. 2005. Identification and Characterization of Clinical Isolates of Members of the *Staphylococcus sciuri* Group. En: *Journal of Clinic Microbiology* 43 (2): 956-958.
- Teviotdale, B y Connell, J. 2003. Almond Leaf Scorch. Universidad de California. En: *ANR Publication* 8106. <<http://anrcatalog.ucdavis.edu/pdf/8106.pdf>> Consultado 14/07/2008.

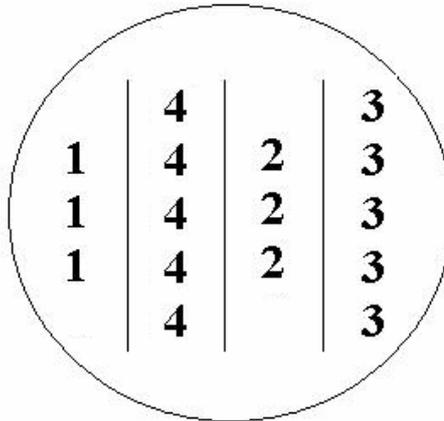
- University of California. 2000. Agriculture and Natural Resources. Integrated Pest Management of the Glassy-winged Sharpshooter and the Diseases it Transmits. <gwss.ucanr.org/faq.html> Consultado 14/07/2008
- University of Guelph. 2008. Pest Diagnosis Clinic Fee Shedule. <<http://www.labservices.uoguelph.ca./labserv/units/pdc/index.cfm>> Consultado 13/07/2008.
- Uribe, L. 2008. Identificación de Bacterias. Metodología y Cuidados antes de la aplicación de la identificación mediante BIOLOG. Comunicación Personal. Directora del Laboratorio de Microbiología Agrícola. Centro de Investigaciones Agronómicas. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. Consulta 30/06/2008.
- USDA. 2007. Agricultural Resecar Services. Citrus Research. <www.ars.usda.gov/Research//docs.htm?docid=8361> Consultado 14/07/2008.
- Van Rostenberghe, H; Zoraida, R; Wan Pauzi, W; Habsah, H; Zeehaida, M; Rosliza, A; Fatimah, I; Nik sharimah, N. Maimunah, H. 2006. The Clinical Picture of Neonatal Infection with *Pantoea* Species. En: *Jpn J Infect Dis* 59 (2): 120-121.
- Vega, F. 2007. Sustainable perennial crops. People and Crops. Summary of research. USDA. <<http://www.ars.usda.gov/pandp/people/people.htm?personid=5818>> Consultado 21/07/2008.
- Vega, F; Blackburn, M; Kurtzman, C y Dowd, P. 2003¹. Identification of a coffee berry borer-associated yeast: does it break down caffeine? En: *Entomologia Experimentalis et Applicata* 107: 19–24.
- Vega, F; Jackson, M; Mercadier, G y Poprawski, T. 2003². The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture. En: *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 19: 363–368.
- Vega, F; Pava-Ripoll, M; Posada, F y Buyer, J. 2005. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. En: *J. Basic. Microbial* 45 (5) : 371-380.
- Villalba, V. 2007. Aspectos Moleculares de la Fitopatología. Manual de Laboratorio. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Escuela de Biología. Publicación Interna ITCR, Cartago, Costa Rica. p 11-13.
- Wells, J; Raju, B; Hung, H; Weisburg, W; Mandelco-Paul, L y Brender, D. 1987. *Xylella fastidiosa* General nov., sp. Nov. Gram negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xantomonas* spp. En: *International Journal of System Bacteriology* 37: 136-143.
- Winston, E; Op de Laak, J; Marsh, T; Lempke, H y Chapman, K. 2005. Arabica coffee manual for Lao-PDR. FAO Regional Office for Asia and the Pacific. Bangkok, Thailand. <<http://www.fao.org/docrep/008/ae939e/ae939e00.HTM>> Consultado 21/07/2008.
- Zamora, L. 1998. Manual de Recomendaciones para el Cultivo del Café. 1 ed. Heredia, Costa Rica. ICAFE-CICAFE. p. 1-198.

Zharikova, N; Markusheva, T; Galkin, E; Korobov, V; Zhurenko, E; Sitdikova, L; Kolganova, T; Kuznetsov, B y Turova, T. 2006. *Raoultella planticola*, a new strain degrading 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid. En: *Applied Biochemistry and Microbiology* 42 (3): 258-262.

CAPÍTULO 10

APÉNDICES

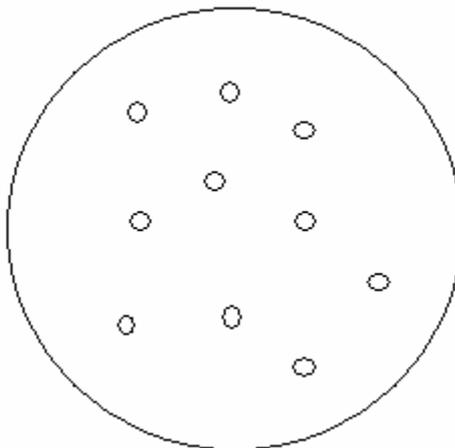
Apéndice 1. Detalle de inoculación en protocolo A de obtención de endófitos.



Microsoft Paint 5.1

Diagrama de inoculación según protocolo A de tejidos en placa de medio semisólido BCYE a 31°C para determinar el crecimiento microbiológico y la posibilidad de obtención de bacterias de lento crecimiento asociadas al hábito endófito.

Apéndice 2. Detalle de inoculación en protocolo B de obtención de endófitos.

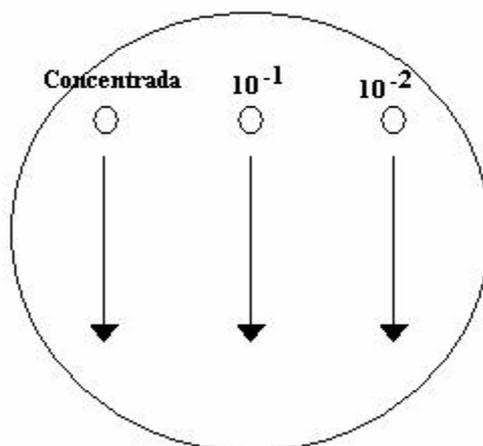


Microsoft Paint 5.1

Diagrama de distribución aleatoria de puntos de savia para el Protocolo B inoculado en medio semisólido BCYE a 24°C para determinar el crecimiento

fúngico y la posibilidad de obtención de bacterias de lento crecimiento asociadas al hábito endófito..

Apéndice 3. Detalle de inoculación en protocolo C de obtención de endófitos.



Microsoft Paint 5.1

Diagrama de distribución de inoculación para el Protocolo C inoculado en medio semisólido BCYE a 26°C para determinar el crecimiento microbiano y la posibilidad de obtención de bacterias de lento crecimiento asociadas al hábito endófito.

Apéndice 4. Registro fotográfico de las bacterias aisladas mediante los diferentes protocolos de extracción ensayados.

ID	Microorganism o	Colonia en medio BCYE	Objetivo de Observación
1	<i>Serratia marcescens</i>		4.0X
2	<i>Geobacillus spp</i>		2.0X



3 *Enterobacter*
spp

2.5 X



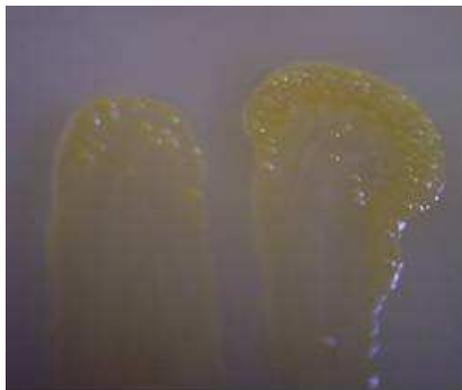
4 *Pseudomonas*
fluorescens

4.0 X



5 *Raoultella*
terrigena

2.0X



6

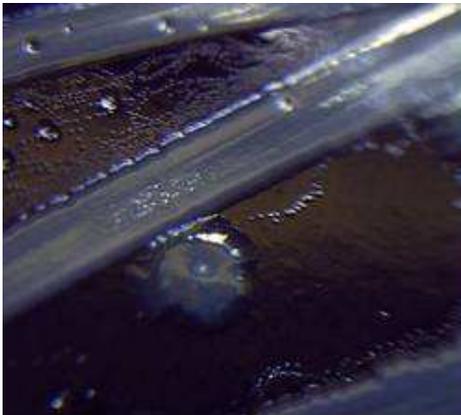
*Raoultella
planticola*



2.0X

7

*Staphylococcus
sciuri*



3.0X

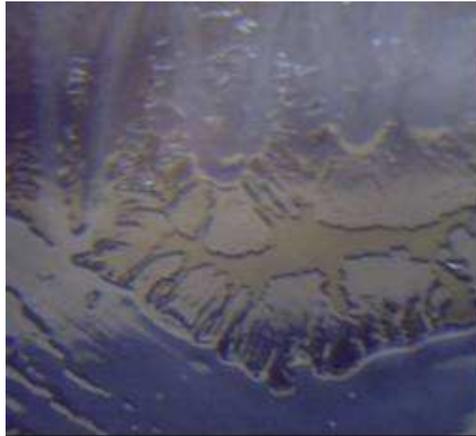
8

*Enterobacter
spp*



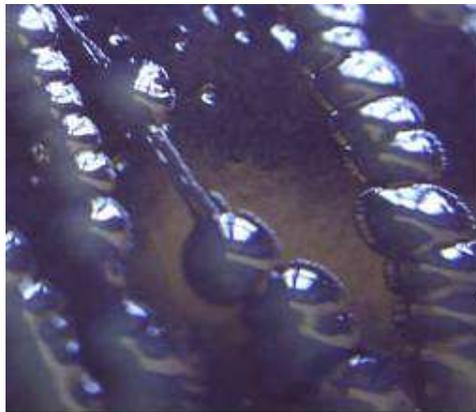
2.5X

9 *Serratia
marcescens*



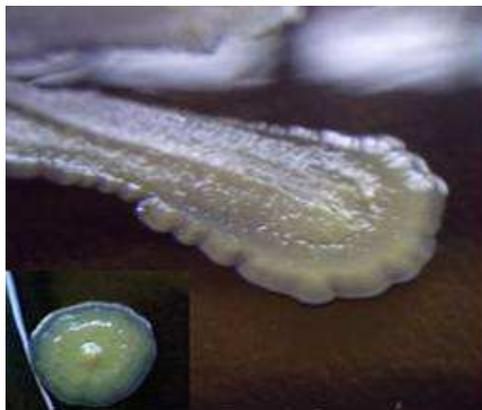
2.0X

10 *Enterobacter
aerogenes*



3.0X

11 *Bacillus
spp*



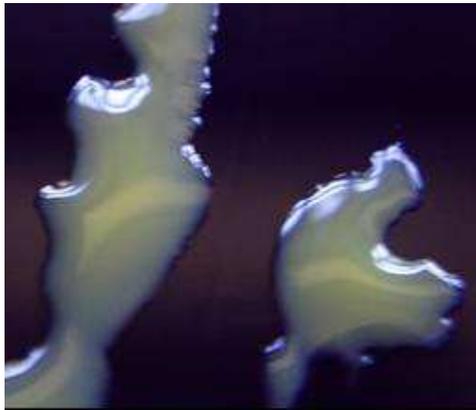
2.0X

12 *Sphingomonas paucimobilis*



4.0X

13 *Klebsiella spp*



3.5X

14 *Bacillus amyloquefaciens*



2.0X

15 *Carnobacterium mobili*



2.0X



16 *Phantoea*
spp

2.0X



17 *Raoultella*
terrigena

2.0X



18 *Streptococcus*
sobrinus

2.0X

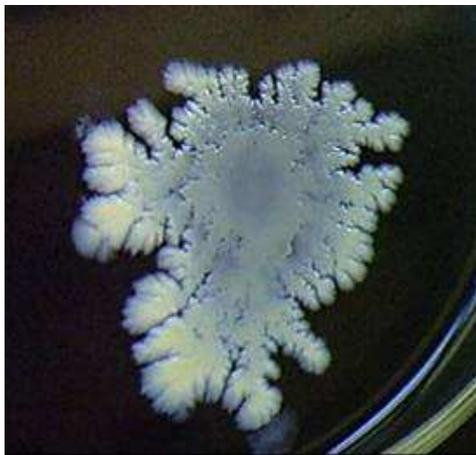


19 *Bacillus*
spp



2.0X

20 *Staphylococcus*
cohnii



2.0X

21

*Xylella
fastidiosa*



3.5X

Microsoft Paint 5.1

Apéndice 5. Registro fotográfico de hongos aislados mediante los diferentes protocolos de extracción ensayados.
Aislamientos fúngicos no levaduriformes.

ID	Microorganismo	Crecimiento en placa	Micelio	Obj	Estructuras reproductoras	Obj
1	<i>Phytium spp</i>			40X		40X
2	No identificado			40X	No encontradas	—

3 **No identificado**

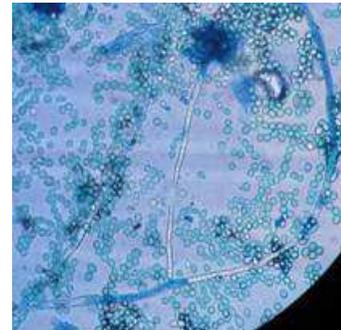


40X

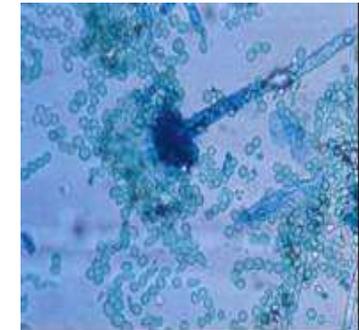
No encontradas

—

4 **Aspergillus spp**

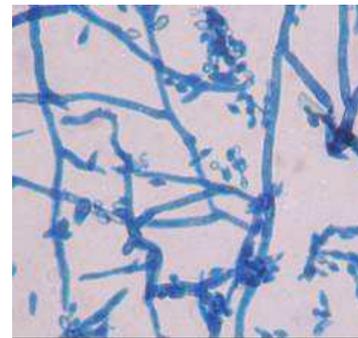


40X

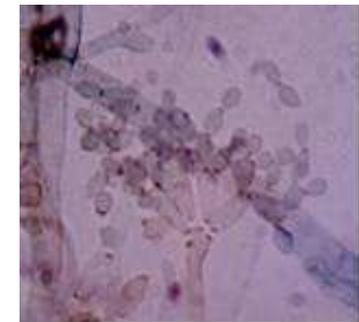


40X

5 **Cladosporium spp**



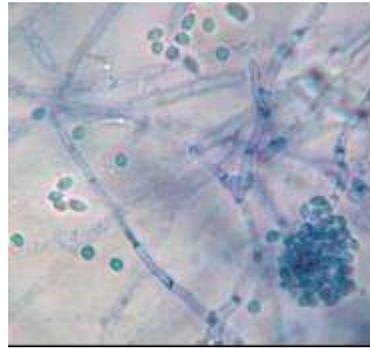
40X



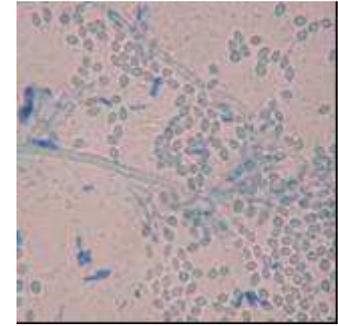
100 X

6

Paecilomyces
spp



40X



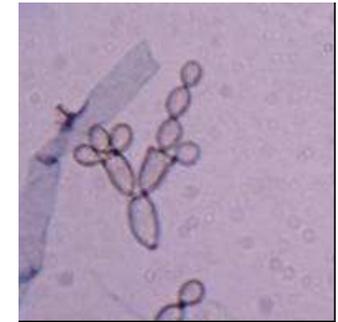
40X

7

Cladosporium
spp



40X



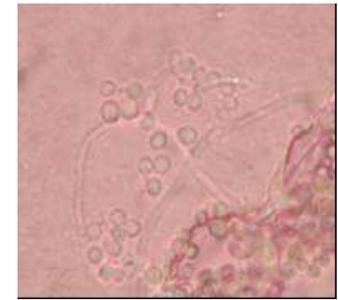
100
X

8

Beauveria *spp*



100
X

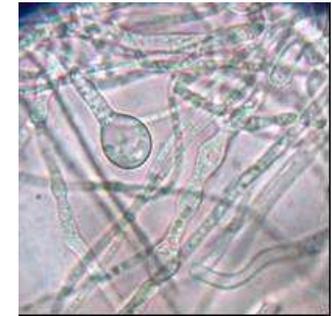


100
X

9 *Phytium spp*

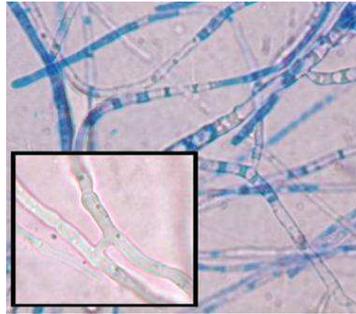


40X



100
X

11 *Noidentificado*

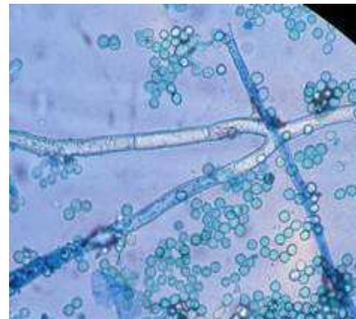


40X

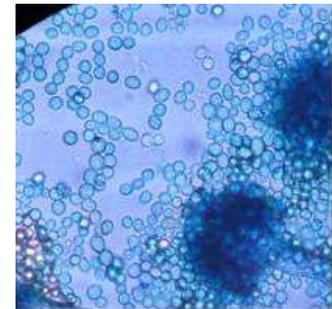
No encontradas

—

12 *Aspergillus spp*



40X



40X

Apéndice 6. Registro fotográfico de hongos aislados mediante los diferentes protocolos de extracción ensayados. Aislamientos levaduriformes.

ID	Microorganismo	Colonia en agar BCYE	Objetivo de Observación
10	<i>No identificado</i>		3.0X
13	<i>No identificado</i>		2.0X

Microsoft Paint 5.1

CAPÍTULO 11

ANEXOS

Anexo 1. Reactivos para la elaboración del medio de cultivo Agar Triple Azúcar TSI (1L) y su nomenclatura de interpretación.

Reactivo	Cantidad
Extracto de Carne	3.0g
Extracto de Levadura	3.0g
Peptona	15.0g
Proteosa peptona	5.0g
Lactosa	10.0g
Sacarosa	10.0g
Glucosa	1.0g
Sulfato ferroso	0.2g
Cloruro de Sodio	5.0g
Tiosulfato de Sodio	0.03g
Agar	12.0g
Rojo de Fenol	0.024g
Agua destilada	1L

Fuente: Rodríguez., 2005¹.

Se ajusta el pH a 7.4 unidades y se autoclave a 121°C por 15 minutos. Se dispensa el medio en tubos inclinados. A continuación las posibles reacciones y su interpretación para la prueba de fermentación de carbohidratos en agar TSI.

Nomenclatura	Interpretación
K/A	Fermentación única de glucosa, utilización de peptona
A/A	Fermentación de Glucosa y Lactosa/Fructuosa
K/K	Utilización de peptona sin fermentación de carbohidratos
K/NC	Utilización de peptona exclusiva aerobia sin fermentación de carbohidratos
NC/NC	Nulo o poco crecimiento, no catabolismo de peptona ni de azúcares
A/A, G	A/A y producción de gas
A/A, H ₂ S	A/A y producción de H ₂ S
A/A, G, H ₂ S	A/A y producción de gas + H ₂ S
K/A, G	K/A y producción de gas
K/A, H ₂ S	K/A y producción de H ₂ S
K/A, G, H ₂ S	K/A y producción de gas + H ₂ S

Fuente: Rollins y Joseph, 2000. Summary of Possible TSI Reactions. <<http://ife.umd.edu/classroom/bsci424>> (25/05/2008).

Anexo 2. Clasificación según ID de insectos cicadélidos para evaluación de colectas. Documento Interno Centro de Investigación en Café de Costa Rica CICAPE.

Nombre común	Código C	Registro Fotográfico
Rayado	01	
Rayado Celeste	02	
Rayado Amarillo (1)	03	
Rayado Amarillo (2)	04	

Rayado Amarillo (3)

05



Cabeza Manchada

06



Manchado sin anillo

07



**Manchado con anillo
(Marrón)**

08



**Manchado con anillo
(Marrón oscuro)**

09



**Manchado con anillo
(Café)**

10



Rayado Verde amarillo

11



Manchado 2

12



Cabeza Manchada 2

13



Cabeza Manchada 3

14



Manchado

15



Liso Rojo

16



Liso Naranja

17



Alas Fuego

18



Alas Fuego

19



Liso Verde Claro

20



Liso Verde

21



Liso Verde Oscuro

22



Alas Mosaico

23



Tipo Avispa

24



Tipo Saltamontes

25



Tipo Saltamontes Oscuro

26



Microsoft Office Excell 2003

Anexo 3. Reactivos para la elaboración del medio de cultivo BCYE (1L).

Reactivo	Cantidad
Extracto de Levadura	10.0g
Carbón Activado	2.0g
L-Cisteina HCl	0.4g
Pirofosfato Férrico	0.25g
Buffer Aces	10.0g
Bacto Agar	17.0g
H ₂ O	970ml
KOH 1N	30ml

Fuente: Wells *et al.*, 1987.

Elaboración: Se calienta el buffer Aces in 500ml de agua destilada a 50°C. Se adiciona 30ml de KOH 1N en 440ml de agua destilada y se agregan 2.0g de carbón activado y se mezcla con el buffer Aces. Se le agrega el extracto de levadura y se regula el pH a 6.85. Se le adiciona el agar y se autoclava por 20min a 1atm. Luego de esterilizado se deja enfriar la solución a 50°C y se agregan la L-cisteina y el pirofosfato férrico, ambos previamente disueltos en 30ml de agua destilada y filtrados en filtros millipore de 0.22um (Wells *et al.*, 1987). Se dispensan por el método de vaciado en placa (Montero, 2006).

Anexo 4. Preparación de solución de ensayo e interpretación de la Prueba de KOH

Se prepara una solución de KOH al 3% y se colocan dos gotas en un portaobjetos. Se toma una asada de un cultivo joven (24-48 horas de crecimiento) y se expone disolviéndose en las gotas, la reacción positiva (KOH +) evidencia la presencia de bacterias Gram negativas con la formación de un hilo que se adhiere al asa cuando esta se retira de las gotas de KOH que tienen las bacterias disueltas. Este hilo es el ADN resultante de la disolución de la membrana celular de las bacterias. La reacción KOH- corresponde a las bacterias Gram positivas las cuales no pierden la integridad con una exposición leve al reactivo (Villalba, 2007).

Anexo 5. Preparación de solución de ensayo e interpretación de la Prueba de Catalasa

Se coloca una gota de peróxido de hidrógeno concentrado en un portaobjetos. Se toma una asada de un cultivo bacteriano joven (24-48 horas de crecimiento) y se expone a la gota. La presencia de burbujas producto de la acción de la enzima catalasa sobre el sustrato peróxido indica la presencia de bacterias catalasa positivas, la ausencia de dichas burbujas se considera catalasa negativas (Villalba, 2007).

Anexo 6. Aplicación e interpretación de la Prueba Tinción de Gram.

Consiste en la identificación de bacterias Gram positivas y negativas. Se aplica sobre un rayado concentrado de colonias de cultivos jóvenes (24-48 horas de crecimiento) disueltas en una gota de agua destilada estéril y fijada con calor al portaobjetos. Se aplica por 1 minuto una solución de cristal violeta y se realiza luego un lavado con agua destilada, luego se aplica por un minuto el reactivo lugol seguido de otro lavado, posteriormente se decolora la fijación con decolorante (alcohol 90%: Acetona (1:4)) por cinco segundos y se realiza un lavado. Por último la placa se expone a una solución de safranina por un minuto y posteriormente se realiza un lavado con agua destilada. Se deja secar la lámina. Se visualiza al microscopio y se consideran positivas aquellas células que retengan el cristal violeta y la safranina en su membrana celular, visualizándose células moradas. Las bacterias Gram negativas no retienen el cristal violeta, solo lo hace con la safranina viéndose de color rosado (Villalba, 2007).

Anexo 7. Reagent Set. DAS ELISA, Peroxidase Label. Agdia Inc. 2008². Ficha Técnica del Protocolo de Detección para el Patógeno *Xylella fastidiosa* (m 17.3). <<http://www.agdia.com/doc/m17.3.pdf>> (Consultado 14/07/2008).

Variaciones en el protocolo

A continuación se detalla el proceso según etapas y la formulación de amortiguadores y conjugados requeridos, así como, las variaciones que se permitieron durante la prueba.

Materiales adicionales

Caja pequeña de polietileno con tapa

Servilletas de papel toalla

Tijeras metálicas

Microtubos eppendorf estériles 2ml

Puntas micropipeta estériles (10, 100 y 1000ul)

Micropistilos plásticos

Placa de microtitulación

Soporte contenedor de nula interacción de 20ml

Reactivos proporcionados

Dilución concentrada anticuerpo de captura Agdia 1:200

Solución MRS 5X

Dilución concentrada anticuerpo de conjugación Agdia 1:200

Solución de sustrato Peroxidasa TBM

Equipo requerido

Lector Espectrofotometro de Microtitulados calibrado 650nm

Equipo de refrigeración estable a -5°C

pH metro

Micropipetas 10, 100 y 1000ul

A Procedimiento

Se prepararon cámaras húmedas confeccionadas con cajas plásticas de polietileno semitransparente con tapa con una servilleta limpia de papel humedecida con agua destilada en el interior de cada caja. Se rotularon según el día inicial de proceso de las muestras. Las pruebas se documentaron en mapas de detección según la nomenclatura propuesta por la casa comercial en la hoja de control de la prueba. La cantidad de pozos para volúmenes efectivos empleados en cada prueba se determinó según el número de muestras a analizar sumando los controles negativos, controles positivos y la validación dedicada al sustrato además de la suma del 10% de la cantidad total de pozos como factor de error y estimación para margen de holgura de trabajo.

- **Recubrimiento inicial de la placa**

Se preparó el Amortiguador Carbonato de Recubrimiento (Carbonate Coating Buffer 1X) empleando 0.16g de Carbonato de Sodio (anhidro) y 0.29g de Bicarbonato de Sodio disueltos en 100ml de agua destilada estéril. Se prescindió del reactivo Azida de sodio de la formulación original (Véase anexo 1, Buffer Formulations). La solución se calibró a 9.6 unidades de pH y se almacenó a 4°C. Se preparó una dilución del anticuerpo de captura (Anti-Xf) en soportes de nula interacción utilizando el buffer de recubrimiento a razón de 1:200 (ul anticuerpo: ul buffer) de manera que el volumen resultante satisficiera la cantidad total de muestras a analizar según 100ul por cada pozo requerido.

Se depositó con ayuda de una micropipeta de puntas estériles un volumen de 100ul por pozo de la dilución del anticuerpo de captura según el mapa de localización de las muestras. La placa una vez cubierta se colocó en una cámara húmeda y se incubó por 4 horas en un cuarto regulado a 24°C y 67% HR. Cuando la prueba se inició en el transcurso de la tarde se colocó en refrigeración a 4°C por un periodo de 12-18 horas en un proceso homólogo de incubación conocido como *overnight* avalado por el protocolo en cuestión.

Luego de la incubación de la placa se decantó la solución de recubrimiento de la placa de microtitulación mediante un movimiento de inversión rápido y se lavó con el Amortiguador de Lavado PBST 1X preparado mezclando en 1000ml de agua destilada 8.0g de Cloruro de Sodio, 1.15g de Fosfato de Sodio Dibásico (Anhidro), 0.2g de Fosfato de Potasio Monobásico (Anhidro), 0.2g de Cloruro de Potasio y 0.5g de Tween-20 ajustando el pH a 7.4 unidades y almacenándose a temperatura ambiente (Véase anexo 1, Buffer Formulations). Dicho buffer se empleó el mismo día de su elaboración. Se realizaron cuatro lavados en total para este paso. El exceso de buffer de lavado PBST 1X se secó mediante inversiones repetidas de la placa sobre papel toalla seco.

- **Montaje de las muestras**

Las muestras se procesaron previamente de forma rápida empleando micropistilos para macerar 0.1g de tejido seleccionado en 1ml de Buffer de Extracción General GEB el cual se preparó mezclando 1.3g de Sulfito de Sodio (Anhidro), 20.0g de Polivinilpirrolidona, 2.0g de Leche descremada en polvo y 20.0g de Tween-20 por cada litro de solución disuelta en el Buffer PBST 1X preparado previamente. Se prescindió del reactivo Azida de Sodio de la formulación original y se sustituyó la Albúmina de Huevo pulverizada Grado II (pollo) por la leche descremada en polvo. El pH del buffer se reguló a 7.4 unidades y se almacenó en refrigeración a 4°C (Véase anexo 1, Buffer Formulations). Una vez macerada cada muestra se colocó en una gradilla de tubos rotulada y se congeló el macerado resultante para su posterior procesado.

Cada muestra se descongeló a temperatura ambiente y se centrifugó por 2min a 6000rpm luego de una breve agitación en vortex que incluyó los controles de la prueba. Una vez sedimentados los sólidos de cada muestra se recuperó un volumen de 300ul de la solución para análisis con una micropipeta de puntas estériles y se colocó 100ul por pozo para un total de tres pozos por cada muestra según el mapa de localización específico para la prueba. La placa se cubrió con cinta adhesiva superficialmente y se incubó en una cámara húmeda a 24°C y 67% HR durante dos horas. Cuando la incubación inició en el transcurso de la tarde la placa se colocó en refrigeración a 4°C por un periodo de 12-18 horas en un proceso homólogo de incubación conocido como *overnight* avalado por el protocolo en cuestión.

Luego del periodo de incubación se eliminó la solución de cada muestra mediante una rápida inversión de la placa y se realizaron 6 lavados adicionales con el buffer PBST1X preparado previamente. La placa se secó como se indicó anteriormente.

- **Adición del conjugado de la enzima peroxidasa**

En un periodo previo de 10min antes de finalizar la preparación de la placa para la adición del anticuerpo conjugado con la enzima peroxidasa de reacción se

preparó una solución del reactivo Diluyente de la Enzima Conjugada empleando el reactivo MRS Componet proporcionado por el kit de detección y un volumen del buffer PBST 1X a razón de 1:4 v/v. A este diluyente se le adicionó el conjugado de la enzima peroxidasa a razón de 1:200 según volumen enzima: diluyente acorde a la cantidad de muestras a analizar según 100ul por pozo empleado en la prueba.

Una vez seca la placa y posterior a los 10min de incubación del conjugado enzimático se procedió a colocar 100ul del mismo por pozo según el mapa de localización de muestras empleando una micropipeta de puntas estériles. La placa se tapó superficialmente con cinta adhesiva y se incubó en una cámara húmeda a 24°C y 67% HR durante dos horas.

Luego de la incubación se decantó el conjugado y se realizaron seis lavados adicionales con el buffer PBST 1X como se indicó anteriormente y se secó el exceso con papel toalla.

- **Aplicación del Sustrato TBM peroxidasa y lectura de la absorbancia de la reacción**

Se colocó un volumen de 100ul de la solución del sustrato TBM para peroxidasa proporcionado por el kit de detección mediante una micropipeta de puntas estériles según los pozos indicados en el mapa de localización. En este paso se evaluaron tres pozos controles neutros que contenían solo el volumen del sustrato TBM peroxidasa. Se realizó en una cámara con luz tenue y se incubó a 24°C y 67% HR durante 15-20 minutos.

Posterior al periodo de incubación se colocó la placa en el soporte del aparato espectrofotómetro: Original Multiskan (Modelo 355) de Thermolab System © calibrado a 650nm de longitud de onda y se obtuvieron los datos de la absorbancia para cada muestra.

- **Interpretación de resultados**

Las absorbancias reportadas para cada muestra se sumaron y promediaron para obtener un valor absoluto de análisis el cual se comparó con el parámetro evaluador específico para cada detección. Este último fue obtenido mediante la suma de una, dos y tres desviaciones estándar al promedio de absorbancias (3 sigma) de los controles negativos. Para aceptar la prueba dentro de los límites de confianza se consideró como válida la determinación si el sustrato evaluado presentó nula o mínima absorbancia y el control negativo presenta una absorbancia menor al control positivo.

Anexo 8. Reactivos para la elaboración de un litro de medio de cultivo Papa Dextrosa Acidificado (PDA).

Reactivo	Cantidad
Puré de papa	200g
Dextrosa	15g
Agar	17g
Agua destilada	1L

Fuente: Villalba, 2007.

Se hierve un litro de agua y se coloca el puré de papa hasta que la masa se ablande. Luego se filtra el cocido y se afora el volumen del recuperado a 1L con agua destilada. Se agregan la dextrosa y el agar y se agita vigorosamente hasta disolver. Se autoclave el medio por 15 minutos a 121°C (Villalba, 2007).