

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN**

**DINÁMICA DE LA SINTOMATOLOGÍA DE CRESPERA DEL CAFÉ  
Y SU RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE LA BACTERIA *Xylella fastidiosa*  
(Wells *et al*)**

**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.**

**Sebastián Fournier Zumbado**

**Cartago, Junio, 2007**

# DINÁMICA DE LA SINTOMATOLOGÍA DE CRESPERA DEL CAFÉ Y SU RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE LA BACTERIA *Xylella fastidiosa* (Wells et al)

Sebastián Fournier Zumbado<sup>1</sup>

## RESUMEN

La enfermedad denominada como “Crespera del café” afecta este cultivo en Costa Rica desde inicios de la década de los ochentas. Esta enfermedad es atribuida a la bacteria *Xylella fastidiosa* y los síntomas más evidentes en hojas son: encrespamiento del borde, nervadura secundaria pronunciada, clorosis y deformidades. En este estudio se analizó la dinámica de la enfermedad en una finca ubicada en Naranjo, provincia de Alajuela, donde se comparó la incidencia de la enfermedad así como la severidad de las plantas enfermas en dos muestreos realizados en febrero y en abril del 2007. Se comparó la presencia y la absorbancia obtenida a partir de análisis por la técnica DAS-ELISA de la bacteria *X. fastidiosa*, esto se realizó a partir de muestras de plantas de diferentes niveles de la enfermedad así como en diferentes estratos y nudos de plantas sanas y enfermas. Se determinó que la incidencia de la enfermedad aumentó alrededor de un 6% entre ambos muestreos y que la aparición de nuevas plantas enfermas ocurre de manera aleatoria, sin embargo conforme transcurre el tiempo es posible observar la aparición de focos donde se manifiestan los síntomas más severos. Se diagnosticó presencia de la bacteria tanto en plantas sanas como en plantas enfermas y los análisis de absorbancia establecieron que la mayor concentración de bacteria ocurre en los estratos medios y superior en los nudos más antiguos de las bandolas, sin embargo no es posible relacionar la cantidad de bacteria con la sintomatología debido a que la absorbancia entre cada uno de los niveles de enfermedad establecidos fue similar.

**Palabras clave:** Crespera, *Coffea arabica*, *Xylella fastidiosa*, DAS-ELISA.

## ABSTRACT

The disease “Crespera” of coffee affects this culture in Costa Rica since 1980. This disease is attributed to *Xylella fastidiosa* and the most evident symptoms in leaves are: crispiness of the edge, pronounced secondary ribbing, chlorosis and deformities. In this study the dynamics of the disease was analyzed in a property located in Naranjo, Alajuela. The incidence of the disease as well as the severity of ill plants was compared in two samplings made in February and April of 2007. The presence and absorbance of the bacterium *X. fastidiosa* was obtained using the technique DAS-ELISA, the samples were taken from plants of different levels of the disease as well as in different layers and knots from healthy and ill plants. The incidence of the disease increased around a 6% between both samplings and the establishment of new ill plants was random, nevertheless in sectors where “Crespera” has been identified is possible to observe patches where the most severe symptoms are detected. Presence of the bacterium in healthy plants as in ill plants was diagnosed, and the absorbance analyses established that the greater concentration of bacterium is located in the oldest knots of the half and superior layers of plants, nevertheless is not possible to relate the bacterium concentration to the symptoms because the absorbance between each one of the established levels of disease was similar.

**Keywords:** Crespera, *Coffea arabica*, *Xylella fastidiosa*, DAS-ELISA.

- 
- <sup>1</sup> INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2007.



**DINÁMICA DE LA SINTOMATOLOGIA DE CRESPERA DEL CAFÉ  
Y SU RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE LA BACTERIA *Xylella fastidiosa*  
(Wells *et al*)**

**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**

---

**MSc. Vladimir Villalba Velásquez  
Profesor Asesor-ITCR**

---

**MSc. Miguel Barquero  
Asesor- Empresa**

---

**MBA. Jaime Brenes Madriz  
Lector**

## **Dedicatoria**

A mis padres (4), por todo el amor, apoyo y cariño incondicional del que me han llenado durante toda mi vida.

## **Agradecimientos**

El autor desea agradecer profundamente a las siguientes personas e instituciones:

Al ICAFE-CICAFE por el apoyo financiero y logístico sin los cuales cual no hubiera sido posible mi experiencia en este proyecto.

A todo el personal del CICAFE, muy en especial al MSc. Miguel Barquero por todo su apoyo y consejos durante la realización del proyecto. Igualmente al Ing. Fabián Echeverría por su mano amiga y la asistencia brindada durante este tiempo.

Al MSc. Vladimir Villalba por su ayuda y colaboración tanto a la hora de realizar este proyecto así como sus consejos y sus enseñanzas cuando fue mi profesor.

A todos los profesores de la Escuela de Biología que a través de los años y con sus conocimientos y experiencia permitieron formarme como profesional.

# **INDICE GENERAL**

<b>RESUMEN</b>	<b>2</b>
<b>ACREDITACION</b>	<b>3</b>
<b>DEDICATORIA</b>	<b>4</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>5</b>
<b>INDICE GENERAL</b>	<b>8</b>
<b>INDICE DE CUADROS</b>	<b>10</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>11</b>
<b>INDICE DE ANEXOS</b>	<b>13</b>
<b>1. INTRODUCCION</b>	<b>14</b>
<b>2. REVISION DE LITERATURA</b>	<b>16</b>
<b>2.1. Coffea Arabica</b>	<b>16</b>
Historia	16
Importancia socioeconómica en Costa Rica	17
Descripción botánica	18
Morfología general	18
Distribución geográfica	20
Plagas y enfermedades	20
<b>2.2. Crespera del Café</b>	<b>21</b>
Antecedentes	21
Síntomas	21
Investigación en Crespera	22
Estrategia de Control	25
<b>2.3. Xylella fastidiosa (Wells et al. 1987)</b>	<b>25</b>
Generalidades	25
Reproducción	26
Distribución geográfica	27
Hospederos	27
Enfermedades que se le atribuyen	27
Transmisión de <i>X. fastidiosa</i>	28
Importancia en café	28
<b>2.4. Técnicas de diagnóstico fitopatológico</b>	<b>29</b>
Ensayos de hibridación dot-blot	29
Restricción de la longitud de los fragmentos polimórficos (RFLP's).	30
Polimorfismos del DNA amplificado al azar (RAPD's)	30
Hibridación del ácido nucleico	30
Anticuerpos mono y policlonales	30
<b>2.1. Técnica ELISA</b>	<b>31</b>
Definición	31
Componentes (biomoléculas)	32
Anticuerpos	32

Antígenos _____	32
Tipos de ELISAS _____	32
Aplicación de la técnica _____	33
ELISA y <i>X. fastidiosa</i> _____	33
<b>3. OBJETIVOS _____</b>	<b>35</b>
<b>3.1. General _____</b>	<b>35</b>
<b>3.2. Específicos _____</b>	<b>35</b>
<b>4. MATERIALES Y METODOS _____</b>	<b>36</b>
<b>4.1. Dinámica de la enfermedad _____</b>	<b>36</b>
Índice de Enfermedad (IE) _____	36
Clasificación de individuos por severidad y presencia de la enfermedad a nivel foliar _____	36
Recopilación de datos _____	39
Cálculo del Índice de Enfermedad _____	39
Construcción de los mapas de incidencia/severidad _____	40
<b>4.2. Presencia y distribución de bacteria <i>X. fastidiosa</i> en plantas de <i>C. arabica</i> _____</b>	<b>40</b>
Colecta del material _____	41
Muestreo de hojas de diferentes partes de plantas con diferente nivel sintomatológico _____	41
Muestreo al azar de bandolas con diferente nivel de severidad foliar _____	42
Muestreo de 90 plantas de café con y sin síntomas de Crespera _____	42
<b>4.3. Protocolo de la técnica DAS-ELISA _____</b>	<b>43</b>
<b>5. RESULTADOS _____</b>	<b>47</b>
<b>5.1. Dinámica de la enfermedad _____</b>	<b>47</b>
<b>5.2. Comparación entre individuos sanos y enfermos de la presencia de <i>X. fastidiosa</i> _____</b>	<b>50</b>
<b>5.3. Comparación entre niveles del Índice de Enfermedad de la absorbancia de <i>X. fastidiosa</i> _____</b>	<b>52</b>
<b>5.4. Comparación entre estratos y nudos de la absorbancia de <i>X. fastidiosa</i> _____</b>	<b>53</b>
<b>6. DISCUSION _____</b>	<b>56</b>
<b>6.1. Dinámica de la enfermedad _____</b>	<b>56</b>
<b>6.2. Absorbancia de la bacteria en diferentes partes de la planta y en diferentes niveles de la enfermedad _____</b>	<b>59</b>
<b>7. CONCLUSIONES _____</b>	<b>63</b>
<b>8. RECOMENDACIONES _____</b>	<b>64</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA _____</b>	<b>65</b>
<b>10. ANEXOS _____</b>	<b>72</b>
<b>6.3. Anexo 1. Hoja de muestreo. _____</b>	<b>72</b>
<b>6.4. Anexo 1. Protocolo AGDIA para DAS-ELISA. _____</b>	<b>73</b>

## **INDICE DE CUADROS**

<b>Nº</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Escala de severidad de la enfermedad.	34
2	Ejemplo de la colocación de los datos de una planta enferma.	36
3	Niveles del IE para plantas de <i>C. arabica</i> .	37

## **INDICE DE FIGURAS**

<b>Nº</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Flor del café.	15
2	Hojas de <i>C. arabica</i> con síntomas de Crespera.	19
3	<i>Graphosephala permagna</i>	21
4	Colonia de <i>X. fastidiosa</i> en tejido xilemático de naranja	23
5	Placa de poliestireno.	28
6	Nivel 0 de severidad de Crespera del café.	34
7	Nivel 1 de severidad de Crespera del café.	34
8	Nivel 2 de severidad de Crespera del café.	34
9	Nivel 3 de severidad de Crespera del café.	35
10	Nivel 4 de severidad de Crespera del café.	35
11	Nivel 5 de severidad de Crespera del café.	35
12	División de la planta de café para los muestreos.	38
13	Distribución espacial de la severidad-incidencia en la finca para el muestreo del día 6 de febrero del 2006.	44
14	Distribución espacial de la severidad-incidencia en la finca para el muestreo del día 12 de abril de 2007.	44
15	Incidencia de Crespera en ambos muestreos.	46
16	Cantidad total de individuos según el nivel de IE para ambos muestreos.	47
17	Plantas dentro del cuadrante seleccionado para el muestreo.	48
18	Porcentaje de muestra con presencia de <i>X. fastidiosa</i> .	49
19	Promedio total de absorbancia según el IE.	49
20	Promedio de absorbancia entre estratos.	50
21	Promedio de absorbancia entre nudos.	51
22	Promedio de absorbancia entre nudos de bandolas muestreadas al azar.	51

- 23 Tendencia de absorbancia de *X. fastidiosa* a nivel de estrato y nudo de cada uno de los cinco niveles del IE. 52

## **INDICE DE ANEXOS**

<b>N°</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Hoja de muestreo	70
2	Protocolo AGDIA para DAS-ELISA	71

## **1. INTRODUCCION**

El origen del café (*Coffea arabica*) se remonta a Etiopía, donde el inicio de su consumo por parte de los seres humanos está encerrado en infinidad de historias y leyendas. En Costa Rica, existen registros de la aparición del café desde el siglo XVIII, mas no fue hasta el año de 1820 cuando se realiza la primera exportación de café a Inglaterra (Zamora, 1998).

Hoy en día, el café continúa siendo uno de los principales productos que identifican a nuestro país en mercados internacionales. La producción cafetalera ha creado un impacto socioeconómico y político importante pero ha sido desplazada durante los últimos años por motivos como la diversificación agrícola, la disminución de precios a nivel internacional y la aparición de patógenos que disminuyen el rendimiento de las parcelas.

Las plagas y enfermedades que afectan el cultivo del café han perjudicado de sobremanera la producción del grano. Los más importantes actualmente son: Ojo de Gallo (*Mycena citricolor*), Llaga Macana (*Ceratocystis fimbriata*) y la Broca del café (*Hypothenemus hampei*) (Zamora, 1998); sin embargo una enfermedad que ha cobrado relevancia durante la última década ha sido denominada “Crespera” del café. Esta enfermedad fue detectada por primera vez a principios de los años 80 en algunos lugares del Valle Central. Se caracteriza porque las plantas enfermas presentan una alta defoliación, entrenudos cortos, bajo rendimiento, hojas cloróticas y pequeñas, malformación en hojas, reducción del tamaño y calidad de la fruta, debilitamiento general de las plantas más afectadas y muerte en algunos casos. Comúnmente los síntomas de la crespera son confundidos con deficiencias nutricionales (Hidalgo *et al*, 2002).

Estudios realizados por centros de investigación en Brasil, Francia y Estados Unidos han identificado, por medio de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa

(PCR), la presencia de la bacteria *Xylella fastidiosa* en materiales de café con síntomas de la Crespeta (Rodríguez, 2002). Esta bacteria se desarrolla en el xilema de las plantas y provoca una reducción en la capacidad de absorber y transportar agua y nutrientes desde la raíz hasta la parte aérea, lo que conlleva a una disminución de la vitalidad de la planta que se evidencia principalmente en las hojas, afecta la calidad del fruto y en algunos casos hasta la muerte (Villalobos *et al*, 2006). Sin embargo, en otros países, tales como Colombia, la relación de la Crespeta con *X. fastidiosa* se ha desestimado dirigiendo su investigación hacia otros agentes causales y actualmente los centros de investigación de ese país tales como el CENICAFE han concluido que la enfermedad es producida por el fitoplasma CCD, del grupo 16SrIII ubicado en el floema de las plantas afectadas (Galvis *et al*, 2007).

El presente estudio tiene como objetivo estudiar la sintomatología de la Crespeta del café y su relación con la presencia de *X. fastidiosa*. Asimismo se pretende determinar el ritmo de avance de la enfermedad en un área determinada de una finca ubicada en el cantón de Naranjo, provincia de Alajuela, por medio del seguimiento de los síntomas en dos épocas diferentes de muestreo, febrero y abril del año 2007.

La importancia de esta investigación radica en observar la dinámica de la enfermedad en campo, y relacionar a *X. fastidiosa* como agente causal de la Crespeta, de esta forma apoyar la hipótesis que se maneja en el país por el Centro de Investigación en Café de Costa Rica (CICAFE), o por el contrario enfocar los objetivos de futuras investigaciones en otros agentes causales como los que se citan en países como Colombia. Con este estudio se obtendrá información importante la cual será de gran ayuda para desarrollar una estrategia de control y erradicación de esta enfermedad, que amenaza nuestro grano de oro.

## **2. REVISION DE LITERATURA**

### **2.1. Coffea Arabica**

#### Historia

El café (*Coffea arabica*) es originario de las tierras altas de Etiopía en la Republica de Yemen, en África. En un principio el café fue introducido en Arabia donde se descubrieron las virtudes y posibilidades económicas de esta planta. En esta zona, durante los siglos VI y IX, se desarrolló todo el proceso de cultivo y procesamiento del café (Zamora, 1998).

En 1573 se obtiene el primer registro por parte de un europeo (Rauwolf) de las características del café como bebida. Más no fue hasta 1645 cuando el café es importado por primera vez a Europa proveniente de África (Ariansen, 2002).

Debido a la alta cotización del café por el mercado Europeo así como para disminuir costos y los riesgos que involucraba el importarlo, se trasladaron algunas plantas desde Indonesia (que a su vez provenían de África) hacia Holanda con el fin de hacerlas crecer en invernaderos, sin éxito, descubriéndose que la planta de café solo crecía en lugares con latitudes tropicales (Ariansen, 2002).

El café empieza a ser introducido en América a partir de 1715 desde Francia hacia sus colonias como un cultivo de exportación para satisfacer la demanda Europea. En 1727, el café es llevado a Brasil, luego a Perú, Paraguay y en 1825 a Hawai. Se extendió a Puerto Rico y a El Salvador en 1740, a Guatemala en 1750, a Bolivia, Ecuador y Panamá en 1784 y por último a Costa Rica, procedente de Cuba y Guatemala, entre 1796 y 1798 (Zamora, 1998).

### Importancia socioeconómica en Costa Rica

En Costa Rica las primeras plantaciones de *C. arabica* datan de 1816. En el año de 1875 se realizó la primera exportación directa a Inglaterra, no sin antes exportar el grano a países como Colombia o Chile (Hernández, 2007).

La calidad del café producido en Costa Rica dió origen a relaciones comerciales y culturales beneficiosas ya que permitió el desarrollo intelectual de muchos estudiantes que viajaron a Inglaterra y regresaron aportando conocimientos en diferentes áreas como la medicina y la ingeniería. Esto permitió que Costa Rica pasara de ser la provincia más pobre de las colonias del Reino de Guatemala a finales del siglo XVIII, a uno de los países en mejor condición económica y cultural en la Centroamérica de la actualidad (Zamora, 1998).

A partir del cambio socioeconómico denominado “Diversificación Agrícola” ocurrido en Costa Rica en los años ochenta, el país ha disminuido paulatinamente su participación en el mercado del café. Sin embargo, mantiene una producción estable y de alta calidad enfocada principalmente a la venta de café gourmet o de primera clase (Hernández, 2007).

La importancia de la producción cafetalera se da principalmente en la generación de empleo que se observa en la labores de mantenimiento, cosecha y beneficiado (Zamora, 1998). Se estima que durante todo el año se emplea un promedio de 55.247 personas beneficiando en gran medida a estratos sociales medios-bajos que encuentran una forma de sustento y desarrollo para sus familias (Barquero, 2007).

Actualmente existen 97.614 hectáreas dedicadas al cultivo y a la producción de grano (Barquero, 2007). Se estima que en el 2006 se realizaron ventas por exportaciones que alcanzaron los \$227 millones, lo que corresponde al 3% del total de las exportaciones costarricenses (Procomer, 2007). El Instituto del Café de Costa

Rica (ICAFFE) estima que para el período que corresponde al 2006-2007 se cosecharán 2,42 millones de fanegas.

### Descripción botánica

#### Clasificación Botánica

Reino	Vegetal
División	Magnoliophyta
Clase	Dicotyledoneae
Subclase	Asteridae
Orden	Rubiales
Familia	Rubiaceae
Género	<i>Coffea</i>
Especie	<i>Arabica</i>



Figura 1.1. Flor del café.

Antoine de Jussieu fue el primero, en 1716, en establecer la descripción y clasificación del café la cual fue: *Jasminus Arabicum Laurifolio*, *cujus semen nos coffe diditur*. Que significa: "Jasmin con hojas como laurel cuyas semillas conocemos como café" (Ariansen, 2002). En 1753, Linneo establece que el cafeto es una variedad del género "*Coffea*" por lo que se abandona la teoría de que pertenece a la familia del Jasmín.

### Morfología general

Los arbustos y árboles de café son del tipo perenne, leñoso y de un tallo resistente cubierto de corcho. El meristemo apical tiene crecimiento continuo y en estado salvaje puede alcanzar los diez metros de altura. El alargamiento del tallo produce nudos y entrenudos (Monroig, 2002).

El eje central o ramas ortotrópicas que crecen verticalmente producen solamente yemas vegetativas. Las ramas laterales o plagiotrópicas se originan de yemas en las axilas de las hojas en el tallo central, estas se denominan bandolas, son las ramas

primarias y dan origen a ramas secundarias las que puede generar a su vez ramas terciarias (Zamora, 1998).

El sistema radical esta compuesto por una raíz pivotante que alcanza hasta 60 cm. De esta estructura salen dos tipos de raíces: unas fuertes y vigorosas que crecen en sentido lateral y que ayudan en el anclaje del arbusto y otras que salen de éstas de carácter secundario y terciario. Normalmente estas se conocen como raicillas o pelos absorbentes (Monroig, 2002).

Las hojas aparecen en ramas plagiotrópicas, en un mismo plano y en posición opuesta. Tienen forma elíptica a lanceolada, con lámina delgada, fuerte y ondulada y tienen de 12 a 24 cm de ancho (Zamora, 1998).

La flor de *C. arabica* se desarrolla en las axilas de las hojas (Figura 1.1). Esta flor tiene en la base un receptáculo corto que se prolonga en el cáliz de color verde que mide de 1 a 2 mm de largo, con 5 picos terminales; la corola es un tubo largo y cilíndrico en la base, de color blanco que mide de 6 a 12 mm de largo la cual se abre arriba en 5 pétalos; consta de 5 estambres insertados en el tubo de la corola alternando con los pétalos; el gineceo está constituido por un ovario súpero, con dos óvulos; el estilo es fino y largo con las terminaciones estigmáticas (Zamora , 1998).

El fruto del café es de forma ovalada o elipsoidal ligeramente aplanada, está constituido por diferentes partes tales como: epidermis, pulpa, pergamino y semilla. La pulpa esta formada por varios estratos de células grandes lignificadas y poliédricas, las más internas comprimidas y aplanadas. El fruto es de color verde al principio, luego se torna amarillo y finalmente rojo aunque algunas variedades maduran color amarillo (Monroig, 2002).

La semilla está constituida en su mayor parte por endospermo, el cual es coriáceo, verdoso o amarillento y forma un repliegue que se inicia en el surco de la cara plana.

Las células del endospermo contienen almidón, aceites, azúcares, alcaloides como cafeína y otras sustancias (FAO, 2001).

El embrión se encuentra en la parte basal y es hipocótilo cilíndrico y dos cotiledones superpuestos que miden de 2 a 5 mm. Al germinar la semilla brota la radícula que se curva hacia la tierra y produce raicillas laterales. El hipocótilo crece y levanta los cotiledones envueltos en el pergamino, lo mismo ocurre con la película plateada y los restos del endospermo que luego se desintegran. Al desaparecer las estructuras de los cotiledones verdes se extienden horizontalmente y entre ellos se desarrolla un tierno tallo que luego formará el resto del follaje (Zamora, 1998).

#### Distribución geográfica

El cultivo del café se extiende por la zona concentrada entre los dos Trópicos, el de Cáncer y Capricornio. Se cultiva en todos los continentes del mundo a excepción de Europa. Las mayores producciones de café provienen de Brasil, Colombia, Centro América, Puerto Rico, Jamaica, Camerún, Costa de Marfil, Vietnam, Indonesia, Java, India, Sumatra, Indonesia, Australia y Hawai, entre otros (Álvarez, 2006).

En Costa Rica el café se encuentra distribuido por todo el territorio nacional; sin embargo, se cultiva con mejores resultados de calidad en zonas tales como la Los Santos, Turrialba, Palmares, Orosi, y Turrialba. El mayor porcentaje de área cultivada se encuentra en el Valle Central (Zamora, 1998).

#### Plagas y enfermedades

El cultivo de *C. arabica* se ve afectado por una cantidad considerable de patógenos que disminuyen en gran manera el rendimiento. Al ser un cultivo importante a nivel comercial y por estar catalogado en muchas regiones de monocultivo, es blanco fácil de plagas y enfermedades.

Las plagas que afectan el cultivo del café en Costa Rica son mayormente insectos entre los cuales se puede mencionar: Broca (*Hypothenemus hampei* Ferrari), el Minador de la hoja del cafeto (*Leucoptera coffella*) y Gallina ciega (*Phyllophaga spp*). Por otro lado las enfermedades más comunes encontradas en los cafetales son: la Roya del café o roya amarilla (*Hemileia vastatrix*), Ojo de gallo (*Mycena citricolor*), Mal de hilachas o arañero (*Pellicularia koleroga* Cooke), Mancha de hierro o Cercospora (*Mycosphaerella coffeicola*), Llaga macana (*Ceratocystis fimbriata* Hunt), Antracnosis (*Colletotrichum coffeanum*) y la Crespera del café (atribuida a *X. fastidiosa*) (Figuerola, 1998, Zamora, 1998).

## **2.2. Crespera del Café**

### Antecedentes

Esta enfermedad fue reportada en Colombia en la primera mitad del siglo XX, país donde se bautiza con el nombre de “Crespera” del cafeto debido a las ondulaciones comunes en los bordes foliares (Chávez *et al*, 2000). En Costa Rica la enfermedad fue observada por primera vez en la década de los ochentas en distintas comunidades que en la actualidad conforman la región cafetalera de Los Santos (Barquero, 2007).

Para el año 2000 en la Zona de Los Santos existían 800 hectáreas afectadas por la enfermedad. Durante los años siguientes la enfermedad se dispersó alcanzando para el año 2002 sectores cafetaleros en cantones como Desamparados, Zaherí, León Cortés, Dota, Curridabat y Orosi. En el caso de Turrialba y Jiménez se ha localizado en Juan Viñas, Quijones y Atirro, sitios que fueron muestreados por la Oficina Regional del ICAFE (Solórzano *et al*, 2000).

### Síntomas

En Costa Rica se han observado plantas con alto grado de defoliación, entrenudos cortos, bajo rendimiento, hojas con manchas cloróticas y pequeñas. De igual forma

se encuentran plantas con otros síntomas tales como enanismo, hojas en ramillete, malformación y amarillamiento de estas, acortamiento de los entrenudos, proliferación de rebrotes, presencia esporádica de la bifurcación de la nervadura central de las hojas, reducción del tamaño y cantidad de la fruta, debilitamiento general de las plantas más afectadas y muerte en algunos casos (Figura 1.2). En las plantas afectadas se observa el oscurecimiento del xilema en el eje central de la planta así como en las bandolas (Solórzano *et al*, 2000; Rodríguez, 2002; Barquero, 2007).



Figura 1.2. Hojas de *C. arabica* con síntomas de Crespera.

Síntomas similares han sido encontrados en Colombia; sin embargo, en este país se consideran otros tales como: formación de rosetas y filodia en ramas, deficiencia de zinc en las hojas, fitotoxicidad con herbicidas, clorosis, cambio en número, forma y tamaño de las yemas florales, no ocurren grandes florescencias y transformación de las yemas florales (Barquero, 2007)

### Investigación en Crespera

Durante el principio de la década de los noventa, la investigación trató de aclarar si la sintomatología mostrada por individuos afectados correspondía a deficiencias relacionadas a la nutrición o a la condición de los suelos. Los estudios iniciales impulsados por el CICAPE demostraron que la sintomatología no correspondía a deficiencias nutricionales ni a características fisicoquímicas de los suelos (Rodríguez, 2002).

En años posteriores la investigación se enfocó en la búsqueda de posibles factores que provocaban la enfermedad. Se realizaron una serie de proyectos tales como: Inoculación mecánica de plantas sanas con savia de plantas con síntomas, mediante heridas en el tallo y por injerto de hoja; utilización de geles secuenciales de poliacrilamida para la detección de viroides; detección de fitoplasmas en café mediante la amplificación del ADN y posterior análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida y detección de *X. fastidiosa* mediante la prueba de ELISA. Cabe mencionar que en estos experimentos los resultados fueron negativos y no brindaron respuesta a las interrogantes planteadas (Barquero, 2007).

La investigación continuó buscando el agente patológico de la enfermedad, y en 1997, Moreira y colaboradores determinaron la presencia de estructuras semejantes a micoplasmas en tejidos enfermos mediante microscopía electrónica y análisis moleculares de PCR (Barquero, 2007). Esta conclusión se reforzó con estudios realizados en Colombia por Leguizamon y colaboradores en 1999 donde se determinó que existía una alta relación de la enfermedad con la presencia de un fitoplasma. En esta misma época, en Brasil, se detectó una sintomatología particular en hojas de café que se ligó con la bacteria *X. fastidiosa*, descubierta en 1987 y responsable de la enfermedad de Pierce en los cítricos (Lopes, 2003).

Para el año 2000 se desestimó la relación de la enfermedad con micoplasmas y durante este período se realizaron investigaciones incentivadas por el ICAFE donde por medio de PCR se determinó la infección de los materiales de café y cítricos con la bacteria *X. fastidiosa* (Rodríguez, 2002). A partir de este momento y en conjunto con el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica se desarrolló una metodología de muestreo y análisis para determinar la presencia de esta bacteria.

En estudios posteriores como el realizado por Iwasawa y colaboradores (2001) se analizaron muestras de café provenientes de la zona de Los Santos utilizando

microscopía electrónica. En este análisis se observó la presencia de bacterias baciliformes con estructuras características propias de bacterias Gram negativas invadiendo los vasos de xilema, estas bacterias fueron identificadas como *X. fastidiosa* (Barquero, 2007). Durante este período se definió y estandarizó la metodología para detectar *X. fastidiosa* por medio de la técnica ELISA en muestras de café y cítricos recolectadas en el campo en Costa Rica (Rodríguez, 2002).

En estudios realizados en Estados Unidos y Brasil a muestras de café de Costa Rica se logró confirmar la relación entre los Cicadelidos y *X. fastidiosa* por lo que se condujeron trabajos de investigación para recolectar, separar e identificar insectos de este tipo asociados al cultivo del café y a los cítricos; esto se realizó por medio del marco de un proyecto de cooperación interinstitucional desarrollado en el



Figura 1.3. *Graphosephala permagna* (Barquero,

años 2001-2005 entre el ICAFE – CIBCM (UCR) – INBio (Rodríguez, 2002; Barquero, 2007). En este estudio se lograron identificar las siguientes especies de cicadelidos: *Agrosoma placetis*, *Apogonalia stali*, *Chinaia bella*, *Dilobopterus hyalinatulus*, *Dilobopterus instratus*, *Erythrogonia areolata*, *Erythrogonia laeta*, *Erythrogonia sonora*, *Fusigonalia sp.*, *Graphocephala permagna*, *Macunolla ventralis*, *Nielsonia n.sp.* y *Scaphytopius sp.* La bacteria *X. fastidiosa* fue identificada en gran parte de los insectos recolectados, principalmente en *Graphosephala permagna* (Figura 1.3), donde se encontró en el 50% de la población así como en *Erythrogonia sonora* donde se encontró en un 25% (Rodríguez, 2002; Barquero, 2007).

Durante el 2006 se realizó un muestreo nacional con el fin de conocer la distribución de *X. fastidiosa* en toda la región cafetalera por medio de la técnica ELISA. Se concluyó que la bacteria está presente en el 97, 5 % de las muestras analizadas, tanto en plantaciones con y sin síntomas de Crespeta. Un dato importante fue que se eliminó la posibilidad de relacionar la altitud de las plantaciones con la presencia de la bacteria, pues se puede encontrar desde los 800 hasta los 1800 en la misma proporción (Barquero, 2007).

### Estrategia de Control

Si bien es cierto, aun no se ha determinado una estrategia de control diseñada específicamente al manejo de la Crespeta del café en Costa Rica, el CICAPE ha implementado una serie de recomendaciones con el fin de disminuir la incidencia de la enfermedad en los cafetales del país, entre las que podemos citar:

- Establecer un programa de certificación de viveros de café y de cítricos para evitar la infección de las plantas en los estados iniciales de desarrollo.
- Reducción de insectos vectores.
- Eliminar las plantas de café y cítricos infectados con *X. fastidiosa*.
- Evaluar la dinámica poblacional de los insectos vectores para determinar la época más indicada para implementar medidas de control.
- Establecer sitios de cuarentena en los sitios con alta incidencia de la enfermedad.
- No utilizar semilla proveniente de plantaciones infectadas.

### **2.3. *Xylella fastidiosa* (Wells et al. 1987)**

#### Generalidades

Este patógeno fue observado por primera vez en 1973 por Hopkins y Mollenhauer en *Vitis sp* y fue nombrada por Wells et al en 1987. *X. fastidiosa*, tiene un tamaño que oscila entre 0,3 y 1 nm, un rango de temperatura óptima entre 26 y 28 °C y un pH

óptimo para crecimiento de 6,5 a 6,9. Se determinó que esta era el agente causal de la Enfermedad de Pierce (Coll *et al*, 1997; Chaves *et al*, 2000 y Rodríguez, 2002).

En estudios taxonómicos el nombre *Xylella fastidiosa* fue propuesto para nombrar una serie de bacterias con características tales como: fastidiosas, Gram negativas y limitadas al xilema (Figura 1.4) (Hopkins, 2006). Estos procariotas requieren medios complejos para su crecimiento con nutrientes similares a los encontrados en el xilema de las plantas y son transmitidos por insectos que se alimentan de este tejido conductor, conocidos como cicadelidos (Machado, 1997)

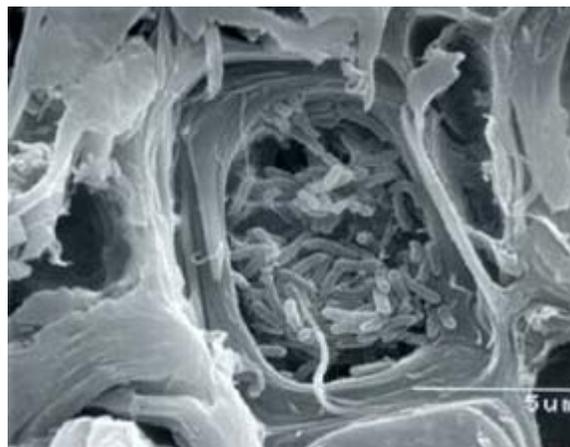


Figura 1.4. Colonia de *X. fastidiosa* en vaso xilemático de naranja.

(Tomada de [www.proteome.ibi.unicamp.br](http://www.proteome.ibi.unicamp.br))

### Reproducción

Este patógeno se manifiesta de diferente manera en sus distintos hospederos dependiendo de la cepa bacteriana así como de factores ambientales. La bacteria se multiplica únicamente en los vasos conductores (xilema) de manera asexual utilizando fisión binaria. Esta es una forma de división celular en la cual cada célula hija recibe una copia del cromosoma padre. El crecimiento es relativamente lento comparado con otras bacterias; sin embargo, puede ser sumamente rápido si sus recursos no se ven limitados así como si las colonias no se envenenan con la acumulación de desechos (ISSG, 2006).

### Distribución geográfica

*X. fastidiosa* está presente en el sur de Norte América, a través de Centro América y el norte de Sur América hasta Brasil. También ha sido detectada en Taiwán (ISSG, 2006).

### Hospederos

Esta bacteria tiene un rango de hospedero sumamente amplio que incluye 28 familias de mono y dicotiledóneas. Dentro de las especies hospederas se encuentran: Cenízaro de Oregon (*Fraxinus latifolia*), Laurel de California, (*Umbellularia californica*), Mora californiana (*Rubus ursinus*), Mora del Himalaya (*Rubus discolor*), Uva silvestre (*Vitis* spp.), Poison Hemlock (*Conium maculatum*), Maple de hoja gigante (*Acer macrophyllum*), Mugwort (*Artemisia vulgaris*), Ortiga (*Urtica dioica*), Roble de la costa (*Quercus agrifolia*), Roble de Valle (*Quercus lobata*), café (*Coffea arabica*), Periwinkle (*Vinca minor*), Roble venenoso (*Toxicodendron diversilobum*), Rosa Salvaje (*Rosa woodsii*), Snowberry (*Symphoricarpos albus*), cítricos (*Citrus* spp.), Sauce (*Salix lasiolepis*), Sauce Rojo (*Salix lasiandra*), Oleander (*Neerium oleander* L.), Alfalfa (*Medicago sativa*), Maple (*Acer* spp.) y Olmo (*Ulmus* spp.), entre otros (ISSG, 2006 y Hopkins, 2006).

### Enfermedades que se le atribuyen

Al tener un amplio rango de hospederos se le atribuye gran cantidad de enfermedades dentro de los que sobresalen: Enfermedad de Pierce, Quema de la hoja de almendra, Alfalfa enana, Clorosis variegada de los cítricos, Quema bacteriana de la hoja de roble, Quema bacteriana de la hoja de olmo, Enfermedad falsa de durazno, Quema de la hoja de maple, Quema de la hoja de pera, Quema de la hoja de café (Brasil), Crespada (Costa Rica) (Machado, 1997; Krivanek *et al*, 2005, ISSG, 2006 y Purcell, 2007).

La investigación de estas enfermedades se ha dificultado por el hecho de que *X. fastidiosa* está presente en plantas sintomáticas así como en plantas asintomáticas, a esto debe añadirse el difícil aislamiento de la bacteria.

#### Transmisión de *X. fastidiosa*

Esta bacteria infecta tejidos xilemáticos y puede transmitirse por tres formas:

- Injerto con material contaminado.
- Daño mecánico con herramientas contaminadas.
- Vectores.

Los insectos vectores de *X. fastidiosa* son aquellos exclusivamente succionadores cuya potencialidad como transmisores de esta bacteria se centra en el modo de alimentación, permitiendo que sus estiletes alcancen los tejidos vasculares de la planta sin producir destrucción de las células adyacentes, asegurando así el éxito de la infección (Coll *et al*, 1997).

Estos vectores especializados en alimentarse del xilema, están clasificados taxonómicamente de la siguiente manera: Orden Homóptera, suborden Homóptera, familia Cicadellidae (Purcell, 2007). Dentro de los más importantes se mencionan: *Graphocephala atropunctat*, *Draeculacephala minerva*, *Xyphon Carneocephala*, *Homalodisca coagulata*, *Acrogonia terminalis*, *Dilobopterus costalimai* y *Oncometopia fascialis*.

#### Importancia en café

Los estudios realizados en *C. arabica* han demostrado que este cultivo es hospedero de la bacteria *X. fastidiosa*. Estudios serológicos a partir de inmunofluorescencia o ELISA así como estudios que han utilizado la técnica molecular PCR han brindado resultado positivos en la identificación de este patógeno en tejidos de café (Barquero, 2002).

En Brasil, la enfermedad de la Quema de la Hoja es atribuida a *X. fastidiosa* desde 1997. En Costa Rica también se ha responsabilizado a esta bacteria de provocar Crespera, una enfermedad con características similares a la Quema de la hoja y se determinó que diferentes híbridos del género *Coffea spp.* son hospederos de *X. fastidiosa* entre ellos: *Coffea kapakata*, *C. canephora*, *C. racemosa*, *C. dewevrei*, *C stenophylla*, *C eugenioides* así como los híbridos *C. arabica* *C. dewevrei*, *C. arabica* x *C. eugenioides*, *C. arabica* x *C racemosa* y *C. arabica* x *C robusta*. Igualmente, estudios realizados por el INBio-CICAPE lograron coleccionar insectos vectores de presencia común en cafetales del país determinando la presencia de la bacteria en gran cantidad de ellos (Rodríguez, 2002; Barquero, 2007).

#### **2.4. Técnicas de diagnóstico fitopatológico**

La creciente demanda de alimentos a nivel mundial ligado a la disminución en la cantidad de terrenos agrícolas aprovechables así como al aumento en la aparición de enfermedades y plagas en los cultivos ha provocado un desarrollo científico y tecnológico enfocado a la solución de estos problemas agrícolas. La biotecnología agrícola ofrece un beneficio potencial en la producción de cultivos, a través de la multiplicación masiva de plantas, plantas resistentes a plagas y enfermedades, así como la manipulación de microorganismos para el control de plagas y enfermedades (Cultek, 2007).

Las principales herramientas de la biotecnología que se utilizan con el fin de identificar patógenos en cultivos agrícolas son la tecnología de hibridación del ácido nucleico e inmunoensayos.

##### Ensayos de hibridación dot-blot

Este tipo de ensayos consisten en colocar una muestra de ácido nucleico desnaturalizado de plantas sanas y plantas infectadas en una membrana de nitrocelulosa. La membrana se incuba varios minutos con una solución de

prehibridación (mezcla de DNA no homólogo y proteína), después se remueve la solución de prehibridación la cual contiene una sonda específica de DNA. La hibridación entre el DNA de la membrana y la sonda es detectada por una autoradiografía sobre película de rayos X (Cultek, 2007).

#### Restricción de la longitud de los fragmentos polimórficos (RFLP's).

Un RFLP incluye el aislamiento y purificación de DNA genómico o de organelas, seguidos por digestión del DNA purificado con enzimas de restricción. Las enzimas (comúnmente Bam HI, EcoR1, HindIII y Pst1) cortan el DNA en secuencias de reconocimiento específico de 4 o 6 nucleótidos. Los fragmentos son separados por geles de agarosa (Mandigan, 2003).

#### Polimorfismos del DNA amplificado al azar (RAPD's)

Los RAPDs son un ensayo de polimorfismo basado en la amplificación de segmentos de DNA al azar utilizando varios primers de secuencia arbitraria. No usa oligonucleótidos específicos a diferencia del par que se usan en PCR (Mandigan, 2003).

#### Hibridación del ácido nucleico

La técnica conocida como hibridación de ácidos nucleicos es una poderosa aplicación de la especificidad con que las moléculas de ADN y ARN forman estructuras dúplex estables. Este método de apareamiento de bases se usa para identificar y determinar la localización de secuencias de ácidos nucleicos específicas dentro de grandes secuencias como puede ser un genoma o mezclas de moléculas de ARN. Dentro de esta técnica se encuentran: Hibridación Southern, Hibridación Northern, PCR, Real Time PCR, entre otros (Cultek, 2007).

#### Anticuerpos mono y policlonales

En estos ensayos se utilizan anticuerpos marcados con enzimas para detectar la presencia de antígenos aislados previamente de tejidos vegetales los cuales son

propios de organismos específicos, entre estas se encuentran los ensayos de inmunoabsorbancia de enzimas conjugadas (ELISA) e inmunofluorescencia (IF) (Coto, 2005).

## 2.1. Técnica ELISA

### Definición

ELISA es la abreviación de enzyme-linked immunosorbent assay, este método se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo)

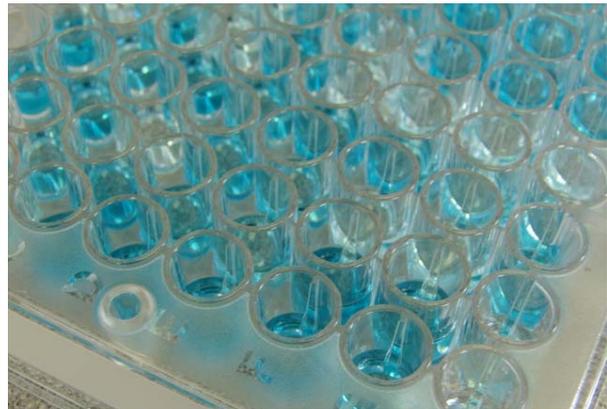


Figura 1.5. Placa de poliestireno

marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmobilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro (Ma *et al*, 2006).

El procedimiento más común se realiza en una placa de poliestireno de 96 pocillos sobre la que se fijan los anticuerpos de interés (Figura 1.5). Al añadir la muestra que contiene el antígeno complementario se produce una unión que se puede detectar mediante la adición de un segundo anticuerpo contra el mismo antígeno,

éste marcado con una enzima que al añadirle un substrato se hidroliza dando una reacción de color. La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra analizada (Cultek, 2007).

### Componentes (biomoléculas)

#### Anticuerpos

Los anticuerpos, también denominados inmunoglobulinas (Ig), son glicoproteínas de alto peso molecular (150.000 a 900.000 kDa) que se producen en los plasmocitos en respuesta a la presencia de un antígeno extraño en el organismo que proviene de una bacteria o de un virus (Coto, 2005). La producción de anticuerpos forma parte de la respuesta inmune humoral.

#### Antígenos

Los antígenos son moléculas (generalmente una proteína o un polisacárido) de superficie celular, que pueden inducir la formación de anticuerpos. Hay muchos tipos de moléculas diferentes que pueden actuar de antígenos, como las proteínas, los polisacáridos y, más raramente, otras moléculas como los ácidos nucleicos (Mandigan *et al*, 2003).

Un antígeno en mayor o menor medida, presenta dos características primordiales: inmunogenicidad o capacidad que presenta una molécula para generar una respuesta inmune en un organismo dado y la antigenicidad o particularidad del antígeno que hace que éste sea reconocido por un determinado anticuerpo (Coto, 2005).

#### Tipos de ELISAS

Existen varios tipos de ELISAS, sin embargo los más importantes y usados comúnmente son el ELISA directo, el ELISA indirecto y el DAS-ELISA o ELISA Sandwich el cual fue el utilizado durante el presente estudio (Cultek, 2007).

### Aplicación de la técnica

El ensayo ELISA ha sido usado en campos en los cuales es importante determinar la presencia y cuantificación de productos mediante anticuerpos tales como diagnóstico clínico, detección viral, clasificación de anticuerpos en isotipos, búsqueda de anticuerpos monoclonales, etc (Mandigan *et al*, 2004).

En fitopatología ha sido un método utilizado en la detección y diagnóstico de enfermedades producidas por virus, tales como PPV, CLSV y TRSV en frutales; CTV en cítricos; PLRV, PVY, PVX, PVA y TRV en papa. Igualmente se utiliza en la investigación de enfermedades producidas por bacterias, micoplasmas así como hongos en cultivos ornamentales y de importancia agrícola tales como la uva, el café y el arroz entre otros (Cultek, 2007).

### ELISA y *X. fastidiosa*

El diagnóstico de *X. fastidiosa* en diversos cultivos por medio de la técnica ELISA ha sido realizado por una gran cantidad de autores. Estudios en Brasil realizados por Gonzáles y colaboradores en el 2002 determinaron la presencia de *X. fastidiosa* en tejidos de cítricos que presentaban síntomas de CVC. Anteriormente y en este mismo país se había comprobado por medio de ELISA la transmisión de *X. fastidiosa* de plantas con síntomas de CVC a plantas sanas por medio de injertos de tejido radical (He *et al*, 2000).

Li y colaboradores en el 2002 diagnosticaron la presencia de la bacteria en especies de café, cítricos y uva; en este estudio se determinó con el uso de PCR se que las cepas de *X. fastidiosa* que infectaban cítricos y café provocaban la enfermedad de Pierce en uvas.

En el 2005, Krivanek y colaboradores lograron determinar la concentración de esta bacteria en diversos tejidos de *Vitis spp.* utilizando un procedimiento optimizado de DAS-ELISA. Para esto produjeron concentraciones de anticuerpos policlonales

específicos a antígenos de *X. fastidiosa* y relacionaron esta concentración con la absorbancia de las muestras de tejidos procesadas en el ELISA y obtenidas de plantas enfermas mantenidas en invernaderos.

En café se ha determinado la presencia de *X. fastidiosa* en varios estudios como los realizados por Lima y colaboradores en 1998 así como por Yorinori y colaboradores y en el 2003. En Costa Rica desde el 2002 se han realizado ensayos inmunológicos para diagnosticar la presencia de la bacteria en cafetales del país, con resultados positivos en la mayoría de los casos (González, 2002). Actualmente la metodología para determinar la presencia de *X. fastidiosa* en el país incluye los análisis DAS-ELISA, tal es el caso de una de las investigaciones más recientes donde se está realizando un mapa de la presencia de *X. fastidiosa* en las principales zonas cafetaleras del territorio nacional (Barquero, 2007).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. General**

Estudiar la dinámica de la enfermedad conocida como "Crespera del café" en campo relacionando la sintomatología de ésta con la presencia de la bacteria *Xylella fastidiosa* por medio de la técnica DAS-ELISA.

#### **3.2. Específicos**

- Diseñar un método de evaluación que combine la distribución de síntomas de la enfermedad en la planta con los niveles de severidad.
  
- Evaluar la dinámica de la "Crespera del café" en una finca, ubicada en el distrito de Cirrí, cantón de Naranjo, provincia de Alajuela.
  
- Relacionar el Índice de Enfermedad (IE) con la absorbancia de la bacteria *X. fastidiosa* presentes en plantas con diferentes grados de enfermedad.
  
- Relacionar el IE con la absorbancia de la bacteria *X. fastidiosa* presentes en nudos de bandolas provenientes de tres estratos de plantas con y sin síntomas.

## **4. MATERIALES Y METODOS**

### **4.1. Dinámica de la enfermedad**

La finca en la cual se obtuvieron las muestras de café con síntomas de Crespera pertenece a la señora Nuria Solano y se encuentra ubicada en el distrito de Cirrí, cantón de Naranjo, provincia de Alajuela, ubicada a 10° 07' 183" latitud norte y 84° 22' 003" longitud oeste, Costa Rica.

Para este estudio se delimitó un área de la finca la cual comprende veinte hileras de longitud variable, que comprende una superficie aproximada de 1500 m<sup>2</sup>, se incluyeron todos los individuos presentes en cada hilera para un total de 1381 plantas de café, se muestreo el 100% de la población cuya edad variaba entre 15 – 20 años.

Se realizaron dos muestreos, el primero el 6 de febrero y el segundo el 12 de abril del año en curso; para esto se tomó cada una de las plantas de *C. arabica* y se realizó la clasificación sintomatológica utilizando los niveles de clasificación del Índice de Enfermedad cuyo diseño será descrito más adelante. Los datos tomados en ambos muestreos se reportaron en la hoja de muestreo diseñada para éste estudio (Anexo 1).

#### **Índice de Enfermedad (IE)**

##### **Clasificación de individuos por severidad y presencia de la enfermedad a nivel foliar**

Las plantas de café se clasificaron según la severidad de Crespera a nivel foliar. Se definieron 6 niveles sintomatológicos los cuales se muestran en el Cuadro 1. Además de esto se determinó por observación el porcentaje de presencia de síntomas en la planta y se tomó en cuenta aquellos que estaban presentes es un porcentaje cercano o mayor al 25% de la totalidad de la planta.

**Cuadro 1.** Escala de severidad de la enfermedad.

Nivel	Descripción	Fotografía
1	<ul style="list-style-type: none"> <li><input checked="" type="checkbox"/> Sin Síntomas, planta sana.</li> </ul>	
2	<ul style="list-style-type: none"> <li><input checked="" type="checkbox"/> Hojas con longitud mayor a 12 cm.</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> Nervaduras secundarias pronunciadas evidentes a vista y tacto.</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> Encrespamiento leve en el borde la de hoja.</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> Sin acortamiento de entrenudos</li> </ul>	
3	<ul style="list-style-type: none"> <li><input checked="" type="checkbox"/> Hojas con longitud mayor a 12 cm.</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> Nervaduras secundarias con mayor pronunciación. Acortamiento de los entrenudos.</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> Encrespamiento moderado en el borde la de hoja.</li> </ul>	

*Figura 6.* Nivel 1 de severidad de Crespera del café

*Figura 7.* Nivel 2 de severidad de Crespera del café

*Figura 8.* Nivel 3 de severidad de Crespera del café

**4**

- ☑ Hojas entre 8-11 cm.
- ☑ Entrenudos cortos
- ☑ Nervadura secundaria pronunciada.
- ☑ Encrespamiento moderado en el borde foliar.
- ☑ Presencia o no de pequeñas invaginaciones en el borde de la hoja.
- ☑ Clorosis distribuida en toda la hoja.



*Figura 9.* Nivel 4 de severidad de Crespada del café

**5**

- ☑ Hojas entre 7-11 cm.
- ☑ Entrenudos cortos.
- ☑ Nervadura secundaria pronunciada.
- ☑ Malformaciones del borde foliar.



*Figura 10.* Nivel 5 de severidad de Crespada del café

**6**

- ☑ Hojas de longitud menor a 8 cm.
- ☑ Nervadura secundaria pronunciada.
- ☑ Entrenudos cortos.
- ☑ Clorosis general.
- ☑ Atrofia general de la hoja.
- ☑ Ancho de lamina de la hoja: 1-3 cm



*Figura 11.* Nivel 6 de severidad de Crespada del café

### Recopilación de datos

Los datos se obtuvieron recorriendo el área delimitada y observando la sintomatología de cada uno de los individuos. Por cada planta se determinaron aquellos síntomas que presentaron una manifestación igual o mayor al 25% y se anotaron según su porcentaje de presencia. Se utilizaron las hojas de muestreo encontradas en el anexo 1.

Los síntomas menos severos de cada individuo se colocaron en las primeras casillas y se avanzó de manera ascendente hasta completar las cuatro casillas. En el cuadro 2 se observa la correcta disposición de los datos de una planta muestreada, esta presentaba un 50% de presencia del síntoma 4, un 25% de presencia del síntoma 3 y el resto de la planta se encontraba sana.

Cuadro 2. Ejemplo de la colocación de los datos de una planta enferma.

# Fila	# Ind	Porcentaje / severidad			
8	5	<b>Casilla 1</b>	<b>Casilla 2</b>	<b>Casilla 3</b>	<b>Casilla 4</b>
		25%	25%	25%	25%
		1	3	4	4

Fuente. Centro de Investigación en Café, Barva de Heredia, Costa Rica

### Cálculo del Índice de Enfermedad

La información obtenida en cada uno de los muestreos fue analizada matemáticamente de acuerdo a un sistema apropiado que tomase en cuenta los valores de severidad. Para esto fue utilizada una forma simplificada de la fórmula de la Toma de Decisiones de Gerez y Grijarva (1980) que se expresa de la siguiente manera:  $\sum X_i V_i$ , entonces,  $X_1(V_a) + X_2(V_b) + X_3(V_c) + X_4(V_d)$ . En esta

fórmula “X” corresponde al valor de severidad de cada una de las casillas y “V” son valores constantes que en el caso de este proyecto correspondieron a:  $V_a=1$ ,  $V_b=2$ ,  $V_c=4$  y  $V_d=8$  los cuales son criterios de grados de condición de la enfermedad.

El valor de enfermedad obtenido a partir de esta fórmula sirve para ubicar cada una de las plantas en uno de los niveles del Índice de Enfermedad el cual es la clasificación final para las plantas enfermas con Crespeta, ya que toma en cuenta tanto la combinación de síntomas dentro de un mismo individuo así como el porcentaje de presencia de estos síntomas. Los niveles del Índice de Enfermedad se encuentran en el Cuadro 3.

**Cuadro 3.** Niveles del IE para plantas de *C. arabica*.

<b>Nivel</b>	<b>Valor de enfermedad</b>	<b>Descripción</b>
<b>1</b>	1 – 20	Individuos Sanos
<b>2</b>	21 – 40	Individuos con síntomas iniciales
<b>3</b>	41 – 60	Individuos con síntomas iniciales - medios
<b>4</b>	61 – 80	Individuos con síntomas medios - graves
<b>5</b>	81 – 100	Individuos con síntomas sumamente graves

Fuente. Centro de Investigación en Café, Barva de Heredia, Costa Rica

#### Construcción de los mapas de incidencia/severidad

Con el IE de cada planta determinado en ambos muestreos, se construyeron dos mapas de la finca. Cada individuo se identificó con un color que corresponde a su nivel en el IE.

#### **4.2. Presencia y distribución de bacteria *X. fastidiosa* en plantas de *C. arabica***

### Colecta del material

Para este estudio se muestrearon hojas de café con síntomas y sin síntomas de Crespeta obtenidas en la finca bajo estudio. Para esto se tomo una muestra representativa que correspondió al 15% de una población que comprendía 1381 individuos.

Se realizaron tres tipos de muestreo con el fin de determinar la relación de la presencia y absorbancia de *X. fastidiosa* en plantas con y sin síntomas de la enfermedad de la Crespeta del café los cuales se detallan a continuación:

### Muestreo de hojas de diferentes partes de plantas con diferente nivel sintomatológico

Se seleccionaron 50 plantas de café, 12 individuos por cada nivel de enfermedad a excepción del nivel 5 donde solo se contaba con 3 plantas. Cada planta fue dividida en estratos consistió en: inferior (primeras dos bandolas), superior (últimas tres bandolas) y medio (bandolas entre ambos estratos) (Figura 12B); igualmente las bandolas de cada estrato fueron divididas en tres secciones: interna (primeros dos nudos), externo (últimos tres nudos) y medio (nudos no incluidos) (Figura 12B).

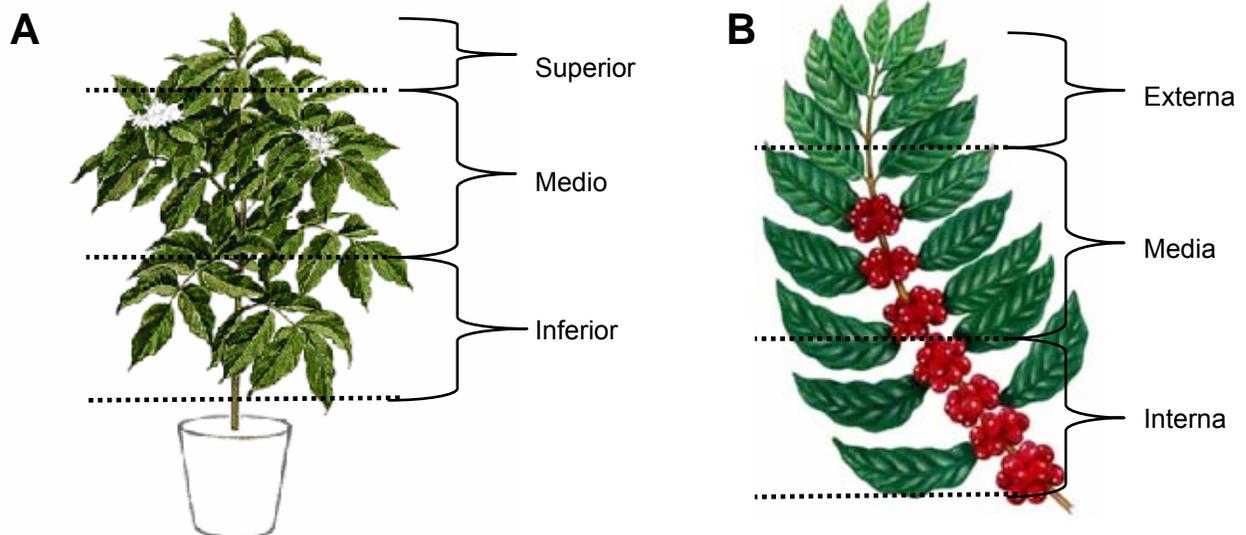


Figura 12. División de la planta de café para los muestreos. **A.** Estratos en que se dividieron las plantas de café. **B.** Secciones en que se dividieron las bandolas.  
(Imágenes tomadas de ww.anyheart.org)

Cada una de las muestras consistió en 3 hojas tomadas al azar de cada sección de diferentes bandolas en cada estrato, para un total de 27 hojas por planta. Las hojas fueron tomadas *in situ* y se depositaron en bolsas plásticas de 500 ml, transparentes, con la debida información de colecta y fueron llevadas al Laboratorio de fitopatología del CICAFFE en Barva de Heredia.

En el laboratorio se cortaron los pecíolos de cada muestra (triada), se colocaron juntos en tubos eppendorf de 1,5 ml con 600 ul de buffer de extracción, se cerraron y refrigeraron a 4°C para posteriormente realizarle la prueba de detección de *X. fastidiosa* con el kit ELISA.

#### Muestreo al azar de bandolas con diferente nivel de severidad foliar

Se tomaron 72 bandolas completas de diferente nivel de severidad foliar de plantas de café seleccionadas al azar. Cada bandola fue enumerada y colocada en una bolsa plástica, de 1000 ml, transparente, debidamente rotulada e identificada. Las muestras fueron llevadas al Laboratorio de Fitopatología del CICAFFE, allí se cortaron dos pecíolos de la parte interna, la parte media y la parte externa de cada bandola, cada par de pecíolos se colocó en un tubo eppendorf de 1,5 ml con la señalización indicada de su posición y de la bandola de la cual se extrajeron; cada tubo se refrigeró completamente cerrado a 4°C. Posteriormente se les realizó la prueba de detección de *X. fastidiosa* con el kit ELISA.

#### Muestreo de 90 plantas de café con y sin síntomas de Crespera

Se seleccionó un cuadrante de la finca de aproximadamente 150 m<sup>2</sup> que incluía un total de 90 individuos de *C. arabica* con y sin síntomas de Crespera. Con la finalidad de comparar los diferentes niveles del IE presentes con la absorbancia de *X. fastidiosa* De cada planta de café se tomaron al azar tres hojas, estas se obtuvieron del estrato superior de la planta y de la parte interna de la bandola. Las muestras se colocaron en bolsas plásticas, de 500 ml, transparentes, rotuladas y fueron llevadas al Laboratorio de Fitopatología del CICAFFE, en este lugar se cortaron los pecíolos

obtenidos de cada individuo, se introdujeron en tubos eppendorf de 1,5 ml, se cerraron completamente y se refrigeraron a 4°C hasta que se les realizó la prueba para determinar la presencia de *X. fastidiosa* por medio del kit ELISA.

Con los resultados obtenidos en este muestreo se realizaron dos mapas del cuadrante de la finca seleccionado para comparar la distribución de los individuos sanos y enfermos con la distribución de la presencia de la bacteria.

Los datos fueron correlacionados evaluando el nivel de absorbancia con los niveles de sintomatología utilizando una regresión lineal.

### **4.3. Protocolo de la técnica DAS-ELISA**

Las pruebas de laboratorio tuvieron lugar en el CICAPE ubicado en San Pedro de Barva, provincia de Heredia, Costa Rica. Para este análisis fue utilizado el Kit AGDIA® para detección de *X. fastidiosa* por medio de DAS-ELISA. El protocolo utilizado fue el que proporciona la Empresa AGDIA (Anexo 2), el mismo se detalla a continuación:

#### *Materiales y equipo*

El Kit Agdia para la detección de *X. fastidiosa* por medio de ELISA contiene:

- Concentrado de anticuerpo de captura (anti-Xf).
- Conjugado de la enzima peroxidasa.
- Componente MRS.
- Solución sustrato de TMB peroxidasa.
- Placas ELISA.

#### *Procedimiento*

Se prepararon con antelación los buffers necesarios para llevar a cabo el análisis: Coating, PBST y Extracción:

- Buffer Coating

En 1000 ml de agua destilada se disolvió: 1,59 g de carbonato de sodio (anhidro), 2,93 g de bicarbonato de sodio y 0,2 g de acida de sodio. Este buffer se almacenó en botellas ámbar y se refrigeró a 4° C.

- Buffer PBST (lavado)

En 1000 ml de agua destilada se disolvió: 30 g de cloruro de sodio, 1,15 de fosfato de sodio dibásico (anhidro), 0,2 g de fosfato de sodio monobásico (anhidro), 0,2 g de cloruro de potasio y 0,5 ml de tween 20. Se almacenó en botellas transparentes y se conservó a temperatura ambiente.

- Buffer General de Extracción:

En 1000 ml de buffer PBST 1X se disolvió: 1,3 g de Sulfito de sodio (anhidro), 20, 0 g de polivinilpirrolidona (PVP), 0,2 g de ácida de sodio, 2,0 g de leche en polvo descremada y 20 ml de tween 20. Este buffer se almacenó en botellas transparentes y se refrigeró a 4° C.

#### *Adición del Anticuerpo de Captura en las Placas*

Se realizó la mezcla del anticuerpo de captura mezclando el concentrado del anticuerpo de captura (kit Agdia) con el buffer Coating, la relación de esta solución debe es de 1:200. Se pipeteó en cada pozo de la placa ELISA un volumen de 100 ul de esta solución. La placa se colocó en una cámara húmeda y se incubó durante 12 horas a 4°C.

Cuando finalizó la incubación, se desechó el contenido de los pozos y se realizaron tres lavados de la placa con buffer PBST 1X y dejándolo reposar durante 3 minutos entre cada uno. Finalmente se seca la placa con papel toalla.

#### *Adición de las muestras de material vegetal*

Se tomó parte del pecíolo y de la vena central de cada una de las muestras y se maceraron utilizando el buffer General de Extracción. La relación entre el material vegetal y el volumen de buffer a utilizar fue de 1:10 (g:ml).

Una vez que todas las muestras se encontraron maceradas, se dispensaron 100 ul de muestra en cada uno de los pozos de la placa. Se añadió el control positivo y el control negativo. La placa se colocó en una cámara húmeda y se incubó durante 12 horas a 4°C.

Finalizada la incubación, se desechó el contenido de los pozos de la placa ELISA y se realizaron tres lavados a la placa con el Buffer PBST 1X de igual manera en que se había realizado anteriormente. Se secó la placa con papel toalla.

#### *Adición del anticuerpo Anti Xf*

Se preparó el diluyente del conjugado enzimático mezclando el componente MRS (kit Agdia) con buffer PBST 1X, la relación fue de 1:4 (ml:ml). Para determinar el volumen necesario se preparó 1 ml de diluyente por cada 8 pozos utilizados o 10 ml por cada placa ELISA. El Conjugado enzimático (kit Agdia®) se añadió a este diluyente, la relación de esta solución fue de 1:200.

Se pipeteó cada pozo un volumen de 100 ul de solución. La placa se colocó en una cámara húmeda y se incubó durante dos horas a 37 °C.

Cuando finalizó la incubación, se desechó el contenido de los pozos y se realizó el tercer lavado de la placa con buffer PBST 1X de igual manera en que se realizó anteriormente. Se seca la placa con papel toalla.

#### *Adición del sustrato revelador*

Una vez que los pozos de la placa se encontraron completamente secos se añadió a cada pozo 100  $\mu$ l de sustrato TMB (kit Agdia®) y se dejó reposar 15 minutos en la cámara húmeda.

*Lectura de resultados*

Se analizan los resultados utilizando el lector para placas ELISA Microarrays Systems utilizando una longitud de onda de 650 nm.

## 5. RESULTADOS

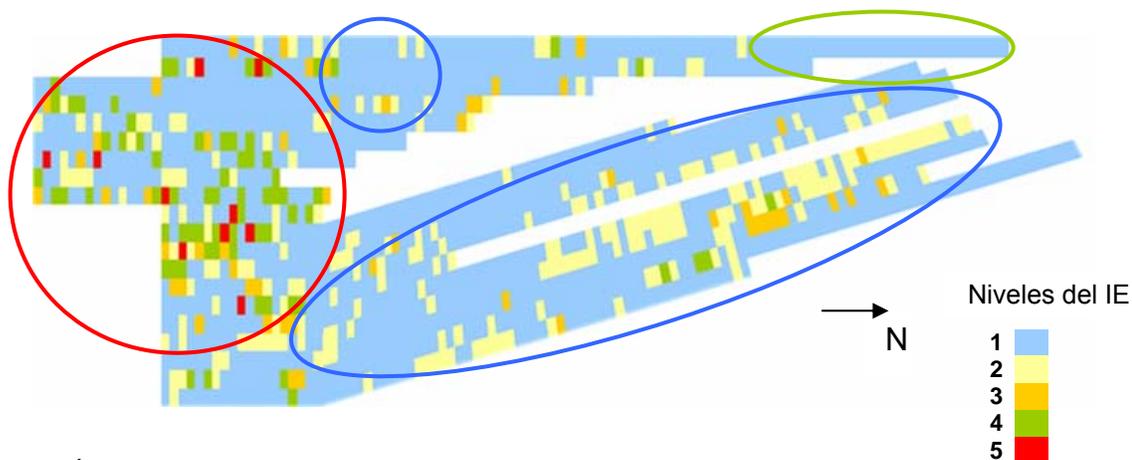
### 5.1. Dinámica de la enfermedad

Los datos obtenidos a partir de la fórmula de Gerez y Grijalva (1980) se utilizaron para la elaboración de los mapas ubicados en las figuras 13 y 14. Ambos mapas fueron realizados con la finalidad de observar la presencia de individuos enfermos en la finca, determinar incidencia y la severidad en la población total así como para observar la dinámica de la Crespeta en un período de dos meses.



\*IE=Índice de Enfermedad

Figura 13. Distribución espacial de la severidad-incidencia en la finca para el muestreo del día 6 de febrero del 2006.



\*IE=Índice de Enfermedad

Figura 14 Distribución espacial de la severidad-incidencia en la finca para el muestreo del día 12 de abril de 2007 (Elaborado con Microsoft Excel).

En ambas figuras se observa la totalidad de individuos muestreados en la finca, cada planta se encuentra identificada con un color determinado que corresponde a su nivel de enfermedad según el Índice de Enfermedad. En ambos mapas se señalan con círculos de diferentes colores las zonas de interés para el estudio.

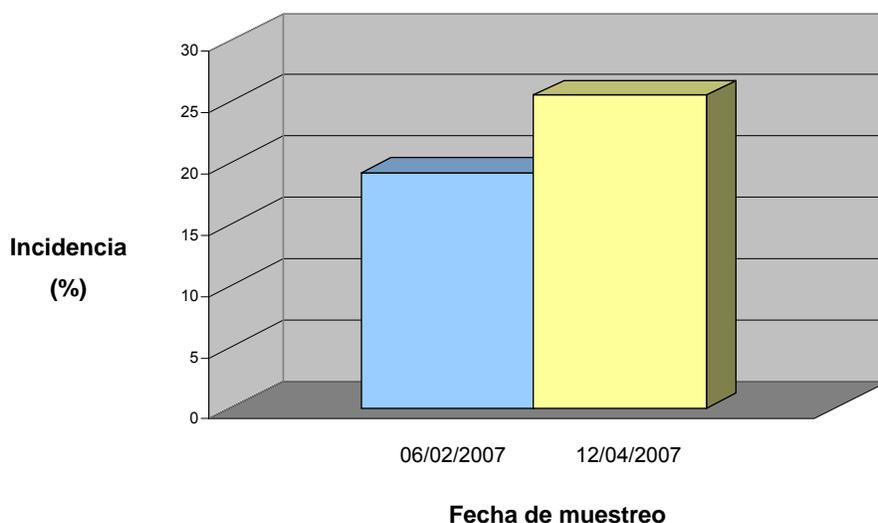
En círculos rojos se encierran zonas de alta concentración de plantas enfermas que presentan los niveles más altos del IE; en círculos azules aparecen zonas donde se encontraron individuos con los síntomas de menor severidad y en círculos verdes se señalan aquellos sectores donde no se encuentran individuos enfermos.

Se puede observar como el foco donde existe mayor concentración de individuos enfermos se encuentra en la parte Sur-Oeste, en este sector se encuentran localizadas plantas con todos los niveles de enfermedad. Se puede notar el aumento en la cantidad de individuos enfermos en este sector para el segundo muestreo así como un incremento en la severidad de los síntomas.

La Figura 13 que corresponde al primer muestreo se puede encontrar individuos enfermos con los niveles más bajos de enfermedad distribuidos de manera aleatoria, sin formar ningún tipo de aglomeración específica. En este mapa también se puede observar amplias zonas de plantas asintomáticas, en especial en el sector central de la plantación.

La Figura 14 evidencia la aparición de mayor cantidad de plantas con niveles iniciales de la enfermedad principalmente en la zona central, oeste y norte respectivamente. Se puede observar a su vez como las zonas asintomáticas del primer muestreo mostradas en la Figura 13 van desapareciendo debido a la aparición de plantas con los síntomas iniciales de la enfermedad.

Para observar del incremento en la incidencia de Crespeta en la finca se presenta la figura 15. En esta figura se muestra la diferencia de incidencia entre ambos muestreos, para el primero se reportó una incidencia menor al 20% mientras que para el segundo la incidencia es cercana al 25%.



*Figura 15.* Incidencia de Crespeta en ambos muestreos.  
(Elaborado con Microsoft Excel)

La cantidad de individuos según el nivel de enfermedad del IE varió entre un muestreo y el siguiente como muestra la figura 16. En esta se observa como para ambos muestreos el nivel con mayor cantidad de individuos es aquel que corresponde a las plantas sanas; sin embargo, para la segunda fecha de muestreo este nivel disminuye. En este gráfico se observa igualmente como ocurre un aumento en la cantidad de individuos de los siguientes niveles para el segundo muestreo, especialmente los de IE 2, 3 y 4.

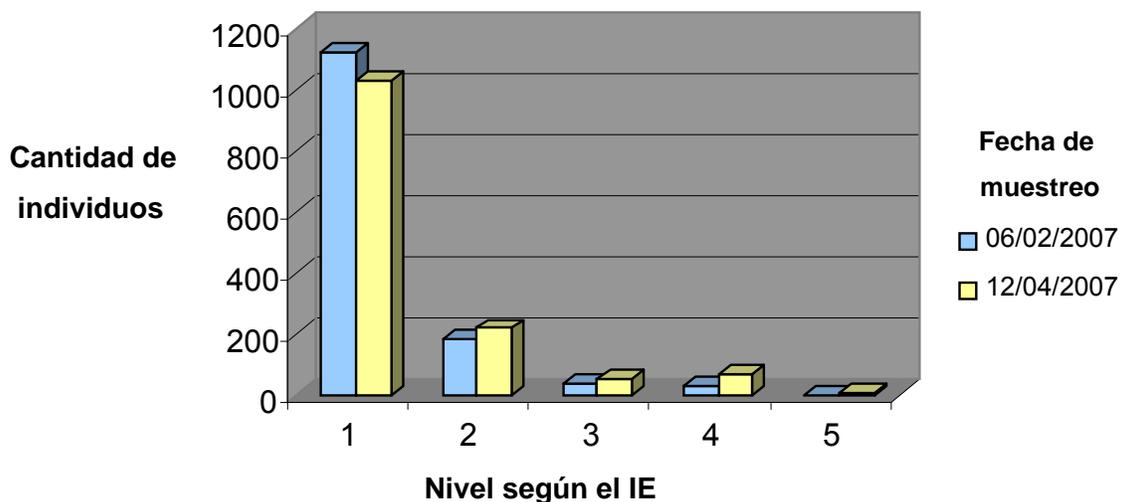


Figura 16. Cantidad total de individuos según el nivel de IE para ambos muestreos.  
(Elaborado con Microsoft Excel)

## 5.2. Comparación entre individuos sanos y enfermos de la presencia de *X. fastidiosa*

Se seleccionó un cuadrante de la finca para comparar el estado de la planta en relación a la Crespera (sana o enferma), con la presencia de la bacteria *X. fastidiosa*. Los resultados de este análisis se observan en las figura 17. Esta figura incluye dos cuadros que representan el cuadrante seleccionado y en cada uno se encuentra la totalidad de los individuos muestreados. En el cuadro A, con color anaranjado, se encuentran aquellas plantas con síntomas de Crespera y con color azul las plantas sanas. En el cuadro B se representan los individuos en los que se encontró presencia de *X. fastidiosa* de color amarillo y de color azul aquellos que no presentaron la bacteria.

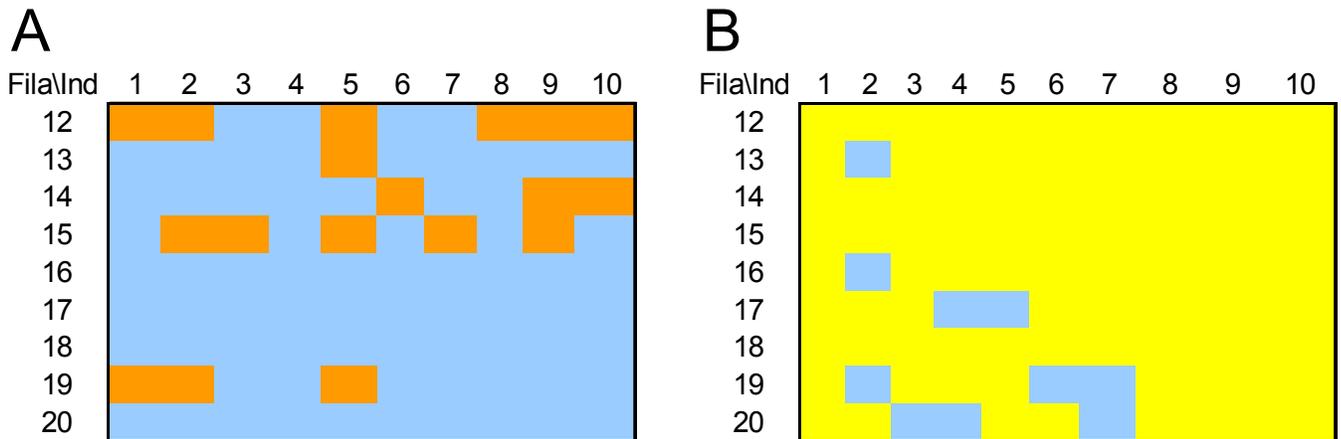


Figura 17. Plantas dentro del cuadrante seleccionado para el muestreo. Simbología: **A.** Anaranjado = plantas enfermas, Azul = Plantas sanas. **B.** Amarillo = Plantas con presencia de *X. fastidiosa*, Azul = Plantas sin *X. fastidiosa*.  
(Elaborado con Microsoft Excel)

Al comparar ambos mapas se distingue que en el cuadro A existe baja cantidad de plantas con síntomas de Crespera, mientras que en el cuadro B es predominante la cantidad de individuos con presencia de *X. fastidiosa*, se observa como la gran mayoría de plantas sanas contienen la bacteria.

El coeficiente de correlación entre la absorbancia de cada una de muestras en relación al grado de sintomatología de los individuos corresponde a 0,198, el cual es bajo, mostrando que la presencia de la bacteria no está relacionada con la presencia de síntomas de Crespera.

Resultados similares a la Figura 17B se obtuvieron al analizar la totalidad de la muestra (212 plantas) para los resultados que corresponden a la absorbancia de *X. fastidiosa* en partes de planta y entre niveles de IE, donde se obtuvo que el 95% de esta presentaba indicios de *X. fastidiosa*, tal como se observa en la figura 18.

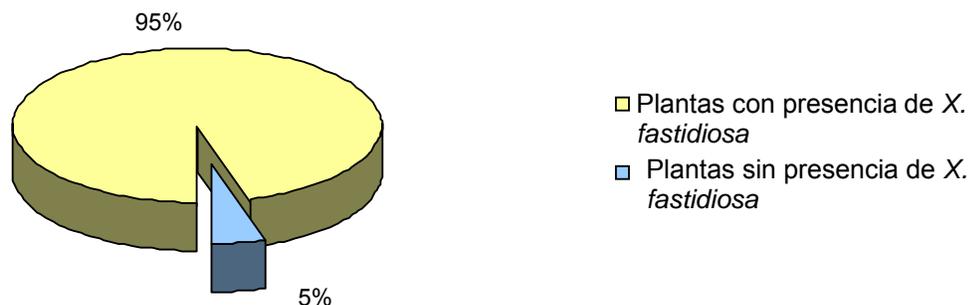


Figura 18. Porcentaje de muestra con presencia de *X. fastidiosa*.

### 5.3. Comparación entre niveles del Índice de Enfermedad de la absorbanza de *X. fastidiosa*

La comparación del promedio de absorbanza de *X. fastidiosa* entre 50 plantas de los cinco niveles del IE se presenta la figura 19. En esta figura es posible visualizar que el nivel 1 es el que presenta un promedio de absorbanza menor en comparación con los demás niveles, el cual es cercano a los 600 nm; el promedio de absorbanza del nivel 2 es mayor que el del nivel 1 ya que está cercano a los 1000 nm y los niveles 3, 4 y 5 son los que reportan los mayores promedios acercándose a los 1200 nm.

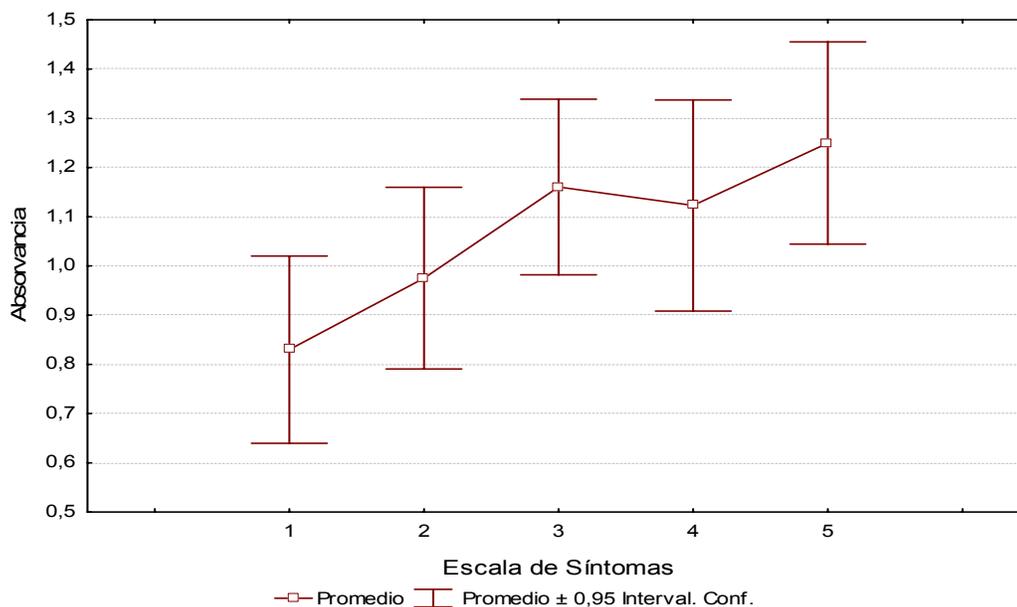


Figura 19. Promedio total de absorbanza según el IE.

(Elaborado con Microsoft Excel)

#### 5.4. Comparación entre estratos y nudos de la absorbancia de *X. fastidiosa*

A continuación se comparan las diferencias de absorbancia entre los estratos de la muestra de 50 plantas. En el gráfico 20 se observa como los mayores promedios se obtienen en los estratos medio y superior con cifras que van desde los 1200 nm a los 1400 nm respectivamente. Por el contrario el estrato inferior alcanza un promedio inferior a los 600 nm lo cual es bajo comparado con los otros dos.

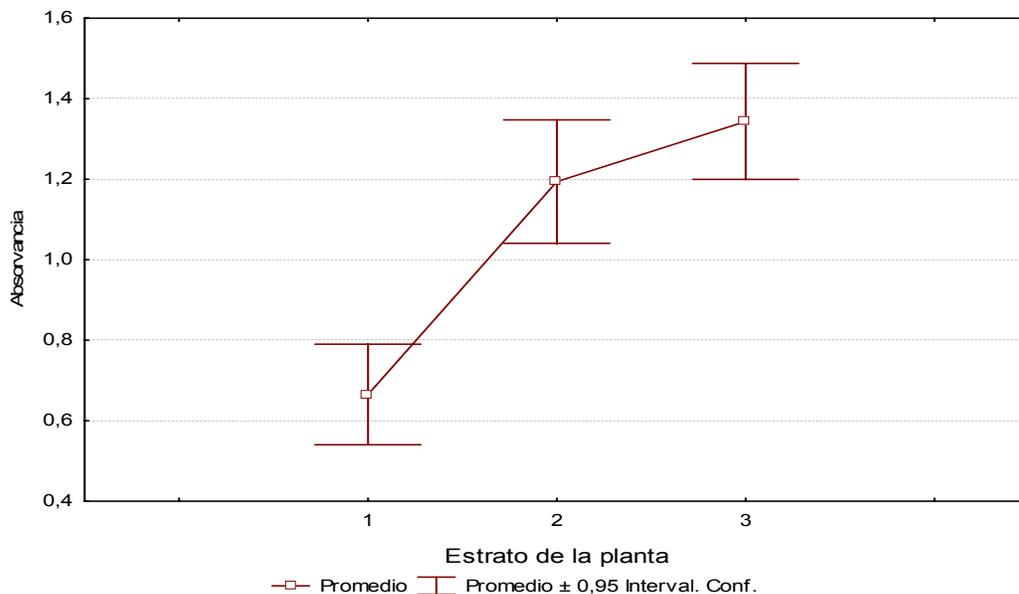


Figura 20. Promedio de absorbancia entre estratos.

La comparación de absorbancia de *X. fastidiosa* entre los nudos de las bandolas de la muestra de 50 individuos se puede observar en la figura 21. En este gráfico se presentan los promedios de absorbancia entre las tres partes en que se dividieron las bandolas muestreadas (interno, medio y externo). Se puede observar como las partes medias e internas son las que presentan promedios más altos de absorbancia

(alrededor de 1200 nm). El sector externo, que corresponde a las partes más nuevas de la bandola, es el que presenta un promedio menor, rondando los 700 nm.

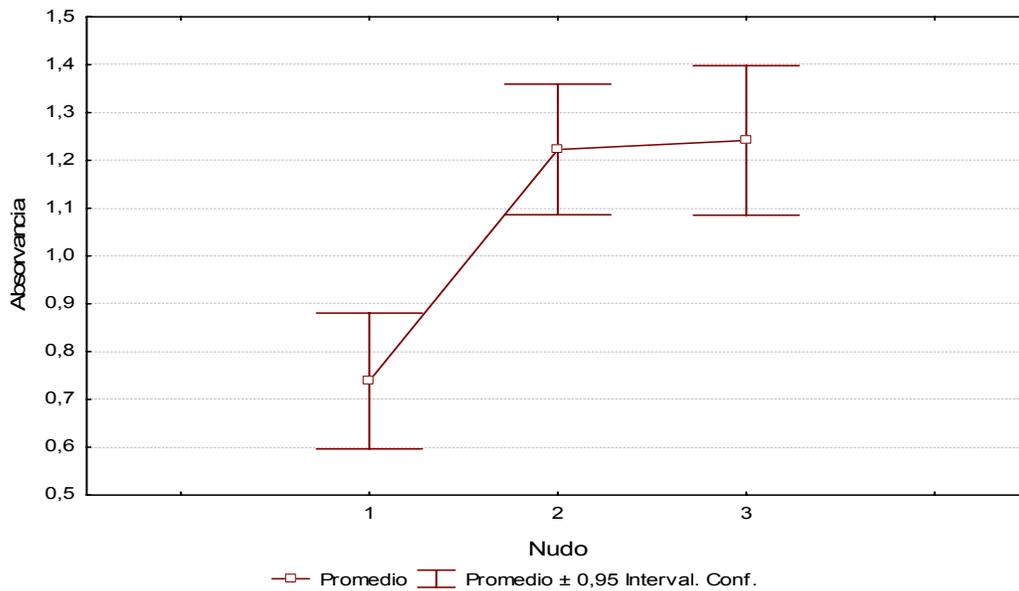


Figura 21. Promedio de absorbancia entre nudos.  
(Elaborado con Microsoft Excel)

Este resultado es similar al obtenido de bandolas muestreadas al azar (figura 22), en donde se obtiene una curva similar con el promedio mayor en las partes medias e internas de las bandolas mientras que el menor promedio es obtenido igualmente en la parte externa de estas.

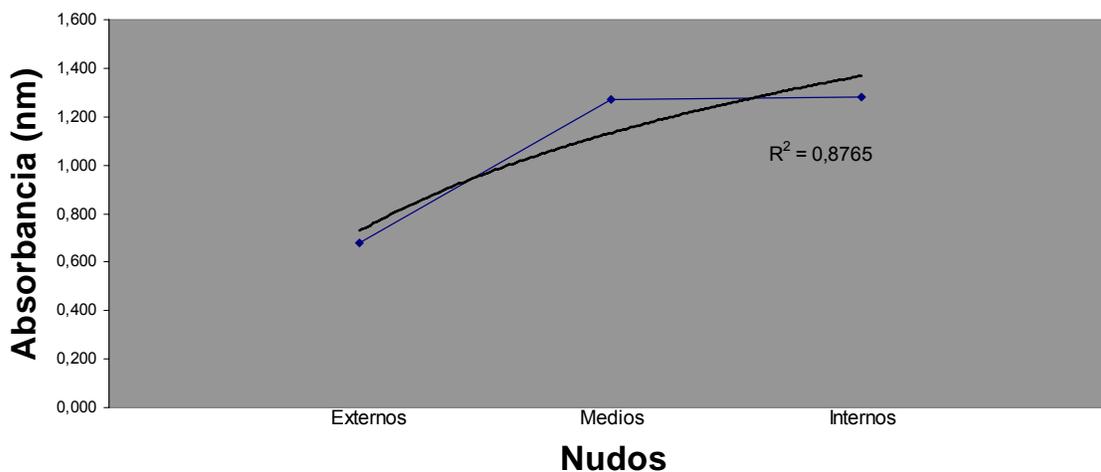
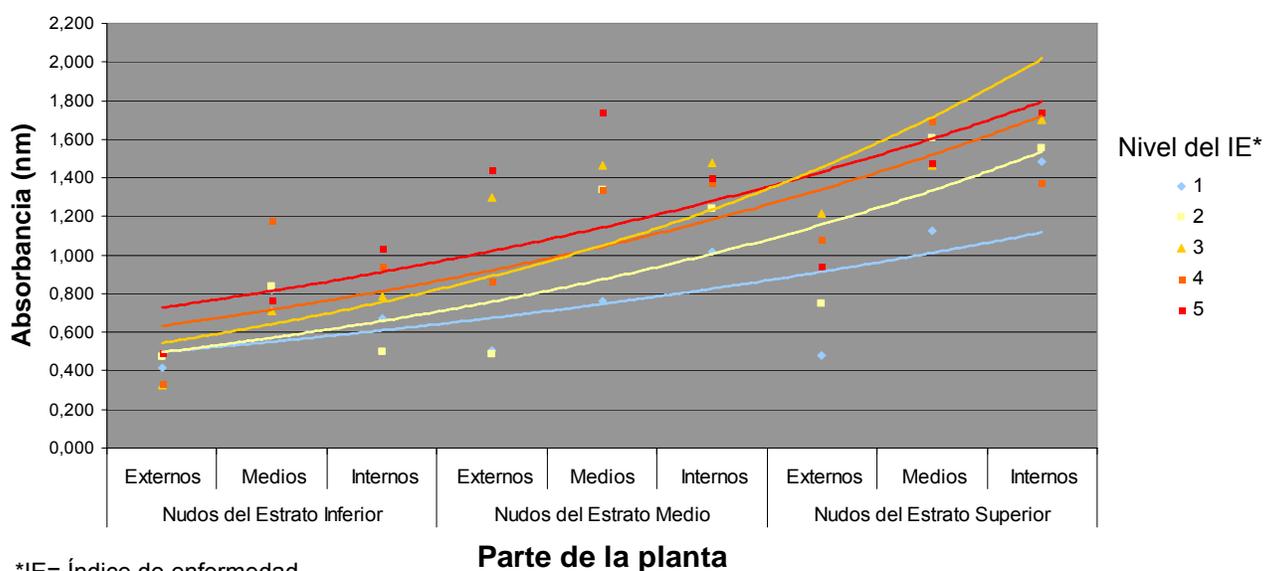


Figura 22. Promedio de absorbancia entre nudos de bandolas muestreadas al azar.  
(Elaborado con Microsoft Excel)

Al comparar los diferentes niveles del IE por separado, como se presenta en la figura 23, se observan curvas de tendencia donde se evidencia que en los cinco niveles, los menores promedios de absorbancia se obtienen en los estratos inferiores, mientras que los de mayor absorbancia se encuentran en los nudos medios e internos del estrato superior.



\*IE= Índice de enfermedad

Figura 23. Tendencia de absorbancia de *X. fastidiosa* a nivel de estrato y nudo de cada uno de los cinco niveles del IE.

(Elaborado con Microsoft Excel)

## **6. DISCUSION**

### **6.1. Dinámica de la enfermedad**

En Costa Rica se ha propuesto que la bacteria *X. fastidiosa* es la responsable de causar la Crespada en el café; algunos autores señalan que la transmisión de esta bacteria ocurre gracias a los insectos denominados ciudadélidos, los cuales se alimentan de los fluidos que obtienen del xilema de gran cantidad de plantas lo que hecho que coincide con la presencia de la bacteria en gran cantidad de cultivos (Zamora, 1998; Lopes *et al*, 2003; Farias *et al*, 2004). Tal es el caso de CVC en cítricos, donde se ha comprobado que las cepas de *X. fastidiosa* que provocan la enfermedad han sido encontradas en café y en herbáceas comunes en ambos cultivos comerciales (de Lima *et al*, 1998).

Para analizar la dinámica de la Crespada del café en una finca de la zona cafetalera de Naranjo se realizaron dos muestreos, el primero se realizó durante el mes de febrero del 2007 y el segundo en abril del mismo año. En los muestreos se contempló tanto la severidad mostrada a nivel de planta así como la incidencia de la enfermedad en esta, de igual forma se contabilizó el número de plantas enfermas para cada uno de los muestreos.

Los datos obtenidos en ambos muestreos fueron analizados mediante la fórmula de Gerez y Grijalva (1980). Esta fórmula consiste en una sumatoria que incluye cifras variables y constantes. En este caso las variables correspondieron a los valores de severidad obtenidos por cada una de las plantas mientras que las constantes correspondieron a 1, 2, 4 y 8. Los valores que se obtuvieron a partir de esta fórmula fueron divididos en cinco niveles que correspondieron a los niveles del IE y cada una de las plantas de la población fue identificada con uno de estos niveles.

El estudio de la dinámica de la Crespada del café en este estudio, determinó que luego de 60 días la enfermedad aumento un 6,28 %, pasando de un 19,21% a un 25,49 % de individuos con síntomas. Resultados similares obtuvieron Roberto y colaboradores en el 2002 al estudiar CVC en Brasil, en su estudio, encontraron que la incidencia de la enfermedad aumentó alrededor de un 3% mensual incrementándose en aquellos meses correspondientes a la época seca.

Es importante destacar, que los muestreos realizados en el presente estudio, fueron llevados a cabo en los meses más secos de la época seca, cerca de la época de inicio de lluvias en mayo. Diversos estudios han propuesto que el progreso de enfermedades atribuidas a *X. fastidiosa* es mucho mayor en la época seca que en otras épocas del año, Farias y colaboradores (2004) determinaron que la dinámica de la población de los vectores de *X. fastidiosa* se incrementa durante las épocas de verano, igualmente, De Lima y colaboradores (1998) observaron que el Quemado de la hoja de café es más evidente durante la época seca y en ese mismo año, Laranjeira y colaboradores (2004) determinaron que el rango de progreso de CVC en la proporción de nuevas plantas enfermas es cinco veces mayor en verano que en los meses mas fríos del año.

En ambos muestreos los resultados coinciden en que la mayor cantidad de plantas enfermas corresponden a aquellas con los síntomas iniciales de la enfermedad, las cuales presentan el borde de la hoja encrespado así como la nervadura secundaria resaltada. Esto se observa claramente en los mapas de las figuras 13 y 14 donde las plantas identificadas dentro de este nivel se encuentran en mayor cantidad y dispersas en toda la zona, sin formar focos específicos, de la misma manera es importante observar como en el segundo muestreo ocurre un gran aumento en la aparición de plantas con estos síntomas, visible sobre todo en aquellas zonas donde no existían plantas enfermas. Estos resultados son similares a los obtenidos por Laranjeira y colaboradores en el 2004 donde descubrieron que la aparición de nuevas plantas enfermas con CVC ocurre de manera aleatoria. Estos investigadores

determinaron que no existe un patrón específico de dispersión de la enfermedad con lo que se concluyó que la estructura y el funcionamiento del patosistema difiere entre regiones y épocas del año. De igual forma Roberto y colaboradores (2002) determinaron que en fincas donde apenas se está iniciando la enfermedad de CVC, la distribución se da de forma aleatoria; sin embargo, en la medida que pasa el tiempo se da una formación de agregados. Estos agregados pueden presentarse tal y como se encuentra la zona sur-oeste de la finca del estudio, donde se puede observar la mayor acumulación de plantas enfermas y dentro de estas aquellas con los síntomas más severos de la enfermedad.

Estudios realizados por Farias y colaboradores (2004) descubrieron que durante meses de intenso crecimiento vegetativo los cícididos por lo general concentran su actividad en parches de cítricos que ofrecen las mejores condiciones nutricionales para alimentación, ovoposición así como reproducción. Adultos de la especie *Homalodisca coagulata* (Say) tiende a seleccionar plantas con mayores concentraciones de ciertos nutrientes en el xilema. Las diferencias nutricionales del xilema dependen de varios factores ambientales como la calidad del suelo, la fertilidad así como la humedad, sombra, edad de la planta y localización. Este comportamiento puede explicar el por que la zona sur-oeste presenta la mayor cantidad de plantas sintomáticas, ya que en algún momento tuvo las mejores condiciones de sobrevivencia para los vectores de la bacteria lo que se manifiesta con una concentración de plantas enfermas exponiendo los síntomas más severos de la enfermedad.

Es importante notar el aumento entre un muestreo y el siguiente en aquellas plantas que presentan los síntomas más severos de CVC. Para el primer muestreo los síntomas de los niveles 3, 4 y 5 no alcanzaban los 50 individuos, en especial el nivel 5, el cual presentó únicamente 3 plantas. Para el segundo muestreo el nivel 3 llegó a los 56 individuos, el nivel 4 a los 69 individuos y las plantas con el mayor nivel de severidad-incidencia llegaron a 10. Este comportamiento en el aumento de la

severidad puede explicarse debido a que en la finca analizada no existe un manejo agronómico de la enfermedad de la Crespada por lo que las plantas que presentaron la enfermedad en sus inicios mantienen su condición, permitiendo que se mantengan las fuentes de inóculo y que el progreso de la enfermedad continúe el deterioro de individuos enfermos.

## **6.2. Absorbancia de la bacteria en diferentes partes de la planta y en diferentes niveles de la enfermedad**

La técnica ELISA ha sido utilizada principalmente para determinar la presencia de patógenos como virus y bacterias en diversos organismos. En este estudio se utilizó para diagnosticar la presencia de la bacteria *X. fastidiosa* en plantas de café, de igual forma, se empleó para comparar los datos de absorbancia con la concentración de la bacteria en diferentes partes de las plantas así como entre plantas de diferente nivel de enfermedad. Esta técnica fue utilizada de manera similar por Krivanek y colaboradores (2005) al comparar cuantitativamente las diferencias de absorbancia de las poblaciones de *X. fastidiosa* entre variedades resistentes y susceptibles a la enfermedad de Pierce. En este estudio se obtuvieron resultados importantes que ayudaron a comprender el mecanismo de defensa de las variedades resistentes a *X. fastidiosa*, coincidiendo con comparaciones realizadas en esta.

El diagnóstico de *X. fastidiosa* en plantas sanas y enfermas corroboró los estudios de varios investigadores donde mencionan que la bacteria puede estar presente en la planta sin manifestar ningún tipo de síntoma, por un lapso de tiempo indeterminado. En el 2002, Gonzáles y colaboradores inocularon plantas de cítricos con la bacteria de manera artificial, los cuales manifestaron síntomas de CVC hasta 7 meses después. Un año más tarde, Lopes *et al*, determinaron que, plantas de cítricos inoculadas con citadélidos muestran síntomas de CVC y hasta 6 meses después de la inoculación, en este estudio se reportó la presencia de *X. fastidiosa* en malezas

presentes en cultivos de cítricos que no presentan ningún tipo de alteración o enfermedad. Yorinori y colaboradores (2003) por su parte, detectaron la presencia de *X. fastidiosa* en plantas de café con y sin síntomas de la enfermedad de la quema de la hoja, estos investigadores atribuyeron este fenómeno a las diferencias genéticas entre plantas hospederas siendo algunas más susceptibles a los efectos de la bacteria y manifestando de esta manera, los síntomas de la enfermedad.

Se encontró que la bacteria estaba presente en el 95% de la muestra, la cual estaba compuesta por 212 plantas con los diferentes niveles de severidad-incidencia. Estos resultados, al compararlos con el análisis de absorbancia realizado a plantas de diferentes niveles según el IE apoyan la teoría comentada anteriormente acerca de la presencia latente de la bacteria.

En los diversos cultivos hospederos de *X. fastidiosa* existen diferencias en la colonización de órganos por la bacteria. En pera, *X. fastidiosa* se concentra principalmente en las raíces en cuanto a alfalfa existe una proporción mayor obstruyendo de la región basal. En uva, cítricos y café se ha reportado una concentración mayor de la bacteria en la parte aérea de la planta (Benetti *et al*, 2005). Esto concuerda con los resultados obtenidos en la presente investigación, donde se puede observar que la mayor concentración de *X. fastidiosa* se puede encontrar en los nudos de mayor edad de la planta de los estratos superiores.

La mayor absorbancia en los estratos superiores ha sido reportada por otros investigadores tales como Krivanek y colaboradores (2005). En su estudio, determinaron que la movilización de *X. fastidiosa* en el xilema de las plantas tiene una disposición hacia los niveles superiores de la planta, esto debido a que 3 meses después de inocular tallos de *Vitis sp* con la bacteria las mayores concentraciones se encontraron en los segmentos superiores (hasta 50 cm) del punto de inoculación, y que las menores concentraciones de la bacteria se encontraron en los puntos inferiores inmediatos al punto de inoculación.

Al comparar la concentración de bacteria en bandolas, los resultados muestran que la mayor absorbancia se obtiene de aquellos nudos correspondientes a las hojas de mayor edad en la bandola. Estos resultados son similares a los encontrados por Oliveira y colaboradores (2002) en Brasil, donde descubrieron que las mayores concentraciones de *X. fastidiosa* se encuentran en pecíolos y venas centrales de aquellas hojas de cítricos con edades mayores a los 8 meses, al contrario, en hojas menores a los 2 meses no encontraron concentraciones significativas de la bacteria.

Al comparar la absorbancia entre plantas de diferente nivel sintomatológico se puede observar que las menores cifras las obtienen el promedio del nivel 1 y que los niveles 2, 3, 4 y 5 son matemáticamente iguales, esto a pesar de las diferentes manifestaciones de severidad y porcentaje de presencia en la planta entre cada uno de los niveles. Estudios realizados por diferentes investigadores determinan que no se puede relacionar la absorbancia (ligada a la concentración) de *X. fastidiosa* con la manifestación de los síntomas de la enfermedad.

Alves y colaboradores (2006), encontraron que aquellos pecíolos extraídos de hojas de café y cítricos con síntomas severos contenían cantidades un poco mayores de colonias de *X. fastidiosa* en los vasos xilemáticos en comparación con aquellos obtenidos de hojas sanas. En este estudio se determinó que en pecíolos de hojas sanas es posible encontrar suficiente cantidad colonias de *X. fastidiosa* para causar algún tipo de bloqueo por lo que concluyeron que la manifestación de síntomas no está relacionada a la cantidad de colonias de *X. fastidiosa* encontradas en los diferentes órganos de la planta.

En otra investigación realizada por Alves y colaboradores en el 2003 se encontró que la concentración de *X. fastidiosa* en pecíolos de plantas de tabaco no está correlacionada a la intensidad de los síntomas, esto debido a que encontraron plantas con síntomas severos que a su vez contenían baja concentración de la

bacteria en los vasos xilemáticos, comportamiento similar se observó en hojas de cítricos, debido a esto concluyeron que lo más importante en la determinación de la sintomatología de *X. fastidiosa* y la resistencia a la enfermedad es la combinación de las características de los vasos xilemáticos de la planta, la bioquímica de estos y su reacción con las fitotoxinas de las diferentes cepas de *X. fastidiosa*. A conclusiones parecidas llegaron Qin y colaboradores en el 2001 al estipular que la severidad de las enfermedades ligadas a *X. fastidiosa* están relacionadas a las diferentes cepas de la bacteria así como a diversos aspectos externos tales como las variaciones climáticas locales, a la estructura del suelo, a la fertilidad de la zona, así como a los diferentes tratamientos culturales.

## **7. CONCLUSIONES**

1. La incidencia de la enfermedad conocida como “Crespera” aumento alrededor de un 6% entre ambos muestreos.
2. La aparición de las primeras plantas enfermas con Crespera en una plantación ocurre de manera aleatoria.
3. Una vez que la enfermedad se ha establecido en una plantación ocurre una formación de focos donde las plantas enfermas manifiestan los síntomas más graves de la enfermedad.
4. El síntoma más frecuente correspondió al borde encrespado y la nervadura secundaria resaltada.
5. Es posible diagnosticar la bacteria *X. fastidiosa* tanto en plantas sintomáticas así como en plantas asintomáticas a través de la técnica ELISA.
6. La mayor concentración de *X. fastidiosa* en plantas de café ocurre en los estratos medios y superiores y en los nudos más antiguos de las bandolas en estos estratos.
7. No se determinó relación entre la absorbancia de *X. fastidiosa* y la sintomatología de la enfermedad.

## **8. RECOMENDACIONES**

Continuar con la investigación de la enfermedad de la “Crespera” del café es vital con el fin de comprender los factores bióticos y abióticos que intervienen en la manifestación de los síntomas. Para futuros estudios es importante tomar en cuenta las siguientes recomendaciones:

1. El aumento en la incidencia de Crespera en la plantación puede estar ligada al incremento en la población de cicadelidos en la época seca. Es importante el estudio de la dinámica poblacional de vectores (cicadelidos) y su relación con el incremento de la presencia de la enfermedad en la plantación.
2. Se deben realizar muestreos durante otras épocas del año, esto para determinar la dinámica de la enfermedad en el transcurso del tiempo, de igual forma estos muestreos deben incluir otras zonas cafetaleras con la finalidad de observar el comportamiento de la Crespera a distintas zonas geográficas.
3. Con el fin de obtener resultados exactos a la hora de cuantificar la cantidad presente de *X. fastidiosa* en tejidos de café es importante el uso de técnicas moleculares que cuya exactitud es mucho mayor que la de la técnica ELISA, tal es el caso de PCR o el Real Time PCR.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

AGDIA. 2007. Agdia product catalog, DAS ELISA for *Xylella fastidiosa*. <[http://www.agdia.com/cgi\\_bin/catalog.cgi/34501](http://www.agdia.com/cgi_bin/catalog.cgi/34501)>. Domingo 28 de enero, 2007

Álvarez, C. 2006. Distribución geográfica, zonas. <<http://www.federacioncafe.com/Publico/EICafe/Zonas.asp#>>. Revisado el 11 de abril, 2007.

Alves, E.; Kitajima, W.; Leite. 2003. Interaction of *Xylella fastidiosa* with different cultivars of *Nicotiana tabacum*: a comparison of colonization patterns. J. Phytopathology 151, 500-506.

Alves, E.; Marucci, C.; Lopes, J.; Leite, B. 2004. Leaf symptoms on Plum, coffee and citrus and the relation with the extent of Xylem vessels colonized by *Xylella fastidiosa*. J Phytopathology 155, 291-297

Ariansen, J. 2002. Historia del café. <<http://www.historiacocina.com/historia/cafe/CAFE3.HTML> >. Revisado el 11 de abril, 2007.

Benetti, R.; Perosin, L.; Paradela, O.; Carvalho, M.; Irinei, J.; Carlos, L. 2005. Efeito da *Xylella fastidiosa* em cafeeiros em diferentes regioes edafoclimáticas. Bragania, Capinas, v.64, n.1, p.89-100.

Barquero, M. 2007. Situación actual del conocimiento de la “Crespera ” del café. Boletín informativo ICAFE.

- Barquero, M. 2007. Cafetaleros urgen renovar plantaciones. La Nación. San José (CR). Febrero 19:30<sup>a</sup>
- Chávez, V.; Obando, J.; Rodríguez, C. 2000. Crespera del café en Costa Rica asociado a la presencia de *Xylella fastidiosa* Wells *et al* Boletín informativo. Centro de Investigación en café (CICAPE). Heredia, Costa Rica. 11p.
- Cirelli, R.; Espósito, A. 2003. La batalla de Viena de 1683: La civilización se salva del peligro islámico. <[http://revista-arbil.iespana.es/\(56\)vien.htm](http://revista-arbil.iespana.es/(56)vien.htm)>. Revisado el 11 de abril, 2007.
- Coll. O.; Remes, A.; Agostini, J.; Paradell. 1997. Aspectos generales de la Clorosis Variegada de los Cítricos (CVC) en Misiones. <<http://www.inta.gov.ar/montecarlo/INFO/documentos/fruticultura/aspectos%20grales%20de%20clorosis.pdf>>. Revisado el 17 de abril, 2007.
- Coto, C. 2005. Reactivos Biológicos: los anticuerpos. <<http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/contratapa/aprendiendo/capitulo9.htm>>. Revisado el 1 de mayo, 2007.
- Cohort. 2005. Update on *Xylella fastidiosa* in Landscape Plant Hosts. CO-HORT. Vol 7. n. 2, p. 1.
- CIB. 2007. <<http://whybiotech.com/mexico.asp>>. Revisado el 1 de mayo, 2007.
- Cultek. 2007. Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA). <[http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=Aplicacion\\_Elisa&opc=introduccion](http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=Aplicacion_Elisa&opc=introduccion)>. Revisado el 30 de abril, 2007.

- De Lima, J.; Miranda, V.; Hortung, J.; Brlansky, R.; Cuntiho, A.; Roberto, S.; Carlos, E.; 1998. Coffee leaf scorch bacterium axenic culture, pathogenicity and comparison with *X. fastidiosa* of citrus. *Plant Dis.* 82: 94-97
- FAO. 2001. *Coffea arabica*. <<http://www.fao.org/ag/AGA/AGAP/FRG/afri/es/Data/540.HTM>>. Revisado el 14 de abril, 2007.
- Farias, O.; Roberto, S.; Lopes, J.; Perecin, D. 2004. Caracterizacao geoestatística da distribuicao espacial de cigarrinhas vectores de *Xylella fastidiosa* em citrus. *Neotropical Entomology.* 33 (I).
- Figueroa, R. 1998. Ficha técnica de café. <[http://radiomaranon.org.pe/images\\_uploads/347a72f0ed6641f16596fc4bf7330417/tcafe.doc](http://radiomaranon.org.pe/images_uploads/347a72f0ed6641f16596fc4bf7330417/tcafe.doc)>. Revisado el 16 de abril, 2007.
- Frohme, M.; Camargo, A.; Heber, S.; Czink, C.; Simpson, A.; Hoheisel, J.; Pereira, A. 2000. Mapping analysis of the *Xylella fastidiosa* genome. *Nucleic Acid Research.* Oxford University Press. Vol.28, No 16. p3100.
- Galvis, C.; Leguizamón, J.; Gaitán, A.; Mejía, J.; Álvares, E. ; Arroyave, J. 2007. Detection and identification of a 16RSIII-related phytoplasma associated with coffee crispiness disease in Colombia. *Plant Dis.* 91:248-252.
- Gerez, V.; Grijalva, M. 1980. El enfoque de sistemas. Editorial LIMUSA. México, México DF. 577p.
- Gonzáles, P.; Souza, P.; Wickert, E.; Donadio, L. 2002. AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA À *Xylella fastidiosa* EM GERMOPLASMA DE TANGERINA E

HÍBRIDOS INTRODUCIDOS DA ITÁLIA E CÓRSEGA. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, v. 24, n. 2, p. 579-582

He, C.; Li, W.; Ayres, A.; Hartung, J.; Miranda, V.; Teixeira, D. 2000. Distribution of *Xylella fastidiosa* in citrus rootstocks and transmission of citrus variegated chlorosis between sweet orange plants through natural root grafts. Plant Dis. 84:622-626.

Hernández, J. 2007. Productores apuestan al café 'gourmet' para generar empleo. <[http://www.nacion.com/ln\\_ee/2007/enero/17/pais962430.html](http://www.nacion.com/ln_ee/2007/enero/17/pais962430.html)>. Revisado el 11 de abril, 2007.

Hidalgo, M. 2002. La enfermedad conocida como "crespera" del café. Boletín Informativo de La Regional Turrialba, ICAFE. Año 2. Número 1. Turrialba, Costa Rica.

Hopkins, D. 2006. *Xylella*. <<http://grove.ufl.edu/~jbjones/XylellaLecture%202006.doc>>. Revisado el 23 de abril, 2007

ISSG. 2006. *Xylella fastidiosa* (micro-organism). <<http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?fr=1&si=326&sts=>>>. Revisado el 23 de abril, 2007.

Iwasawa, H.; Vargas, A.; Solórzano, A.; Sánchez, E. 2001 Microscopia electrónica de transmisión del agente causal de la Crespera (*Xylella fastidiosa*) en el cultivo del café. Boletín informativo ICAFE. 133-138

- Krivanek, A.; Walker, M. 2005. Vitis resistance to Pierce Disease is Characterized by Differential *Xylella fastidiosa* populations in stems and leaves. *Phytopathology* 96:44-52
- Laranjeira, F.; Beramin, A.; Amorim, L.; Gottwald, T. 2004. Dinámica espacial da clorose variegada dos citros em tres reioes do estado de Sao Paulo. *Fitopatologia brasileira* 29:056-065.
- Li, W.; Zhou, C.; Pria, W.; Teixeira, D.; Miranda, V.; Pereira, E.; Ayres, A.; He, C.; Costa, P.; Hartung, J. 2002. Citrus and coffee strains of *Xylella fastidiosa* induce Pierce's disease in grapevine. *Plant Dis.* 86:1206-1210.
- Lima, J.; Miranda, V.; Hartung, J.; Brlasky, R.; Coutinho, A.; Roberto, S. 1998. Coffee leaf scorch bacterium: Axenic culture, pathogenicity, and comparison with *Xylella fastidiosa* of citrus. *Plant Dis.* 82:94-97.
- Lopes, S.; Marcussi, S.; Torres, S.; Souza, V.; Fagan, Franca, S.; Fernandez, N.; Lopes, J. 2003. Weeds as alternative host of the citrus, coffee and plum strains of *Xylella fastidiosa* in Brazil. *Plant Dis.* 87:544-549.
- Ma, H.; Shieh, K.; Lee, S. 2006. Application of ELISA Technique. *Nature and science.* 4(2):36-37
- Machado, M. 1997. Citrus variegated Chlorosis, a new destructive citrus disease in Brazil, and the xylem-limited bacteria, *Xylella fastidiosa*. <<http://watson.fapesp.br/Xylella.htm>>. Revisado el 23 de abril, 2007
- Mandigan, M.; Martinko, J.; Parker, J. 2004. ELISA. *Biología de los microorganismos.* Madrid, España. 10ma edición. 1011p.

- Monroig, M. 2002. Morfología del café. <  
<http://academic.uprm.edu/mmonroig/id53.htm>>. Revisado el 14 de abril, 2007.
- NBII. 2006. *Xylella fastidiosa* (micro-organism). <  
<http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?fr=1&si=326&sts=>>.  
Revisado el 17 de abril, 2007.
- Oliverira, A.; Vallim, M.; Semighini, C.; Araújo, W.; Goldman, G.; Machado, M. 2002. Quantification of *Xylella fastidiosa* from citrus trees by real time polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* 92:1048-1054
- ONSA (Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis) . 2000. *Xylella fastidiosa* Genome Project. <<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/>>. Domingo 28 de enero, 2007.
- Procomer, 2007. Exportaciones de bienes según actividad económica. <[http://www.procomer.com/est/informes/index.cfm?queHacer=loadPage&page=06\\_noviembre\\_1](http://www.procomer.com/est/informes/index.cfm?queHacer=loadPage&page=06_noviembre_1)>. <http://www.apsnet.org/meetings/div/cr05abs.asp>. Miércoles 3 de enero de 2007.
- Purcell, A. 2007. *Xylella fastidiosa*. < <http://www.cnr.berkeley.edu/xylella/index.html>>. Revisado el 23 de abril, 2007
- Qin, X.; Miranda, V.; Machado, M.; Lemos, E.; Hartung, J. 2001. An evaluation of the genetic diversity of *Xylella fastidiosa* isolated from diseased citrus and coffee in Sao Paulo, Brazil. *Phytopathology*, St. Paul. V.91, n.6, p.599'605
- Solórzano, A.; León, R.; Garbanzo, M. 2000. Determinación del agente causal y evaluación en la producción causado por la Crespita en el cultivo de café

(*Coffea arabica*) en la zona de Los Santos, Costa Rica. Boletín informativo ICAFE. 128-133p.

Roberto, S.; Farias, P.; Bergamin, A. 2002. Geoestatistical analysis of spatial dynamics of citrus variegated chlorosis. *Fitopatologia Brasileira* 27:599-604.

Rodríguez, C. 2002. *Xylella fastidiosa* (Wells *et al.* 1997) como patógeno del café en los países tropicales. Boletín informativo. Centro de Investigación en café (CICAFE). Heredia, Costa Rica. 11p.

Villalobos, W., Rodríguez, C., Rivera, C. 2006. Geographical distribution and incidence of *Xylella fastidiosa* in coffee plantations in Costa Rica. <<http://www.apsnet.org/meetings/div/cr05abs.asp>>. Miércoles 3 de enero de 2007.

Yorinori, M.; Ribas, A.; Ueno, B.; Massola, N.; Leite, R. 2003. Detecção de *Xylella fastidiosa* em germoplasma de cafeeiro. *Fitopatologia. bras.* vol.28 no.4

Zamora, L. 1998. Manual de recomendaciones para el cultivo del café. 1 ed. Heredia, Costa Rica: ICAFE-CICAFE. 198 p.

## 10. ANEXOS

### 6.3. Anexo 1. Hoja de muestreo.

Encargado: \_\_\_\_\_

Número de Hoja: \_\_\_\_\_

# Fila	# Ind	Presencia / severidad			
		25%	25%	25%	25%
		25%	25%	25%	25%
		25%	25%	25%	25%
		25%	25%	25%	25%
		25%	25%	25%	25%
		25%	25%	25%	25%
		25%	25%	25%	25%
		25%	25%	25%	25%
		25%	25%	25%	25%
		25%	25%	25%	25%
		25%	25%	25%	25%

## 6.4. Anexo 1. Protocolo AGDIA para DAS-ELISA.

# Reagent Set

## DAS ELISA, peroxidase label

### Coating test wells of ELISA plate

1. Prepare humid box	Prepare a humid box by lining an airtight container with a wet paper towel. Keeping test wells in a humid box during incubation will help prevent samples from evaporating.
2. Prepare buffers	Buffer formulations are provided on page 4. A peroxidase buffer pack can also be purchased directly from Agdia (ACC 00222).
3. Prepare capture antibody	<p><b>Note: Capture antibody should be prepared in a container made of a material such as polyethylene that does not readily bind antibodies.</b></p> <p>The capture antibody is provided in a concentrated solution and must be diluted with coating buffer before use. The recommended antibody to buffer ratio is given on the label.</p> <p>Prepare the volume of coating buffer (formulation on page 4) needed for the test. You will need 100 µl of coating buffer for each test well you are using. Then, add the appropriate volume of concentrated capture antibody to the coating buffer at the dilution on the label.</p> <p>For example, if the dilution given on the bottle of concentrated capture antibody is 1:200, and you are preparing 10 ml of capture antibody solution, you should mix 10 ml of coating buffer with 50 µl of the concentrated capture antibody. Mix the prepared capture antibody thoroughly and use immediately.</p>
4. Coat plate	Pipette 100 µl of the prepared capture antibody into each well.
5. Incubate plate	Incubate the plate in a humid box for 4 hours at room temperature or overnight in the refrigerator (4°C).
6. Wash plate	<p>Empty the wells into a sink or waste container. Fill the testwells to overflowing with 1X PBST, then quickly empty them again. Repeat 2 more times.</p> <p>Hold the plate upside down and tap firmly on a folded paper towel to remove excess liquid.</p> <p><b>Note: Use freshly coated plates immediately.</b></p>

### Grind and dilute samples

When possible, select samples showing symptoms. Leaf tissue is often used in ELISA testing. Stem, seed, and other tissue can also be tested.

For most samples use Agdia's general extraction buffer (GEB) to grind and dilute samples. However, other buffers are recommended for some plant species. Please contact Agdia if you have any questions about the appropriate extraction buffer for your samples.

In some cases, composites of up to ten leaves per testwell can be used to make testing more economical. However, too many plant samples per well can reduce the sensitivity of the test.

Grind plant tissue in sample extraction buffer at a 1:10 ratio (g/ml). You will need about 100 µl of diluted sample extract per testwell, plus an additional amount to assure easy dispensing. You can use Agdia sample extraction bags (ACC 00930), a mortar and pestle, or other grinding devices to grind samples. If you are using a mortar and pestle, wash and rinse it thoroughly between samples.

m17.2

2

# Reagent Set

## DAS ELISA, peroxidase label

### Test Procedure

1. Dispense samples

Following your loading diagram, dispense 100  $\mu$ l of prepared sample into sample wells. Dispense 100  $\mu$ l of positive control into positive control wells, and dispense 100  $\mu$ l of sample extraction buffer into buffer wells.

2. Incubate plate

Set the plate inside the humid box and incubate for 2 hours at room temperature or overnight in the refrigerator (4°C).

3. Prepare enzyme conjugate

To prepare the enzyme conjugate diluent, mix MRS component with 1X PBST in a 1:4 ratio. The volume of enzyme conjugate required depends on the number of test wells used, with 100  $\mu$ l needed per test well. To estimate the volume needed, prepare 1 ml for each 8-well strip used, or 10 ml for each 96-well plate.

You should calculate the volume of enzyme conjugate needed based on the volume of enzyme conjugate diluent used and on the dilutions given on the bottles. Use a new, sterile pipette tip for each bottle to prevent contamination.

For example, if the dilution given on the bottle is 1:100, and you are preparing 1 ml of enzyme conjugate, you should first dispense 1 ml of enzyme conjugate diluent. Then add 10  $\mu$ l from the enzyme conjugate bottle to the enzyme conjugate diluent. After adding the concentrated enzyme conjugate to the diluent, it is important to mix the enzyme conjugate well.

**Note:** Always prepare enzyme conjugate within 10 minutes before use.

4. Wash plate

When the first incubation is complete, wash the plate. Use a quick flipping motion to dump the well into a sink or waste container without mixing the contents.

Fill all the wells to overflowing with 1X PBST, and then quickly empty them again. Repeat 4 to 8 times.

After washing, hold the frame upside down and tap firmly on a folded paper towel to remove all droplets of wash buffer.

5. Add enzyme conjugate

Dispense 100  $\mu$ l of prepared enzyme conjugate per well.

6. Incubate plate

Incubate the plate in the humid box for 2 hours at room temperature.

7. Wash plate

As before, wash the plate 4 to 8 times with 1X PBST.

8. Add TMB substrate

Dispense 100  $\mu$ l of TMB substrate into each well. Substrate should remain refrigerated when not in use.

9. Incubate plate

Incubate the plate in a humid box for 20 minutes.

10. Evaluate Results

Examine the wells by eye or measure the optical density of the test wells on a plate reader at 650 nm. Wells in which a blue color develops indicate positive results. Wells in which there is no significant color development indicate negative result. Test results are valid only if positive control wells give a positive result and buffer wells remain colorless.