

CARACTERIZACION BIOLÓGICA DE UN VIRUS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) EN COLOMBIA

Carlos Arturo Betancourth García ¹

RESUMEN

Un nuevo virus en café que causa síntomas de clorosis intervenal, deformaciones foliares, ampollamientos y sobrecrecimientos, al igual que el hinchamiento de nervaduras, necrosamiento y defoliación, se detectó en las localidades de Fusagasugá (Cundinamarca) y Andes (Antioquia). La eficiencia de transmisión por inoculación mecánica varió desde 20% de café a café, 40% de café a *Chenopodium amaranticolor* y 50% de café a *Chenopodium quinoa*, pero no se logró transmisión a *Datura stramonium*, *Phaseolus vulgaris*, *Nicotiana tabacum* y *Gomphrena globosa*. En transmisión por injerto la eficiencia fue del 80% de café a café y no se logró transmitir a ninguna de las otras especies probadas. El rango experimental de hospedantes incluyó *C. amaranticolor* y *C. quinoa* en las cuales se producen lesiones locales cloróticas redondeadas y en algunos casos, clorosis sistémica. Estudios de microscopía electrónica de transmisión revelaron la presencia de partículas isométricas de 50 a 60 nm de diámetro, en muestras sintomáticas tanto de café como de las plantas indicadoras.

Palabras Claves : Café, virus, transmisión, rango de hospedantes.

¹. Profesor Tiempo Completo. Facultad de Ciencias Agrícolas Universidad de Nariño, Pasto - Colombia.
E-mail: cbet70@yahoo.com

ABSTRACT

A new virus infecting coffee at Fusagasugá (Cundinamarca) and Andes (Antioquia) localities was found associated to symptoms of interveinal chlorosis, yellowing, leaf distortion, blisters and outgrowths, as well as to swollen veins, necrosis, and defoliation. Efficiency of transmission by mechanical inoculation was 20% from coffee to coffee, 40% from coffee to *Chenopodium amaranticolor*, and 50% from coffee to *C. quinoa*. No transmission was obtained from coffee to *Datura stramonium*, *Phaseolus vulgaris*, *Nicotiana tabacum*, *N. benthamiana*, and *Gomphrena globosa*. Transmission by grafting had a efficiency of 80% from coffee to coffee, and there was no transmission to any other species tested. The experimental host range includes *C. amaranticolor* and *C. quinoa*, in which round chlorotic lesions were present, and sometimes systemic chlorosis. Observation of symptomatic foliar tissue of coffee and *C. quinoa* under transmission electron microscope revealed isometric 50-60 nm diameter particles in the cytoplasm.

Keywords : Coffee, virus, transmission, host range.

INTRODUCCION

En el año de 1997, investigadores de la Corporación Colombiana de Investigación Agrícola- CORPOICA, adelantaron trabajos de diagnóstico serológico y rango de hospedantes del virus del rayado del banano (Banana streak virus, BSV), en las localidades de Andes (Antioquia) y Fusagasugá (Cundinamarca), y observaron árboles de café de la variedad Colombia con síntomas de paloteo, hojas con poco brillo y enanismo, creciendo en cercanías de plantaciones de banano con síntomas de la enfermedad causada por el BSV. Con base en estas observaciones se tomaron muestras foliares de estos árboles, para analizarlas mediante estudios

ron muestras foliares de estos árboles, para analizarlas mediante estudios serológicos con la prueba inmunoenzimática ELISA, utilizando anticuerpos policlonales para el BSV. Los resultados indicaron que el 23% de las plantas presentaron reacción positiva (+) lo que llevó a los investigadores a sugerir que el disturbio en café se debía a la presencia de éste virus (Reichel *et al.*, 1997).

Observaciones realizadas por Leguizamón y Martínez (1998), en plantas de café de las localidades de Andes y Fusagasugá, donde el grupo de investigadores de Corpoica registraron el posible problema viral, mostraron que estas plantas presentaban clorosis foliar, mosaicos, hojas con poco brillo y severa defoliación, sintomatología desconocida previamente en este cultivo y asociada posiblemente a un virus. Además, que muestras foliares con esta sintomatología examinadas bajo microscopía electrónica de transmisión en el Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT, revelaron la presencia de partículas isométricas de un tamaño entre 50 y 60 nm de diámetro, similares a las del género *Caulimovirus*.

En el presente trabajo y contribuyendo al estudio del problema registrado en café, se determinaron en condiciones de casa de malla algunos métodos de transmisión del virus, su rango de hospedantes experimental y estudios de microscopía electrónica, que permitieron observar su forma y tamaño.

METODOLOGIA

El trabajo se desarrolló en condiciones de casa de malla, en la Universidad de Caldas, ubicado a 2.200 msnm y a una temperatura promedio de 19 °C., en un invernadero del Centro Nacional de Investigaciones de Café Pedro Uribe Mejía CENICAFE, municipio de Chinchiná (Caldas), a 1.310 msnm y en la unidad de Virología del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Palmira (Valle).

Plantas indicadoras

Cenizo rojo (*Chenopodium amaranticolor* Coste y Reyn), Quinoa (*Chenopodium quinoa* L.), Chamico (*Datura stramonium* L., Willd), Globitos (*Gomphrena globosa* L., Globe), Tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), Tabaquillo (*Nicotiana benthamiana* Domin) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L).

Como unidad experimental se utilizaron seis plantas de cada una de las especies herbáceas de un mes de edad, con dos pares de hojas bien desarrolladas, y seis plantas de café variedad Colombia de cuatro meses de edad. Se emplearon cinco repeticiones, con ocho tratamientos correspondientes a las especies de plantas herbáceas anteriormente mencionadas y café, los cuales se distribuyeron en un diseño experimental completamente al azar y sus correspondientes testigos de las mismas especies, las cuales tuvieron la misma distribución y se ubicaron aparte para evitar contacto entre ellas. Como variables de respuesta se establecieron el número de plantas enfermas y el tiempo de aparición de síntomas, las cuales se evaluaron semanalmente.

Transmisión mecánica

Se utilizaron tejidos sintomáticos de hojas jóvenes de café, se maceraron en morteros estériles, previamente refrigerados y en presencia de una solución tampón (fosfato de potasio) en proporción 1:1 (v/v). Mediante pruebas preliminares inoculando grupos de diez plantas por especie, se evaluaron en forma descendente (décima) diferentes pH de la solución tampón desde 8,0 hasta 7,0 y de igual manera molaridades (centésima) desde 0,05 hasta 0,01. Además, se adicionaron 0,01 g de Polivinil pirrolidona 40 (PVP) y 0,02 g de Polivinil poli pirrolidona (PVPP), para evitar problemas de fenolización. Se inoculó el primer par de hojas bien desarrollado en cada una de las potenciales plantas indicadoras de un mes de edad, las cuales se asperjaron previamente con carborundum 600 mallas y se frotaron con una gasa

estéril, siguiendo la metodología descrita por Yarwood y Fulton (1967). Después de la inoculación, las hojas se lavaron con agua destilada. Los testigos se inocularon únicamente con la solución tampón con aditivos. Una vez seleccionado el (los) mejor(es) pH y la mejor molaridad, se inocularon 100 plantas más de cada una de las especies que resultaron positivas en las pruebas preliminares.

Transmisión por injerto

Se utilizaron hojas sintomáticas de las plantas afectadas y se pusieron en contacto con las potenciales plantas indicadoras de un mes de edad y con café variedad Colombia de cuatro meses de edad, por medio de injerto de cuña. Esta técnica de injerto se adoptó, teniendo en cuenta los métodos citados por Bos (1967). Las plantas injertadas se mantuvieron en casa de malla a prueba de insectos. Además, entre planta y planta injertada se dejó una distancia adecuada, para evitar contacto entre ellas. Cada una de las plantas tenía su testigo correspondiente injertado con material aparentemente sano, procedente de Cenicafé. Posteriormente, se injertaron 120 plantas de café adicionales.

Prueba de patogenicidad

Luego de la transmisión del virus a las plantas indicadoras y para comprobar que los síntomas registrados en dichas plantas eran causados por el mismo patógeno, se tomaron plantas de *C. quinoa* y *amaranticolor* que resultaron positivas después de la transmisión mecánica, con síntomas de manchas cloróticas sistémicas y se repitió el proceso de transmisión mecánica nuevamente hacia plantas de café. Se inocularon cincuenta plantas de café variedad Colombia de dos meses de edad, para comprobar que el patógeno consistentemente está relacionado directamente con el disturbio.

Microscopía electrónica

Muestras foliares de plantas sintomáticas de *C. quinoa*, *C. amaranticolor* y café se llevaron al Laboratorio de Virología del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), para comprobar la presencia de partículas de virus en los tejidos afectados. Se examinaron las muestras por observación al microscopio electrónico de transmisión.

RESULTADOS Y DISCUSION

Transmisión mecánica y rango de hospedantes

En las pruebas preliminares se determinó que la transmisión mecánica dio resultados positivos únicamente con un rango de pH de la solución tampón (fosfato de potasio) desde 7,0 hasta 7,3 y con una concentración de 0,05 M, pero los mejores resultados se obtuvieron con un pH de 7,2; con valores de pH superiores a 7,3 nunca se obtuvo transmisión, lo mismo ocurrió con molaridades menores de 0,05 M. El porcentaje de transmisión mecánica de café a café varió desde 1% hasta 20%, desde 6% hasta 40% para transmisión de café a *C. amaranticolor* y desde 6% hasta 50% para transmisión de café a *C. quinoa* (Tabla 1).

Tabla 1. Eficiencia de transmisión mecánica en diferentes especies, utilizando fosfato de potasio a diferentes pH y a una concentración de 0.05 M.

Especies	Transmisión mecánica con fosfato de potasio a diferentes pH			
	7,0	7,1	7,2	7,3
<i>Coffea arabica</i> (var. Colombia)	^a 1/100 ^b	5/100	20/100	6/100
<i>Chenopodium quinoa</i>	10/100	40/100	50/100	6/100
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	6/100	20/100	40/100	8/100

^{a/b}: Número de plantas afectadas/ Número de plantas inoculadas.

La mayor eficiencia de transmisión de café a las diferentes especies inoculadas se logró en *C. quinoa*, (50%), seguido por *C. amaranticolor* (40%) y café (20%) al utilizar la solución tampón a un pH de 7,2 y una molaridad de 0,05 (Tabla 1). De otro lado, no se presentaron síntomas en las plantas utilizadas como testigos en ninguna de las especies y tampoco se presentaron síntomas en las demás especies de plantas probadas: *Datura stramonium*, *Nicotiana tabacum*, *N. benthamiana*, *Gomphrena globosa* y *Phaseolus vulgaris*, las cuales se comportaron como no susceptibles (Tabla2).

Tabla 2. Eficiencia de transmisión mecánica en diferentes especies, utilizando solución tampón fosfato de potasio a pH 7,2 y 0,05 M, en 40 días de evaluación.

Especies	Número de Plantas Enfermas			Eficiencia (%)
	15 DIAS	30 DIAS	40 DIAS	
<i>Coffea arabica</i> (Var. Colombia)	0	12	20	20
<i>Chenopodium quinoa</i>	50	50	50	50
<i>C. amaranticolor</i>	40	40	40	40
<i>Phaseolus vulgaris</i>	0	0	0	0
<i>Datura stramonium</i>	0	0	0	0
<i>Gomphrena globosa</i>	0	0	0	0
<i>Nicotiana tabacum</i>	0	0	0	0

El pH a 7.2 de la solución tampón tuvo un marcado efecto en la eficiencia de transmisión del virus en las pruebas de café a café, de café a *C. quinoa* y de café a *C. amaranticolor*.

En café los síntomas se expresaron después de un período de incubación de 30 a 40 días, siendo predominantes las bandas cloróticas intervenales y deformaciones de la lámina foliar por sobrecrecimientos y ampollamientos. Los síntomas se manifestaron inicialmente hacia la nervadura central y avanzaron progresivamente hacia toda la hoja, causando posteriormente un necrosamiento de la misma y por último su defoliación. Algunos de estos síntomas se describieron en condiciones de campo en los municipios de Andes y Fusagasugá (Leguizamón y Martínez, 1998).

Consistentemente en todas las plantas de *C. quinoa* y *C. amaranticolor*, que presentaron síntomas, estos estuvieron asociados con síntomas sistémicos en forma de lesiones cloróticas circulares, que aparecieron 6 a 15 días después de la inoculación. Estos síntomas se iniciaron un par de hojas por encima de las hojas inoculadas aproximadamente (6 u 8 días después de la inoculación) y se expresaron en todas las hojas nuevas. Además, en algunas plantas se presentó clorosis, moteado sistémico y deformación de hojas desde los primeros días y con un aspecto diferente al síntoma anteriormente mencionado.

La literatura registra que los *Caulimovirus* presentan un rango de hospedantes estrecho con unas pocas especies dentro de una o dos familias (Larson *et al.*, 1950; Walker *et al.*, 1945; Frazier, 1955; Brierley y Smith, 1950). Sin embargo, deben realizarse pruebas de transmisión con un mayor número de especies, para poder comprobar si esta situación es la misma para este virus. Además, las plantas indicadoras pueden ser usadas para mantenimiento, diagnóstico y multiplicación del virus, así como también en procesos de purificación del mismo. Las pruebas de transmisión mecánica demostraron la importancia del pH y la concentración de la solución tampón (fosfato de potasio) en el éxito de la transmisión y posiblemente, en la estabilidad e infectividad del virus. De acuerdo a los resultados obtenidos es importante estudiar el efecto de concentraciones molares superiores a 0,05M. Estos factores se han discutido en muchas relaciones de virus - hospedante (Lawson y Taconis, 1965; Yarwood, 1952).

Transmisión por injerto

La transmisión por injerto de café a café fue el método más eficiente. El virus se transmitió a 120 de las 150 plantas injertadas (80%). Los síntomas aparecieron entre 50 - 60 días después de la inoculación, en el primer brote por debajo del injerto en forma de manchas anulares conspicuas y muy abundantes en la haz, junto con ampollamientos y textura áspera de la lámina foliar como los síntomas más

prevalentes. No hubo transmisión por injerto de café a *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, *D. stramonium*, *G. globosa*, *N. tabacum*, *N. benthamiana* y *P. vulgaris*, situación que según Bos (1967) se debe a la incompatibilidad fisiológica existente entre el patrón y el injerto. Los síntomas se presentaron en los primeros brotes nuevos por debajo del injerto, en ocasiones con proliferación de los mismos y clorosis generalizada. Las hojas presentaron deformaciones tanto en la lámina foliar como en los bordes, los patrones de nervaduras presentaron formas irregulares totalmente atípicas en comparación con hojas normales de los testigos, los cuales no desarrollaron síntomas. Esta sintomatología no se había registrado anteriormente en café y es diferente a los síntomas producidos por factores abióticos.

Síntomas como estos son muy frecuentes en enfermedades causadas por virus y en especial la clorosis intervenal, deformación de hojas y manchas anulares, se han descrito anteriormente en especies como dalia, fresa, coliflor y otras que han sido probadas dentro del rango de hospedantes, de virus del género *Caulimovirus* (Brierley, 1951; Larson *et al.*, 1950; Walker *et al.*, 1945; Frazier, 1955; Brierley y Smith, 1950).

Pruebas de patogenicidad

Las pruebas de transmisión mecánica de *C. quinoa* y *C. amaranticolor* a café, permitieron confirmar que los síntomas observados en estas plantas indicadoras están asociados con el virus causante del disturbio en café, ya que en diez de cincuenta plantas de café inoculadas se desarrollaron síntomas similares a los encontrados en campo y en las otras pruebas de transmisión. Los síntomas aparecieron a los 45 días después de la inoculación y se manifestaron como manchas cloróticas de tamaño pequeño, las cuales progresaron hacia bandas intervenales, deformaciones de la lámina foliar y textura áspera por ampollamientos.

Microscopía electrónica

En exámenes de microscopía electrónica de transmisión de tejidos foliares de *C. quinoa*, *C. amaranticolor* y café con síntomas de lesiones locales cloróticas y manchas anulares respectivamente revelaron la presencia de partículas isométricas de un tamaño entre 50 a 60 nm de diámetro. Mediante la técnica de cortes histológicos ultrafinos, se encontraron viroplasmias ubicados en el citoplasma, similares a los descritos para los *Caulimovirus* tal como se registra en la literatura (Kitajima, 1973; Fujisawa *et al.*, 1967; Fujisawa *et al.*, 1971, 1972, 1973; Rubio, 1956; Prione *et al.*, 1960, 1961; Lawson y Hearon, 1977; Hearon y Lawson, 1981; Francki *et al.*, 1995, Arroyave y Morales, 1999, comunicación personal).

CONCLUSIONES

En algunas fincas de los municipios de Andes (Antioquia) y Fusagasugá (Cundinamarca), el cultivo de café está afectado por un agente de posible naturaleza viral que causa síntomas de clorosis intervenal, manchas anulares, mosaico, deformación de hojas, ampollamientos, necrosis y defoliación. Por otra parte, aunque existe la posibilidad de presentarse transmisión mecánica en condiciones de campo, el hecho de no ser un patógeno de fácil transmisión mecánica, como lo demostraron las diferentes pruebas realizadas, disminuye el riesgo que esta ocurra con labores como cosecha, poda o zoqueo.

Únicamente dos de las especies diferentes al café, *Chenopodium quinoa* y *C. amaranticolor*, se infectaron por transmisión mecánica. Estas plantas pueden ser usadas para diagnóstico de la enfermedad gracias a la rápida expresión de los síntomas después de la inoculación y se presentan como alternativa para mantenimiento y multiplicación del patógeno, así como también para los futuros trabajos de purificación del mismo. La forma y tamaño de las partículas, permiten considerar la posibilidad de que este patógeno sea una especie dentro del género *Caulimovirus*.

BIBLIOGRAFIA

BOS, L. Graf transmission of plant viruses. In : Maramorosch, K.; Koprowski, H. eds. Methods in virology. Vol. 1. New York, Academic Press, 1967b. P. 403-410.

BRIERLEY, P. Value of index plants for detecting dahlia viruses. *Phytopathology* 35: 405-407. 1951.

BRIERLEY, P. and SMITH, F. Some vectors, host, and properties of dahlia mosaic virus. *Plant Disease Report* 34: 363-371. 1950.

FRANCKI, R.I.B., ROBERT, G. and MILNE, T. Atlas of plant viruses. Boca Raton, CRC Press, 1985. 222 p.

FRAZIER, N. Strawberry vein banding virus. *Phytopathology* 45: 307-312. 1955.

FUJISAWA, M., RUBIO, M. and MATSUI, C. Deoxyribonuclease digestion of the nucleic acid from carnation etched ring virus. *Phytopathology* 62: 810-811. 1972.

FUJISAWA, M., RUBIO, M. and MATSUI, C. Incorporation of thymidina-³H into carnation etched ring virus. *Phytopathology* 61: 681-684. 1971.

FUJISAWA, M., RUBIO, M. and MATSUI, C. Deoxyribonucleic acid in dahlia mosaic virus. *Phytopathology* 64: 287-290. 1973.

FUJISAWA, M., RUBIO, M., MATSUI, C. and YAMAGUCHI, A. Intracellular appearance of cauliflower mosaic virus particles. *Phytopathology* 57: 1130-1132. 1967.

HEARON, S. and LAWSON, R.H. Effects of light intensity, photoperiod, and temperature on symptom expression and host and virus ultrastructure in *Saponaria vaccaria* infected with carnation etched ring virus. *Phytopathology* 71: 645-652. 1981.

KITAJIMA, E.W. Strawberry vein banding virus, a member of cauliflower mosaic virus group. *Journal of General Virology* 20: 117-119. 1973.

LARSON, R.H., MATTHEWS, R.E.F. and WALKER, J.C. Relations between certain viruses affecting the genus brassica. *Phytopathology* 40: 955-962. 1950.

LAWSON, R.H. and HEARON, S.S. Ultrastructure of extracted carnation etched ring virus inclusion bodies treated with proteolytic enzymes and Dnase. *Phytopathology* 67: 1217-1226. 1977.

LAWSON, R.H. and TACONIS, P.J. Transfer of dahlia mosaic virus with liquid nitrogen and relation of transfer to symptoms and inclusions. *Phytopathology* 55: 715-718. 1965.

LEGUIZAMON C., J.E. and MARTINEZ, L., G. Informe de observaciones preliminares de un posible nuevo disturbio en café de etiología desconocida. Chinchiná, Cenicafé, 1998. 22 p. (Sin publicar).

PRIONE, T.P., POUND, G.S. and SHEPHERD, R.J. Properties and serology of purified cauliflower mosaic virus. *Phytopathology* 51: 541-546. 1961.