

TRANSMISIÓN Y EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL VIRUS DE LOS ANILLOS CLORÓTICOS DEL CAFÉ (CoCRSV), SOBRE EL DESARROLLO DE TRES VARIEDADES DE *Coffea arabica* CULTIVADAS EN COLOMBIA

María Elena Ocampo-A.* ; Jairo E. Leguizamón-Caycedo** ; Gerardo Martínez-López***

RESUMEN

OCAMPO A., M.E. ; LEGUIZAMÓN C., J.E.; MARTINEZ L.,G. Transmisión y evaluación del efecto del virus de los anillos cloróticos del café (CoCRSV) sobre el desarrollo de tres variedades de *Coffea arabica* cultivadas en Colombia. *Cenicafé* 53(2):144-161.2002

Utilizando muestras con síntomas del virus de los anillos cloróticos del café (CoCRSV), se evaluaron los métodos de transmisión mecánica, por injerto, por insectos y por semilla y se determinó el efecto sobre el crecimiento y desarrollo de las variedades de café Caturra, Colombia y Típica. La eficiencia de transmisión mecánica fue de 60%, con un período de incubación de 25 a 35 días en las tres variedades, presentándose una diversidad de síntomas como: moteado, manchas cloróticas, ampollamiento internerval, amarillamientos y deformación de nervaduras. Por injerto, se presentaron manchas anulares cloróticas o grabadas, deformación foliar, clorosis internerval y arrosamiento de brotes, con un 70% de eficiencia y un período de incubación de 60 días. La mejor eficiencia de transmisión 80% se obtuvo con *Toxoptera aurantii*, en grupos de 10 adultos por planta, con incubación de 15 a 20 días en las plantas inoculadas, mostrando lesiones circulares cloróticas o grabadas, moteado, clorosis de nervaduras o mosaico. La transmisión por insectos después de 10 meses de seguimiento mostró una marcada reducción en el crecimiento. Al comparar la altura de las plantas enfermas con testigos sanos se encontraron reducciones de un 20%, 40% y 60% en Típica, Caturra y Colombia, respectivamente. No se obtuvo transmisión del virus en la semilla. En plantas enfermas se observaron inclusiones en forma de viroplastos, con partículas isométricas entre 50 a 60nm de diámetro características de los caulimovirus.

Palabras claves: Café, Caulimovirus, *Toxoptera aurantii*, métodos de transmisión, efecto sobre el crecimiento.

ABSTRACT

Plant material collected in Andes (Antioquia) and Fusagasugá (Cundinamarca) was used to evaluate the methods of mechanical, graft, insect and seed transmission as well as the effect of Coffee chlorotic ringspot *caulimovirus* on the growth and development of Caturra, Colombia and Típica varieties. The mechanical transmission efficiency was 60%, with an incubation period of 25-35 days in the three coffee varieties and with the presence of mottle, chlorotic spots, interveinal blisters, chlorosis and vein deformation. In the graft transmission it was possible to see chlorotic and etched ringspots, leaf distortion, interveinal chlorosis and rosetting of the buds, with 70% transmission efficiency and an incubation period of 60 days in the three varieties. The best transmission efficiency (80%) was obtained with the aphid *Toxoptera aurantii*, in groups of 10 adults per plant, with an incubation period of 15-20 days in the inoculated plants and with the presence of circular chlorotic or etched lesions, mottle, vein chlorosis, or mosaic. Plants inoculated with the virus throughout the aphid presented growth reduction the after 10 months of evaluation. The inoculated plants development has a reduction in their height of 20, 40 and 60% in Típica, Caturra and Colombia varieties. In seed transmission there was no evidence of symptoms. Transmission electron microscopic observations revealed the presence of viroplasts with isometric particles of 50-60nm in diameter, which are characteristic of the Caulimovirus.

Keywords: Coffee, caulimovirus, *Toxoptera aurantii*, transmission methods, growth reduction.

* Bacterióloga, M.Sc. en Fitopatología, Universidad de Caldas.

** Investigador Principal I. Fitopatología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia, hasta mayo de 2000.

*** Ph.D. Profesor Universidad de Caldas, Manizales, Caldas, Colombia.

Las enfermedades de mayor importancia económica en el cultivo del café, en el mundo, han estado relacionadas con agentes patógenos de tipo fúngico y el Comité Internacional de Taxonomía de Virus sólo había reconocido una enfermedad causada por virus asociada al café; la conocida como el virus de la Mancha anular del café (Coffee ringspot (?) nucleorhabdovirus, CoRSV), sin que exista información sobre su impacto económico.

En Colombia, Reiche *et al.* (25), observaron en la región de Andes (Antioquia) en plantas de la variedad Colombia la presencia de clorosis foliar, mosaico, pérdida de brillo de las hojas y defoliación. Estos investigadores realizaron pruebas inmunoenzimáticas ELISA, utilizando anticuerpos policlonales para el Virus del Rayado del Banano (BSV) y, según los resultados positivos de los mismos consideraron que el cuadro de síntomas observado en las plantas de café en esta zona estaba asociado a este badnavirus. Con el fin de confirmar esta situación Leguizamón y Martínez¹, estudiaron plantas con síntomas de un posible disturbio causado por virus en Andes (Antioquia) y Fusagasugá (Cundinamarca) y confirmaron la naturaleza viral de la enfermedad por medio de la transmisión positiva mediante injerto, pero descartaron la posibilidad que se tratara de un badnavirus debido a los resultados negativos encontrados en la prueba DAS ELISA para BSV, y al observar al microscopio electrónico de transmisión en el CIAT (Palmira- Valle) inclusiones en forma de viroplastos y partículas isométricas asociadas al citoplasma, con un diámetro entre 50 a 60nm, las cuales por sus características morfológicas y métodos de transmisión asociaron tentativamente al género Caulimovirus. Con base en estos antecedentes se propuso realizar esta investigación a partir de la cual en tres variedades comerciales de café se determinaron

los métodos de transmisión de este nuevo virus, la eficiencia de transmisión de cada método y el efecto que ocasiona en los primeros diez meses sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas inoculadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización. El trabajo se desarrolló en las instalaciones de la Universidad de Caldas (Manizales), ubicada a 5° 03" latitud norte, 75° 29" longitud oeste, 2.150m de altitud, precipitación anual de 1.867mm, brillo solar de 1.657 horas, temperatura máxima media de 21,5°C, temperatura media de 16,6°C, temperatura mínima media de 13°C y humedad relativa de 79%, y en los laboratorios de Fitopatología del Centro Nacional de Investigaciones de café "Pedro Uribe Mejía" CENICAFÉ, municipio de Chinchiná, departamento de Caldas, Colombia; ubicado a una longitud 5° 03" N, latitud 75° 36" W, altitud de 1.425msnm, precipitación media anual 2.537mm, temperatura media 20,9°C, humedad relativa del 77% y brillo solar de 1.901 horas/año (7). Los trabajos de microscopía electrónica de transmisión se adelantaron en la unidad de virología en el Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT, Palmira.

Material vegetal fuente de virus. Con base en visitas de diagnóstico realizadas a las zonas de Andes (Antioquia) y Fusagasugá (Cundinamarca), se colectó material vegetal enfermo fuente de virus en plantas de café en producción de las variedades Caturra, Típica a la sombra, que presentaron como cuadro sintomatológico: clorosis internerval, moteado, hojas con poco brillo, deformación de la lámina foliar, necrosamiento y en algunos casos defoliación de árboles que se encontraban a

¹ LEGUIZAMÓN C. J.E.; MARTINEZ L.,G. Informe de observaciones preliminares de un posible nuevo disturbio en café de etiología desconocida. Cenicafé, Chinchiná, 1998. 22p. (Documento interno).

libre exposición solar. Se tomó una cantidad de 10 hojas sintomáticas por planta, las cuales se guardaron en sobres de papel aluminio con una toalla humedecida y previamente rotulados. Estas muestras se depositaron en una nevera de icopor para su transporte, evitando temperaturas extremas.

Material vegetal. Se emplearon plántulas de las variedades de café Caturra, Colombia y Típica, cultivadas en las instalaciones de Cenicafe, en suelo más pulpa como sustrato en proporción 3:1, en condiciones de sombrero y libres de virus, las cuales se utilizaron en cada uno de los métodos de transmisión estipulados en esta investigación. Estas plántulas se fertilizaron mensualmente con 2 gramos de fosfato diamónico (DAP), se regaron diariamente y no se les aplicaron fungicidas para el control de enfermedades foliares.

Colección e identificación de pulgones. Se realizaron visitas a la Estación Central Naranjal (Chinchiná, Caldas), para coleccionar pulgones asociados a la parte aérea de plantas de café y establecer colonias de ellos. La identificación se realizó en la Disciplina de Entomología de Cenicafe en ninfas y adultos preservados en alcohol al 80% y en toallas de papel².

Establecimiento de colonias de pulgones libres de virus. Con el fin de establecer colonias libres de virus y multiplicar el número de insectos colectados, se empleó la metodología descrita por Harris y Maramorosh (14), Silvestre (27,28, 29), y Matthews (21), quienes recomiendan obtener estas colonias mediante la cría de ninfas de primer instar que no han tenido acceso a plantas enfermas, debido a que en el caso de los pulgones no hay evidencia de transmisión a la progenie de los virus adquiridos por hembras adultas. El establecimiento de colonias de pulgones se realizó sobre plantas jóvenes de

café de la variedad Caturra de 6 meses de edad y se prolongó durante la realización de toda la investigación.

Evaluación de los métodos de transmisión. Esta etapa incluyó la evaluación de los cuatro métodos de transmisión, la descripción de síntomas en las plantas inoculadas y por último, la realización de microscopía electrónica de transmisión en la unidad de virología del CIAT a partir de tejido foliar sintomático obtenido para cada uno de los métodos de transmisión.

Transmisión mecánica. Se evaluaron dos soluciones tampón, seis rangos de molaridad y seis de pH, utilizando tejido foliar joven sintomático de la variedad Caturra. El inóculo se obtuvo macerando 5g de hojas con síntomas, con 10ml de las soluciones tampón fosfato de sodio y fosfato de potasio en rangos de molaridad de: 0,005 - 0,1 - 0,2 - 0,3 - 0,4 - 0,5 y rangos de pH de: 7,0 - 7,1 - 7,2 - 7,3 - 7,4 y 7,5. Una vez obtenido el macerado y siguiendo la metodología descrita por Yarwood y Fulton (29), se frotó sobre el primer par de hojas verdaderas de plantas de café de las variedades Caturra, Típica y Colombia, espolvoreadas previamente con carborundum 600 mallas, con el fin de ocasionar en el momento de la inoculación heridas que permitieran el ingreso del virus. Después de la inoculación se lavaron las hojas con agua corriente. Por cada tratamiento se tuvieron cinco unidades experimentales, donde la unidad experimental estuvo conformada por 10 plántulas. Semanalmente, y durante un período de 4 meses, se evaluó el número de plantas con síntomas y el tiempo de su aparición (período de incubación).

Transmisión por injerto. Se hicieron 150 injertos de cuña, teniendo en cuenta los métodos citados por Bos (4), con material vegetal enfermo proveniente de Andes y Fusagasugá,

² BUSTILLO, A. Comunicación personal. 1999.

empleando 50 plantas de café de las variedades Caturra, Colombia y Típica sembradas en suelo franco con pulpa de café bien descompuesta en una proporción de 3:1 (tres partes en volumen de suelo y una parte de pulpa). Cuando las plantas tuvieron tres pares de hojas verdaderas se les eliminó el par superior cortando el nudo, e inmediatamente se procedió a realizar el injerto de cuña. Las plantas injertadas se llevaron a casa de mallas a prueba de insectos y se cubrieron cada una con bolsa plástica transparente durante 20 días para evitar su deshidratación, tarea recomendada por Martínez (Comunicación personal, 1998). Se empleó el mismo número de testigos y éstos recibieron igual tratamiento, pero se injertaron con tejido proveniente de plantas sanas cultivadas en Cenicafé. Semanalmente se observó buscando síntomas y durante un período de 4 meses se evaluaron parámetros como proporción de plántulas con síntomas y el tiempo de aparición de los mismos (período de incubación).

Transmisión por vectores. Se probó una sola especie de pulgón: *Toxoptera aurantii*, con grupos de 5, 10 y 15 pulgones, adultos y ninfas. Las inoculaciones se realizaron sobre plantas sanas siguiendo los procedimientos recomendados en la literatura (20, 21, 26, 27, 28). Los insectos se manejaron como si la relación virus-vector fuera no persistente, característica de los Caulimovirus, realizando ensayos de adquisición sobre plantas de café enfermas y luego la inoculación sobre plántulas de café de las tres variedades con períodos de ayuno de dos horas, período de alimentación-adquisición sobre plantas enfermas de 5 minutos y período de alimentación-inoculación de 2 minutos, seguido por la aplicación de un insecticida (Malathion) en dosis de 1 ml/ia para la eliminación de los insectos. Por cada grupo de insectos se tuvieron cinco unidades experimentales, donde la unidad experimental estuvo conformada por 10 plántulas de la variedad Colombia. Durante 4 meses, a intervalos semanales, se registró el número de

plantas enfermas por unidad experimental y el período de incubación. Este sistema de evaluación permitió establecer las relaciones vector-virus-hospedante.

Transmisión por semilla. Se utilizaron 500 semillas cosechadas de plantas enfermas de las variedades Caturra, Colombia y Típica (tratamientos), colectadas en el municipio de Andes (Antioquia) y como testigos, semillas cosechadas de plantas sanas de las mismas variedades en zonas libres de la enfermedad. Las semillas se sembraron individualmente, conservando la identidad de las plantas de origen. Se observó la posible alteración en el desarrollo de las plantas obtenidas comparándolas con las plantas testigo. Posteriormente se transplantaron a bolsas plásticas (con 1.750g de suelo estéril) 50 plantas jóvenes de cada uno de los tratamientos y se llevaron a una casa de malla para evaluar por un tiempo más largo el posible desarrollo de síntomas. Por cada variedad se tuvieron cinco unidades experimentales y cada una estuvo conformada por 10 plantas. Éstas se observaron semanalmente durante 4 meses, registrándose el número de plantas con síntomas y el tiempo de aparición de ellos.

Evaluación y descripción de síntomas. Durante un período de cuatro meses se registró semanalmente el momento de la observación de los primeros síntomas para establecer el período de incubación, el número de plantas que presentaron los síntomas y se describió en forma detallada el síntoma que se presentó en cada una de las plantas inoculadas, teniendo como patrón de comparación las plantas testigo en estado normal de desarrollo. Se hizo entonces una descripción particular por cada variedad evaluada.

Microscopía electrónica de transmisión. En la unidad de Virología del CIAT (Palmira, Colombia), se analizó tejido foliar sintomático

proveniente de las plantas inoculadas por los diferentes métodos de transmisión, con el fin de evidenciar la presencia de partículas virales y presencia de inclusiones asociadas con el mismo.

Selección del mejor método de transmisión.

El mayor número de plantas sintomáticas y el menor período de incubación fueron los parámetros tenidos en cuenta para la selección del método más eficiente de transmisión.

Efecto del virus sobre el desarrollo de las tres variedades de café.

Al momento de inocular el virus se escogieron plantas lo más homogéneas posible respecto a altura y diámetro de las hojas. Se inocularon 20 plantas jóvenes de cada una de las tres variedades de café, Caturra, Colombia y Típica, por el método de transmisión por insectos debido a que con este método se obtuvo la más alta eficiencia de transmisión y por tanto, un mayor número de plantas sintomáticas en un menor tiempo, en comparación con los otros métodos de transmisión empleados en el estudio. Se dejaron 20 plantas jóvenes de cada variedad como testigos (tratamientos). Se aplicó un diseño completamente aleatorizado, donde la unidad experimental estuvo conformada por 40 plántulas (20 inoculadas y 20 sin inocular).

Para determinar el efecto que el virus causa sobre cada una de las variedades de café, se empleó la medición de índices de reducción de altura y diámetro de hojas con respecto a las plántulas sanas, mediciones que se hicieron mensualmente por un período de 10 meses, en cada una de las plantas después de la aparición de los síntomas. El diámetro foliar se midió

empleando la regla diseñada por Arcila³ en 1987. Los resultados se analizaron mediante la prueba de comparación de promedios (Tukey al 5%) y análisis de varianza. Los índices de reducción fueron calculados de la siguiente manera:

Índice de reducción de altura:

$$\frac{\text{altura planta sana} - \text{altura planta enferma}}{\text{altura planta sana}} \quad \langle\langle 1 \rangle\rangle$$

Índice de reducción de diámetro de hojas:

$$\frac{\text{diámetro hojas planta sana} - \text{diámetro de hojas planta enferma}}{\text{diámetro de hojas planta sana}} \quad \langle\langle 2 \rangle\rangle$$

El efecto del virus sobre cada una de las variedades quedaría corroborado si en al menos una de las variedades inoculadas el desarrollo de las plantas se viera afectado en un 50 %, es decir, los índices de reducción fueran mayores o iguales a 0,5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento de colonias del insecto. Se establecieron colonias libres de virus mediante la obtención de ninfas de primer instar a partir de adultos. En estas plantas se logró la multiplicación de las colonias del pulgón, durante el tiempo que duró la investigación. No hubo síntomas de la enfermedad en las plantas en las cuales se alimentaron estos insectos.

³Arcila P., J. Métodos prácticos para la medición de área foliar del cafeto. Diseño de una reglilla para medición de área foliar en campo. Informe anual de labores. Disciplina de Fisiología Vegetal, 1986-1987. Cenicafé. 1987

Tabla 1. Período de incubación y porcentaje de eficiencia de transmisión mecánica en las variedades de café Caturra, Típica y Colombia, con diferentes pH y molaridades de la solución tampón de fosfato de potasio.

pH	Mol	Variedad	Número de plantas inoculadas	Período de incubación (días)	Transmisión (%)
7,1	0,1	Caturra	50	25	60
7,2	0,3	Caturra	50	25	60
7,5	0,5	Caturra	50	25	70
7,1	0,1	Típica	50	25	60
7,2	0,3	Típica	50	25	60
7,5	0,5	Típica	50	25	60
7,1	0,1	Colombia	50	25	40
7,2	0,3	Colombia	50	25	40
7,5	0,5	Colombia	50	25	50

Métodos de transmisión. Transmisión mecánica. Los síntomas en las plantas inoculadas mecánicamente comenzaron a presentarse de 25 a 35 días, independientemente de la variedad o de la solución tampón utilizada, presentándose estabilidad del virus en un rango amplio de molaridades y pH (Tabla 1). La eficiencia de transmisión mecánica osciló entre 40 y 70%. Los síntomas iniciaron como pequeñas manchas cloróticas, lesiones circulares concéntricas y moteado. Al mes se observó un incremento en la intensidad de los síntomas y 4 meses después se observó una aparente recuperación de las plantas asociada a un enmascaramiento de los síntomas. En condiciones experimentales los síntomas fueron muy diversos en las tres variedades y hubo una reducción muy marcada en el vigor de las plantas enfermas, con menor altura y menos follaje.

La deformación de las nervaduras fue el síntoma más frecuente cuando se hizo la transmisión mecánica. En la var. Caturra, fue común observar un moteado leve distribuido uniformemente a lo largo de la superficie foliar (Figura 1a), acompañado de manchas cloróticas (Figura 1b). Dos meses después de la inoculación se registró un incremento en la intensidad de los síntomas y la presencia de hojas con poco brillo y ampollamiento (Figura 1c). Después de

4 meses se enmascararon los síntomas foliares en todas las plantas inoculadas que presentaron síntomas; sin embargo, el crecimiento de las plantas se vio afectado en comparación con los testigos (Figura 2). En la variedad Colombia la transmisión presentó una eficiencia del 50% con la solución tampón de fosfato de potasio pH 7,5 y molaridad 0,5. El inicio de síntomas se caracterizó por la presencia un ligero moteado (Figura 3), el cual se observó 30 días después de realizar las inoculaciones. En la var. Típica se obtuvo mayor eficiencia con transmisión mecánica con un período de incubación de 25 días y la presencia de clorosis internerval marcada (Figura 4a), pérdida de brillo de las hojas (Figura 4b), hinchamiento de nervaduras (Figura 4c), hinchamiento de venas (Figura 5).

Los síntomas observados fueron similares a los descritos para el Virus de la Mancha Anular del Café, asociada con un Rhabdovirus (1, 16).

Transmisión por injerto de caña. El método presentó un porcentaje de eficiencia del 70%, el período de incubación fue de 50-60 días y los síntomas obtenidos como resultado del progreso de la enfermedad se manifestaron en forma de manchas anulares, clorosis internerval y anillos circulares concéntricos. El material vegetal que se empleó para injertar plantas sanas



Figura 1. Plantas de la variedad Caturra, inoculadas mecánicamente con el virus diluido en solución tampón de fosfato de potasio. a) Moteado, b) Manchas cloróticas, c) Presencia de hojas con poco brillo y ampollamiento intervenal.



Figura 2. a) Plantas de la variedad Caturra inoculadas mecánicamente, b) Plantas testigo de la variedad Caturra sin inocular.



Figura 3. Plantas de la variedad Colombia inoculadas mecánicamente con el virus. Obsérvese la presencia de un ligero moteado.

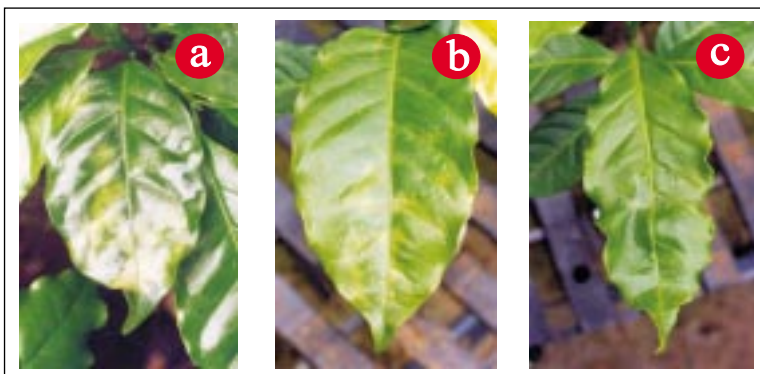


Figura 4. Plantas de la variedad Típica inoculadas mecánicamente con el virus. a) Presencia de clorosis intervenal. b) Pérdida de brillo de las hojas y clorosis intervenal. c) Hinchamiento de nervaduras.

provino de plantas de la var. Colombia, que presentó como cuadro sintomatológico, clorosis marcada en la mitad de la lámina foliar (Figura 6a), hojas con el borde doblado hacia el envés casi en ángulo recto y arqueado de la nervadura central (Figura 6b). El período de incubación más prolongado en este procedimiento está asociado con la necesidad de emisión de brotes nuevos para la expresión de los síntomas. Una inducción previa de la brotación, antes de la injertación, reduciría la diferencia con los períodos de incubación registrados con los otros métodos de inoculación lo cual podría tenerse en cuenta por la realización de trabajos posteriores. Al igual que las plantas inoculadas por otros métodos, después de unos 6 meses hubo enmascaramiento de los síntomas foliares en las tres variedades.

Descripción de síntomas en las variedades inoculadas por injerto. Los síntomas

comenzaron con la aparición de un moteado leve, clorosis internerval que se fue expandiendo a lo largo de la superficie foliar hasta ocasionar necrosis de las hojas, alrededor de 6 meses después de la injertación. También se presentó deformación de hojas, moteado e intensa clorosis de brotes y hojas de tamaño reducido (Figura 7), anillos concéntricos irregularmente distribuidos en la superficie foliar (Figura 8), clorosis internerval, arrosamiento de brotes y manchas anulares (Figura 9). Este último síntoma se obtuvo sólo mediante este método de transmisión y se destaca dentro de la amplia gama de síntomas presente en los demás métodos de transmisión empleados en el estudio. Otros síntomas observados en estas plantas se caracterizaron por el alargamiento de hojas, hojas que se doblan hacia el envés, arrugamiento de hojas, alteración de venas, patrón paralelo de nervaduras, hojas con textura áspera y necrosis apical.



Figura 5. Hinchamiento de nervaduras en hojas de la variedad Típica, después de la inoculación mecánica con el virus.



Figura 6. Plantas de la variedad Caturra localizadas en Fusagasugá (Cundinamarca). a) Presencia de clorosis marcada en la mitad de la lámina foliar. b) Borde doblado hacia el envés casi en ángulo recto y arqueamiento de la nervadura central.

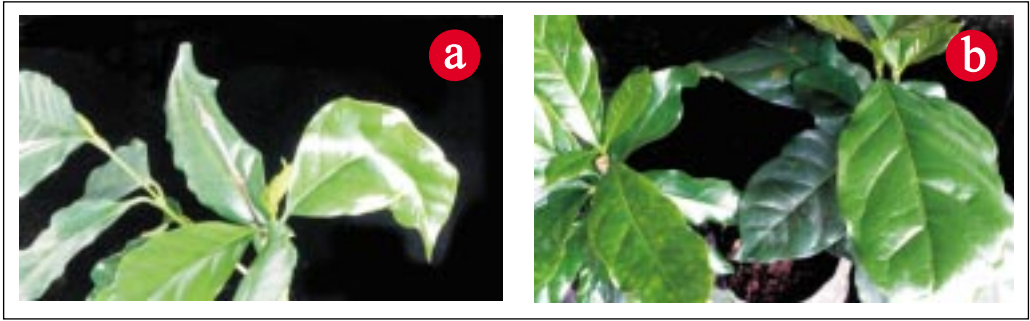


Figura 7. Plantas de la variedad Caturra injertadas, a) Obsérvese la deformación de hojas, b) Moteado de brotes y hojas de tamaño reducido.



Figura 8. Plantas de la variedad Colombia injertadas. Obsérvese los anillos circulares concéntricos.

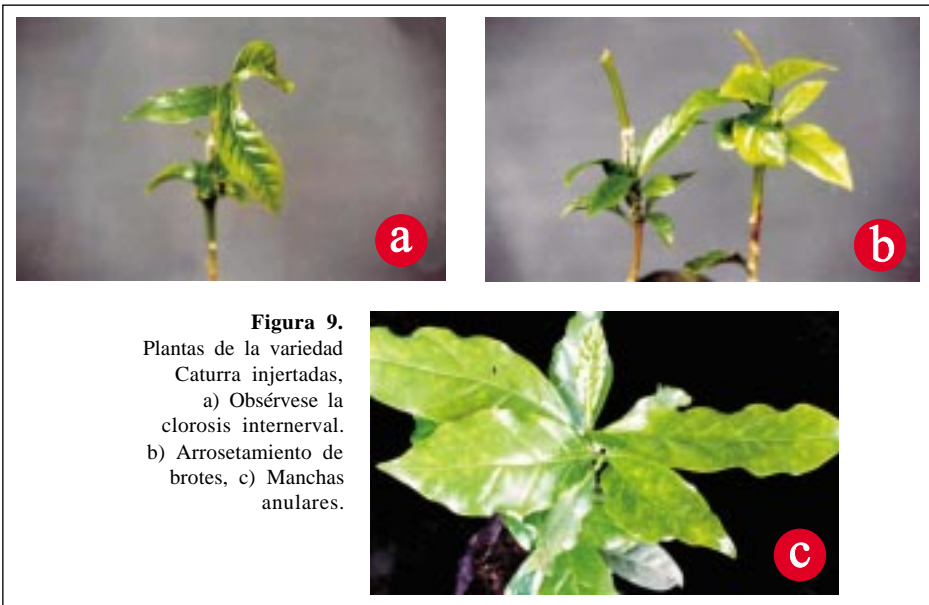


Figura 9. Plantas de la variedad Caturra injertadas,
 a) Obsérvese la clorosis internerval.
 b) Arrosetamiento de brotes, c) Manchas anulares.

Transmisión por insectos. La transmisión por *Toxoptera aurantii* presentó la mejor eficiencia (80%) y el período de incubación más corto (15-20 días). En la Tabla 2 se observa el porcentaje de eficiencia de transmisión de *Toxoptera aurantii*, en los estados de ninfa, adulto y formas aladas. *T. aurantii* es de común ocurrencia en la zona cafetera tanto en café como en cítricos (6); además, está registrado como transmisor de casi todos los virus que integran la familia Caulimoviridae (3, 22). Estudios sobre la transmisibilidad de virus por pulgones en el género Caulimovirus están ampliamente documentados (5, 9). En esta investigación se registró un efecto tanto del número de pulgones empleados como el estado del insecto sobre la eficiencia de la transmisión. En las Tablas 2 y 3 se observa cómo el empleo de hembras ápteros y hembras aladas, en grupos de 10, permitió obtener síntomas en un menor tiempo y la intensidad de los mismos fue mayor, sin importar la variedad. Además, se registró que la eficiencia de transmisión va disminuyendo a través del tiempo, aunque con el empleo de grupos de 10 y 15 insectos por planta la eficiencia de transmisión es muy alta desde el inicio. En este estudio se determinó que en un período entre 84 y 112 días después de cumplirse el período de incubación, la eficiencia disminuye notoriamente llegando a un 0%.

Han sido muchos los estudios realizados en los cuales se registra que existen vectores eficientes que permiten la amplia diseminación de agentes patogénicos de origen viral, resultando especialmente los insectos los que juegan un papel importante en que esta

diseminación sea efectiva (8). En el caso de los virus que hacen parte del género de los Caulimovirus, entre ellos el virus del mosaico de la coliflor (Cauliflower Mosaic Virus, CaMV), los pulgones son los agentes diseminadores más eficientes.

Descripción de síntomas en las variedades inoculadas con insectos. Los síntomas comenzaron a presentarse tanto en la var. Caturra como en Colombia después de 15 días de realizar las inoculaciones en forma de pequeñas lesiones circulares de aspecto clorótico, las cuales se expandieron hasta invadir toda la superficie foliar (Figura 10). En los primeros 60 días los síntomas fueron muy definidos pero hacia los 4 meses perdieron intensidad y lo único que se conservó fue la reducción en el crecimiento de las plantas que se enfermaron. Los síntomas en la var. Caturra se caracterizaron por la presencia de moteado y lesiones circulares, clorosis de nervaduras con anillos circulares, presencia de ampollas en forma de anillos concéntricos distribuidos en la superficie foliar, clorosis intensa de la lámina foliar (Figura 11). Por este método de transmisión los síntomas foliares permanecieron más tiempo en las plantas y fue muy notorio a través del tiempo el escaso desarrollo de estas plantas comparado con el del testigo.

En la var. Colombia los síntomas se iniciaron con la aparición de una ligera clorosis alrededor de la nervadura central. Posteriormente, las lesiones cloróticas se distribuyen en toda la superficie foliar y a medida que avanzó la enfermedad se observó una marcada clorosis

Tabla 2. Eficiencia de transmisión de los diferentes estados de *Toxoptera aurantii* en plantas de las variedades Colombia

Estado insecto	Plantas Inoculadas	Plantas sintomáticas	Transmisión (%)
Hembras aladas	50	40	80
Hembras ápteros	50	40	80
Ninfas	50	30	60

Tabla 3. Eficiencia de transmisión mediante el empleo de grupos de 5, 10 y 15 pulgones de *Toxoptera aurantii* sobre plantas de la variedad Colombia.

Días después de la aparición de síntomas	Número de plantas con síntomas	Eficiencia de transmisión de (5 insectos por planta)	Número de plantas con síntomas	Eficiencia de transmisión de (10 insectos por planta)	Número de plantas con síntomas	Eficiencia de transmisión con el empleo de (15 insectos por planta)
7	32	56%	19	58%	30	64%
28	27	54%	28	56%	30	60%
35	27	54%	28	56%	30	60%
49	28	56%	28	56%	29	58%
84	17	34%	23	46%	26	52%
91	8	16%	5	10%	14	28%
112	0	0%	0	0%	0	0%

Figura 10. Plantas de la variedad Colombia inoculadas mediante *Toxoptera aurantii*. Obsérvese el inicio de lesiones caracterizados por la presencia de ampollas circulares de aspecto clorótico.



sobre las hojas inoculadas. Otro tipo de lesión que se observó en estas plantas incluyó la presencia de anillos concéntricos que rodeaban las lesiones cloróticas y se distribuyeron uniformemente a lo largo de la superficie foliar. También se observó moteado foliar y clorosis intensa (Figura 12).

Transmisión por semilla. En las plantas obtenidas a partir de semillas colectadas de plantas de café enfermas de las variedades Caturra, Típica y Colombia provenientes de Andes (Antioquia), no se presentaron alteraciones en su desarrollo que al compararlas con las semillas provenientes de plantas sanas permitiera sugerir que hay transmisión del virus a través de las semillas. En la Tabla 4 se presentan

los resultados obtenidos en cada una de las variedades y se registra la ausencia de síntomas en estas plantas a través del tiempo.

Estudios de microscopía electrónica. Las muestras provenientes de plantas con síntomas, resultado de las inoculaciones realizadas por diferentes métodos, permitieron confirmar con la ayuda del microscopio electrónico de transmisión que el agente causante es un virus de alrededor de 50-60nm de diámetro, partículas características de los Caulimovirus (Figura 13) (10, 11, 12, 13, 15, 16, 18, 23, 24, 25).

Efecto del virus sobre el desarrollo de las tres variedades. En las plantas inoculadas con cual se expresó con reducción en la altura de éstas en comparación con los testigos sin inocular.

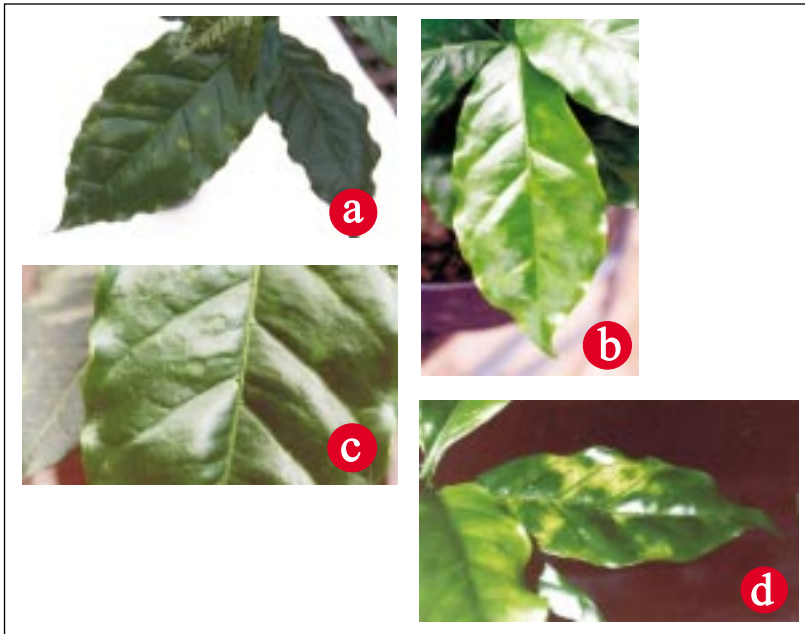


Figura 11. Plantas de la variedad Caturra inoculadas con *Toxoptera aurantii*, a) Con presencia de lesiones circulares y moteado, síntomas que aparecieron 15 días después de la inoculación, b) Clorosis de nervaduras y ampollas circulares, síntomas que aparecieron 15 días después de la inoculación, c) Ampollas en forma de anillos circulares concéntricos distribuidos en la superficie foliar, síntomas que aparecieron 15 días después de la inoculación, d) Intensa clorosis de la lámina foliar, síntomas que aparecieron 15 días después de la inoculación.

Tabla 4. Transmisión por semilla realizada mediante el empleo de las variedades Caturra, Típica y Colombia provenientes de Andes (Antioquia) y de Cenicafé.

Variedad	Procedencia	# de plantas con síntomas *
Caturra	Andes	0
Colombia	Andes	0
Típica	Andes	0
Caturra (test)	CENICAFÉ	0
Colombia (test)	CENICAFÉ	0
Típica (test)	CENICAFÉ	0

Con respecto al índice de reducción de altura, durante las diez evaluaciones según la prueba de “F” se encontró una reducción significativa en la primera y en la tercera evaluación. En las demás evaluaciones se redujo la altura de manera altamente significativa, con valores de (<0,0001), encontrándose además según la prueba de Tukey diferencias altamente

significativas entre las tres variedades de café. En la Tabla 5 se observan los promedios de reducción de altura, los cuales se incrementaron desde la primera hasta la décima evaluación. Los mayores promedios de reducción se presentaron desde la cuarta a la novena evaluación.

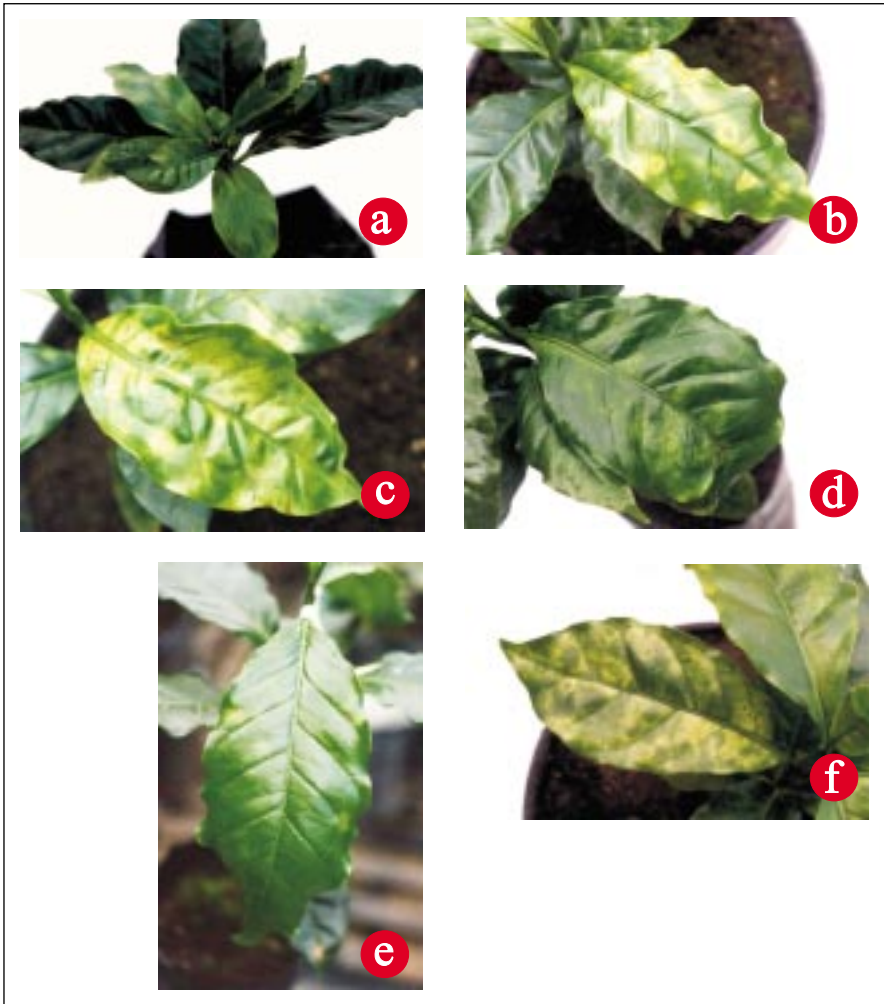
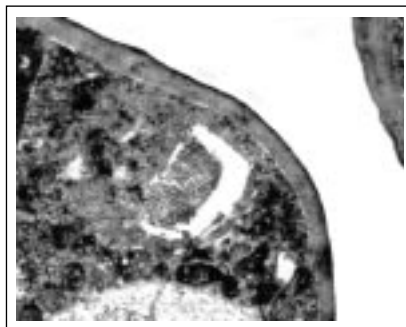


Figura 12. Plantas de la variedad Colombia inoculadas con *Toxoptera aurantii*. a) Ligera clorosis alrededor de la nervadura central, b) Lesiones cloróticas distribuidas en la superficie foliar, c) Marcada clorosis sobre las hojas inoculadas, d) Anillos circulares concéntricos, e) Moteado foliar, f) Clorosis intensa.

Figura 13.
Partículas virales isométricas en forma de viroplastos asociadas al citoplasma de células de tejido foliar de plantas con síntomas de CoCRSV.



En la Tabla 6 se observa el índice de reducción de área foliar. En éste, se registraron diferencias altamente significativas según la prueba de “F” desde la primera a la cuarta evaluación. En las otras evaluaciones las diferencias fueron solamente significativas. Los promedios de reducción de área foliar fueron menores en comparación con el índice de reducción de altura y según la prueba de Tukey se observaron diferencias altamente significativas entre las variedades Caturra y Típica desde la quinta a la décima evaluación.

Índice de reducción de altura. En la Tabla 7 se ven muy claras las diferencias que se encuentran en los anava. En todas las

evaluaciones se observó que la variedad que más altura perdió fue la variedad Colombia, le sigue en orden de importancia la variedad Caturra y la variedad que menos altura perdió fue Típica. En esta Tabla se observa que la variedad Colombia, con valores de reducción de (0,59869-0,68996), sobrepasa el índice de reducción de 0,5; por tanto, se corrobora la hipótesis de trabajo que indica que el desarrollo de la planta si se ve afectado con respecto a la variable índice de reducción de altura. Como se mencionó anteriormente, la var. Caturra también se vio afectada en su crecimiento con valores de reducción de altura que oscilaron desde (0,42817-0,51378), lo cual no ocurrió con la variedad Típica que registró los menores porcentajes

Tabla 5. Significancia estadística del índice de reducción de altura ocasionado por el virus en plantas de café de las variedades Caturra, Colombia y Tipica.

Evaluación	Promedio	Pr>F	Tukey
1	0,3334	0,0193	Col-Cat ***
2	0,4026	<0,0001	Col-Cat***, Col-Tip***
3	0,3288	0,0199	Col-Tip***
4	0,4498	<0,0001	Col-Cat***, Col-Tip***
5	0,4882	<0,0001	Col-Cat***, Col-Tip***, Cat-Tip***
6	0,4806	<0,0001	Col-Cat***, Col-Tip***, Cat-Tip ***
7	0,4361	<0,0001	A 0.5983 Colombia; B 0.1964 Típica
8	0,4270	<,0001	Col-Cat***, Col-Tip***, Cat-Tip***
9	0,4343	<0,0001	Cat-Tip***, Col-Tip***
10	0,4132	<0,0001	Cat-Tip***, Col-Tip***

Tabla 6. Significancia estadística del índice de reducción de área foliar ocasionado por virus en plantas de café de las variedades Caturra, Colombia y Tipica.

Evaluación	Promedio	Pr>F	Tukey
1	0,3459	<0,0001	A 0.467 Cat, B 0.357 Col,C 0.213,Tip
2	0,3447	<0,0001	Cat-Col***, Cat-Tip***, Col-Tip***
3	0,3806	0,0081	Cat-Tip***
4	0,3703	0,0055	Cat-Col***, Cat-Tip***
5	0,3610	0,0294	Cat-Tip***
6	0,3610	0,0294	Cat-Tip***
7	0,3494	0,0268	Cat-Tip***
8	0,3530	0,0415	Cat-Tip***
9	0,3485	0,060	Cat-Tip***
10	0,3570	0,0226	Cat-Tip***

de reducción de altura con valores de (0,18-0,33).

Con respecto a la relación entre días después de la inoculación y el índice de reducción de altura, se determinó que en la variedad Caturra los mayores valores de pérdida de altura se registraron entre los 180 a 360 días después de la inoculación, presentándose el mayor valor de pérdida de

altura (0,51378) a los 270 días después de la inoculación, es decir 7 meses después de cumplirse el período de incubación, el cual fue de tres meses.

En la var. Colombia durante todas las evaluaciones se presentaron promedios de reducción altos; sin embargo, los mayores valores se registraron 180ddi (0,62077), 210ddi (0,68996), 240ddi (0,68996), 270ddi (0,59835) y 300 ddi

Tabla 8. Efecto del virus sobre la altura y el área foliar de las variedades Caturra, Colombia y Típica.

Variedad	Observación	DDI *	altura	Diámetro	CValtura	CVdiámetro
Caturra	1	90 días	0,28178	0,46784	44,1241	34,0017
	2	120 días	0,28178	0,46784	44,1241	34,0017
	3	150 días	0,28178	0,46784	44,1241	34,0017
	4	180 días	0,31200	0,46784	54,8097	34,0017
	5	210 días	0,42817	0,44185	27,5812	38,8794
	6	240 días	0,42817	0,44185	27,5812	38,8794
	7	270 días	0,51378	0,42454	17,8438	38,6838
	8	300 días	0,47189	0,42468	18,1743	38,6202
	9	330 días	0,50418	0,41750	24,8326	39,6653
	10	360 días	0,48293	0,42822	23,2841	36,9375
Colombia	1	90 días	0,38474	0,35705	26,6052	43,3987
	2	120 días	0,62,89	0,34087	9,5948	48,6784
	3	150 días	0,38474	0,35776	26,6052	43,4954
	4	180 días	0,62077	0,32893	9,6008	50,3495
	5	210 días	0,68996	0,32893	6,7981	50,3495
	6	240 días	0,68996	0,32893	6,7981	50,3495
	7	270 días	0,59835	0,32894	12,0122	48,5083
	8	300 días	0,59869	0,32894	11,9903	48,5083
Típica	9	330 días	0,59835	0,32894	12,0122	48,5083
	10	360 días	0,52596	0,34305	30,7947	41,8000
	1	90 días	0,33390	0,21303	31,9941	49,6233
	2	120 días	0,28105	0,21935	52,3487	45,1436
	3	150 días	0,28439	0,30028	46,0743	54,0279
	4	180 días	0,28439	0,30028	46,0743	54,0279
	5	210 días	0,27045	0,30028	95,3624	54,0279
	6	240 días	0,21921	0,30028	85,7422	54,0279
	7	270 días	0,19646	0,28129	81,7892	53,5236
	8	300 días	0,19915	0,29366	82,7749	51,4996
9	330 días	0,18835	0,28752	87,7935	54,9752	
10	360 días	0,22121	0,28555	72,7047	53,5470	

(0,59869). En la var. Típica los valores de reducción fueron menores en comparación con las otras dos variedades; sin embargo, 270-360 ddi estos valores fueron disminuyendo (0,19646-0,18835) (Tabla 8).

Índice de reducción de área foliar. La variedad más afectada según el análisis de varianza fue Caturra; luego le sigue la var. Colombia y por último la var. Típica. Hay que tener en cuenta que esta variable no sobrepasó el índice de reducción de 0,5; los mayores porcentajes sólo llegaron hasta 0,445, según los promedios por variedad (Tabla 8), lo cual indica que las tres variedades de café inoculadas con el virus no presentaron alteraciones en su desarrollo foliar.

En café este es el primer estudio orientado a medir el efecto que una enfermedad causada por virus puede tener sobre el desarrollo de las plantas. La reducción de altura en estas plantas como resultado de la infección con este virus, la cual se conserva a pesar del enmascaramiento de síntomas que ocurre después de varios meses de infección, va a tener un marcado efecto sobre el rendimiento de estas plantas.

La mayoría, si no todos los cultivos económicamente importantes son infectados por lo menos por un virus y en el caso del café es reconocido el Virus de la Mancha Anular del café, pero son numerosos los ejemplos en los cuales son varios los virus que pueden interferir con el desarrollo normal de una planta. En muchos casos, los virus causan reducción en la producción o calidad del cultivo infectado, pero el alcance de las pérdidas económicas es muy variable. Ejemplos de enfermedades de origen viral en plantas perennes en las cuales se han establecido pérdidas en producción han sido el virus de la tristeza de los cítricos en norte y sur América, al igual que la enfermedad del hinchamiento de brotes de cacao en el oeste de África.

Teniendo en cuenta el efecto de éste nuevo virus sobre el vigor de las plantas, una de las recomendaciones que surgen de esta investigación, es la de continuar con el estudio del efecto que este tiene sobre los rendimientos de las variedades más cultivadas en Colombia.

Para complementar la información acerca de las características del virus se debe continuar con estudios de purificación, caracterización molecular y el desarrollo de pruebas serológicas de diagnóstico que faciliten la identificación temprana de plantas enfermas. Es de importancia estudiar otros hospedantes alternos del virus, como arvenses asociadas al cultivo del café, debido a que estos pueden actuar como reservorios del virus y de su vector. Para conocer el efecto que ocasiona el virus sobre las plantas en las cuales logra establecerse es necesario continuar las observaciones sobre las pérdidas en producción ocasionadas por este nuevo virus.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al señor Hernando García de la disciplina de Biometría y al Dr. Francisco Morales y al Ingeniero José Alejandro Arroyave de la unidad de Virología del Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT, por su valiosa colaboración en la realización de procedimientos como microscopia electrónica.

LITERATURA CITADA

1. BITANCOURT, A.A. A mancha anular, uma nova doença do cafeeiro. *O Biológico* 5: 404-405. 1938.
2. BITANCOURT, A.A. Ring spot lesions on coffee berries. *Biológico* 2:33-34. 1939.
3. BLANC, S.; CERUTTI, M.; USMANY, M.; VLAK, J.M. Biological activity of cauliflower mosaic

- virus aphid transmission factor expressed in a heterologous system. *Virology* 192(2): 643-650. 1993.
4. BOS, L. Methods of studying plants as virus host. *In*: MARAMOROSCH, K.; KOPROWSKI, H. eds. *Methods in virology*. vol. 1. New York, Academic Press, 1967. p. 129-169.
 5. BRIERLEY, P.; SMITH, F. Some vectors, host, and properties of dahlia mosaic virus. *Plant Disease Report* 34: 363-371. 1950.
 6. BUSTILLO P., A.E. Lista de áfidos (Homoptera: Aphididae) y sus huéspedes registrados en Colombia. Medellín, ICA, 1976. 11 p. (Boletín Técnico No. 44).
 7. CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DE CAFÉ - CENICAFE. CHINCHINA. COLOMBIA. Anuario Meteorológico Cafetero 1991. Chinchiná, Cenicafe, 1991. 369 p.
 8. COSTA, A.S. Transmisso dos virus de plantas por vetores. *In* : COSTA, A.S.; MULLER, G.W.; NAGAI, H.; LIMA, M.C.; KUNIYUKI, H.; BERGAMIN FILHO, A. BRAGANTIA 40: 266-283. Sao Paulo, Universidade de Sao Paulo, 1975b. FALTA PAGINACION DEL CAPITULO
 9. FRAZIER, N. Strawberry vein banding virus. *Phytopathology* 45: 307-312. 1955.
 10. FUJISAWA, M.; RUBIO, M.; MATSUI, C. Deoxyribonuclease digestion of the nucleic acid from carnation etched ring virus. *Phytopathology* 62: 810-811. 1972.
 11. FUJISAWA, M.; RUBIO, M.; MATSUI, C. Incorporation of thymidina-³H into carnation etched ring virus. *Phytopathology* 61: 681-684. 1971.
 12. FUJISAWA, M.; RUBIO, M.; MATSUI, C. Deoxyribonucleic acid in dahlia mosaic virus. *Phytopathology* 64: 287-290. 1973.
 13. FUJISAWA, M.; RUBIO, M.; MATSUI, C.; YAMAGUCHI, A. Intracellular appearance of cauliflower mosaic virus particles. *Phytopathology* 57: 1130-1132. 1967.
 14. HARRIS, K.; MARAMOROSH, K. Vectors of plant pathogens. New York, Academic Press, 1980. 465 p.
 15. HEARON, S.; 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.
 16. KITAJIMA, E.W.; BETTI, J.A.; COSTA, A.S. Strawberry vein banding virus, a member of cauliflower mosaic virus group. *Journal of General Virology* 20:117-119. 1973.
 17. LARSON, R.H.; MATTHEWS, R.E.F.; WALKER, J.C. Relations between certain viruses affecting the genus Brassica. *Phytopathology* 40: 955-962. 1950.
 18. LAWSON, R.H.; HEARON, S.S. Ultrastructure of extracted carnation etched ring virus inclusion bodies treated with proteolytic enzymes and Dnase. *Phytopathology* 67: 1217-1226. 1977.
 19. LAWSON, R.H.; TACONIS, P.J. Transfer of dahlia mosaic virus with liquid nitrogen and relation of transfer to symptoms and inclusions. *Phytopathology* 55: 715-718. 1965.
 20. MARAMOROSCH, K. ; KOPROWSKI, H. (eds). *Methods in virology*. New York, Academic Press, 1967. 5 vols.
 21. MATTHEWS, R.E.F. *Plant virology*. New York, Academic Press , 1970. 778 p.
 22. NAKAYASHIKI, H.; KOBAYASHI, K; TSUGE, S. Cauliflower mosaic virus isolate CM1841 can be transmitted by aphids from infected plants. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 60 (4): 496-500.1994.
 23. PRIONE, T.P.; POUND, G.S.; SHEPHERD, R.J. Properties and serology of purified cauliflower mosaic virus. *Phytopathology* 51: 541-546. 1961.
 24. PRIONE, T.P.; POUND, G.S.; SHEPHERD, R.J. Purification and proprieties of cauliflower mosaic virus. *Nature* 186: 656-657. 1960.
 25. REICHEL, H.; BELALCAZAR, S.; MUNERA, G.; AREVALO, E.; NARVAEZ, J. Primer reporte del virus del rayado del banano (BSV) afectando plantaciones de plátano (*Musa AAB*) Simmonds, caña de azúcar *Saccharum officinarum* y achira *Canna edulis* en Colombia. *Revista CORPOICA* 1 (1):35-39.1998.

26. SILVESTER, E.S. Beet mosaic virus - green peach aphid relationships. *Phytopathology* 39: 417-424. 1949.
27. SILVESTER, E.S. Comparative transmission of beet-mosaic virus by four aphid species. *Phytopathology* 42: 252-254. 1952
29. SILVESTER, E.S. *Brassica nigra* virus transmission some vector-host plant relationships. *Phytopathology* 43: 209-214. 1953.
30. YARWOOD, C.E.; FULTON, R.W. Mechanical transmission of plant viruses. *In*: MARAMOROSCH, K.; KOPROWSKI, H. eds. *Methods in virology*. Vol. 1. New York, Academic Press, 1967. 535-537.