

MÉTODOS DE TRANSMISION DE UN VIRUS DE *Coffea arabica* EN COLOMBIA

Carlos Betancourth García*; Jairo Leguizamón Caycedo**; Gerardo Martínez López***.

RESUMEN

BETANCOURTH G., C; LEGUIZAMÓN C., J. E.; MARTÍNEZ L., G. Métodos de transmisión de un virus de *Coffea arabica* en Colombia. Cenicafé 51(4):272-284. 2000

Un nuevo virus en café que causa síntomas de clorosis intervalar, amarillamientos, deformaciones foliares, ampollas y sobre-crecimientos, al igual que 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 transmitió 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 obtuvo éxito en las demás especies probadas. La eficiencia de transmisión en forma no persistente mediante el áfido *Toxoptera aurantii* fue del 60% al utilizar hembras ápteras, 65% con ninfas y 75% con hembras aladas, en pruebas de café a café con grupos de diez insectos por planta. En grupos de cinco áfidos la eficiencia fue de 34, 44 y 55%, respectivamente. La eficiencia de transmisión mediante el vector a las plantas indicadoras nunca superó el 16%. El rango experimental de hospedantes incluyó *C. amaranticolor* y *C. quinoa* en las cuales se producen lesiones cloróticas redondeadas y en algunos casos, clorosis sistémica. En cuanto a sus propiedades físicas, el punto final de dilución estuvo entre 10^{-3} y 10^{-4} , su longevidad *in vitro* de 20 días y su punto termal de inactivación fue de 70°C. Observaciones al microscopio electrónico de transmisión revelaron la presencia de partículas isométricas de 50 a 60nm de diámetro, en muestras sintomáticas tanto de café como de las plantas indicadoras.

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

ABSTRACT

A new virus infecting coffee at Fusagasuga (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 an efficiency of 80% from coffee to coffee, and there was no transmission to any of the other species tested. Efficiency for vector transmission using aphid *Toxoptera aurantii* was 60% with apterous females, 65% with nymphs, and 75% with winged females, from coffee to coffee using groups of ten insects. With groups of five insects, efficiency was 34, 44 and 55%, respectively. Insect transmission was non-persistent, and efficiency of transmission by aphids to *C. quinoa* and *C. amaranticolor* was never above 16%. The experimental host range includes *C. amaranticolor* and *C. quinoa*, in which round chlorotic lesions were present, and sometimes systemic chlorosis. Dilution end point was between 10^{-3} and 10^{-4} , longevity *in vitro* was 20 days, and death thermal point was 70°C. Observation of symptomatic foliar tissue of coffee and *C. quinoa* under transmission electron microscope revealed isometric 50-60nm diameter particles in the cytoplasm.

Keywords: Coffee, virus, transmission, host range, physical properties.

* Ing. Agr. 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.

*** Ing. Agr. Ph.D. Profesor Universidad de Caldas y Subdirector Programas de Ciencia y Tecnología-Colciencias.

En Colombia el café es el principal producto agrícola debido a la generación del 15% de las divisas del país por concepto de exportaciones. Además, su producción da sustento a más de quinientas mil familias en todo el territorio nacional (17). En las últimas décadas la caficultura colombiana ha experimentado cambios importantes en su extensión y en su composición. Según el Sistema de Información Cafetera, SICA (8), de la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, el área sembrada con café en Colombia es de 869.000 hectáreas distribuidas en 566.000 fincas y el promedio del tamaño de las fincas es de 1,61ha y la producción de 74@ de cps/año (café pergamino seco/año).

En el año de 1997, investigadores de la Corporación Colombiana de Investigación Agrícola «CORPOICA» adelantaron estudios serológicos mediante la prueba inmunoenzimática ELISA (7) utilizando anticuerpos policlonales para el virus del rayado del banano (BSV), en 22 muestras de tejido foliar de café de la variedad Colombia recolectadas en el municipio de Andes (Antioquia). Las muestras procedían de árboles con síntomas de enanismo, paloteo y hojas con poco brillo. Los resultados indicaron que el 23% de las plantas presentaron reacción positiva (+) para Badnavirus, lo cual sugirió que los síntomas observados estaban asociados a éstos (29).

En observaciones realizadas en plantas de café por Leguizamón y Martínez (22), en las localidades de Andes (Antioquia) y Fusagasugá (Cundinamarca), registraron un problema asociado con clorosis, mosaico, hojas con poco brillo y severa defoliación, sintomatología desconocida en café y asociada posiblemente con un virus.

El estudio desarrollado por Leguizamón y Martínez (22), concluyó que la enfermedad se transmitía por injerto y el virus presente en café no es un Badnavirus, ya que las pruebas de ELISA utilizando anticuerpos policlonales para

el virus del rayado del banano (BSV) dieron resultados negativos. 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 a 60nm de diámetro. Por otra parte, las partículas virales encontradas eran similares a las del género Caulimovirus. Finalmente, que la sintomatología característica asociada al disturbio es diferente a la causada por problemas abióticos ya conocidos en café (22).

Con base en los anteriores antecedentes se planteó la presente investigación con el objetivo de determinar bajo condiciones de casa de malla algunas de las características físico-químicas del virus en café, así como también sus métodos de transmisión e identificar sus vectores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización. El trabajo se desarrolló en condiciones de casa de malla en la Universidad de Caldas, (Manizales, Caldas) a 2.200msnm y a una temperatura promedio de 19°C. También se trabajó en los laboratorios de Cenicafé en Chinchiná y en los laboratorios de virología del CIAT, en Palmira.

Fuente de inóculo. Se seleccionaron árboles de café sintomáticos que presentaban entre otros, síntomas de clorosis internerval, moteado, hojas con poco brillo, deformación de la lámina foliar, necrosis y en algunos casos defoliación y paloteo, procedentes de las poblaciones de Andes (Antioquia) y Fusagasugá (Cundinamarca) (Figura 1). Este material sirvió de fuente de inóculo de las diferentes pruebas de transmisión. Adicionalmente, se utilizó tejido foliar sintomático procedente de los árboles de café injertados durante el trabajo realizado por Leguizamón y Martínez (22).



Figura 1. Síntomas registrados en café bajo condiciones de campo. **a.** Síntomas iniciales de clorosis, Fusagasugá (Cundinamarca); **b.** Deformación del borde de la lámina foliar, Andes (Antioquia); **c.** Mosaico (Fusagasugá); **d.** Clorosis internerval generalizada, en Andes; **e.** Moteado e inicio de necrosis, Fusagasugá; **f.** Árbol defoliado, Fusagasugá. Fotos (Gerardo Martínez L.).

Multiplicación de plantas indicadoras potenciales. Se utilizaron las siguientes especies de plantas registradas como potenciales indicadoras de virus: Cenizo rojo (*Chenopodium amaranticolor* Coste y Reyn), Quinoa (*Chenopodium quinoa* L.), Chamico (*Datura stramonium* L., Jimson-Weed, Willd), Globitos (*Gomphrena globosa* L., Globe), Tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), Tabaquillo (*Nicotiana bentamiana* Domin) y fríjol (*Phaseolus vulgaris* L). Estas plantas se multiplicaron por semilla, en un suelo Franco, mezclado con pulpa de café descompuesta en una proporción 2:1 y se mantuvieron en invernadero antes y después de la inoculación. También se fertilizaron mensualmente con 2g de DAP y se les suministró riego diariamente.

Metodología experimental. Como unidad experimental se usó un grupo de seis plantas de

cada una de las especies herbáceas de un mes de edad, 6 plantas de café variedad Colombia en estado cotiledonar, para conseguir la transmisión por insectos y de cuatro meses de edad para las demás pruebas. Se emplearon cinco repeticiones con ocho tratamientos distribuidos en un diseño experimental completamente al azar y sus correspondientes testigos, conformados por las mismas especies, las cuales tuvieron la misma distribución y se ubicaron aparte, para evitar contacto entre ellas en todos los métodos de transmisión evaluados.

Pruebas de transmisión. Injerto. Para ésta, se pusieron en contacto hojas sintomáticas de café con las plantas potencialmente indicadoras y con plantas de café, utilizando el injerto de cuña. Esta técnica se adoptó teniendo en cuenta los métodos citados por Bos (1). Cada una de las plantas tuvo su testigo correspondiente el cual se

injertó con material aparentemente sano. Adicionalmente se injertaron 120 plantas de café.

Transmisión mecánica. Se maceró tejido sintomático de hojas jóvenes de café 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 10 plantas por especie, se evaluaron en forma descendente diferentes valores de pH de la solución tampón, desde 8,0 hasta 7,0 y de igual manera, concentraciones desde 0,05M hasta 0,01M. Además, se adicionaron 0,01g de Polivinil pirrolidona 40 (PVP) y 0,02g de Polivinil poli pirrolidona (PVPP), por cada 2g de tejido, para evitar problemas de fenolización. Se inocularon un par de hojas en cada una de las plantas indicadoras potenciales 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 (40). Después de la inoculación las hojas se lavaron con agua destilada.

Los testigos se inocularon únicamente con la solución tampón y una vez determinado el (los) mejor(es) pH y la mejor concentración (molaridad), se inocularon 100 plantas más de cada una de las especies que resultaron positivas en las pruebas preliminares.

Determinación de algunas de las características físico-químicas del virus. Se evaluó el punto final de dilución, el punto termal de inactivación y la longevidad *in vitro* del virus. Se utilizaron las metodologías descritas por Nordam (26), utilizando savia infectada de *C. quinoa* para inocular mecánicamente plantas de la misma especie y se realizó un análisis de regresión lineal para cada una de las propiedades evaluadas.

Punto final de dilución. Para establecerlo se evaluaron seis tratamientos, correspondientes al

inóculo (extracto de savia infectada) a diferentes diluciones: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} y el testigo que consistió en inocular las plantas de *C. quinoa* con el extracto puro de savia infectada (10^{-0}). Se inocularon 10 plantas de *C. quinoa* en cada una de tres pruebas en cada tratamiento para un total de 180 plantas.

Punto termal de inactivación. Se colocaron 2ml de savia infectada de *C. quinoa* cada 4 tubos de ensayo. Se calentaron hasta alcanzar las siguientes temperaturas: 60, 70, 80 y 90 °C, en un baño María manteniéndose controlada la temperatura con un termómetro durante 10 minutos. Pasado el tiempo de tratamiento se llevaron los tubos a un baño de hielo. Además, se tuvo un testigo a 20°C, temperatura ambiente.

Posteriormente se hizo la inoculación mecánica. Como en el caso anterior, se inocularon 10 plantas de *C. quinoa* en cada una de 3 pruebas, para cada tratamiento, para un total de 150 plantas.

Longevidad *in vitro*. Se colocaron 2ml de extracto de savia infectada en tubos de ensayo y se guardaron en nevera, a 4°C, con diferentes tiempos de conservación del inóculo: 1, 10, 20 y 30 días. El testigo se inoculó con savia infectada inmediatamente extraída. Una vez transcurrido cada uno de los tiempos se inocularon mecánicamente 10 plantas de *C. quinoa* en cada una de 3 pruebas en cada tratamiento, para un total de 150 plantas.

Transmisión por vectores. Se utilizaron 3 especies de áfidos: *Toxoptera aurantii* Koch., *Myzus persicae* Sulzer. y *Aphis gossypii* Glover. Se obtuvieron colonias libres de virus mediante la cría de ninfas de primer instar, teniendo en cuenta que los áfidos no transmiten virus a la progenie y siguiendo las recomendaciones de otros investigadores (15, 24, 32, 33, 34, 35). Para las pruebas de transmisión se tomaron ninfas hembras, ápteras y aladas, se trasladaron con un pincel de punta fina a cajas Petri con

toallas de papel humedecidas, dejándolas en ayuno durante dos horas. Posteriormente y transportándolas con el pincel, se pusieron en plantas sintomáticas siguiendo los procedimientos descritos en la literatura para la adquisición de virus por áfidos (25, 30, 32, 33, 34, 35, 36, 37). Se probó un tiempo de adquisición y de inoculación de 5 minutos y grupos de 1, 5 y 10 insectos. Se dejaron los testigos respectivos, los cuales se expusieron a insectos alimentados en plantas no sintomáticas, aparentemente sanas. Adicionalmente se inocularon 100 plantas de café en estado cotiledonar para cada caso.

Determinación de la mejor especie indicadora y el mejor método de transmisión de virus.

Una vez realizada la transmisión por los diferentes métodos se estableció cuál fue el mejor de todos de acuerdo a su eficiencia en porcentaje y las especies de plantas indicadoras por el número de plantas enfermas y por sus síntomas.

Prueba de patogenicidad. Luego de la transmisión del virus a las plantas indicadoras potenciales y para completar las pruebas de patogenicidad, se tomaron plantas de *C. quinoa* con síntomas y se repitió el proceso de transmisión mecánica nuevamente hacia plantas de café.

Se inocularon 50 plantas de café variedad Colombia de dos meses de edad, para comprobar que el patógeno está consistentemente relacionado directamente con el disturbio.

Microscopía electrónica. Las muestras de hojas de plantas sintomáticas de *C. quinoa*, *C. amaranticolor* y café se llevaron al CIAT en Palmira, Valle, para comprobar la presencia del virus en ellas mediante observación al microscopio electrónico de transmisión, con la técnica de tinción negativa y cortes histológicos ultrafinos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Transmisión mecánica y rango de hospedantes.

Se determinó que la solución tampón (fosfato de potasio) funcionó mejor cuando el pH fue 7,2 (Tabla 1). No se obtuvieron resultados positivos con pH superiores a 7,3 y con valores de molaridad inferiores a 0,05. El virus se transmitió a *C. quinoa*, *C. amaranticolor* y a café por inoculación por frotación con una eficiencia de 50%, 40% y 20%, respectivamente (Tabla 2). Las plantas herbáceas presentaron lesiones cloróticas circulares, que aparecieron entre 6 y 15 días después de la inoculación y permanecieron constantes hasta los 40 días. Además, en algunas plantas ocurrieron clorosis, moteado sistémico y deformación de hojas (Figura 2). Estos síntomas se presentaron consistentemente en todas las plantas afectadas. En plantas de café el período de incubación fue más largo y los síntomas aparecieron entre 25 y 40 días, predominando las bandas cloróticas internervales y deformaciones de la lámina foliar como sobrecrecimientos y ampollamientos. Los

Tabla. 1. Eficiencia de transmisión mecánica del virus de café en diferentes especies, utilizando buffer fosfato a diferentes valores de pH y 0,05M.

ESPECIES	TRANSMISIÓN MECÁNICA CON BUFFER FOSFATO A DIFERENTE pH			
	7,0	7,1	7,2	7,3
<i>Coffea arabica</i>	^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

Tabla 2. Eficiencia de transmisión mecánica del virus de café en diferentes especies, utilizando buffer fosfato a pH 7,2 y 0,05M, durante 40 días de evaluación.

ESPECIE	NÚMERO DE PLANTAS ENFERMAS			EFICIENCIA (%)
	15 DIAS	30 DIAS	40 DIAS	
<i>Coffea arabica</i> .	0	12	20	20
<i>Chenopodium quinoa</i>	50	50	50	50
<i>C. amaranticolor</i>	40	40	40	40

síntomas se manifestaron inicialmente hacia la nervadura central y avanzaron progresivamente a toda la hoja causando posteriormente un necrosamiento de la misma y por último, su defoliación (Figura 3).

Transmisión por injerto. El virus se transmitió eficientemente por injerto de café a café en un 80%. Los síntomas más abundantes se observaron entre 50 y 60 días después de la inoculación como manchas anulares conspicuas y muy abundantes en la haz, junto con deformaciones, ampollamientos y textura áspera de la lámina

foliar. En total, 120 de 150 plantas desarrollaron síntomas; sin embargo, en el resto de especies no hubo transmisión, posiblemente por la incompatibilidad existente entre el patrón y el injerto. Los síntomas tardaron más tiempo en manifestarse que con los otros métodos y se presentaron en los primeros brotes nuevos por debajo del injerto, en algunas ocasiones, con proliferación de los mismos. Las hojas nuevas presentaron deformaciones tanto de la lámina foliar como de las nervaduras que presentaron un patrón totalmente atípico (Figura 4).

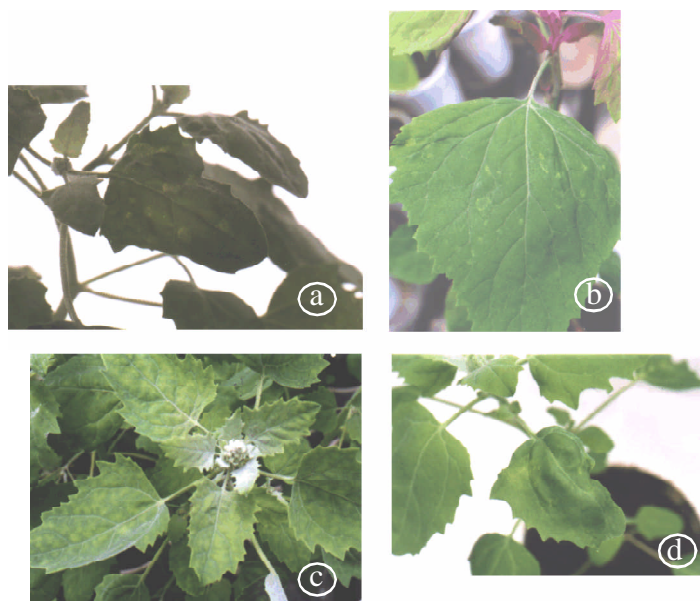


Figura 2. Síntomas obtenidos en dos especies de *Chenopodium* por medio de transmisión mecánica con extracto de savia de café infectada con un nuevo virus; **a.** Lesiones cloróticas obtenidas en *Chenopodium quinoa*, ocho días después de la inoculación; **b.** Lesiones cloróticas en *Chenopodium amaranticolor*, diez días después de la inoculación; **c.** Síntomas de clorosis sistémica en *C. quinoa*, seis días después de la inoculación; **d.** Síntomas de deformación de hojas en *C. quinoa*.



Figura 3. Síntomas en plantas de café de la variedad Colombia, mediante inoculación mecánica. **a.** Clorosis intervenal generalizada (70 días después de la inoculación); **b.** Deformación de la lámina foliar y ampollamientos (55 días después de la inoculación); **c.** Síntomas iniciales de clorosis (40 días después de la inoculación); **d.** Necrosamiento de hojas (80 a 100 días después de la inoculación).



Figuras 4. Síntomas en plantas de café de la variedad Colombia, mediante transmisión por injerto. **a.** Manchas anulares; **b.** Deformación de la lámina foliar y ampollamientos; **c.** Entorchamiento de brotes; **d.** proliferación de brotes y amarillamiento; **e.** Clorosis intervenal; **f.** Patrón de nevaduras atípico. Los síntomas se manifestaron dos meses después de la inoculación.

Transmisión por áfidos. El áfido *Toxoptera aurantii* transmitió el virus en forma no persistente con una eficiencia de 60, 65 y 75%, cuando se utilizaron hembras ápteras, ninfas y hembras aladas con grupos de 10 insectos. Pero cuando se inocularon con 5 insectos por planta en café, las eficiencias fueron de 34, 44 y 55%. Sin embargo, para las plantas de *C. quinoa* y *C. amaranticolor* los porcentajes fueron menores (Tablas 3 y 4). Además, no se logró transmisión en las otras especies probadas. Las pruebas con *Myzus persicae* Sulzer. y *Aphis gossypii* Glover. no dieron resultados positivos en ninguna de las especies. Los síntomas se manifestaron en el primer par de hojas verdaderas entre los 15 y 25 días después de la inoculación y se presentaron como clorosis de la lámina foliar que progresó a bandas internervales de color amarillo pálido y luego se tornaron de una tonalidad casi blanca que alcanzó hasta un color rojizo. El síntoma prevalente, al utilizar este método, fue el de manchas anulares cloróticas agrupadas o dispersas en la haz de la hoja (Figura 5).

Propiedades físicas. Las propiedades físicas del virus se determinaron en *C. quinoa*. El virus presentó un punto final de dilución entre 10^{-3} y

10^{-4} , un punto termal de muerte entre 60 y 70°C y retuvo su infectividad durante 20 días (Figura 6) Las plantas de *C. quinoa* presentaron los mismos síntomas registrados anteriormente. La longevidad *in vitro*, el punto final de dilución y el punto termal de muerte se ajustaron a un modelo de regresión lineal simple, con R^2 de 0,89, 0,88 y 0,96, respectivamente. Esto indica que para concentraciones inferiores a 10^{-4} , temperaturas superiores a 70 °C y después de 20 días de conservación del inóculo, es muy poco probable que haya infección.

Pruebas de patogenicidad. Estas pruebas mostraron que en 10 de las plantas de café inoculadas con savia de *C. quinoa* se desarrollaron síntomas similares a los encontrados en el 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, que progresaron hacia bandas internervales y deformaciones de la lámina foliar. Cabe anotar que los síntomas tienden a desaparecer o atenuarse en forma periódica cada 2 meses aproximadamente, pero al final, la pérdida de la hoja por necrosamiento y defoliación es consistente en todas las plantas

Tabla 3. Eficiencia de transmisión por el áfido *Toxoptera aurantii*, en grupos de diez insectos por planta, en café variedad Colombia, *C. quinoa* y *C. amaranticolor*.

Especie	Ninfas	Eficiencia	Hembras aladas	Eficiencia	Hembras ápteras	Eficiencia
<i>Coffea arabica</i> .	^a 65/100 ^b	65	75/100	75	60/100	60
<i>Chenopodium quinoa</i>	3/30	10	5/30	16	3/30	10
<i>C. amaranticolor</i>	3/30	10	5/30	16	3/30	10

Tabla 4. Eficiencia de transmisión por el áfido *Toxoptera aurantii*, en grupos de cinco insectos por planta en café variedad Colombia, *C. quinoa* y *C. amaranticolor*.

Especie	Ninfas	Eficiencia	Hembras aladas	Eficiencia	Hembras ápteras	Eficiencia
<i>Coffea arabica</i> .	^a 44/100 ^b	44	55/100	55	34/100	34
<i>Chenopodium quinoa</i>	2/30	6,6	5/30	16	3/30	10
<i>C. amaranticolor</i>	0	0	2/30	6,6	0 0	

a/b: Número de plantas afectadas/ Número de plantas inoculadas.



Figura 5. Síntomas en plantas de café de la variedad Colombia, mediante transmisión por áfidos. **a.** Clorosis del primer par de hojas verdaderas; **b.** Bandas cloróticas intervenales; **c.** Inicio de necrosis de la hoja; **d.** Manchas anulares. Los síntomas se presentaron desde los 15 a los 25 días después de la inoculación.

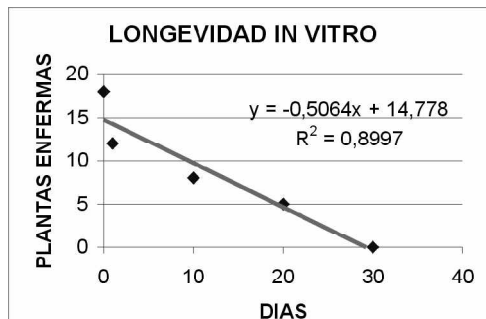
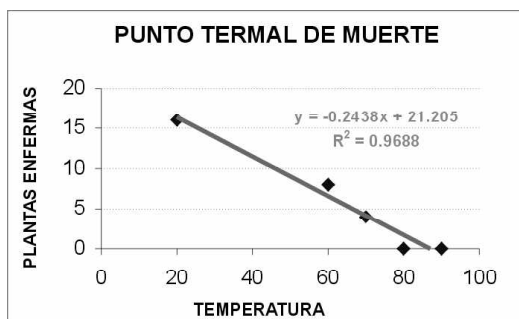
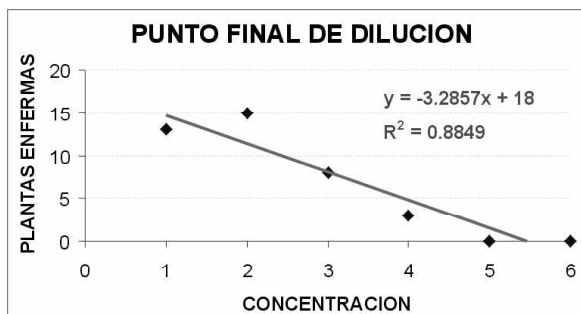


Figura 6. Curva del punto final de dilución, la del punto final de inactivación y la de longevidad *in vitro* del nuevo virus estudiado en café, posiblemente un Caulimovirus.

afectadas, al igual que sucedió en todos los métodos de transmisión.

Determinación del mejor método de transmisión y la mejor especie indicadora. Tal como se aprecia en la Tabla 5, el método que presentó la mayor eficiencia al evaluar el porcentaje de transmisión fue el de injerto, con un promedio de 80% en pruebas de café a café; sin embargo, ésta no es una práctica común en campo. En cambio la transmisión por áfidos fue bastante alta, con un promedio de 67% cuando se usaron 10 insectos por planta en café y representa un peligro potencial ya que este insecto se encontró asociado a plantas enfermas en las dos localidades. De otro lado, la transmisión mecánica fue del 20% para plantas de café y con ella se obtuvo infección en plantas diferenciales como *C. quinoa* y *C. amaranticolor*, las cuales sirven como especies de diagnóstico y para conservación del virus. Éstas no presentaron resultados positivos al ser inoculadas por medio de injerto o presentaron porcentajes muy bajos al exponerlas a insectos. Además, este método es importante porque permitió determinar las propiedades físico químicas del virus.

Microscopía electrónica. En el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), mediante la técnica de tinción negativa se observaron al microscopio electrónico de transmisión partículas isométricas entre 50 a 60nm de diámetro, las cuales se detectaron en tejidos foliares

sintomáticos de *C. quinoa*, *C. amaranticolor* y café. Además, observando cortes histológicos ultrafinos se detectó la presencia de viroplasmos en el citoplasma de células afectadas en los mismos tejidos¹ (Figura 7).

Los síntomas que desarrollaron las plantas de café en las diferentes pruebas de transmisión coinciden con las observaciones hechas por Leguizamón y Martínez (22), y tal como lo afirman estos investigadores, esta sintomatología no se ha registrado anteriormente en café y es



Figura 7. Célula de café con presencia de viroplasma (v) con partículas de virus en su interior. Transmisión por insectos. (Foto: Arroyave, CIAT, 1998)

Tabla 5. Eficiencia de transmisión mecánica, por injerto y mediante vectores del virus de café a café, *Chenopodium quinoa* y *C. amaranticolor*.

Métodos	Café	Eficiencia (%)	<i>C. quinoa</i>	Eficiencia (%)	<i>C. amaranticolor</i>	Eficiencia (%)
Injerto	^a 120/150 ^b	80	0/60	0	0/60	0
Áfidos	200/300	67	11/90	12	11/90	12
Mecánica	20/100	20	50/100	50	40/100	40

a/b: Número de plantas afectadas/ Número de plantas inoculadas

¹ Arroyave y Morales, comunicación personal; 1999

diferente a los síntomas producidos por factores abióticos. Estos síntomas son muy frecuentes en enfermedades causadas por virus y en especial, la clorosis internerval, la deformación de bordes foliares, los ampollamientos de la lámina foliar y las manchas anulares que han sido descritos anteriormente en dalia, fresa, coliflor y en otras especies que se han probado dentro del rango de hospedantes de Caulimovirus (2, 3, 10, 19, 21, 38).

Los síntomas en plantas de café se manifestaron luego de un período de incubación desde 15 a 55 días, dependiendo del método de transmisión y periódicamente cada dos o tres meses presentaron un enmascaramiento de los mismos, situación que puede estar influenciada por las condiciones climáticas, tal como se ha registrado en otros virus dentro del género Caulimovirus (16). Luego de probar los diferentes métodos de transmisión sólo se obtuvo infección de dos especies diferentes a café: *C. quinoa* y *C. amaranticolor*. Los síntomas desarrollados por estas plantas indicadoras en el presente estudio se presentaron como lesiones cloróticas circulares, moteado y clorosis sistémica. De otro lado, las plantas *Datura stramonium*, *Nicotiana tabacum*, *N. benthamiana*, *Gomphrena globosa* y *Phaseolus vulgaris* se comportaron como especies no susceptibles al virus. La literatura registra que los Caulimovirus presentan un rango de hospedantes estrecho con unas pocas especies dentro de una o dos familias (2, 10, 19, 38). 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, estas plantas pueden ser usadas para mantenimiento y multiplicación del virus, así como también en procesos de purificación del mismo. Las pruebas de transmisión mecánica demostraron la importancia de la solución tampón y sus condiciones en el éxito de la transmisión y posiblemente, en la estabilidad e

infectividad del virus. Estos factores se han discutido en muchas relaciones virus-hospedante (39).

La transmisión por injerto presentó la mayor eficiencia al compararse con los otros métodos probados, sin embargo, no es una práctica de cultivo que se utilice en café. Los resultados coincidieron con los obtenidos por Leguizamón y Martínez (22), en cuanto la longevidad *in vitro*, el punto termal de inactivación y el punto final de dilución. Los resultados demuestran que el virus es bastante estable y retiene su infectividad por varios días fuera del ambiente celular. Es importante destacar que los resultados obtenidos en este estudio coinciden con las propiedades registradas para los Caulimovirus (2, 9, 10, 19, 38).

La presencia del áfido *Toxoptera aurantii* es común en las zonas productoras de café (6), especialmente en cultivos de café asociados con cítricos o creciendo en cercanías a ellos². Este insecto debe tenerse en cuenta para estudios epidemiológicos de la enfermedad, así como también en programas de manejo de la misma, si la importancia económica del disturbio lo amerita. Además, representa un peligro potencial ya que este insecto se encontró asociado a plantas enfermas en las dos localidades estudiadas. Cabe anotar que en campo podría presentarse transmisión mecánica por frotación de hojas durante labores de cosecha, pero el método más importante de dispersión del virus en este caso, está asociado a los áfidos. Estudios sobre la capacidad de transmisión de virus por áfidos en el género Caulimovirus están ampliamente documentados (2, 10, 23). Además, la alta especificidad de la relación virus-vector (15), puede ser la razón por la cual las otras dos especies de áfidos *Myzus persicae* y *Aphis gossipii* no dieron resultados positivos.

²Bustillo P., A.E. Comunicación personal

Los exámenes bajo microscopio electrónico revelaron la presencia de partículas virales isométricas con un diámetro entre 50 a 60nm y la presencia de inclusiones citoplasmáticas en forma de viroplastos. Estos resultados coinciden con los registrados por Leguizamón y Martínez (22). Este tipo de partículas e inclusiones citoplasmáticas son típicas de los Caulimovirus, tal como se registra en la literatura (4, 5, 11, 12, 13, 14, 16, 18, 20, 27, 28, 31).

La forma y tamaño de las partículas, su insecto vector y las propiedades físico-químicas descritas anteriormente para este nuevo virus en café lo ubican como un posible Caulimovirus. Estos resultados están en contraposición con los obtenidos por Reichel *et al.*(29), quienes afirman que el agente causante del nuevo disturbio en café está asociado a un virus perteneciente al género Badnavirus.

LITERATURA CITADA

1. BOS, L. Methods of studying plant as virus host. *In*: MARAMOROSCH, K.; KOPROWSKI, H. eds. *Methods in virology*. Vol.1. New York, Academic Press, 1967. p. 129-169.
2. BRIERLEY, P.; SMITH, F. Some vectors, host, and properties of dahlia mosaic virus. *Plant Disease Report* 34:363-371. 1950.
3. BRIERLEY, P. Value of index plants for detecting dahlia viruses. *Phytopathology* 35:405-407. 1951.
4. BRUNT, A.; CRABTREE, K.; GIBBS, A. Viruses of tropical plants; descriptions and list from the VIDE database. Wallingford, CAB-International, 1990. p. 620-622.
5. BRUNT, A.; CRABTREE, K.; DALLWITZ, J. M., WATSON, L.; ZURCHER, E. J. *Plant Viruses*. Descriptions and list from the vide database. Version 20th. 1996. On line. <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>.
6. BUSTILLO P., A.E. Lista de áfidos (Homoptera: Aphididae) y sus huéspedes registrados en Colombia. Medellín. ICA. Subgerencia de Investigación. Programa de Entomología. 1976 (Boletín Técnico No. 44).
7. CLARK, M.F.; ADAMS, A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34:475-483. 1977.
8. FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA-FEDERACAFÉ. BOGOTÁ. COLOMBIA. Sistema de Información Cafetera. Encuesta Nacional Cafetera SICA. Estadísticas Cafeteras. Informe Final. Santafé de Bogotá, FEDERACAFE, 1997. 178 p.
9. FRANCKI, R.I.B.; ROBERT, G.; MILNE, T. Atlas of plant viruses. CRC Press, Inc. 1985. 222 p.
10. FRAZIER, N. Strawberry vein banding virus. *Phytopathology* 45:307-312. 1955.
11. FUJISAWA, M.; RUBIO, M.; MATSUI, C. Deoxyribonuclease digestion of the nucleic acid from carnation etched ring virus. *Phytopathology* 62:810-811. 1972.
12. FUJISAWA, M.; RUBIO, M.; MATSUI, C. Incorporation of thymidina-³H into carnation etched ring virus. *Phytopathology* 61:681-684. 1971.
13. FUJISAWA, M.; RUBIO, M.; MATSUI, C. Deoxyribonucleic acid in dahlia mosaic virus. *Phytopathology* 64:287-290. 1973.
14. FUJISAWA, M.; RUBIO, M.; MATSUI, C.; YAMAGUCHI, A. Intracellular appearance of cauliflower mosaic virus particles. *Phytopathology* 57:1130-1132. 1967.
15. HARRIS, K.; MARAMOROSH, K. *Vectors of plant pathogens*. New York, Academic Press, 1980. 465 p.
16. 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.

17. JUNGUITO B., R.; PIZANO S., D. Producción de café en Colombia. Santafé de Bogotá, Fedesarrollo - Fondo Cultural Cafetero, 1991. 320p.
18. KITAJIMA, E.W.; BETTI, J.A.; COSTA, A.S. Strawberry vein banding virus, a member of the Cauliflower mosaic virus group. *Journal of General Virology* 20:117-119. 1973.
19. LARSON, R.H.; MATTHEWS, R.E.F.; WALKER, J.C. Relations between certain viruses affecting the genus Brassica. *Phytopathology* 40:955-962. 1950.
20. 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.
21. 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.
22. LEGUIZAMON C., J.E.; MARTINEZ L., G. Informe de observaciones preliminares de un posible nuevo disturbio en café de etiología desconocida. Chinchiná, Cenicafé, 1998. 22 p.
23. LUNG, M.C.Y.; PRIONE, T.P. Studies on the reason for differential transmissibility of Cauliflower mosaic virus isolates by aphids. *Phytopathology* 63:910-914. 1973.
24. MATTHEWS, R.E.F. *Plant virology*. New York, Academic Press, 1970. 835 p.
25. MESSIEHA, M. Aphid transmission of maize dwarf mosaic virus. *Phytopathology* 57:956-959. 1967
26. NORDAM, D. Identification of plant viruses; Methods and experiments. Wageningen, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 1973. 207 p.
27. PRIONE, T.P.; POUND, G.S.; SHEPHERD, R.J. Properties and serology of purified cauliflower mosaic virus. *Phytopathology* 51:541-546. 1961.
28. PRIONE, T.P.; POUND, G.S.; SHEPHERD, R.J. Purification and properties of cauliflower mosaic virus. *Nature* 186:656-657. 1960.
29. REICHEL, H.; DE LA ROTTA, M.C.; GUTIÉRREZ, T.; BELALCÁZAR, S.; ARÉVALO, E. Pruebas serológicas dan reacción positiva para *badnavirus* en plantas de café (*Coffea* sp.). Bogotá. Corpoica, 1997.
30. ROIVAINEN, O.H. Effect of vector feeding on virus transmission. *Rep. Cocoa Res. Inst. Ghana* 1967-68: 40-44. 1969.
31. RUBIO, M. Origin and composition of cell inclusions associated with certain tobacco and crucifer viruses. *Phytopathology* 46:553-556. 1956.
32. SILVESTER, E.S. Beet mosaic virus - green peach aphid relationships. *Phytopathology* 39:417-424. 1949.
33. SILVESTER, E.S. Comparative transmission of beet-mosaic virus by four aphid species. *Phytopathology* 42:252-254. 1952.
34. SILVESTER, E.S. *Brassica nigra* virus transmission some vector-host plant relationships. *Phytopathology* 43:209-214. 1953.
35. SILVESTER, E.S. Lettuce mosaic virus transmission by the green peach aphid. *Phytopathology* 45:357-369. 1955.
36. SILVESTER, E.S.; SIMONS, J.N. Relation of plant species inoculated to efficiency of aphids in the transmission of *Brassica nigra* virus. *Phytopathology* 41:908-910. 1951.
37. SWENSON, K.G. Plant virus transmission by insects. *In: MARAMOROSCH, K.; KOPROWSKI, H.* eds. *Methods in virology*. Vol. 1. New York, Academic Press, 1967. pp. 267-303.
38. WALKER, J.C.; LEBEAU, F.J.; POUND, G.S. Viruses associated with cabbage mosaic. *Journal of Agricultural Research* 70:379-404. 1945.
39. YARWOOD, C. E. The phosphate effect in plant virus inoculations. *Phytopathology* 42:137- 143. 1952.
40. 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.