

Efecto de la época y tipo de sombra sobre bacterias endófitas en cafetos (*Coffea arabica*) en Puerto Rico^{1,2}

Carlos Bolaños³, Mildred Zapata⁴, Brent Brodbeck⁵,
Pete Andersen⁶ y Linda Wessel-Beaver⁴

J. Agric. Univ. P.R. 99(1):37-51 (2015)

RESUMEN

El café, *Coffea arabica*, es un cultivo de importancia económica mundial. En la zona montañosa de Puerto Rico se siembra solo o formando un agroecosistema importante desde el punto de vista económico y ecológico. *Xylella fastidiosa* Wells et al., una bacteria endófito limitada al xilema y que produce el encorchamiento de la hoja del cafeto, representa una seria amenaza para este cultivo. La gran mayoría de las bacterias endófitas colonizan un nicho ecológico similar al de los organismos fitopatógenos; por lo tanto, algunas cepas son potenciales agentes de control biológico. El presente estudio buscó aislar y caracterizar las bacterias de colonización endófitas en hojas y ramas de cafetos bajo sombra y a sol, durante la época seca y la época lluviosa. Durante dos años, en fincas de café de los pueblos de Adjuntas, Jayuya, Las Marías y Yauco, se determinó el efecto de época, localidad, tipo de sombra y año sobre la cantidad y diversidad de bacterias endófitas asociadas al café. Para contrastar las poblaciones de bacterias endófitas, se analizaron las poblaciones y la diversidad de cepas bacterianas, esto es, unidades formadoras de colonias (UFC/mL), y el número de cepas fenotípicamente distintas (diversidad de cepas) aisladas de hojas y ramas de los cafetos. Se obtuvieron poblaciones bacterianas más altas en las ramas versus las nervaduras de hojas ($p < 0.0001$), por lo que, para obtener mayor representatividad de la diversidad bacteriana, los aislamientos deben realizarse de las ramas y no de las hojas. La interacción tipo de sombra por época fue la que mostró significación estadística en mayor número de

¹Manuscrito sometido a la junta editorial el 2 de mayo de 2014.

²Proyecto financiado por el Departamento de Agricultura de EE.UU. Proyecto de Investigación en Agricultura Tropical y Subtropical (USDA-TSTAR), subcontrato ZTS-51.- "Potential effects of *Xylella fastidiosa* on shade coffee establishment in Puerto Rico". Se agradece al Dr. Eduardo Schoeder y a la Dra. C. Estévez por sus sugerencias, y al Dr. Raúl Macchiavelli por su ayuda en la determinación de los modelos estadísticos.

³Exestudiante graduado, Departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales, Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez.

⁴Catedrática, Departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales, Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez, Mayagüez, PR 006981.

⁵Biólogo, Centro de Investigación y Enseñanza, Florida del Norte, Universidad de Florida, Quincy, FL.

⁶Catedrático, Centro de Investigación y Enseñanza, Florida del Norte, Universidad de Florida, Quincy, FL.

veces, indicativo de que el efecto de época dependerá del tipo de sombra utilizado. Durante la época seca se detectaron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) en el factor tipo de sombra y localidad en los aislamientos realizados a partir de muestras de ramas y hojas. En la época lluviosa se detectaron diferencias para diversidad de bacterias por árbol para el factor tipo de sombra en muestras de hoja y rama. En general, un número alto de bacterias en una localidad, época o tipo de sombra fue asociado con un alto nivel de diversidad de cepas. Existe la posibilidad de que ciertas cepas endófitas interactúen de forma antagonista con *X. fastidiosa*, siendo esto una alternativa con potencial para el manejo de la enfermedad.

Palabras clave: población y diversidad bacteriana, café, *Xylella fastidiosa*

ABSTRACT

Effect of shade and season on bacterial endophytes isolated from coffee (*Coffea arabica*) trees in Puerto Rico

Worldwide, coffee (*Coffea arabica*) is an economically important crop. In the mountainous zone of Puerto Rico this crop is planted alone or as an intercrop forming an economically and ecologically important agroecosystem. *Xylella fastidiosa* Wells et al., an endophytic bacteria, causes coffee leaf scorch, which is a serious threat to the crop. Most endophytic bacteria colonize an ecological niche similar to that of phytopathological organisms, thus, some strains of these bacteria could potentially be biological control agents. This study aimed to isolate and characterize endophytic colonizing bacteria in coffee trees under shade and sun, during the rainy and dry seasons. During two years, on coffee farms of Adjuntas, Jayuya, Las Marías and Yauco, we evaluated the effect of season, location, shade and year on the amount and diversity of endophytic bacteria associated with coffee. To contrast endophytic bacterial populations, we analyzed colony-forming units (CFU/mL) and the number of phenotypically different strains (strain diversity) isolated from leaf veins and branches of coffee trees. Higher bacterial populations were observed on branches versus leaf veins ($p < 0.0001$); therefore, in order to obtain a higher number of bacterial diversity, isolations should be performed from branches instead of leaf veins. The interaction of shade type with season was the most common statistically significant interaction, indicative that the effect of the season depends on the type of shade used. During the dry season, statistical differences in the shade and location were found ($p < 0.05$) for leaf veins and branches. In the rainy season, statistical differences were found in the number of strains per tree in shade from leaf veins and tree samples. In general, a high number of bacteria in a location, season or type of shade management was associated with a high degree of strain diversity. Certain endophytic strains might interact in an antagonist manner to *Xylella fastidiosa*, representing an alternative for controlling the disease.

Key words: population and diversity of bacteria, *Xylella fastidiosa*

INTRODUCCIÓN

La industria del café en Puerto Rico es muy importante, tanto por su impacto económico como por su impacto social. Existen problemas fitosanitarios graves que afectan al cultivo, entre ellos la enfermedad

conocida como encorchamiento de la hoja del cafeto (CLS) o crespada del cafeto como se conoce en países de Centro y Sur América, causada por la bacteria *Xylella fastidiosa* Wells et al.

En la cuenca del Caribe la bacteria causa problemas fitosanitarios en cafetos de Costa Rica (Rodríguez et al., 2001), mientras que en Sur América existe desde hace varias décadas en el Brasil (Beretta et al., 1995). En cafetos de Puerto Rico se ha observado sintomatología similar a la descrita para crespada. La enfermedad se transmite en el campo principalmente a través de insectos pertenecientes a la familia Cicadellidae. En un estudio local, Mariño-Cárdenas y Zapata (2009) identificaron como especies predominantes y vectores potenciales a: *Agallia pulchra*, *Apogonalia* spp., *Caribovia coffeacola* y *Hortensia similis*.

Las plantas se encuentran asociadas a una amplia y diversa gama de microorganismos cuyas interacciones pueden ser perjudiciales, neutrales o benéficas; se encuentran endófitos en virtualmente todas las cerca de 300,000 especies de plantas que existen sobre el planeta (Strobel et al., 2004). La gran mayoría de las bacterias endófitas colonizan un nicho ecológico similar al de los organismos fitopatógenos, por lo tanto, algunas cepas podrían resultar útiles como agentes de control biológico (Berg y Hallman, 2006).

El presente estudio buscó aislar y contrastar la magnitud de las poblaciones y la diversidad de las bacterias endófitas del agroecosistema del cafeto en distintos sistemas de siembra bajo sombra y a sol, además de en épocas seca y lluviosa en distintas localidades de Puerto Rico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para contrastar las poblaciones de bacterias endófitas aisladas de cafetos, según la localidad, manejo de sombra, época y año, se realizó investigación desde febrero 2010 hasta abril 2012. La investigación se llevó a cabo en cuatro localidades cafetaleras de Puerto Rico, en la época seca (diciembre-mayo) y la lluviosa (junio-noviembre).

Las localidades bajo estudio variaron en altitud y en cada finca el porcentaje de cobertura de sombra fue variable dentro de las parcelas experimentales (Cuadro 1). Esta variabilidad se debe a que el agricultor siembra especies arbóreas con distintos propósitos, para obtener un producto adicional al café o para proporcionar sombra al mismo.

En cada localidad se identificaron tres fincas con tres diferentes tipos de manejo (i) sombra con alta diversidad de especies de plantas (tres o más especies), (ii) sombra con baja diversidad de especies (una a dos especies), y (iii) a sol (control, donde solo hay cafetos sembrados). En cada finca se definieron cinco parcelas (repeticiones).

CUADRO 1.—*Altitud y porcentaje de cobertura de las fincas de café muestreadas en Puerto Rico.*

Localidad	Tipo de sombra ¹	Altitud (m.s.n.m ²)	% de cobertura ³
Adjuntas (A)	Alta diversidad	637	92.7
	Baja diversidad	779	97.9
	A sol	757	0
Jayuya (J)	Alta diversidad	816	91.7
	Baja diversidad	947	81.3
	A sol	891	0
Las Marías (LM)	Alta diversidad	563	100
	Baja diversidad	445	89.1
	A sol	542	92.3 ⁴
Yauco (Y)	Alta diversidad	946	100
	Baja diversidad	935	99.2
	A sol	918	0

¹Se refiere a la diversidad de especies de plantas: Alta = tres o más; Baja = una o dos especies; A sol = solo cafetos.

²Metros sobre el nivel del mar, lectura obtenida con el GPS Garmin CS 60 (Olathe, Kansas, EE.UU.).

³Valores tomados con densitómetro GRS (Arcata, California, EE.UU.).

⁴Valores altos debido al tipo de poda del café que maneja el agricultor, la cobertura es de café.

Se utilizó un GPS Garmin CS60 (Garmin International, Olathe, Kansas, EE.UU.)⁷ para geo-referenciar los árboles en las parcelas. La forma de las parcelas varió, dependiendo de la disposición de los árboles en el campo, de rectangular a alargada. Dentro de cada parcela, se seleccionó un café, y de cada café se recolectaron cinco hojas para obtener las nervaduras y tres ramas de 5 a 6 cm de largo.

Se colectaron muestras que presentaron síntomas tales como: ramificación anormal con acortamiento de ramas y entrenudos, lignificación y hojas pequeñas dando la apariencia de escobilla de bruja y algunos de roseta. Se utilizó un densitómetro (GRS Arcata, California, EE.UU.) para medir el porcentaje de cobertura de la sombra sobre el café. Se midió la irradiación solar recibida con el metro de luz digital "Ex-tech modelo LT 300" (Whaltham, Massachusetts, EE.UU.) y se usaron tarjetas "log tag recorders" (MicroDAQ, Ltd, Contoocook, New Hampshire, EE.UU.) con el fin de obtener datos de temperatura en el campo.

Las muestras se transportaron en hielo y se procesaron inmediatamente en el Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Cultivos

⁷Los nombres de compañías y de marcas registradas solo se utilizan para proveer información específica y su uso no constituye garantía por parte de la Estación Experimental Agrícola de la Universidad de Puerto Rico, ni endoso sobre otros productos o equipo que no se mencionan.

y Ciencias Agroambientales, Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez. Las ramas y nervaduras de las hojas se lavaron con jabón líquido diluido y se eliminó todo tipo de insectos y plantas epífitas con la ayuda de cepillos estériles.

Las muestras se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 0.05% durante un minuto, luego con etanol al 70% por un minuto, y para remover el agente desinfectante los segmentos se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Los segmentos se cortaron sobre amortiguador fosfato de extracción [NaCl, 8 g/L; K_2HPO_4 , 1.15 g/L; KH_2PO_4 , 0.2 g/L; Tween 20, 0.5 g/L; Polyvinyl prolidone PVP-40 6 g/L (D. Hopkins en Schaad et al., 2001)], en condiciones asépticas, para evitar la oxidación de los tejidos. Posteriormente los segmentos se colocaron en medio PW (periwinkle) líquido (Soytone, 4 g/L; Triptone, 0.5 g/L; K_2HPO_4 , 0.6 g/L; KH_2PO_4 , 0.5 g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.4 g/L; $(NH_4)_2HPO_4$, 0.8 g/L; Potato starch, 2 g/L; L-histidine HCl, 1 g/L; L-glutamine, 4 g/L; Bovine serum albuminum, 3 g/L; Hemin chloride, 10 mg/L; Phenol, 20 mg/L; Cycloheximide, 50 mg/L) por treinta minutos al ambiente, y luego en la nevera a 4° C hasta el próximo día (D. Hopkins en Schaad et al., 2001).

Al día siguiente se tomó una alícuota de 100 uL de la suspensión preparada con el tejido vegetal y se colocó en una placa de dimensiones 100 x 15 mm con medio PW sólido. Las placas se incubaron a 28° C, y el crecimiento de bacterias en ellas se evaluó durante un mes.

Se contaron las colonias viables en placa y se generaron los valores de unidades formadoras de colonias (UFC/mL). Los datos de UFC/mL obtenidos en nervaduras de las hojas y ramas por separado se transformaron con el logaritmo en base 10 de la variable más uno [$Y' = \log(Y + 1)$] con el fin de ajustar los errores a la curva normal. Además, se determinó el número total de cepas fenotípicamente diferentes por placa (una medida de diversidad de colonias).

Los datos de log UFC/mL (población) y el número total de cepas fenotípicamente diferentes (diversidad) por árbol en muestras de hoja y rama constituyeron las cuatro variables dependientes y fueron analizados usando ANOVA. De dos modelos completamente aleatorizado con cinco repeticiones, uno de ellos tuvo un arreglo factorial (3 x 2 x 2) de tres tipos de sombra (de alta diversidad, de baja diversidad y control a sol) por dos épocas (seca y lluviosa) por dos años (año 1, 2010-2011 y año 2, 2011-2012) en cada una de las cuatro localidades (Adjuntas, Jayuya, Las Marías y Yauco). El otro modelo contó con un arreglo factorial (4 x 3) de cuatro localidades por tres tipos de sombra en cada una de las combinaciones de época por año. En ambos modelos se incluyeron todas las interacciones dobles que permitía el modelo, y la triple interacción para el primer modelo. En

ambos modelos se utilizaron cinco repeticiones, que corresponden a un árbol de cada una de las parcelas experimentales. De estos árboles se obtuvo cinco hojas para obtener las nervaduras y tres ramas de 5 a 6 cm de largo.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico INFOSTAT versión 2011 (Universidad de Córdoba, Argentina). Además, se utilizó la prueba de t pareada para determinar si existieron diferencias en los niveles de UFC/mL y de cepas por árbol obtenidos de nervaduras de hojas versus ramas, considerándose el total de UFC/mL de nervaduras de las hojas y de las ramas como variables independientes, así como al número de cepas fenotípicamente diferentes de las nervaduras de las hojas versus de las ramas.

RESULTADOS

En general, la precipitación total fue mayor en el año 1 que en el año 2, en cambio el calor ambiental fue levemente menor en el año 1 (Cuadro 2). Según los resultados obtenidos del ANOVA del modelo que incluyó época, año y localidad, durante la época seca en el año 1, se observó un efecto significativo de localidad, con mayores log UFC/mL

CUADRO 2.—Precipitación total y temperatura promedio en cuatro localidades de Puerto Rico, período 2010-2012.

Localidad	Época ¹	Año 1: 2010-2011		Año 2: 2011-2012	
		Temperatura °C	Precipitación (mm)	Temperatura °C	Precipitación (mm)
Adjuntas	seca	20.8 ²	700	20.8 ²	820
	lluviosa	22.5 ²	1950	22.6 ²	1600
Jayuya	seca	20.8 ³	720 ⁴	20.3 ⁵	720 ⁴
	lluviosa	25.5	1200 ⁶	29.3 ⁷	1200 ⁶
Las Marías	seca	23.5 ³	810	20.7 ⁵	410
	lluviosa	22.9	1970	30.4 ⁷	1770
Yauco	seca	17.7 ³	910	19.0 ⁵	610
	lluviosa	n/d	1720	29.5 ⁷	1110

¹Seca = diciembre a mayo; Lluviosa = de junio a noviembre

²Promedio de febrero a marzo 2011, datos tomados con "log tag recorders" en las parcelas muestreadas

³Promedio de diciembre 2011 y de enero 2012 a mayo 2012, datos de log tag recorders en las parcelas muestreadas

⁴Promedio noviembre y junio 2011 datos tomados con "log tag recorders" en las parcelas muestreadas

⁵Datos de temperatura tomados de: <http://weather.com/climate/annual> Climo-USPR0001

⁶Valores de precipitación período 1939-2002

Datos de precipitación tomados de Southeast Regional Climate Center (SERCC)

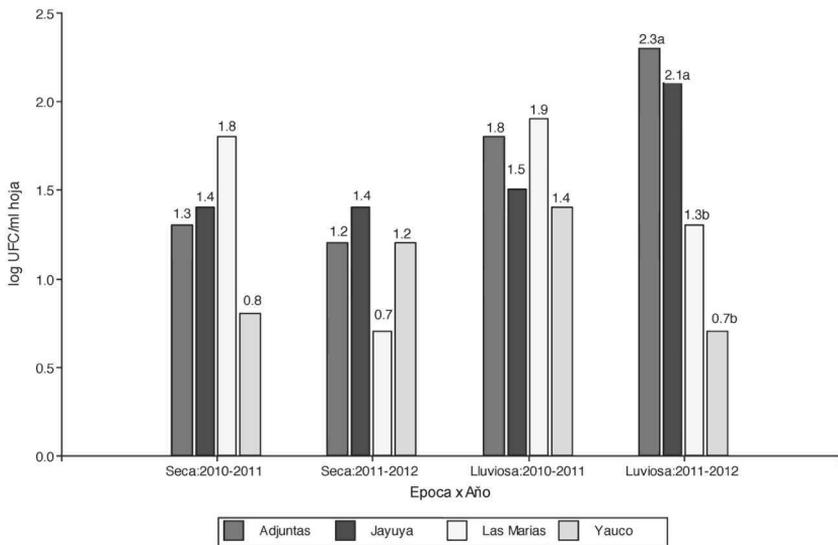


FIGURA 1. Medias para la población total de bacterias endófitas en nervaduras de café, *Coffea arabica*, por época y año en cuatro localidades cafetaleras de Puerto Rico. Letras diferentes denotan diferencias según DMS a nivel de $\alpha = 0.05$.

de ramas en Las Marías versus Adjuntas, Jayuya y Yauco ($\alpha = 0.05$) (Figura 1). En cambio, durante la época seca del año siguiente, no se detectaron diferencias significativas entre las localidades. Durante la época lluviosa en el año 2, a diferencia del año anterior, se observó un efecto significativo de localidad con mayores poblaciones bacterianas en Adjuntas y Jayuya versus Las Marías y Yauco ($\alpha = 0.05$) tanto para hoja como para rama (Figuras 1 y 2). Las localidades de Adjuntas y Jayuya representan áreas donde se han documentado los mayores conteos de vectores potenciales de *X. fastidiosa* (Brodbeck et al., 2011). No se incluyó análisis de triple interacción.

En la época seca de ambos años no se detectaron diferencias en la diversidad de cepas bacterianas por árbol obtenidas de nervaduras de hojas y ramas de café (Figuras 3 y 4). En la diversidad de cepas bacterianas en ramas de cafetos se detectaron diferencias entre las localidades tanto para el año 1 (2010-2011) como para el año 2 (2011-2012) en la época lluviosa (Figura 4). Para la época lluviosa en el año 1, los mayores valores de diversidad bacteriana se detectaron en ramas de cafetos colectadas en Las Marías (Figura 4), siendo estos los valores más altos de diversidad registrados en todo el experimento. Aunque no hubo diferencias significativas para la diversidad de cepas en las ner-

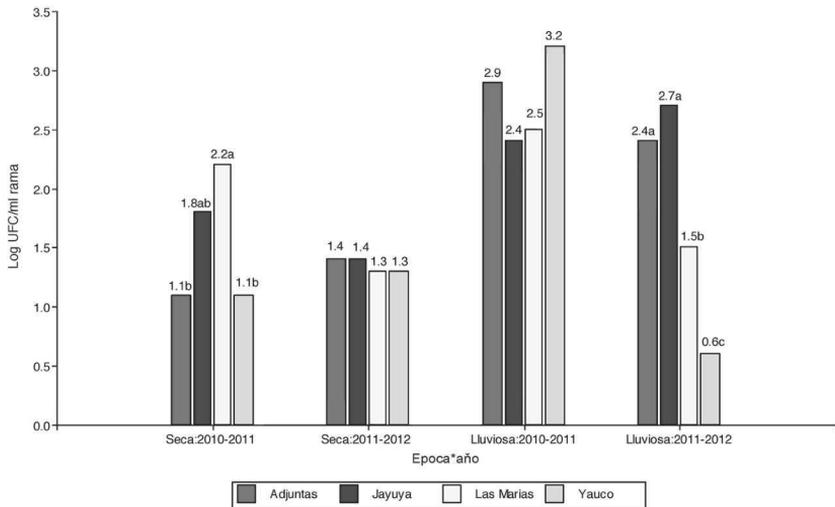


FIGURA 2. Medias para la población total de bacterias endófitas en ramas de cafeto, *Coffea arabica*, por época y año en cuatro localidades cafetaleras de Puerto rico. Letras denotan diferencias según DMS al nivel de $\alpha = 0.05$.

vaduras de las hojas durante la época lluviosa en el año 1, se observó la misma tendencia que en las ramas, con los valores de diversidad más altos en Las Marías (Figura 3).

Hubo efecto de tipo de sombra sobre la diversidad de cepas bacterianas obtenidas de nervaduras de las hojas en Jayuya (Cuadro 3); las parcelas con sombra presentaron mayor diversidad de cepas ($\alpha = 0.05$) comparado con las parcelas a sol. En general, en las parcelas a sol se detectó menor diversidad, lo que concuerda con los resultados obtenidos en Yauco en ramas de cafetos ($\alpha = 0.05$). Sin embargo, en esta localidad hubo interacción época por año (Cuadro 3).

La población (log UFC/mL) y la diversidad de cepas por árbol fueron más altas en la época lluviosa comparada con la época seca. En Adjuntas, el efecto de época fue significativo sobre las poblaciones bacterianas en ramas y hojas ($\alpha = 0.05$) y se verificó la interacción sombra por época en el caso de la hojas. En Jayuya, hubo efecto de época e interacción sombra por época para las poblaciones de ramas. En Yauco, hubo efecto de época para las poblaciones de ramas, pero la interacción sombra por año estuvo presente y fue no ordenada (Cuadro 3). En Las Marías, hubo efecto de época sobre las poblaciones en hojas y ramas ($\alpha = 0.05$) con mayores promedios en la época lluviosa frente a la época seca. En general, hubo mayor población y diversidad bacteriana en la

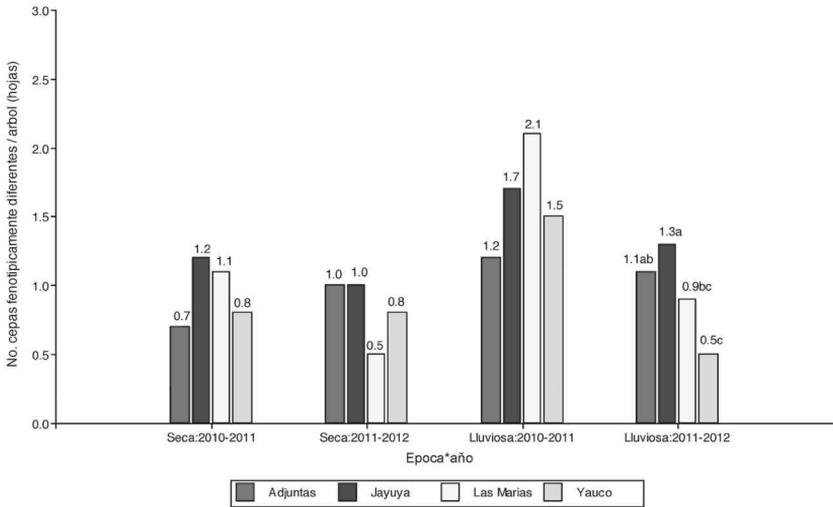


FIGURA 3. Medias para diversidad de cepas bacterianas en hojas de café, *Coffea arabica*, por época y año en cuatro localidades cafetaleras de Puerto Rico. Letras denotan diferencias según DMS al nivel de $\alpha = 0.05$.

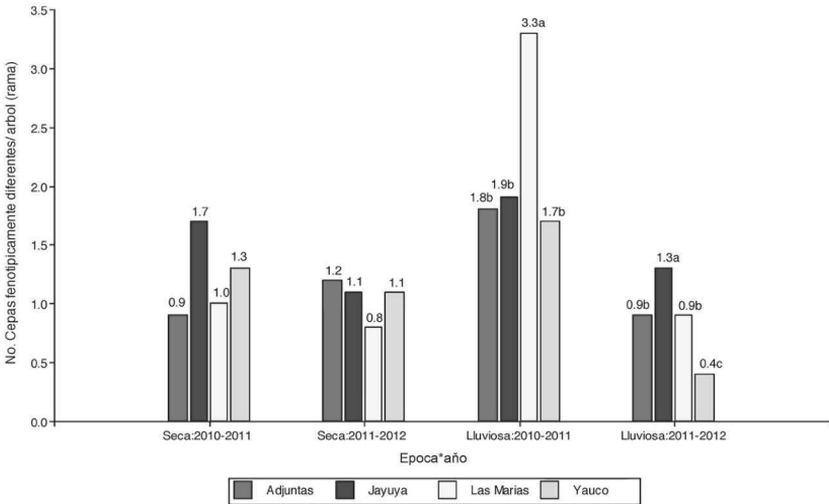


FIGURA 4. Medias para diversidad de cepas bacterianas en ramas de café, *Coffea arabica*, por época y año en cuatro localidades cafetaleras de Puerto Rico. Letras denotan diferencias según DMS al nivel de $\alpha = 0.05$.

CUADRO 3.—Efecto de tipo de sombra, de la época, del año y de sus interacciones sobre las poblaciones y diversidad de cepas bacterianas determinadas en hojas y ramas de café en cuatro localidades de Puerto Rico.

Efecto	ADJUNTAS						JAYUYA						YAUCO						LAS MARIAS						
	Población ²		Diversidad ³		Población		Diversidad		Población		Diversidad		Población		Diversidad		Población		Diversidad		Población		Diversidad		
	Hoja	Rama	Hoja	Rama	Hoja	Rama	Hoja	Rama	Hoja	Rama	Hoja	Rama	Hoja	Rama	Hoja	Rama	Hoja	Rama	Hoja	Rama	Hoja	Rama	Hoja	Rama	
<i>Sombra</i> ¹																									
Baja div.	1.91	1.99	1.10	1.30	1.47	2.01	1.35a	1.25	1.03	1.64	0.95	1.10	1.42	2.03	1.45	1.18									
Alta div.	1.72	1.78	1.10	1.35	1.58	2.00	1.70a	1.00	0.94	1.63	0.95	1.50	1.29	1.85	1.00	1.50									
Sol	1.32	2.05	0.75	1.00	1.75	2.25	0.70b	1.15	1.14	1.31	0.80	0.80	1.52	1.68	0.95	1.20									
F valor	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS									
DMS $\alpha = 0.05$	—	—	—	—	—	—	0.62	—	—	—	—	—	—	—	—	—									
<i>Época</i>																									
Seca	1.23b	1.23b	0.83	1.13	1.38	1.62	1.10	1.47	1.00	1.15	0.80	1.20	1.23	1.73	0.80b	0.90b									
Lluviosa	2.07a	2.65a	1.07	1.37	1.82	2.55	1.53	1.17	1.06	1.91	1.00	1.07	1.59	1.98	1.47a	2.10a									
F valor	**	**	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**									
DMS $\alpha = 0.05$	0.55	0.53	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—									
<i>Año</i>																									
2010-2011	1.54	1.30	0.93	1.37	1.42	2.12	1.37	1.77	1.13	2.14	1.13	1.50	1.86	2.32	1.60a	0.90b									
2011-2012	1.76	1.20	1.03	1.07	1.78	2.06	1.57	1.17	0.94	0.92	0.67	0.77	0.96	1.40	0.67b	2.10a									
F valor	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**	NS	NS	**	**									
DMS $\alpha = 0.05$	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—									

¹Cafetos manejados bajo sombra de baja diversidad, de alta diversidad de árboles y a sol

²Población bacteriana (Log UFC/mL)

³Diversidad fenotípica de cepas bacterianas por árbol

NS, *, ** No significativa y significativa $\alpha = 0.05$ y 0.01 , respectivamente

DMS= Diferencia Mínima Significativa de Fisher

CUADRO 3.—(Continuación) Efecto de tipo de sombra, de la época, del año y de sus interacciones sobre las poblaciones y diversidad de cepas bacterianas determinadas en hojas y ramas de café en cuatro localidades de Puerto Rico.

Efecto	ADJUNTAS						JAYUYA						YAUCO						LAS MARÍAS					
	Población ²		Diversidad ³		Población		Diversidad																	
	Hoja	Rama	Hoja	Rama	Hoja	Rama	Hoja	Rama	Hoja	Rama	Hoja	Rama	Hoja	Rama	Hoja	Rama	Hoja	Rama	Hoja	Rama				
<i>Sombra x Época</i>																								
F valor	*	NS	*	*	**	**	**	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS		
<i>Sombra x año</i>																								
F valor	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS		
<i>Época x año</i>																								
F valor	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS	NS	**		
<i>S x E x A</i>																								
F valor	NS	NS	NS	NS	*	**	**	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		

¹Cafetos manejados bajo sombra de baja diversidad, de alta diversidad de árboles y a sol

²Población bacteriana (Log UFC/mL)

³Diversidad fenotípica de cepas bacterianas por árbol

NS, *, ** No significativa y significativa $\alpha = 0.05$ y 0.01 , respectivamente

DMS= Diferencia Mínima Significativa de Fisher

época lluviosa que en la época seca en las cuatro localidades evaluadas aunque las diferencias no siempre fueron significativas (Cuadro 3).

DISCUSIÓN

Existen muchas cepas bacterianas que se pueden aislar de los tejidos vasculares de ramas y hojas del café. La configuración quimiotaxonómica más frecuente en 1,278 cepas aisladas fue: morfología redonda, margen liso y aplanado, Gram positiva, catalasa positiva, oxidasa negativa (aerobias) y con habilidad de crecer en medio TSA. Estas bacterias no han sido identificadas hasta el momento.

El efecto de época sobre las poblaciones y la diversidad de cepas bacterianas fue significativa en nervaduras de hojas y ramas de los cafetos (población bacteriana para Adjuntas 2.07 versus 1.23, en hojas; diversidad bacteriana para Adjuntas 2.65 versus 1.23, en ramas; población bacteriana en Jayuya 2.55 versus 1.62; población bacteriana en Las Marías 1.47 versus 0.8; diversidad bacteriana en Las Marías 2.1 versus 0.9; población bacteriana en Yauco 1.91 versus 1.15) resultando mayores en la época lluviosa que en la época seca. Por lo tanto, para obtener mayor representatividad de los aislados bacterianos presentes en los tejidos de cafetos, la colección de tejidos debe realizarse durante la época lluviosa.

En la época lluviosa se obtuvieron las poblaciones bacterianas más altas en las ramas de cafetos. Irizarry (2010) realizó un estudio de aislamiento de bacterias endófitas de *Coccoloba uvifera* en la localidad de Cabo Rojo, Puerto Rico, y también encontró un mayor porcentaje de colonización de bacterias endófitas en la época lluviosa que en la época seca. El incremento en las poblaciones bacterianas en la época lluviosa podría relacionarse a las crecientes poblaciones de insectos vectores (Mariño y Zapata, 2009). Además, en la época lluviosa existe mayor presencia de malezas, las cuales hospedan insectos vectores y agentes fitopatógenos. Al respecto, *X. fastidiosa* se ha encontrado en distintas especies de malezas y puede colonizar plantas herbáceas y leñosas (Harakava, 2000). En este estudio se intentó identificar las bacterias aisladas de tipo fastidioso asociadas con los síntomas de crespada utilizando técnicas bioquímicas y moleculares. La caracterización bioquímica y el crecimiento en medios de cultivo selectivos fueron asociados con *X. fastidiosa*. Sin embargo, los resultados a nivel molecular fueron erráticos; en parte porque los iniciadores utilizados no fueron lo suficientemente específicos y no se pudo confirmar la presencia de *X. fastidiosa*.

Estudios paralelos realizados por Cruz y Zapata (2011) en las mismas fincas utilizadas en el presente estudio, evidenciaron mayores niveles de malezas asociadas al cultivo de café en la época lluviosa versus

la época seca. Las malezas constituyen un reservorio de plagas y enfermedades, lo que se relaciona con el incremento de bacterias endófitas aisladas de estos nichos en el presente estudio.

Las condiciones lluviosas hacen que los cafetos y otras especies leñosas asociadas en el agroecosistema generen nuevos brotes, lo que a su vez atrae a insectos fitófagos posibles portadores de bacterias fitopatógenas procedentes de las malezas en los alrededores. Al respecto, Brodbeck y Andersen (2006) mencionan que ciertos vectores potenciales se alimentan principalmente de las malezas y solo ocasionalmente de cafetos u otras especies leñosas.

A lo largo del estudio se observaron mayores poblaciones bacterianas en ramas versus nervaduras de hojas de los cafetos ($p < 0.0001$). Los promedios generales para el experimento fueron 349 UFC (media no transformada a Log UFC/mL) en nervaduras de las hojas y 727 UFC en ramas. Estos valores se encuentran dentro del rango obtenido por Kobayashi y Palumbo (2000) para bacterias endófitas en alfalfa, maíz dulce, remolacha, algodón y papa, con promedios desde 100 hasta 100,000 UFC.

La interacción de tipo de sombra por época fue la que en más ocasiones alcanzó significación estadística, lo que indica que el efecto de época dependerá del tipo de sombra utilizado. Los tres tratamientos de sombra (alta diversidad, baja diversidad y el control a sol) constituyen comunidades biológicas distintas con una variación intrínseca, por lo que no es recomendable analizarlas juntas. En el control a sol se detectó la menor diversidad de cepas bacterianas comparado con la obtenida en los dos tratamientos de sombra.

Las interacciones de tipo de sombra por época, observadas principalmente en Adjuntas y Jayuya (Cuadro 3) pueden estar relacionadas con el manejo de las plantaciones. En las parcelas a sol se usó glifosato para el control de malezas, y control químico para insectos y enfermedades fungosas en la época lluviosa. En contraste, en las fincas con sombra de alta diversidad de especies de las localidades Las Marías y Yauco, se utilizan prácticas orgánicas con un manejo de malezas mecánico, y no se usan plaguicidas químicos.

El cultivo de café a sol en Las Marías, que mostró un 92.3% de cobertura, medida con el densitómetro GRS (Cuadro 1), es un caso particular, ya que se trata de un manejo en el que la estructura de la copa es más compacta y la radiación solar que ingresa al dosel, de donde se toma la muestra, es menor en comparación a las otras parcelas a sol. Para futuros trabajos se debería considerar ampliar las categorías de tipo de sombra debido a las grandes diferencias en las comunidades biológicas del café bajo sombra versus el café en plantación comercial "a sol".

Probablemente las diferencias que se observaron en el presente ensayo entre las parcelas manejadas a sol reflejan las características propias de la especie de café y de las diferentes prácticas agronómicas utilizadas en estas parcelas. Las poblaciones bacterianas obtenidas de nervaduras de hojas y ramas de café en la localidad de Las Marías fueron bajas en comparación con las de las otras localidades. Dicha localidad también presentó los conteos más bajos de insectos vectores potenciales de *X. fastidiosa* (Brodbeck et al., 2011). Aún cuando los contajes de bacteria sean bajos, estos podrían incluir algún patógeno bacteriano, si existen bajas poblaciones de posibles insectos vectores. Por otro lado, en las localidades de Adjuntas, Jayuya y Yauco existe un mayor potencial para el establecimiento y desarrollo de la enfermedad causada por *X. fastidiosa*.

LITERATURA CITADA

- Aguilar, E., L. Moreira y C. Rivera, 2008. Confirmation of *Xylella fastidiosa* infecting grapes *Vitis vinifera* in Costa Rica. *Trop.Plant Pathol.* 33: 445-448.
- Andersen, P., 2005. *Xylella fastidiosa* in plants and in leafhoppers of Puerto Rico. *En: <http://www.reeis.usda.gov/web/crisprojectpages/0198646-xylella-fastidiosa-in-plants-and-in-leafhoppers-of-puerto-rico.html>*
- Arango-Argoti, M., 2007. Zonificación agroecológica del café en Puerto Rico y análisis estructural y de composición de especies arbóreas presentes en el agro ecosistema cafetero. Tesis M.S. Departamento de Agronomía y Suelos. Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez. 126 pp.
- Beretta, M., R. Harakava, M. Chagas, K. Derrick, G. Barthe, T. Ceccardi, R. Lee, M. Sugimori, I. Ribeiro, 1996. First report of *Xylella fastidiosa* in coffee. *Plant Dis.* 80:821.
- Berg, G., L. Eberl y A. Hartmann, 2005. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environ. Microbiol.* 7: 1673-1685.
- Bolaños, C. y M. Zapata, 2011. Characterization of endophytic bacteria isolated from healthy and diseased coffee trees showing witches brooms under field conditions in Puerto Rico. *Phytopathol.* 101:S276.
- Brodbeck, B. y P. Andersen, 2006. Status of xylem limited bacterium *Xylella fastidiosa* in Puerto Rico. North Florida Research and Education Center, University of Florida. *NFREC NEWS* 8(19): 3.
- Cruz, A. y M. Zapata, 2011. Prevalent weeds and insects on shaded coffee plantations in two localities of Puerto Rico. Entomological Society of America - American Phytopathological Society Meeting. San Juan Puerto Rico. March 2011.
- Davis, M., H. Purcell y S. Thomson, 1978. Pierce's disease of grapevines: Isolation of the causal bacterium. *Science* 199: 75-77.
- Departamento de Agricultura de Puerto Rico, 2010. Ingreso Bruto Agrícola 2007-2008. Oficina Estadísticas Agrícolas. Estado Libre Asociado de Puerto Rico.
- Flores, C., 2011. Informe empresa del café. Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez, Colegio de Ciencias Agrícolas, Estación Experimental Agrícola, Río Piedras, Puerto Rico. 29 pp.
- Harakava, R., 2000. Citrus variegated chlorosis: Development of transgenic resistance and molecular studies of pathogenesis. Tesis PhD. Universidad de Florida. Florida, EE.UU. 79 pp.

- Irizarry, I., 2010. A study of bacterial endophytes of *Coccoloba uvifera* at Cabo Rojo, Puerto Rico. Tesis M.Sc. Universidad del Turabo, Gurabo, P.R. 91 pp.
- Kobayashi, D. y J. Palumbo, 2000. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture: 199-233. *En*: C. W. Bacon and J. F. White (ed.), *Microbial Endophytes*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. 487 pp.
- Lacava, P., W. Araujo, J. Marcon, W. Maccheroni y J. L. Azevedo, 2004. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. *Lett. Appl. Microbiol.* 39: 55-59.
- Li, W., W. Pria, D. Teixeira, V. Miranda, A. Franco, M. Costa, C. He, P. Costa y J. Hartung, 2001. Coffee leaf scorch caused by a strain of *Xylella fastidiosa* from citrus. *Plant Dis.* 85: 501-505.
- Lima, J., V. Miranda, J. Hartung, R. Brlansky y E. Carlos, 1998. Coffee leaf scorch bacterium: Axenic culture, pathogenicity, and comparison with *Xylella fastidiosa* of citrus. *Plant Dis.* 82: 94-97.
- Mariño-Cárdenas, Y., 2008. Identificación de bacterias en cicadélidos vectores potenciales de *Xylella fastidiosa* Wells *et al.*, que se alimentan del tejido vascular de plantas de café *Coffea arabica* L. en tres localidades de Puerto Rico. Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico. Recinto Universitario de Mayagüez. 160 pp.
- Mariño-Cárdenas, Y. y M. Zapata, 2009. Diversidad de bacterias en cicadélidos vectores potenciales de *Xylella fastidiosa* Wells *et al.* en cafetales en Puerto Rico. *J. Agric. Univ. P.R.* 93: 101-121pp.
- Minsavage, G., C. Thompson, L. Hopkins, R. Leite y R. Stall, 1994. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathol.* 84: 456-461.
- OIC (Organización Internacional del Café), 2010. History of coffee. *En*: http://www.ico.org/coffee_story.asp?section=About_Coffee.
- Purcell, A. y D. Hopkins, 1996. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopa.* 34: 131-151.
- Rodríguez, C., J. Obando, W. Villalobos y C. Rivera, 2001. First report of *Xylella fastidiosa* infecting coffee in Costa Rica. *Plant Dis.* 85: 1027.
- Savannotti, S., P. Silva y S. Rufo, 2007. Genetic characterization of *Xylella fastidiosa* isolated from citrus and coffee plants. *Sci. Agric.* 64: 482-485.
- Schaad N., J. Jones y W. Chun, 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3ed. Minnesota, USA. 213 pp.
- Strobel, G., B. Daisy y U. Castillo, 2004. The biological promise of microbial endophytes and their natural products. *Plant Pathol. J.* 4: 161-176.
- Subhadeep, Ch., P. Almeida y S. Lindow, 2008. Living in two worlds: The plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46: 243-271.
- Vicente-Chandler, J., F. Abruña, R. Bosque-Lugo y S. Silva, 1968. Intensive coffee culture in Puerto Rico. Universidad de Puerto Rico, Estación Experimental Agrícola. Bull. 211.
- Wells, J. M., B. C. Raju, H. Y. Hung, W. G. Weisburg, P. L. Mandelco y D. J. Brenner, 1987. *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov.: gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *Int. J. of Syst. Bacteriol.* 37: 136-143.
- Zapata, M., J. Hartung, B. Brodbeck y P. Andersen, 2011. Endophytic bacteria from the vascular tissue of coffee (*Coffea arabica* L.) and citrus (*Citrus sinensis* L.) leaves found during the attempt to isolate the pathogen *Xylella fastidiosa* in Puerto Rico. *Phytopathology* 101: S276.

