

**Detección y Caracterización de Bacterias Endofíticas en Árboles de Cafeto
(*Coffea arabica* L.) y de Sombra en Puerto Rico**

Por
Carlos A. Bolaños Carriel

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS
en
Protección de Cultivos**

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2012

Aprobado por

Consuelo Estévez de Jensen, Ph. D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Linda Wessel Beaver, Ph. D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Mildred Zapata Serrano, Ph. D.
Presidente, Comité Graduado

Fecha

Jaquelina Alvarez, M. A.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Skip Van Bloem, Ph. D.
Director del Departamento

Fecha

SUMMARY

Among bacterial diseases affecting coffee (*Coffea arabica* L.), coffee leaf scorch (CLS) caused by the bacterium *Xylella fastidiosa* (Xf) Wells et al., limits production in many countries. The importance of endophytic bacteria is related to potential antagonistic or synergistic interactions with Xf. The objective of this research was to characterize bacterial endophytes of coffee and shade trees in Puerto Rico (PR). Three types of shade treatments were studied: coffee shaded with trees of high species diversity, coffee shaded with trees of low species diversity and sun coffee, in four localities in the dry and rainy seasons during years 2010-2012. In this study ANOVA in a complete randomized design was used to determine the effect of the factors. Endophytic bacteria were isolated on Periwinkle medium (semi selective to Xf) and characterized phenotypically. Endophytic Gram negative bacteria and tree samples with CLS disease symptoms, were tested with a double antibody sandwich enzyme linked immune absorbent assay (DAS-ELISA for Xf). A subset of bacteria and tree samples suspected to have CLS and bacteria were analyzed with polymerase chain reaction (PCR) with Xf primers 272 -1-2, COX Xf and Xf-16S rRNA. Cluster analysis was carried out using Gower method for fastidious bacteria and spatial cluster analysis using SatScan for symptomatic trees. Few bacterial strains were of fastidious type. There were no significant differences in the percentage of fastidious bacteria, in the number of colony forming units (CFU/ml) and bacterial diversity per tree in symptomatic versus asymptomatic trees. CFU/ml and bacterial diversity per tree were higher in the rainy season compared to the dry season ($\alpha=0.05$). The effects of location and shade treatment were more variable, with a tendency of lower diversity in sun versus shaded coffee. Spatial clustering showed more than 14 times greater relative risk of encountering diseased coffee trees at higher altitudes such as Adjuntas, Jayuya and Yauco ($p<0.001$). Some DNA products were amplified with PCR (272 - 1-2); but they were not related to Xf, neither with COX Xf primers. DNA sequencing was negative for Xf. Ambiguous results in DNA amplification and sequencing do not allow us to confirm that these samples are Xf. Therefore, the causal agent of the disease observed in PR remains to be identified according to Koch's postulates.

RESUMEN

Entre las enfermedades bacterianas que afectan el cafeto (*Coffea arabica* L.), tenemos al encorchamiento de la hoja del cafeto (CLS) causada por la bacteria *Xylella fastiosa* (Xf) Wells et al., que limita la producción en muchos países. La importancia de las bacterias endofíticas está relacionada a las posibles interacciones antagonistas y sinergistas con Xf. Esta investigación tuvo como objetivo caracterizar las bacterias endofíticas de árboles de cafeto y de árboles que se utilizan para la sombra de cafeto en Puerto Rico (PR). Se estudiaron tres tratamientos de sombra: sombra de alta diversidad de especies, sombra de baja diversidad de especies y cafetos a sol, en cuatro localidades en la época seca y lluviosa del 2010-2012. Se usó ANOVA en diseño completamente aleatorizado para determinar los efectos de los factores en estudio. Las bacterias endofíticas se aislaron en medio Periwinkle (semiselectivo para Xf) y se caracterizaron de acuerdo al fenotipo de la colonia. Se realizó la prueba serológica de conjugados enzimáticos de doble sándwich (DAS-ELISA para Xf) con las endófitas Gram negativas y muestras de árboles sospechosos de CLS. Un grupo de bacterias y muestras de árboles sospechosos de CLS se analizaron con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los iniciadores 272 1-2, COX Xf y Xf-16S rRNA. Se realizó un análisis de conglomerados para las bacterias tipo fastidioso usando el método de Gower y de conglomerados espaciales para árboles sintomáticos usando el programa SatScan. Pocas bacterias resultaron de tipo fastidioso. No hubo diferencias significativas en el porcentaje de bacterias de tipo fastidioso, en el número de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) y la diversidad bacteriana en árboles de cafeto sintomáticos versus asintomáticos. La época lluviosa resultó con un mayor UFC/ml y diversidad bacteriana por árbol versus la seca ($\alpha=0.05$). Los efectos de localidad y manejo de sombra fueron variables con una tendencia de menor diversidad bacteriana en el cafeto a sol versus sombra. Los conglomerados espaciales permitieron asociar con mayor riesgo relativo de enfermedad (sospechosos de CLS) a las localidades de mayor altitud Adjuntas, Jayuya y Yauco (Riesgo Relativo mayor a 14; $p<0.001$). Algunos productos de DNA fueron amplificados con PCR (272 1-2); pero éstos no se relacionaron a Xf, tampoco con los iniciadores COX Xf. La secuenciación fue negativa para Xf. Los resultados de la amplificación de ADN y de la secuenciación fueron ambiguos y no se logró confirmar la existencia de Xf en las muestras. Por tanto, el agente causal de la enfermedad observada en PR queda por ser identificado según los postulados de Koch.

DEDICATORIA

A Dios por su infinito amor y provisión.

A mi madre Cristina Carriel Valdéz, a mi padre Marco Bolaños Osorio, a mi hermana María Belén, a mis sobrinas, Emily y Daniela, y a mi abuelo Alfonso Bolaños Guerra.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece especialmente a la Dra. Mildred Zapata por su amistad por los consejos, a la Dra. Consuelo Estévez por su amistad, su apoyo y su contribución vital para poder cumplir con el diagnóstico molecular de bacterias potenciales para *X. fastidiosa* en Puerto Rico, a la Dra. Linda Beaver por todos los consejos y apoyo en la redacción del documento, al Dr. Brent Brodbeck por su amistad y sus consejos, al Dr. Pete Andersen por sus consejos, al Dr. Eduardo Schodrer, al Dr. Raúl Machiavelli por su ayuda en la determinación de los modelos estadísticos utilizados en el presente trabajo de investigación. A todos los agricultores: Sr. Geraldino, Sr. Rivera, Dr. Ferdinand Rivera, Sr. Padua, Sr. Bengochea, Sr. Martínez, Sr. Rivera, Sr. Arroyo, Sr. Reyes, Sr. Santana, Sr. Serrano. A todos los extensionistas: Agro. Cordero, Agro. Catalá, Agro. Jiménez. Sr. Serrano. A Rosario Gaud por su amistad y consejos, a mis queridos amigos que han sido como mi familia en Puerto Rico: Dainette Vázquez, Neida Soto y Juan Vázquez, Margarita Marroquín y Pedro Rivera, Viviana Rivera y toda su familia, Mayra Ronquillo, Jorge Caicedo y la Iglesia CCRVA a sus pastores y a todos los amigos que pude formar ahí, Giovanna Emmanuelli, Orlando Ortega. A Zuelika Beltrán quien me hizo sentir parte de su familia a Nancy Lebrón, Heidy Beltrán, Renán Beltrán, Moises Beltrán. Al proyecto ZTS-51 “Potential effects of *Xylella fastidiosa* on shade coffee establishment in Puerto Rico” del USDA.

LISTA DE CONTENIDOS

ABSTRACT	ii
RESUMEN.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
LISTA DE CONTENIDOS.....	vi
LISTA DE TABLAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ANEXOS.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
<u>Generalidades del Dominio Bacteria</u>	3
<u>Bacterias Fastidiosas Limitadas al Xilema</u>	5
<u>Identificación de Bacterias</u>	8
<u>Diagnóstico de Enfermedades Causadas por Bacterias Fitopatógenas</u>	8
<u>Filogenia Molecular</u>	12
<u>El Cultivo del Cafeto</u>	13
<u>Árboles asociados al Cultivo del Cafeto</u>	15
Cítricos.....	15
Leguminosas.....	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
<u>Lotes Experimentales</u>	17
<u>Estudio I: Muestreo de Árboles Sintomáticos y Asintomáticos</u>	17
Diseño Experimental y Muestreo de Árboles.....	17
Procesamiento de Muestras.....	18
Caracterización Morfológica y Bioquímica de las Poblaciones	
Bacterianas.....	19
Análisis Estadístico.....	19
<u>Estudio II: Efecto de Año, Época Localidad y Tipo de Sombra</u>	20
Diseño Experimental y Muestreo de Árboles.....	20
Procesamiento de Muestras.....	20
Caracterización Morfológica y Bioquímica de las Poblaciones	
Bacterianas.....	20
Análisis Serológico.....	21
Análisis Estadístico.....	21
<u>Estudio III: Distribución Espacial de Árboles Sospechosos para X.</u>	
<u>fastidiosa</u>	22
Muestreo de Árboles.....	22
Análisis Serológico.....	22
Mapeo y Generación de Conglomerados Espaciales.....	22
<u>Estudio IV: Análisis Conglomerado</u>	23
<u>Estudio V: Aislamiento de ADN y Técnica de PCR</u>	23
Aislamiento de ADN y PCR de Cepas Bacterianas.....	24
Aislamiento de ADN y PCR de Muestras Vegetales.....	25

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
<u>Condiciones Generales en los Estudios.....</u>	26
<u>Estudio I: Caracterización De Bacterias Endofíticas Aisladas de Cafetos</u>	
<u>Sintomáticos versus Asintomáticos.....</u>	28
<u>Estudio II: Efecto de Localidad, Manejo de Sombra, Época y Año sobre Bacterias</u>	
<u>Aisladas en Cafeto y Árboles de Sombra.....</u>	34
Bacterias Endofíticas Aisladas de Cafetos.....	34
<i>Análisis de varianza por Época-Año.....</i>	<i>34</i>
<i>Número de Log (UFC/ml).....</i>	<i>34</i>
<i>Cepas fenotípicamente diferentes por Árbol.....</i>	<i>37</i>
<i>Análisis por Localidad de Cafeto.....</i>	<i>40</i>
a. <i>ADJUNTAS.....</i>	<i>40</i>
<i>i Log UFC/ml en Adjuntas.....</i>	<i>40</i>
<i>ii Cepas fenotípicamente diferentes por árbol en Adjuntas.....</i>	<i>43</i>
b. <i>JAYUYA.....</i>	<i>43</i>
<i>i Log UFC/ml en Jayuya.....</i>	<i>43</i>
<i>ii Cepas fenotípicamente diferentes por árbol en Jayuya.....</i>	<i>46</i>
c. <i>LAS MARÍAS.....</i>	<i>46</i>
<i>i Log UFC/ml en Las Marías.....</i>	<i>46</i>
<i>ii Cepas fenotípicamente diferentes por árbol en Las Marías.....</i>	<i>50</i>
d. <i>YAUCO.....</i>	<i>50</i>
<i>i Log UFC/ml en Yauco.....</i>	<i>50</i>
<i>ii Cepas fenotípicamente diferentes por árbol en Yauco.....</i>	<i>50</i>
<i>Análisis serológico para X. fastidiosa en Muestras de cafeto</i>	<i>53</i>
<i>Efecto de la Época.....</i>	<i>53</i>
<i>Efecto de Localidad.....</i>	<i>54</i>
<i>Efecto del año.....</i>	<i>55</i>
Contrastación de Poblaciones de Bacterias Endofíticas Aisladas de Cítricos...	56
<i>Log UFC/ml Muestras de Árboles de Cítrico.....</i>	<i>56</i>
<i>Cepas Fenotípicamente Diferentes por Árbol.....</i>	<i>59</i>
<i>Análisis serológico para X. fastidiosa en Muestras de Citrus sp.....</i>	<i>61</i>
Contrastación de Poblaciones de Bacterias Endofíticas Aisladas de Inga sp...	62
<i>Log UFC/ml Muestras de Árboles de Inga sp.....</i>	<i>62</i>
<i>Cepas Fenotípicamente Diferentes por Árbol de Inga sp.....</i>	<i>64</i>
<i>Análisis serológico para X. fastidiosa en Muestras de Inga sp</i>	<i>66</i>
Contrastación de poblaciones para otras especies de sombra.....	67

<u>Estudio III: Distribución espacial de árboles sospechosos con la prueba DAS ELISA para <i>Xylella fastidiosa</i></u>	68
<u>Estudio IV Análisis Conglomerado</u>	75
<u>Estudio V: Aislamiento de ADN y Técnica de PCR de Bacterias y Muestras Vegetales Sospechosas para <i>Xylella fastidiosa</i></u>	78
 V. CONCLUSIONES.....	84
VI. RECOMENDACIONES.....	85
VII. LITERATURA CITADA.....	86
VIII. ANEXOS.....	96

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.- Altitud de las fincas de cafeto muestreadas de Puerto Rico.....	17
Tabla 2.- Resumen de precipitación total y temperatura promedio en cuatro localidades de Puerto Rico período 2010-2012.....	26
Tabla 3.- Irradiación mínimo, máximo y promedio en las algunas de las parcelas muestreadas.....	27
Tabla 4.- Porcentaje de cobertura en las parcelas muestreadas.	28
Tabla 5.- Cepas aisladas en el Estudio I clasificadas por tipo de cepa y tipo de árbol muestreado.....	29
Tabla 6.- Origen de las cepas aisladas de cafeto que fueron de tipo fastidioso (Gram-, TSA-, PW+).....	29
Tabla 7.- Origen de las cepas aisladas de cafeto de reacción Gram negativa y que crecen en medio TSA.....	31
Tabla 8.- Origen de las cepas aisladas de cafeto (<i>Coffea arabica</i>) de reacción Gram positiva y que no crecen en medio TSA.....	32
Tabla 9.- Origen de las cepas aisladas de cafeto (<i>Coffea arabica</i>) de reacción Gram positiva y que crecen en medio TSA.....	32
Tabla 10.- Medias, significancia de la prueba de F y valor de la diferencia mínima significativa para el logaritmo del número de UFC/ml de árboles de cafeto en Puerto Rico.....	35
Tabla 11.- Medias, significancia de la prueba de F y valor de la diferencia mínima significativa para el total de cepas fenotípicamente diferentes por (árbol) placa para cafeto <i>Coffea arabica</i> en Puerto Rico.....	38
Tabla 12.- Medias, prueba de F y DMS (Fisher $\alpha=0.05$) para el logaritmo del número de UFC/ml y cepas fenotípicamente diferentes por árbol en nervaduras de las hojas y ramas de cafeto en Adjuntas, PR.....	41
Tabla 13.- Medias, prueba de F y DMS (Fisher $\alpha=0.05$) para el logaritmo del número de UFC/ml y cepas fenotípicamente diferentes por árbol en nervaduras de las hojas y ramas de cafeto en Jayuya, PR.....	44
Tabla 14.- Medias, prueba de F y DMS (Fisher $\alpha=0.05$) para el logaritmo del número de UFC/ml y cepas fenotípicamente diferentes por árbol en nervaduras de las hojas y ramas de cafeto en Las Marías, PR.....	47

Tabla 15.- Medias, prueba de F y DMS (Fisher $\alpha=0.05$) para el logaritmo del número de UFC/ml y cepas fenotípicamente diferentes por árbol en nervaduras de las hojas y ramas de cafeto en Yauco, PR.....	51
Tabla 16.- Frecuencia de árboles de cafeto seropositivos (≥ 0.7) o seronegativos (< 0.7) en la prueba DAS-ELISA para <i>X. fastidiosa</i> , distribuidos por época.....	53
Tabla 17.- Frecuencia de árboles de cafeto seropositivos (≥ 0.7) o seronegativos (< 0.7) en la prueba DAS-ELISA para <i>X. fastidiosa</i> , distribuidos por localidad.....	54
Tabla 18.- Frecuencia de árboles de cafeto seropositivos (≥ 0.7) o seronegativos (< 0.7) en la prueba DAS-ELISA para <i>X. fastidiosa</i> , distribuidos por año.....	55
Tabla 19.- Medias, significancia de la prueba de F y valor de la diferencia mínima significativa para el logaritmo del número de UFC/ml de árboles de <i>Citrus</i> sp. en Puerto Rico.....	57
Tabla 20.- Medias, significancia de la prueba de F y valor de la diferencia mínima significativa para el total de cepas diferentes por árbol de <i>Citrus</i> sp. en Puerto Rico...	60
Tabla 21.- Medias, significancia de la prueba de F y valor de la diferencia mínima significativa para el logaritmo del número de UFC/ml de árboles de <i>Inga</i> sp. en Puerto Rico.....	63
Tabla 22.- Medias, significancia de la prueba de F y valor de la diferencia mínima significativa para cepas fenotípicamente diferentes por árbol de <i>Inga</i> sp. en Puerto Rico.....	65
Tabla 23.- Resumen del log UFC/ml y cepas fenotípicamente diferentes/placa para tres especies de árboles de sombra en el agro-ecosistema del cafeto.....	67
Tabla 24.- Lecturas de Absorbancia a 650 nm en la prueba DAS ELISA para <i>X. fastidiosa</i> de nervaduras de las hojas y ramas de árboles con valores iguales o superiores a 0.7A.....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Medias de Log UFC/ml de nervaduras de las hojas de cafeto en la época lluviosa período 2010-2011.....	36
Figura 2.- Medias del Log UFC/ml de nervaduras de hojas de cafeto en siembras de Adjuntas, PR período 2010-2012.....	42
Figura 3.- Medias del Log UFC/ml de ramas de cafeto en siembras de Adjuntas, PR período 2010-2012.....	42
Figura 4.- Medias de Log UFC/ml de nervaduras de hojas en siembras a sol y bajo distintos tipos de sombra de Jayuya-PR. período 2010-2012.....	45
Figura 5.- Medias de Log UFC/ml de ramas de cafeto en siembras a sol y bajo distintos tipos de sombra de Jayuya, PR. período 2010-2012.....	45
Figura 6.- Medias de Log UFC/ml de nervaduras de hojas en siembras de Las Marías- PR. período 2010-2012.....	48
Figura 7.- Medias de Log UFC/ml de nervaduras de hojas en siembras de Las Marías- PR. período 2010-2012.....	48
Figura 8.- Medias de cepas fenotípicamente diferentes por árbol de ramas de cafeto en siembras de Las Marías- PR. período 2010-2012.....	50
Figura 9.- Medias de Log UFC/ml de ramas de cafeto en siembras de Yauco- PR. período 2010-2012.....	52
Figura 10.- Medias de Cepas fenotípicamente diferentes por árbol de ramas de cafeto en siembras de Yauco- PR. período 2010-2012.....	52
Figura 11.- Medias de Log UFC/ml de ramas de cafeto muestreadas en la época lluviosa del período 2010-2011 en parcelas de cuatro localidades de Puerto Rico.....	56
Figura 12.- Medias de Log UFC/ml de ramas de Inga muestreadas en la época seca del período 2010-2011.....	62
Figura 13.- Medias de Log UFC/ml de ramas de Inga muestreadas en la época seca del período 2011-2012.....	64
Figura 14.- Medias de Cepas fenotípicamente diferentes por árbol de ramas de Inga muestreadas en la época seca del período 2011-2012	66
Figura 15- Geo-referenciación de árboles muestreados en Adjuntas, según los valores de absorbancia a 650 nm en la prueba DAS- ELISA para <i>X. fastidiosa</i>	69

Figura 16.- Geo-referenciación de árboles muestreados en Jayuya, según los valores de absorbancia a 650 nm en la Prueba DAS- ELISA para <i>X. fastidiosa</i>	70
Figura 17.- Geo-referenciación de árboles muestreados en Jayuya, según los valores de absorbancia a 650 nm en la Prueba DAS- ELISA para <i>X. fastidiosa</i>	70
Figura 18.- Geo-referenciación de árboles muestreados en Las Marías, según los valores de absorbancia a 650 nm en la Prueba DAS-ELISA para <i>X. fastidiosa</i>	71
Figura 19.- Geo-referenciación de árboles muestreados en Las Marías, según los valores de absorbancia a 650 nm en la Prueba DAS-ELISA para <i>X. fastidiosa</i>	71
Figura 20.- Geo-referenciación de árboles muestreados en Yauco, según los valores de absorbancia a 650 nm en la Prueba DAS-ELISA para <i>X. fastidiosa</i>	72
Figura 21.- Conglomerado espacial principal de los árboles sospechosos con la prueba DAS ELISA para <i>X. fastidiosa</i> en Puerto Rico.....	73
Figura 22.- Conglomerado espacial secundario (amarillo) de los árboles sospechosos con la prueba DAS ELISA para <i>X. fastidiosa</i> en Puerto Rico.....	73
Figura 23.- Morfología de las cepas sospechosas de <i>Xylella fastidiosa</i> sobre medio PW (a: 5221, b:5040, c: 5151, y d:5029).....	75
Figura 24.- Porcentajes del total de cepas de comportamiento fastidioso aisladas a partir de diferentes especies vegetales en Puerto Rico.....	76
Figura 25.- Dendograma para cepas aisladas en el agro-ecosistema de cafeto de reacción Gram negativa y que no crecen en medio TSA.....	78
Figura 26.- Producto de PCR para cepas potenciales de <i>Xylella fastidiosa</i> con iniciadores 272 1-2.....	79
Figura 27.- Producto de PCR para cepas potenciales de <i>Xylella fastidiosa</i> con iniciadores 1492R y 27F.....	79
Figura 28 .- Producto de extracción de ADN para muestras vegetales colectadas en el período enero a marzo 2012.....	81

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.- Precipitación registrada en la Estación Experimental Agrícola de Adjuntas, Puerto Rico durante el período en estudio 2010-2012.....	96
Anexo 2.- Precipitación total (pulg.) para la estación Jayuya, Puerto Rico promedio del período 1949-2002.....	96
Anexo 3.- Precipitación total por mes en la localidad de Las Marías (Hacienda Constanza) para el período en estudio 2010-2012 (fuente NOAA).....	97
Anexo 4.- Precipitación total (pulg.) para la estación Corral Viejo en Yauco- Puerto Rico para el período en estudio 2010-2012 (Fuente NOAA).....	97
Anexo 5.- Dendograma para cepas aisladas de cafeto (<i>Coffea arabica</i>) de reacción Gram negativa y que no crecen en TSA.....	98
Anexo 6.- Dendograma para cepas aisladas de cafeto (<i>Coffea arabica</i>) de reacción Gram negativa y que crecen en TSA.....	98

INTRODUCCIÓN

El cafeto (*Coffea arabica* L.) es una especie de importancia económica mundial, tanto por la extensión del cultivo como por su rol social. Se produce en más de 60 países generando 120 millones de empleos en todo el mundo y las ventas anuales superan los 90 billones de dólares (OIC, 2010).

En Puerto Rico en el período agrícola 2007-2008 el cafeto aportó el 6.99% al producto interno agrícola de la isla (Departamento de Agricultura de Puerto Rico, 2010); en el año 2011 generó ingresos de 38 millones de dólares. Se han reportado 10,000 caficultores en la isla, de los cuales la gran mayoría son pequeños y medianos, distribuidos en 22 municipios en una superficie de 56,000 cuerdas. Se han identificado 132 beneficiados y la industria genera empleos para 20,000 personas (Flores, 2010).

La problemática de la producción mundial de cafeto incluye entre otros, los problemas fitosanitarios. Entre las enfermedades bacterianas que afectan al cafeto, podemos citar al encorchado de la hoja del cafeto (Coffee Leaf Scorch, CLS) causada por la bacteria *Xylella fastidiosa* Wells et al. Se ha reportado que CLS ha reducido en un 30% la producción en ciertas plantaciones del Brasil, e incidencia en todas las zonas cafetaleras de este país (Li et al., 2001). Esta bacteria causa epidemias de importancia económica para otros cultivos como cítricos desarrollando la enfermedad de la clorosis variegada de los cítricos (CVC).

En naranjos (chinas) del Brasil para el año 2010, se reportó una incidencia de CVC de 35.5% mientras que para el 2011 se reportó una incidencia de 40.3% según los datos del Fondo de Defensa de la Citricultura (Fundecitrus, 2009). La región Norte del País (estado de Sao Paulo) es la zona más afectada con un 59.7% de árboles enfermos seguida por el Noroeste con 52.5%. En la zona montañosa de Puerto Rico el agricultor acostumbra sembrar el cultivo de cafeto intercalado con cítricos, por lo tanto de existir la bacteria *Xylella fastidiosa* bajo estas condiciones podría convertirse en una amenaza seria para estos cultivos.

Los sistemas agroforestales, donde se asocia el cafeto con árboles multipropósito tienen potencial para el manejo y conservación de la biodiversidad dentro de los paisajes agrícolas, ya que al ser agro ecosistemas simplificados pero estables proveen un hábitáculo para la vida silvestre, conservan la biodiversidad, y sirven como zonas de amortiguamiento (U.S. Fish and Wildlife Service, 2009).

A pesar de la viabilidad agroecológica de estos sistemas, muchos de ellos son utilizados inadecuadamente, añadiendo especies que responden a las preferencias de los agricultores en vez de usarse especies forestales en peligro de extinción o que contribuyan con fijación de nitrógeno al sistema. En general, estos sistemas incrementan la productividad total de la tierra agrícola, y sus interacciones ecológicas son importantes para sustentar a la vida silvestre. En Puerto Rico, la caracterización de dichos agro ecosistemas ha sido limitada especialmente desde el punto de vista fitopatológico. Por lo tanto, una caracterización sobre las interacciones biológicas que suceden en el mismo es importante para ofrecer una tecnología amigable con el ambiente, y viable para el caficultor desde el punto de vista económico.

Con estos antecedentes se plantearon los siguientes objetivos:

- 1.- Estudiar la relación entre la clasificación morfológica y bioquímica de cepas de bacterias endofíticas, y la presencia de síntomas de CLS.
- 2.- Aislar, caracterizar y contrastar las poblaciones de bacterias endofíticas en árboles de cafeto bajo condiciones de sombra y sol, en distintas localidades de Puerto Rico.
- 3.- Aislar, caracterizar y contrastar las poblaciones de bacterias endofíticas de árboles de sombra en fincas de cafeto bajo condiciones de sombra, en distintas localidades de Puerto Rico.
- 4.- Generar mapas con la tecnología de Sistemas de Información Geográfica para determinar la distribución espacial de árboles sospechosos de estar enfermos en el agro-ecosistema de cafeto.

Esta investigación fue financiada y forma parte de los objetivos del proyecto ZTS-51 USDA de la Estación Experimental Agrícola (EEA) “Potential effects of *Xylella fastidiosa* on shade coffee establishment in Puerto Rico”, donde se ha planificado conocer el efecto de la sombra en las poblaciones de bacterias endofíticas en cafeto y árboles de sombra utilizados en fincas cafetaleras de Puerto Rico.

REVISIÓN DE LITERATURA

Generalidades del Dominio Bacteria:

El término bacteria fue introducido por Christian Gottfried Ehrenberg en 1828 (Whitman, et al., 1998). Este término fue utilizado para referirse a aquellos microorganismos parecidos a un bastón. Las bacterias habían carecido de definición hasta que en 1962 Stanier y Van Niel publicaron el artículo llamado "The concept of bacterium". En este artículo apareció la articulación dicotómica entre células Procariotas y Eucariotas, siendo este un momento muy importante para la microbiología. (Sapp, 2006).

Hasta hace poco tiempo el estudio taxonómico de las bacterias fue relegado y más bien se habían estudiado determinadas actividades bioquímicas de los grupos bacterianos (Poole y Penny, 2007). De igual manera, durante mucho tiempo se consideró el concepto procariota como un grupo monofilético predecesor de los eucariotas. Este enfoque se mantuvo indiscutible hasta el nacimiento de la biología molecular evolutiva y el desarrollo de métodos coherentes en filogenia bacteriana basados en el estudio de la región 16S de ARN ribosomal (Woese, 1987).

Las bacterias son organismos procariotas más pequeños que los organismos eucariotas y tienen estructura celular simple (Poole y Penny, 2007). La expresión procariota significa que el ADN está organizado en cromosomas sin núcleo o membrana (Lüttge et al., 1993). La célula bacteriana, en la generalidad de los casos es 10 veces más pequeña que una célula eucariota (Schulz y Jorgensen, 2000).

En cuanto a forma de bacterias, los principales tipos son: bacilos (en forma de bastón), cocos (forma esférica) y espirilos. Su forma permanece estable mecánicamente debido a la pared celular la cual le brinda al mismo tiempo protección frente al ambiente (Lüttge, et al., 1993).

Las bacterias se clasifican en base a su estructura celular, metabolismo celular, o en base a diferencias en los componentes celulares como ADN, ácidos grasos, pigmentos, antígenos y quinonas (Thomson y Bertram, 2001). Las bacterias a diferencia de los eucariotas nunca son verdaderamente pluricelulares si bien algunas forman filamentos o masas celulares (Madigan et al., 1998).

Las bacterias generalmente son transparentes (hialinas) por ello no es recomendable su estudio mediante la observación de suspensiones de células en agua (Whitman et al., 1998). El empleo de colorantes permite aumentar el contraste entre la célula bacteriana y el medio ambiente, además a través del empleo de técnicas especiales es posible distinguir algunos de los constituyentes celulares más importantes. Cualquiera sea el procedimiento de tinción, éste produce la muerte de la célula y en cierto modo la alteración de la estructura física de la bacteria (DeLong y Pace, 2001).

La tinción Gram desarrollada en 1884 por Hans Gram permite determinar diferencias muy importantes de la pared celular bacteriana útil para su respectiva identificación (Alcamo, 2001). En base a los resultados de la tinción de Gram, las bacterias que retienen el cristal violeta y aparecen coloreadas de violeta intenso son Gram positivas y aquellas que pierden el cristal violeta y se vuelven a teñir con safranina diluida tomando un color rojo son Gram negativas (Woods y Walker, 1996). Las bacterias Gram positivas generalmente persisten en condiciones ambientales adversas con la formación de endósporas que funcionan como parte de su ciclo biológico. Estas perduran por su resistencia a la desecación como a elevadas temperaturas (Lüttge, et al., 1993).

Las plantas normalmente se encuentran asociadas a una amplia y diversa gama de microorganismos, y sus interacciones pueden ser perjudiciales, neutrales o benéficas; las bacterias endofíticas residen en los tejidos vegetales, y se pueden encontrar endófitos en las cerca de 300,000 especies de plantas que existen sobre el planeta (Strobel et al., 2004). Existen dos criterios para determinar que un organismo es endofítico. El paso inicial consiste en el aislamiento mediante la esterilización superficial del tejido y posterior siembra en medio de cultivo, y la evidencia microscópica del microorganismo marcado en el tejido vegetal (Reinhold y Hurek, 1998). En general, las bacterias endofíticas ocurren en densidades poblacionales bajas (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006). Es conocido también que las bacterias endofíticas ingresan principalmente por la raíz (Ryan et al., 2008) y residen dentro de las plantas causando diversidad de síntomas (Zinniel et al., 2002). Existen numerosas bacterias endofíticas que han sido aisladas del xilema entre ellas la bacteria *Xylella fastidiosa* que es parásita (Purcell y Hopkins, 1996). Sin embargo, la gran mayoría de bacterias endofíticas colonizan un nicho ecológico similar al de los organismos fitopatógenos, por lo tanto algunas cepas resultan potenciales como agentes de control biológico (Berg et al., 2005).

Bacterias Fastidiosas Limitadas al Xilema:

El criterio de bacterias fastidiosas limitadas al xilema (XLFB) se define como aquellas bacterias endófitas parásitas de las traqueidas o los vasos del xilema (Purcell y Hopkins, 1996). Numerosas bacterias se han aislado a partir del xilema pero solo tres de estas bacterias son patógenas de plantas y han sido ampliamente caracterizadas. Dos de ellas *Xylella fastidiosa* y *Pseudomonas syzygii* son transmitidas por insectos, mientras que *Clavibacter xyli* es transmitida de forma mecánica (Purcell y Hopkins, 1996).

X. fastidiosa es la bacteria causante de epidemias de importancia económica en la agricultura. *X. fastidiosa* (Wells et al., 1987) es reconocida como una bacteria nativa de toda América. Está presente en 27 estados de Norte América (Goldberg, 2007), en la cuenca del Caribe, en toda América Central, en el noroeste de Sur América (Purcell, 2005) y en áreas de los trópicos y subtrópicos (Purcell y Hopkins, 1996).

En el Brasil se asocia a la enfermedad de la clorosis variegada de los cítricos (CVC) (Wickert, et al., 2007) con el encorchamiento de la hoja del cafeto “Coffee Leaf Scorch” (CLS) (Lima et al., 1998, Miranda et al., 2007, Paradela Filho et al., 1995). En Costa Rica, la enfermedad causada por la bacteria *X. fastidiosa* en el cafeto se la conoce como crespura (Rodríguez, et al., 2001). Antes de ser reportada por primera vez en el Brasil, plantaciones extensivas de cafeto fueron eliminadas. Sin embargo, la baja producción y el deterioro de las plantaciones no se asociaba completamente a la influencia de la bacteria sino que atribuían la sintomatología a otras enfermedades del cafeto como minador (*Perileucoptera coffeella* Guein. & Meneville), roya (*Hemileia vastatrix* Berk & Br.) estrés hídrico o destrucción del sistema radicular por nematodos (Lima et al., 1998).

La incidencia de CVC en Brasil aumentó de 35.5% en el 2010, a 40.3% en el 2011, siendo una seria amenaza para la industria citrícola de este país. La enfermedad CVC ha sido observada en todas la variedades de naranja (chinas) conocidas (Denecke, 2005). Sin embargo, ciertos cultivares exhiben diferentes grados de severidad. “Valencia” muestra una alta reducción en el rendimiento por causa de la bacteria. Además, el naranjo dulce, el naranjo amargo (*Citrus aurantium*) y la mandarina (*Citrus reticulata*) son susceptibles al CVC.

CVC no ha sido confirmada en Norte América. Sin embargo, el vector se ha informado en Florida y todos los cultivares de cítrico que se siembran en este estado son susceptibles a la enfermedad (Brodbeck et al., 2011). De ahí que la introducción del agente causal de la enfermedad podría ser devastador para la producción de cítricos en Estados Unidos (Harmon y Schubert, 2007). Por lo tanto, la mejor alternativa de controlar la enfermedad es evitar la entrada del patógeno a través de programas de certificación, medidas cuarentenarias y educando a los productores.

Por mucho tiempo el agente causal de CVC y CLS se consideró de tipo viral, hasta que en 1970 se observaron con microscopía electrónica vasos del xilema obstruidos por bacilos. La supresión de la enfermedad usando tetraciclina permitió descartar la hipótesis de origen viral (Aguilar et al., 2008). La bacteria fue nombrada primeramente como ‘Fastidious xylem limited bacterium (FLXB)’. Luego, Wells et al., (1987) propusieron el nombre de *X. fastidiosa* para esta bacteria y caracterizaron la bacteria como Gram negativa, limitada al xilema, y que ataca a un amplio rango de huéspedes que incluyen a dicotiledóneas y monocotiledóneas.

Debido a su importancia como factor limitante en la industria de la citricultura brasilera *Xylella fastidiosa* fue la primera bacteria de la cual se obtuvo la secuenciación completa de su genoma (Wickert, et al., 2007).

La bacteria es más pequeña si se compara con otras bacterias fitopatógenas (0.2-0.5 por 1.0- 4.0 μm) es de reacción Gram negativa y de apariencia rizada (Wells et al., 1987). *X. fastidiosa* es una bacteria no-flagelada, limitada al xilema, y pertenece a la familia *Xanthomonadaceae*.

Davis, et al. (1978) cumpliendo con los postulados de Koch determinaron que el agente causal del ‘Pierce disease’ de la vid es *X. fastidiosa*. Actualmente la vid y los cítricos son los cultivos de valor agronómico más afectados por *X. fastidiosa* (Brown et al., 2002).

Varios patotipos de *X. fastidiosa* se han reportado como fitopatógenos, diferenciándolos a través de metodologías como ELISA, microscopía de contraste de fase y de fluorescencia, crecimiento en medios de cultivo específicos, y amplificación de segmentos genómicos específicos usando PCR (Minsavage et al., 1994).

La infección de la bacteria *X. fastidiosa* en cultivares susceptibles de vid causa oclusión de los vasos del xilema por la formación de agregados bacterianos, gomas y “tilosas” (Fritschi et al., 2008). Del Rio et al., (2002) mostraron que las tilosas se originan a partir de células parenquimatosas adyacentes al xilema, debida a cambios producidos en la pared celular y está asociada con la acumulación de estructuras polifenólicas cristalinas y taninos.

La enfermedad del acorchamiento de hojas del cafeto (CLS) causa síntomas de enanismo y amarillamiento de las hojas principalmente en las copas de los árboles, acortamiento de entrenudos, reducción del vigor y del crecimiento, y por último la muerte del árbol (Lima et al., 1998). En cafetales de la zona central de Costa Rica se han observado síntomas severos de CLS en las variedades ‘Caturra’ y ‘Catuaí’, encontrándose reducción del tamaño y malformación de hojas, acortamiento de entrenudos, flores y granos inmaduros abortados, y mosaicos severos que terminaban en necrosis. Luego de realizar los análisis serológicos (ELISA), se confirmó y se reportó por primera vez la presencia de la bacteria *X. fastidiosa* en Costa Rica (Rodríguez, et al., 2001).

Varias hipótesis se han sugerido acerca de la patogenicidad de *X. fastidiosa*, siendo la primaria la acumulación de la bacteria y de sus exudados en los vasos del xilema, lo cual no permite que los minerales y el agua que absorbe la planta lleguen a las hojas y a otros órganos (Souza et al., 2006). Sin embargo, otras hipótesis están relacionadas a la biosíntesis de proteínas y alteraciones en los niveles hormonales (Hayward y Mariano, 2006).

La bacteria se transmite a través de insectos vectores pertenecientes al orden Homoptera familia *Cicadellidae*, tribus Cicadellini y Proconiini (Redak et al., 2004). El vector es muy eficiente debido a que el período de latencia (desde que el insecto adquiere la bacteria hasta que la transmisión es viable) es muy corto, por ejemplo en *Graphocephala atropunctata* es de solo 2 horas y tienen potencial para transmitir la bacteria en forma semipersistente (Purcell y Finlay, 1979). El hábito alimenticio de los saltones de hoja es generalista y han sido reportados en una amplia gama de hospederos que incluyen plantas leñosas y herbáceas (Lopes et al., 2003).

Los saltones de hojas vectores de *X. fastidiosa* tienen su nicho de alimentación en la savia del xilema, por esta razón son insectos muy exitosos dentro de los ecosistemas porque tienen baja competencia (Purcell y Hopkins, 1996). En un estudio realizado en Puerto Rico por Mariño-Cárdenas y Zapata (2009) determinaron como especies predominantes y vectores potenciales a: *Agallia pulchra*, *Apogonalia* spp., *Caribovia coffeacola* y *Hortensia similis*, este último es muy abundante en áreas de baja humedad y puede ser encontrado desde el nivel del mar hasta praderas de montaña (Caldwell y Martorell, 1952).

Identificación de Bacterias:

La identificación de una bacteria es su asignación a un taxón según las características fenotípicas y/o genotípicas y la comparación de estas características con los diferentes taxones (Bou et al., 2011). Las características a determinar y su número depende principalmente del tipo de bacteria y del fin que se persigue en la identificación.

Existen pruebas de utilización y oxidación de distintas fuentes de carbono (BIOLOG[®], 2001) utilización de fuentes de nitrógeno, producción de enzimas y otras sustancias que se excretan al medio de cultivo durante el crecimiento, requerimiento de nutrientes adicionales, crecimiento en medios de cultivo especiales, utilización de sustratos poco frecuentes, crecimiento a diferentes niveles de pH y temperaturas, etc. Para observar los resultados de las distintas pruebas bioquímicas existen diversas técnicas. En muchos casos el cambio de pH subsecuente a la utilización de un sustrato o a la acción de una enzima es el modo más sencillo y rápido de comprobar el resultado, incorporando un indicador al medio de cultivo (Schaad et al., 2003).

Diagnóstico de Enfermedades Causadas por Bacterias Fitopatógenas:

Para el diagnóstico de bacterias fitopatógenas se necesita un enfoque integrado, debido a la gran variabilidad genotípica y fenotípica de las mismas. Las herramientas para el diagnóstico son varias como por ejemplo observación de síntomas, microscopía, cultivo, técnicas moleculares y serológicas. El uso de técnicas moleculares para la detección resulta útil por la sensibilidad, especificidad, confiabilidad y ahorro en el tiempo del procedimiento (Alvarez, 2004).

La mayoría de las bacterias fitopatógenas se diseminan por material propagativo o semillas. De ahí que los protocolos que se siguen para su diagnóstico y detección, están basados en el aislamiento de las mismas a partir de semillas o extractos de plantas en medios semiselectivos, seguido por la identificación de las colonias por sus características morfológicas y fisiológicas seguido por las pruebas de patogenicidad.

Con ciertas bacterias el diagnóstico preliminar es fácil y eficiente, basándose en el uso de compendios de enfermedades que atacan a los cultivos y revisando la sintomatología. El inconveniente de estas guías es que las listas de patógenos deben mantenerse al día en base a los cambios en la taxonomía bacteriana o los avances en la investigación de los posibles agentes causales. Aunque los compendios son excelentes recursos conllevan al riesgo de la simplificación y considerar que ciertas enfermedades son causadas por ciertos agentes causales cuando en realidad no lo son (Alvarez, 2004).

Existe una necesidad de reemplazar las pruebas largas y costosas que se realizan con plantas por métodos seguros y rápidos para la detección. En este aspecto, muchas compañías se han dedicado a la producción de “kits” comerciales. Además, se observa un movimiento hacia el desarrollo de protocolos basados en ADN, siendo los métodos de inmunodiagnóstico investigados en menor magnitud (Schaad et al., 2003).

El proceso de detección de bacterias patogénicas por inmunodiagnóstico se basa en que las bacterias poseen en su superficie una variedad de moléculas antigénicas como proteínas, lipopolisacáridos, y polisacáridos extracelulares, los cuales se utilizan para producir antisueros policlonales (Macario, 1985). Estos tienen especificidad múltiple por lo cual las reacciones cruzadas son comunes. Desde el desarrollo del hibridoma, se direccionó la producción de anticuerpos monoclonales de mayor especificidad, que pueden seguir el movimiento de cepas específicas que se originan de diferentes fuentes de inóculo en estudios epidemiológicos.

La inmunoespecificidad de las cepas a ciertos anticuerpos monoclonales ha sido usada para estudios taxonómicos como por ejemplo, la bacteria *Pseudomonas syringae* (Ovod et al., 1997). Si se utilizan anticuerpos monoclonales o anticuerpos policlonales para ensayos de detección estos pueden desarrollarse bajo técnicas tal como conjugados enzimáticos (ELISA enzyme linked immunosorbent assay), western blot, inmunofluorescencia, o la inmunofluorescencia de colonias teñidas (IFC).

El procedimiento de ELISA usando anticuerpos monoclonales y policlonales, se utiliza para varias especies de bacterias fitopatógenas, y se han generado kits comerciales para su detección. La sensibilidad del ELISA que va desde 10^5 a 10^6 UFC/ml es adecuada para la identificación de patógenos bacterianos de plantas sintomáticas y de colonias aisladas en medios de cultivo semiselectivos (Jones et al., 1997). Si se usan amortiguadores de extracción que contengan EDTA (ácido etileno diamino tetra acético) y una lisozima, la sensibilidad del ELISA puede incrementarse en 10 veces (Alvarez, 2004).

Los dispositivos de flujo lateral usan principios similares a los del ELISA, con varios filtros que son usados como un soporte sólido para la reacción inicial de unión enzima-sustrato. Los más comunes son los inmunostrips (rapid immunodetection paper assay) que se comercializan para bacterias como *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii*.

Los ensayos de inmunofluorescencia son de uso generalizado en Europa para la detección de bacterias fitopatógenas en semillas y material propagativo, comúnmente usado para las bacterias *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensis* subsp *sepedonicus* (Van der Wolf y Schoen, 2004).

La citometría de flujo es un proceso mejorado de inmunodiagnóstico. Esta es una técnica rápida de identificación y detección de células bacterianas así como de otras partículas que pasan a través de un sensor que las identifica (Van der Wolf et al., 2004). Las células son identificadas por tintes fluorescentes que se conjugan a anticuerpos específicos y dan ciertas mediciones de parámetros específicos debidos a la refracción del tinte al pasar por el sensor. Se ha aplicado para *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*, *Xanthomonas axonopodis* pv *dieffenbachiae*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, y *Ralstonia solanacearum*.

La separación inmunomagnética consiste en usar bolitas electromagnéticas impregnadas de anticuerpos que pueden unirse a células objetivo. Estas bolitas luego pueden ser usadas para PCR o siembra en medios semi-selectivos (Van der Wolf et al., 1997).

La hibridación genómica, especialmente de la región 16S rRNA mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para la subsecuente secuenciación y comparación de la molécula con las secuencias almacenadas en los bancos de genes, es el método más común para detección de bacterias de mezclas heterogéneas o para parásitos obligados. El método fue desarrollado por Pace con sus colegas, y la estrategia consiste en explotar la clonación y secuenciación de ácidos nucleídos para obtener información de la diversidad microbiana (Sthal, et al., 1985). Otras metodologías moleculares incluyen la hibridación genómica, los “dot-blots”, y la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA) por sus siglas en inglés.

El propósito de una diagnosis rápida es confirmar la presencia de un patógeno para establecer las medidas de control pertinentes (Alvarez, 2004). Este proceso se vuelve crítico en ciertos cultivos donde la enfermedad puede ser muy agresiva, o donde las condiciones predisponen el desarrollo de una epidemia. Es necesario que la identificación del patógeno se realice en estados tempranos del desarrollo de la enfermedad.

En el momento de realizar el diagnóstico de una enfermedad que es causada por bacterias, se debe determinar la necesidad de realizar cultivos; a medida que los ensayos moleculares o serológicos sean más precisos esta necesidad irá disminuyendo. Sin embargo, no cabe duda de que los aislamientos en medios de cultivo semiselectivos y las pruebas de patogenicidad constituyen la herramienta de validación de dichos ensayos (Alvarez, 2004).

El crecimiento en medio de cultivo es una herramienta presuntiva de las bacterias que están causando una enfermedad. El conocimiento de la morfología de las colonias, color, forma, margen, elevación, el tiempo de incubación son herramientas útiles para discriminar posibles agentes causales de contaminantes (Alvarez, 2004). Ciertas pruebas bioquímicas simples como reacción de catalasa y oxidasa, además del crecimiento en cultivos específicos o con agentes inhibidores puede ser una alternativa válida en el proceso de diagnóstico y detección de bacterias patogénicas.

La confirmación final de un agente fitopatógeno lo constituye la prueba de patogenicidad, pero esto requiere tiempo, germoplasma, condiciones óptimas y controles. Para ciertos patógenos la reacción de hipersensibilidad en tabaco puede ser una excelente opción, pero es necesario considerar que no todos los patógenos la generan o pueden generar una reacción leve (Alvarez, 2004). También resulta impráctica cuando el patógeno o ciertas cepas del patógeno requieren un periodo de incubación largo para generar síntomas. Otras pruebas de confirmación alternativas a las pruebas de patogenicidad son ensayos inmuno diagnósticos y de análisis de ADN, siendo necesario que la información referente a los organismos en experimentación se encuentre en las bases de datos.

A pesar de la alta especificidad de la técnica de PCR, se observa que las pruebas serológicas presentan menor error de falsos positivos en comparación a estas porque a veces los iniciadores o iniciadores específicos pueden no serlo por ciertas reacciones cruzadas que pueden ocurrir.

La integración de la información generada durante el diagnóstico permite establecer estudios filogenéticos y de comparación genómica, ya que es necesario saber los orígenes de los agentes causales para poder establecer medidas cuarentenarias u otras estrategias de control (Alvarez, 2004).

No solo se puede confiar en una prueba de laboratorio o en una prueba molecular para confirmar que el agente ensayado constituye el causante de la enfermedad. La validación de los métodos de serología y técnicas moleculares como la PCR, requieren de muchos años de perfeccionamiento en la especificidad, y deben realizarse en una colección internacional de cepas de una bacteria específica (Alvarez, 2004).

Además, resulta imprescindible usar un método correcto de muestreo que represente la realidad de lo que está ocurriendo en el campo. En programas de certificación fitosanitaria, es necesario contar con datos del desarrollo de la epidemia para determinar estados de infección.

Filogenia Molecular:

Los estudios filogenéticos de los microorganismos son muy importantes porque nos permiten conocer como se relacionan evolutivamente, en el caso de agentes fitopatógenos con sus vectores y sus hospederos.

La bacteriología moderna ha realizado énfasis en la clasificación, usando técnicas como la determinación de la razón G/C (guanina-citosina), cuantificando la variación proporcional de estos componentes en una cepa específica, la hibridación genómica especialmente de la región 16S rRNA mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para la subsecuente secuenciación y comparación de la molécula, y la realización de los estudios filogenéticos moleculares (Ciccarelli, et al., 2006).

La función del ribosoma es traducir la información que codifica el RNA mensajero (mRNA) para la síntesis de proteínas. El ribosoma procariota está compuesto por dos subunidades de 30S y 50S, y cada una está constituida por subunidades de rRNA y polipéptidos. La subunidad pequeña (SSU) 30S consiste de una molécula de 16S rRNA y 21 cadenas de polipéptidos, mientras que la subunidad grande 50S consiste en una de 5S y otra de 23S con 34 cadenas de polipéptidos (Ciccarelli, et al., 2006). La zona 16S rRNA (SSU) está directamente relacionada a la iniciación y la terminación de la translación (Snyder y Champness, 1997), es una región altamente conservada y es moderadamente variable para la detección de las relaciones evolutivas.

La caracterización del gen 16S rRNA es estándar para establecer relaciones filogenéticas y esta zona permite la identificación de familia, género y especie de individuos pertenecientes al Dominio Bacteria (Ward, 2002). La comparación de las regiones secuenciadas pertenecientes al gen 16S rRNA es usada en la ecología microbiana y en la fitopatología, porque provee suficiente información para el análisis de relaciones filogenéticas cercanas y distantes entre bacterias (DeLong y Pace, 2001).

El Cultivo del Cafeto:

El cafeto pertenece a la familia *Rubiaceae*, y tiene su centro de origen en Etiopía en el nororiente de África. Existen más de 70 especies (Denecke, 2005) de las cuales *arabica* y *canephora* son ampliamente cultivadas a nivel mundial.

En Puerto Rico, el cultivo del cafeto es importante desde el punto de vista económico ecológico y social. En los últimos años diversos factores han causado el incremento de los costos de producción: insumos, escasez de mano de obra, regulaciones ambientales, y el control de la broca del cafeto, *Hypotenemus hampei*, *Coleoptera: Scolytidae* (Flores, 2011)

El cafeto se siembra generalmente bajo dos sistemas: a sol y bajo sombra. Datos históricos indican que en Puerto Rico el cafeto bajo sombra incrementó de 7000 ha en 1828 a cerca de 77,000 ha en los inicios del siglo XX (Vicente-Chandler, 1968). A finales de los años 50 algunas plantaciones fueron abandonadas principalmente por la falta de renovación de las plantaciones que conllevó a tener plantaciones con árboles viejos (más de 30 años) y al desconocimiento de la composición y densidad necesaria para la sombra, que conllevó a tener plantaciones bajo sombra densa con la consecuente baja producción de los cafetos establecidos.

Posteriormente en la década del 60 y 70, empezó el establecimiento del paradigma de la “revolución verde” planteado por Norman E. Borlaug. Siguiendo este paradigma el Departamento de Agricultura de Puerto Rico comenzó a promocionar el cafeto bajo sol, con germoplasma mejorado, mayores densidades de siembra, altas dosis de fertilizante y enclamiento y control químico de malezas plagas y enfermedades (Arango-Argoti, 2007).

Los problemas asociados a la siembra de cafeto a sol son: deforestación, pérdida de hábitculo para la vida silvestre y aves migratorias, erosión y pérdida de la capa arable de los suelos, pérdida de germoplasma nativo por el establecimiento de variedades de alto rendimiento entre otros.

Una alternativa al modelo del cafeto a sol es el modelo de cafeto bajo sombra; bajo estos sistemas agroforestales de alto dinamismo, basados en principios ecológicos, se diversifica la producción, y se generan beneficios a nivel ambiental, económico y social (Nair et al., 2009).

Los sistemas agroforestales permiten simular las condiciones y relaciones ecológicas naturales del bosque nativo, combinando componentes forestales con agricultura; así se puede conservar y mejorar sosteniblemente la capacidad productiva de los suelos, mantener una diversidad biótica, y tener una productividad más alta (Ekkehard, 1992).

Tanto la investigación reciente, como las experiencias de los agricultores de muchas partes del mundo, demuestran que los agro-ecosistemas de cafeto bajo sombra tienen un gran potencial para la conservación de especies tropicales de plantas y animales, además de producir cafeto de muy buena calidad (Mendez y Bacon, 2007).

Los sistemas agroforestales, donde se asocia el cafeto con árboles sembrados en forma planificada, pueden ser una solución potencial para el manejo y conservación de la biodiversidad dentro de los paisajes agrícolas. La caracterización de los sistemas agroforestales debe brindar elementos de análisis para la toma de decisiones en la composición, arreglo, manejo, productos y servicios agroforestales (Ospina, 2006).

Aproximadamente un 30% de las explotaciones cafetaleras ubicadas en el país se encuentran sometidas a un manejo bajo árboles de sombra (Schröder, E. comunicación personal) con predominancia de árboles de la familia Leguminosae (*Inga* sp., *Erythrina* sp., *Cajanus cajan*, *Gliricidia* sp., entre otras). Además se utilizan bananos (*Musa* sp.), cítricos (*Citrus* sp.), y especies maderables como Moca (*Andira inermis*), roble (*Quercus* sp.), laurel (*Cordia alliodora*) con el mismo fin.

Algunos estudios se han llevado a cabo sobre la factibilidad ecológica del cafeto bajo sombra; recalcando la importancia de este agro-ecosistema como refugio para las aves migratorias. Los estudios de la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia indican que en la región andina han registrado 290 aves entre migratorias y residentes en estos agro-ecosistemas, al menos 32 especies migratorias de Norteamérica usan el área cafetalera como corredores biológicos hacia bosques nativos (The Nature Conservancy, 2011).

Las regiones de Mesoamérica, Islas del Caribe y Colombia poseen habitáculos importantes de descanso y alimentación para las aves migratorias. Estas aves son solo uno de los grupos de organismos que habitan en las fincas de cafeto con sombra, ciertos insectos, anfibios, y plantas como orquídeas, se refugian en este habitáculo debido a la falta de bosques primarios y secundarios (Philpott et al., 2008).

A pesar de las ventajas ecológicas que presenta la alternativa de siembra de cafeto bajo sombra, existe una disminución en la producción cuando se siembra de esta manera. Vicente-Chandler et al., (1968) reportaron que los rendimientos de cafeto se reducen aproximadamente en un 40% cuando se utilizaba 30% de sombra en los cafetales.

Árboles Asociados al Cultivo de Cafeto:

Cítricos:

Los sistemas de cafetos bajo sombra generan una gran cantidad de productos agrícolas en adición al café (U.S. Fish and Wildlife Service, 2009). En los policultivos tradicionales de los agricultores de Puerto Rico, ellos asocian los cítricos al cultivo del cafeto.

La ventaja de la asociación del cítrico al sistema de cafeto bajo sombra es que aportan biomasa al sistema, aportan un ingreso adicional al agricultor, ayudan a controlar las malezas debajo del cultivo, además de las ventajas ecológicas asociadas al policultivo tradicional.

En el caso del sistema cafeto-cítrico donde la salida del nitrógeno por cosecha es mayor, si la cantidad de fertilizante es la misma que la aplicada en el sistema cafeto-leguminosa, se esperaría que las reservas de nitrógeno disponibles sigan disminuyendo del suelo; por lo tanto estos sistemas de multipropósito deben ser estudiados desde los puntos de vista agronómico de calidad de suelos y fitopatológico.

Existen bacterias endófitas en los cítricos que al colonizar nichos ecológicos similares con los agentes fitopatógenos y pueden interactuar con ellos. Las investigaciones han mostrado que algunos microorganismos endófitos aislados de tejidos vegetales desinfectados superficialmente exhiben potencial como biocontrol contra los fitopatógenos (Lacava et al., 2004).

En el trabajo realizado por Lacava et al., (2004), al aislar endófitos a partir de ramas y hojas del naranjo encontraron a las bacterias *Bacillus pumilus*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Enterobacter cloacae*, *Methylobacterium extorquens*, *M. mesophilicum*, *Nocardia* sp., *Pantoea agglomerans*, *Streptomyces* sp. y *Xanthomonas campestris*. Estos autores encontraron también que la comunidad de endófitos aislados a partir de hojas fue mayor que en ramas, lo que sugiere que estas últimas son un nicho preferencial para las bacterias endofíticas en las naranjas y mandarinas.

Araujo et al., (2002) y Lacava et al., (2004) encontraron una interacción entre *Methylobacterium* spp., y los síntomas de CVC. La bacteria *Curtobacterium flaccumfaciens* también mostró potencial antagonista contra *Xylella fastidiosa*.

Leguminosas:

Los árboles utilizados para dar sombra al cultivo del cafeto pueden jugar un papel muy importante en el ciclo del nitrógeno, debido a que aportan cierta cantidad de N al suelo a través de la caída de hojarasca, la producción de residuos de raíces y la fijación biológica para el caso de leguminosas (Roskoski, 1982). De esta forma, representan un factor importante para el mantenimiento de la fertilidad de los suelos y la sostenibilidad del sistema.

Dentro de las leguminosas utilizadas como sombra en el cultivo de cafeto en Puerto Rico están *Inga vera* y *Andira inermis* que junto con los cítricos sumaban el 52.5% del índice de importancia (Arango-Argoti, 2007). El cafeto bajo sombra permite una eficiencia fotosintética mayor que a pleno sol, debido a que ésta disminuye cuando en la superficie de las hojas alcanza una temperatura de 25°C, mientras que en el sistema a pleno sol la temperatura de las hojas alcanza 35-45°C en aquellas localizadas en el tercio superior del árbol.

Las especies del género *Inga* sp. son importantes para el sistema no solo por la sombra que proporcionan a los cafetos, sino también porque pueden compensar las exportaciones de N requeridos en la obtención de cafeto (Aranguren et al., 1982). Roskoski (1982) reportó una fijación de nitrógeno de más de 40 kg /ha año en cafeto con sombra de la leguminosa *Inga jinicuil*, equivalente al 53% de la cantidad de fertilizante nitrogenado aplicado anualmente.

Las ventajas que tienen los sistemas agroforestales de cafeto bajo sombra con *Inga* sp., son una reducción en la emergencia de malezas, ahorrando el gasto de la limpieza anual de malezas (Romero et al., 2001). Por muchas décadas la simplificación de los sistemas agroforestales bajo sombra se han idealizado como modelos que incrementan los niveles de producción del cafeto.

En países cafetaleros como México, los productores reemplazan los sistemas de alta diversidad por sistemas de baja diversidad y usan solo *Inga* sp. Esta práctica se supone que provee ciertas ventajas como mayor fijación biológica de nitrógeno. Sin embargo, el efecto de los diferentes sistemas es poco conocido (Perfecto et al., 1996).

Romero et al., (2001) en un estudio agroecológico, encontraron que no hubo efecto del tipo de sombra al comparar sistemas de baja diversidad con *Inga* sp. y sistema de alta diversidad en cuanto a la cantidad de grano producida y en los nutrientes del suelo. Se encontró también que la materia orgánica en los sistemas de alta diversidad, se correlacionó positivamente con el nitrógeno total, indicando que la adición de biomasa en los sistemas de alta diversidad es mayor en relación a un sistema de baja diversidad de *Inga* sp.

Además, un sistema de alta diversidad se puede certificar como sistema amigable con las aves migratorias. Sin embargo un estudio realizado en Hawái con árboles de cafeto asociados con *Leucaena* sp. mostró que el tamaño del grano se incrementaba en los tratamientos con sombra versus el testigo a sol, demostrando que el sistema de producción con *Leucaena* era óptimo tanto por la productividad como por el tamaño del grano obtenido (Youkhana, 2010).

MATERIALES Y MÉTODOS

Lotes Experimentales:

Se seleccionaron parcelas experimentales sembradas con una variedad de cultivares de cafeto de aproximadamente 5 a 6 años de edad, todas fueron de la especie *Coffea arabica*. Se obtuvieron muestras de los cultivares: Catuai, Catimor, Caturra (Puerto Rico), Mundo Novo, Borbón, Limani, Libérico, y selección Paca. Para los árboles multipropósito, se tomaron muestras de Guaba o Guamá (*Inga* sp.), Moca (*Andira innermis*), *Gliricidia* sp. y *Citrus* sp.

Las parcelas de sombra y a sol de Jayuya y Yauco se ubicaron a mayor altitud, frente a las parcelas de Las Marías que se ubicaron a menor altitud (tabla1)

Tabla 1.- Altitud de las fincas de cafeto muestreadas de Puerto Rico.

Localidad	Tipo de sombra	m.s.n.m ¹
Adjuntas	Alta diversidad	637
	Baja diversidad	779
	A Sol	757
Jayuya	Alta diversidad	816
	Baja diversidad	947
	A Sol	891
Las Marías	Alta diversidad	563
	Baja diversidad	445
	A Sol	542
Yauco	Alta diversidad	946
	Baja diversidad	935
	A Sol	918

¹Metros sobre el nivel del mar obtenidos con el GPS Garmin CS 60 (Olathe, Kansas, USA).

Estudio I: Muestreo de Bacterias de Árboles Sintomáticos y Asintomáticos.

Diseño Experimental y Muestreo de Árboles:

En un primer estudio se tomaron muestras de árboles asintomáticos y sintomáticos de cafeto con el fin de caracterizar y contrastar las bacterias endofíticas aisladas a partir de estos en condiciones de campo. La sintomatología que se buscó fue ramificación anormal con acortamiento de ramas y entrenudos, lignificación y hojas pequeñas, dando la apariencia de escobilla de bruja o roseta.

El muestreo se realizó sobre 66 árboles de cafeto de los cuales 26 presentaron síntomas y 40 fueron asintomáticos, en el período entre febrero – agosto 2010, visitando fincas con varios tipos de manejos de sombra y a sol, en cuatro localidades (i) Adjuntas, (ii) Jayuya, (iii) Las Marías y (iv) Yauco. De cada árbol se recolectaron cinco hojas para obtener las nervaduras y tres ramas de 5 a 6 cm de largo.

Procesamiento de Muestras:

Las muestras se procesaron en el laboratorio de Bacteriología del Departamento de Cultivos y Ciencias Agro-ambientales, Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez. Las ramas y nervaduras de las hojas se lavaron con jabón líquido diluido y se eliminaron todo tipo de insectos y epífitas con la ayuda de cepillos estériles.

Las muestras se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 0.0525 % durante un minuto, 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 de extracción (ClNa 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, Almidón de papa 2 g/l, L-Histidine HCl 1 g/l, L-glutamina 4g/l, Suero bovino con albumina 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 15mm con medio PW sólido. Las placas se incubaron a 28 °C y el crecimiento de las bacterias fue evaluado por un mes.

Se purificaron las colonias que crecieron, transfiriéndolas tres veces consecutivas; para ello se escogió una colonia representativa de acuerdo a su frecuencia, forma de la colonia, forma del margen, elevación y color.

Se evaluó el crecimiento de todas las cepas en medio Trypticase Soya Agar (TSA) caseína de digestión pancreática 7.5g/l, soya de digestión enzimática 2.5g/l, cloruro de sodio 2.5g/l y agar 7.5g/l (Becton Dickinson, Maryland, USA). Se asignaron códigos numéricos a las cepas purificadas.

Se contabilizaron las colonias viables en placa (que representa a un árbol muestreado) y se generaron los valores de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml). Los datos de UFC/ml obtenidos en nervaduras de las hojas y ramas 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 determinaron el número total de cepas fenotípicamente diferentes por placa que corresponde a un árbol (una medida de diversidad).

Caracterización Morfológica y Bioquímica de las Poblaciones Bacterianas:

Las cepas bacterianas se caracterizaron morfológicamente tomando datos de morfología celular, cambio de color del medio PW, margen, borde, configuración, color y diámetro de las colonias (Schaad et al., 2001). Para la caracterización bioquímica se realizaron las siguientes pruebas: prueba de hidróxido de potasio (KOH) al 3% (prueba indirecta de la reacción Gram), catalasa que distingue bacterias aeróbicas versus anaeróbicas y la prueba de oxidasa que distingue entre bacterias entéricas versus no entéricas. La prueba de tinción de esporas se realizó en ciertas bacterias Gram-positivas.

Análisis Estadístico:

Para determinar si hubo asociaciones entre cepas de comportamiento fastidioso frente a la sintomatología se utilizó la prueba de chi cuadrada. Cepas de comportamiento fastidioso fueron: Gram negativa (Gram-), sin capacidad de ser cultivada en medio TSA (TSA-) y con capacidad de ser cultivada en medio (PW+). Los datos analizados con chi cuadrada fueron los conteos de cepas de comportamiento fastidioso versus el resto de cepas, clasificados como presentes en árboles sin versus con síntomas.

Los datos de log UFC/ml y el número de cepas fenotípicamente diferentes por placa fueron analizados usando análisis de varianza (ANOVA). El modelo fue un diseño completamente aleatorizado con dos tratamientos sin y con síntomas

Estudio II: Efecto de Año, Época, Localidad y Tipo de Sombra.

Diseño Experimental y Muestreo de Árboles:

Para contrastar las poblaciones de bacterias endofíticas aisladas de árboles de cafeto y árboles de propósito múltiple según la localidad, manejo de sombra, época y año, se realizó un segundo estudio en las mismas localidades donde se desarrolló el estudio I.

En cada localidad se identificaron tres fincas con tres diferentes tipos de manejo (i) sombra con alta diversidad de especies, (ii) sombra con baja diversidad de especies, y (iii) a sol. En cada finca se definieron cinco parcelas (repeticiones). Se utilizó un GPS Garmin CS60 (Garmin International, Olathe, Kansas, USA) 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. El muestreo se realizó en la época seca (diciembre a mayo) y en la época lluviosa (junio a noviembre) en dos años (año 1: mayo 2010- junio 2011; año 2: junio 2011-mayo 2012).

En cada fecha de muestreo dentro de cada parcela, se seleccionó un árbol de cafeto, uno de *Inga* sp. y uno de *Citrus* sp. excepto en las parcelas del manejo a sol donde solo se seleccionaron cafetos. De cada árbol se recolectaron cinco hojas para obtener las nervaduras y tres ramas de 5 a 6 cm de largo. Además se muestrearon árboles de otras especies cuando estuvieron presentes como Moca, Gliricidia y Carbonero.

Para cafeto se colectaron muestras que presentaban síntomas como: ramificación anormal con acortamiento de ramas y entrenudos, lignificación y hojas pequeñas dando la apariencia de escobilla de bruja y algunos de roseta. Para los árboles de propósito múltiple se colectaron muestras con síntomas como marchitez apical, muerte descendente, moteado, amarillamiento intervenal y daño de insecto.

Para caracterizar las parcelas y obtener ciertos datos generales de las localidades en estudio, se utilizó un GRS densitometer (Arcata, California, USA) con el fin de medir el porcentaje de cobertura de la sombra sobre el cafeto. Se midió la irradiación recibida con el digital light meter Extech modelo LT 300 (Waltham, Massachusetts, USA). Además se usaron tarjetas “logtag recorders” de la compañía MicroDAQ, Ltd. (Contoocook, New Hampshire, USA) con el fin de colectar datos de temperatura en el campo.

Procesamiento de Muestras:

Las muestras se procesaron siguiendo el mismo protocolo que el detallado en el estudio I.

Caracterización Morfológica y Bioquímica de las Poblaciones Bacterianas:

Las cepas bacterianas se caracterizaron siguiendo el mismo protocolo que el detallado en el estudio I.

Análisis Serológico:

Se utilizó el ‘Pathoscreen Kit’: DAS-ELISA para *X. fastidiosa* (Agdia Elkhart, Indiana, USA). Este ensayo se aplicó a un grupo de las bacterias Gram negativas y a las nervaduras y ramas de cafeto, *Inga* sp. y *Citrus* sp., muestreados que presentaron la sintomatología de acortamiento de entrenudos, amarillamiento, hojas deformes, ramificación anormal, marchitamiento y muerte descendente, amarillamiento intervenal y daño de insecto. El protocolo que se utilizó correspondió al de la casa comercial con las siguientes modificaciones:

Se tomaron cinco nervaduras principales de las hojas y tres ramas, se maceraron separadamente en una proporción (tejido:10 amortiguador). El amortiguador fue “general extraction buffer” GEB (sulfito de sodio 1.3 g/l polyvinylpyrrolidone 20 g/l, azida sódica 0.2 g/l, albumina de huevo 2 g/l y Tween-20 20 g/l). Las muestras se cernieron con una malla fina (cheese cloth) y se centrifugaron a 4000 rpm por 5 minutos.

Para los cultivos bacterianos se crecieron durante 48 horas o más dependiendo del período de incubación, se diluyeron 1ul en 500 ul de GEB se agitaron en vortex por 5 segundos y se incubaron por una hora, agitándose cada media hora, se colocaron 100 ul de muestras y de los controles en los pocillos. Desde aquí, se continuó con el protocolo de la casa comercial.

Se examinó la placa para ver cambios en color, a una longitud de onda de 650 nm. Se consideraron resultados positivos aquellos de color azul con absorbancia mayor a 0.7 A.

Análisis Estadístico:

Los datos de UFC/ml, el número total de cepas fenotípicamente diferentes por árbol fueron analizados usando ANOVA. Se analizaron los datos de cada especie (cafeto, Inga y cítrico) separadamente. Para cada una de las cuatro combinaciones de época y año, se utilizó un modelo completamente aleatorizado con cinco repeticiones con un arreglo factorial de tres tipos de sombra (sombra de alta diversidad, sombra de baja diversidad y control a sol) por cuatro localidades (Adjuntas, Jayuya, Las Marías y Yauco). Adicionalmente, para cada localidad se realizó ANOVA en modelo completamente aleatorizado con un arreglo factorial de tres tipos de sombra por dos épocas (sequía y lluvia) por dos años (2010-2011 y 2011-2012). Además se utilizó la prueba de t pareada para determinar si existieron diferencias en los niveles de UFC/ml y cepas/ árbol obtenidos de nervaduras de hojas versus ramas.

Se utilizó prueba de chi cuadrado para determinar si existió asociación entre las cepas de características fastidiosas frente a localidades, o entre cepas fastidiosas y manejo de sombra.

En cafeto, se utilizó la prueba de chi cuadrado para analizar el efecto de año, época localidad y tipo de sombra sobre la presencia o no de árboles sospechosos de estar infectados con *X. fastidiosa*. Para realizar el análisis se contaron el número de muestras con y sin valor de absorbancia mayor o igual a 0.7A (definido como lectura sospechosa).

Estudio III: Distribución Espacial de árboles sospechosos para *X. fastidiosa*

Muestreo de Árboles:

Se realizó una investigación en cuatro localidades (i) Adjuntas, (ii) Jayuya, (iii) Las Marías y (iv) Yauco, en parcelas con distinto tipo de manejo de la sombra y al sol, con el fin de establecer la distribución espacial de árboles sospechosos de estar enfermos con la bacteria *X. fastidiosa* en el agro-ecosistema del cafeto.

El muestreo se realizó en el período de febrero 2010- junio 2012. Se seleccionaron cafetos que presentaban ramificación anormal con acortamiento de ramas y entrenudos, lignificación y hojas pequeñas dando la apariencia de escobilla de bruja y algunos de roseta.

Para *Inga* sp. y *Citrus* sp., se colectaron muestras con síntomas como marchitez apical, muerte descendente, moteado, amarillamiento intervenal y daño de insecto. Se geo-referenciaron 348 árboles entre cafeto, *Inga* sp. y *Citrus* sp. Para ello se utilizó un GPS Garmin CS60 (Garmin International, Olathe, Kansas, USA).

Análisis Serológico:

Las muestras se procesaron siguiendo el mismo protocolo utilizado en el estudio II.

Mapeo y Generación de Conglomerados Espaciales:

Se generaron mapas de Geo-referenciación usando los valores de absorbancia a 650 nm en la prueba DAS-ELISA para *X. fastidiosa* con la siguiente categorización: puntos de color verde (0.02-0.1 A) amarillo (0.11-0.4 A) naranja (0.41-0.69 A) y rojo (≥ 0.7 A). Se utilizó un GPS Garmin CS60 (Garmin International, Olathe, Kansas, USA) para tomar los puntos de referencia de los árboles muestreados. Se utilizó el programa: Explorer ArcGIS online software Environmental Systems Research Institute, Inc. (Redlands, California, USA).

Con el propósito de determinar la distribución espacial de los árboles sospechosos de estar infectados con la bacteria según los resultados del ensayo de DAS- ELISA para *X. fastidiosa*, se utilizó el software SaTScan versión 9.1.1. (Kulldorf, 2009).

Se ingresaron tres archivos al programa que contenían información referida al punto de coordenadas, el archivo de casos que correspondió a los valores de absorbancia en la prueba de DAS-ELISA iguales o superiores a 0.7 A de nervaduras de las hojas o de las ramas o ambas, y el archivo de controles que correspondió a las lecturas obtenidas de nervaduras de hojas y ramas de los árboles geo-referenciados con lecturas de absorbancia menores de 0.7 A.

La identificación de conglomerados de la distribución espacial se realizó con el modelo de probabilidad de Bernoulli presente en el software SatScan, donde la variable es la presencia de casos (representan a los árboles donde la absorbancia fue mayor de 0.7 A en nervaduras de las hojas, o en ramas, o en ambas) versus los controles (que representan a los árboles donde las lecturas de absorbancia en hojas o ramas fue menor a 0.7 A). Se usaron 999 iteraciones de acuerdo al método de Monte Carlo, para generar inferencias estadísticas.

El riesgo relativo se determinó de acuerdo a un cociente de probabilidades. Se obtuvo la razón de la probabilidad de un evento dentro del conglomerado sobre la probabilidad del evento fuera del conglomerado, más un factor de corrección (Kulldorf, 2009).

Estudio IV: Análisis Conglomerado

Para las cepas de comportamiento fastidioso (Gram- TSA- PW+) obtenidas de los estudios I, II, y III, se generaron varios agrupamientos usando un análisis de conglomerados jerárquico. El algoritmo de agrupamiento escogido fue Gower y la distancia seleccionada fue Ward (Raúl Machiavelli información personal, 2011). Se definió los conglomerados por medio de una línea de corte al 50% de la distancia máxima.

Estudio V: Aislamiento de ADN y Técnica de PCR

Aislamiento de ADN y PCR de Cepas Bacterianas:

Una muestra de las cepas bacterianas de comportamiento fastidioso (Gram- TSA- PW+) se utilizó para extraer el ADN, usando el Kit wizard genomic DNA purification de la compañía Promega (Madison, Wisconsin, USA), según las indicaciones del fabricante. Además se utilizó el kit de purificación para ADN de bacterias “capture column” de la compañía Qiagen (Valencia, California, USA) según especificaciones del fabricante.

Se usó PCR convencional para amplificar segmentos de ADN de los aislados que tenían potencial de ser *Xylella fastidiosa*, es decir solo con aquellas cepas que presentaron las características de crecimiento fastidioso (Gram- TSA- PW+). Se utilizó el protocolo de Minsavage et al., (1994), con las modificaciones de Pooler et al., (1997).

Para amplificar los segmentos de DNA de las bacterias endofíticas, se utilizó iniciadores universales para bacterias 27F 5'-AGAGTTTGATC(A,C)TGGCTC AG-3' y 1492R 5'-TACGG(T,C)TACCTTGTTACGACTT-3' (Lane, 1991) con 0.6 ul de cada uno, a la concentración de 50 pmol/ul, desoxiribonucleótidos 0.75 ul por reacción, Taq polimerasa 0.15 unidades por reacción, MgCl₂ 3 ul por reacción, Suero bovino con albumina 0.6 ul por reacción, buffer 1X 3 ul por reacción y agua molecular 20.3 ul.

Se utilizó un termociclador Bio Mycycler de la compañía Bio-Rad laboratorios Inc. (Hercules, California, USA), los ciclos y tiempos de amplificación fueron: un ciclo inicial de desnaturalización: 94°C por cinco minutos, seguido por 25 ciclos de: desnaturalización 94°C por un minuto, apareamiento: 53°C por un minuto, extensión: 72°C por tres minutos, seguido por un ciclo final de extensión de 72°C por 10 minutos.

El Gel de calidad se realizó con agarosa a concentración de 1%, y adicionando 2 µl de bromuro de etidio. Se colocaron 4µl del producto de la extracción, y 4ul de "loading buffer". En el primer pozo se colocó 5 ul del marcador o ladder de 10 kbp (IDT Technologies Coralville, Iowa, USA). Se dejó correr por 40-60 minutos a 75-100 voltios.

Otra reacción en cadena de la polimerasa fue realizada en la clínica de diagnóstico de la Estación Experimental Agrícola de Juana Díaz como se describe a continuación: los iniciadores: 272-1-int:5'CTGCACTTACCAATGCATCG3' y 272-2-int:3'GCCGCTTCGGAGAGCATTCCT5'(IDT Technologies, Coralville, Iowa, USA) previamente hidratados en amortiguador TE, se diluyeron colocando 2 ul de cebador 100x en 198 ul agua molecular llegando a la concentración 1X. La fórmula para la reacción fue: Go Taq Master Mix (12.5 ul), cebador 272-1 (2.5 ul), cebador 272-2 (2.5 ul), 5 ul de producto de ADN, y 2.5 ul de agua molecular, para un total de 25 ul de reacción (Pooler y Hartung, 1995).

Para la amplificación del ADN se utilizó un termociclador (Modelo T 3000, Biometra, Rudolf-Wissell-str, Goettingen). Los tiempos y ciclos de amplificación fueron: ciclo de inicial de desnaturalización a 94°C por cuatro minutos, seguido por 30 ciclos amplificación de: 94°C por un minuto, 62°C por un minuto y extensión: 72°C por 1 minuto, seguido por una extensión final de 72°C por 10 minutos (Lacava et al., 2004).

El Gel de calidad se realizó con agarosa a concentración de 0.8% a 1%, y adicionando 2 ul de bromuro de etidio. Se colocaron 4 ul del producto de la extracción, y 4 ul de "loading buffer". En el primer pozo se colocó 5 ul del marcador o ladder. Se dejó correr por 40-60 minutos a 75-100 voltios.

Se enviaron cepas bacterianas y productos de extracción provenientes de cepas bacterianas al USDA- “Agricultural Research Center” Beltsville-Maryland, para realizar PCR con el fin de confirmar los supuestos positivos para *Xylella fastidiosa* (Gram-, Catalasa+, Oxidasa-) y de crecimiento fastidioso (PW+,TSA-). Los protocolos utilizados en este laboratorio fueron CVC Cox y XF 16S Cox, que son protocolos específicos para esta bacteria.

Aislamiento de ADN y PCR de Muestras Vegetales:

Se realizó la extracción de ADN genómico a partir de ciertas muestras vegetales que presentaban sintomatología similar a “crespera” (Rodríguez et al., 2003) y que presentaron valores de absorbancia superior a 0.7 en la prueba DAS-ELISA para *Xylella fastidiosa*. Se utilizó el kit “Plant Mini Kit” de la compañía Qiagen (Elkhart, Indiana, USA) según las especificaciones del fabricante. Al igual que para la extracción realizada en las cepas, los productos de extracción obtenidos fueron enviados al USDA “Agricultural Research Center” Beltsville-Maryland, para realizar PCR con el fin de diagnosticar la presencia de la bacteria *Xylella fastidiosa*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Condiciones Generales en los Estudios:

La precipitación total en el año 1 fue más alta en comparación al año 2 (tabla 2). El año 2 fue más caluroso que el año 1. Más información de la precipitación separada por meses para Adjuntas, Jayuya, Las Marías y Yauco se presenta en los anexos 1, 2, 3 y 4, respectivamente.

Las parcelas que contenían los tratamientos de sombra (sombra de alta diversidad de especies y sombra de baja diversidad de especies) fueron muy diferentes en relación al manejo, a la cantidad de irradiación solar recibida en el dosel del cafeto (excepto en Las Marías) (tabla 3) y en el porcentaje de cobertura (tabla 4) frente a las parcelas a sol. Por esta razón, se consideran como comunidades biológicas distintas que poseen una variación intrínseca la que podría estar interactuando con los factores en estudio.

Tabla 2.- Resumen de 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 ⁵	700	20.8 ⁵	820
	lluviosa	22.5 ⁵	1950	22.6 ⁵	1600
Jayuya	seca	20.8 ²	720 ⁶	20.3 ³	720 ⁶
	lluviosa	25.5	1200 ⁷	29.3 ⁴	1200 ⁷
Las Marías	seca	23.5 ²	810	20.7 ³	410
	lluviosa	22.9	1970	30.4 ⁴	1770
Yauco	seca	17.7 ²	910	19.0 ³	610
	lluviosa	n/d	1720	29.5 ⁴	1110

¹seca dic-may lluviosa jun-nov

²promedio de febrero a marzo 2011 datos tomados con logtag en las parcelas muestreadas

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

⁴promedio noviembre y junio 2011 datos tomados con log tag en las parcelas muestreadas

⁵datos de temperatura fuente <http://weather.com/climate/annualClimo-USPR0001>

⁶normales de precipitación período 1939-2002.

datos de precipitación obtenidos de Southeast regional climate center (SERCC)

En las parcelas a sol de Adjuntas, Jayuya y Yauco el nivel de irradiación fue similar y el porcentaje de cobertura fue bajo (tabla 3). Debido a fallas en el equipo no fue posible obtener datos con el luxómetro en las parcelas a sol de Las Marías. En estas parcelas el porcentaje de cobertura fue muy alto (tabla 4), debido a que la estructura del dosel de los árboles fue diferente porque la forma de poda hace que los árboles se unan en la parte superior del dosel y formen una estructura completamente sombreada debajo de los cafetos.

Para las parcelas de baja diversidad y alta diversidad, los porcentajes de cobertura fueron altos y similares para las localidades de Jayuya, Adjuntas, Las Marías y Yauco (tabla 4). El valor de irradiación recibida en el dosel fue bajo (tabla 3), aunque no se pudo obtener datos para las parcelas de Las Marías.

Las parcelas a sol y de baja diversidad en la localidad de Adjuntas son muy cercanas (240 metros de distancia) y siguen un patrón de manejo convencional con aspersiones de herbicidas y controles fitosanitarios con insecticidas. Las parcelas que estuvieron más alejadas correspondieron a la localidad de Jayuya donde hay una distancia de 12 km entre el control a sol y las parcelas de alta diversidad.

Tabla 3.- Irradiación mínimo, máximo y promedio en las algunas de las parcelas muestreadas.

		Klux¹		
Localidad	Tipo sombra	Mínimo	Máximo	Promedio
Adjuntas	A sol	50.40	109.80	80.58
Jayuya	A sol	80.10	91.20	85.65
Yauco	A sol	14.80	137.90	83.33
Jayuya	Alta diversidad	4.34	9.90	7.02
Adjuntas	Baja diversidad	2.20	19.29	6.82
Jayuya	Baja diversidad	4.70	19.10	9.87
Yauco	Baja diversidad	1.10	20.60	6.48

¹Valores tomados con el Luxómetro Extech Mo.LT 300 (Whaltham, Massachusetts, USA)

Tabla 4.- Porcentaje de cobertura en las parcelas muestreadas.

Localidad	Tipo de sombra	% Cobertura ¹
Adjuntas	Control Sol	0.0
Adjuntas	Baja Diversidad	92.7
Adjuntas	Alta Diversidad	97.9
Jayuya	Control Sol	0.0
Jayuya	Baja Diversidad	81.3
Jayuya	Alta Diversidad	91.7
Las Marías	Control Sol	92.3
Las Marías	Baja Diversidad	89.1
Las Marías	Alta Diversidad	100.0
Yauco	Control Sol	3.1
Yauco	Baja Diversidad	99.2
Yauco	Alta Diversidad	100.0

¹Valores tomados con GRS densitometro (Arcata, California , USA)

Estudio I: Caracterización de Bacterias Endofíticas Aisladas de Cafetos Sintomáticos versus Asintomáticos.

No se observaron diferencias ($p=0.80$, prueba t) entre los Log UFC/ml en árboles sintomáticos versus asintomáticos. Tampoco hubo diferencias en el número de cepas fenotípicamente diferentes por árbol ($p=0.88$, prueba t).

Durante el aislamiento de bacterias endofíticas en PW se separaron igual número de cepas asociadas a cafetos sintomáticos (escobilla de bruja o roseta), y cepas asociadas a cafetos asintomáticos (tabla 5).

Muy pocas cepas fueron de comportamiento fastidioso (Gram- TSA- PW+). Aunque el 63% de las cepas fastidiosas se encontraron en árboles sintomáticos versus solamente el 37% en árboles asintomáticos, estas proporciones no fueron significativamente diferentes ($p=0.33$, χ^2).

Tabla 5.- Cepas aisladas en el Estudio I clasificadas por tipo de cepa y tipo de árbol muestreado.

Tipo de Cepa			Total cepas por árbol muestreado		
Gram	TSA	Clasificación	Asintomático	Sintomático	TOTAL
-	-	Fastidiosa	3 (37%)	5 (63%)	8
-	+	No fastidiosa	13 (52%)	12 (48%)	25
+	-	No fastidiosa	5 (45%)	6 (55%)	11
+	+	No fastidiosa	9 (56%)	7 (44%)	16
TOTAL			30(50%)	30 (50%)	60

En este estudio no hubo evidencia de mayor concentración de bacterias (Log UFC/ml) en árboles con sintomatología asociada a CLS. Tampoco se observó mayor diversidad en estos árboles. Finalmente, no se observó una relación entre tipo de bacteria (fastidiosa versus no fastidiosa) y la presencia o ausencia de síntomas de CLS.

Entre las ocho cepas de comportamiento fastidioso (tabla 6), se detecta que las cepas 4985 y 5040 de localidades distintas, compartieron atributos similares (tamaño 2mm, forma de la colonia redonda, margen liso, elevación aplanada, reacción de oxidasa negativa, catalasa positiva, y aparecimiento en el grupo 1, primeros siete días) (anexo 5). Las otras cepas fueron variables en cuanto a su morfología y reacción bioquímica.

Tabla 6.- Origen de las cepas aisladas de cafeto que fueron de tipo fastidioso (Gram-, TSA-, PW+).

Código	Localidad	Sintomatología árbol muestreado	Tipo de sombra
5011	Adjuntas	Asintomática	Baja diversidad
4853	Jayuya	Escobilla de bruja	Baja diversidad
5221	Jayuya	Escobilla de bruja	Alta diversidad
5040	Las Marías	Escobilla de bruja	Baja diversidad
5043	Las Marías	Asintomática	Baja
5151	Las Marías	Asintomática	Control de sol
4985	Yauco	Escobilla de bruja	Alta diversidad
4986	Yauco	Escobilla de bruja	Alta diversidad

A pesar de que el cafeto no presente sintomatología característica de la enfermedad de CLS o crespera, es posible aislar bacterias endofíticas de comportamiento fastidioso entre las cuales puede ocurrir *X. fastidiosa*.

Al respecto, Li et al. (2001) encontraron que plantas portadoras de la bacteria *X. fastidiosa* no siempre presentan síntomas de la enfermedad. También, Freitag (1951) menciona que la cepa de *X. fastidiosa* que causa la enfermedad del “pierce de la vid” tiene un rango amplio de hospederos que no manifiestan síntomas, pero que sirven como fuente de inóculo para la transmisión de la bacteria a los viñedos. Subhadeep et al. (2008) mencionan también que el patógeno ha sido reportado en cientos de especies de plantas donde no produce síntomas. Probablemente la falta de síntomas puede estar relacionada a la presencia de bacterias antagonistas a *Xylella fastidiosa*. Al respecto, Lacava et al. (2004) han encontrado que *Curtobacterium* sp. puede inhibir el crecimiento de *Xylella fastidiosa*. Zapata et al. (2011) informaron *Curtobacterium* sp. en árboles de café, por tanto es posible que dentro de las cepas aisladas en este estudio dicho género esté representado en las plantas asintomáticas.

Para las cepas Gram negativas y que crecen en medio de cultivo TSA, 13 cepas provienen de árboles de café asintomáticos frente a 12 que provienen de árboles sintomáticos (tabla 7). Mediante análisis de conglomerados se determinaron relaciones fenotípicas entre las cepas aisladas (anexos 5 y 6). Las cepas 5106 y 5222 son iguales en las características de tamaño (2 mm), forma de colonia (redonda), margen liso, elevación aplanada, reacción de oxidasa negativa, catalasa positiva, y periodo de incubación (<7 días). Las cepas 4977, 5134, 5178 y 5220 son idénticas en forma de la colonia redonda, margen liso, elevación aplanada, reacción de oxidasa negativa, catalasa positiva, variando en tamaño y periodo de incubación. Las cepas 5107, 5180, 5138, 4852 y 4920 son idénticas entre ellas excepto en el tamaño de la colonia (anexo 6).

Las cepas 5000, 5060 y 5062 comparten las características de morfología, margen, elevación de la colonia y reacción de catalasa, difieren en la reacción a la prueba oxidasa, periodo de incubación y tamaño de colonia. Las cepas 4866, 4996, 4919 y 5142 comparten las características de margen, elevación y reacción a la prueba catalasa (anexo 6).

Las cepas Gram negativas fueron ligeramente predominantes (33 cepas) representando un 55% de todos los aislados (tabla 5). Esto concuerda con los resultados obtenidos por Taghavi et al. (2009) quienes de 78 endófitos bacterianos aislados a partir de muestras de *Populus* spp. encontraron como dominantes a las bacterias Gram negativas pertenecientes al grupo de las gamma proteobacterias. DeLong y Pace (2001) realizaron estudios de diversidad bacteriana de otros ambientes como aguas termales y rocas porosas, donde también encontraron mayor proporción de cepas Gram negativas frente a las Gram positivas.

Una razón para este comportamiento es que las bacterias Gram negativas poseen una diversidad metabólica asombrosa y su capacidad de interacción con los organismos eucariotas, hace que puedan vivir en ambientes diferentes (Colby, 1997).

Tabla 7.- Origen de las cepas aisladas de cafeto de reacción Gram negativa y que crecen en medio TSA.

Código	Localidad	Sintomatología árbol muestreado	Tipo de sombra
5000	Adjuntas	Asintomática	Baja diversidad
4852	Jayuya	Escobilla de bruja	Baja diversidad
4866	Jayuya	Escobilla de bruja	Baja diversidad
4919	Jayuya	Escobilla de bruja	Alta diversidad
4920	Jayuya	Escobilla de bruja	Alta diversidad
5220	Jayuya	Escobilla de bruja	Alta diversidad
5222	Jayuya	Escobilla de bruja	Alta diversidad
5041	Las Marías	Escobilla de bruja	Baja diversidad
5060	Las Marías	Escobilla de bruja	Baja diversidad
5062	Las Marías	Escobilla de bruja	Baja diversidad
5106	Las Marías	Asintomática	Baja diversidad
5107	Las Marías	Asintomáticas	Control sol
5108	Las Marías	Asintomáticas	Control sol
5133	Las Marías	Asintomáticas	Control sol
5134	Las Marías	Asintomáticas	Control sol
5139	Las Marías	Asintomáticas	Alta diversidad
5141	Las Marías	Asintomáticas	Alta diversidad
5150	Las Marías	Asintomáticas	Control sol
5142	Las Marías	Asintomáticas	Control sol
4996	Yauco	Escobilla de bruja	Alta diversidad
4977	Yauco	Asintomáticas	Baja diversidad
4978	Yauco	Asintomáticas	Baja diversidad
5138	Yauco	Escobilla de bruja	Alta diversidad
5178	Yauco	Escobilla de bruja	Alta diversidad

Se aislaron 11 cepas Gram positivas, que no crecen en medio de cultivo TSA (tablas 5 y 8). Las cepas 4976, 5140, 4980, 4999, 4984, 5012, 5238, 5179, 5061 y 4998 comparten las características de: forma de la colonia redonda, margen liso, elevación aplanada, reacción de oxidasa negativa, catalasa positiva.

Tabla 8.- Origen de las cepas aisladas de cafeto (*Coffea arabica*) de reacción Gram positiva y que no crecen en medio TSA.

Código	Localidad	Sintomatología árbol muestreado	Tipo de sombra
4999	Adjuntas	Asintomática	Baja diversidad
5012	Adjuntas	Asintomática	Baja diversidad
4918	Jayuya	Escobilla de bruja	Alta diversidad
5238	Jayuya	Escobilla de bruja	Alta diversidad
5061	Las Marías	Escobilla de bruja	Baja diversidad
5140	Las Marías	Asintomáticas	Alta diversidad
4976	Yauco	Asintomáticas	Baja diversidad
4980	Yauco	Asintomáticas	Baja diversidad
4984	Yauco	Escobilla de bruja	Alta diversidad
4998	Yauco	Escobilla de bruja	Alta diversidad
5179	Yauco	Escobilla de bruja	Alta diversidad

Finalmente, se encontraron 16 cepas Gram positivas y que crecen en medio de cultivo TSA (tablas 5 y 9). Las cepas 5237 y 5156 fueron idénticas y en otro grupo las cepas 4979, 5013 y 5223 fueron idénticas entre sí. Las cepas comparten las características de: elevación de la colonia tipo aplanada, reacción de oxidasa negativa, catalasa positiva.

Tabla 9.- Origen de las cepas aisladas de cafeto (*Coffea arabica*) de reacción Gram positiva y que crecen en medio TSA.

Código	Localidad	Sintomatología árbol muestreado	Tipo de sombra
4993	Adjuntas	Asintomática	Baja diversidad
5013	Adjuntas	Asintomática	Baja diversidad
4865	Jayuya	Escoba de bruja	Baja diversidad
5219	Jayuya	Escobilla de bruja	Alta diversidad
5223	Jayuya	Escobilla de bruja	Alta diversidad
5237	Jayuya	Escobilla de bruja	Alta diversidad
5240	Jayuya	Escobilla de bruja	Alta diversidad
5042	Las Marías	Escobilla de bruja	Baja diversidad
5132	Las Marías	Asintomáticas	Control sol
5156	Las Marías	Asintomáticas	Alta diversidad
5159	Las Marías	Asintomáticas	Alta diversidad
5162	Las Marías	Asintomáticas	Alta diversidad
5163	Las Marías	Asintomáticas	Alta diversidad
4979	Yauco	Asintomáticas	Baja diversidad
4997	Yauco	Escobilla de bruja	Alta diversidad

Entre las bacterias comunes que se han aislado de cafetos en Puerto Rico se ha reportado a: *Bacillus cereus*, *B. coagulans*, *B. pumilus*, *Citrobacter farmeri*, *Curtobacterium pusillum*, *Erwinia stewartii* ss. *stewartii*, *Kokuria kristinae*, *K. varians*, *Methylobacterium mesophylicum*, *Microbacterium chocolatum*, *Micromonas paracarbonacea*, *Pantoea dispersa*, *P. agglomerans* (*Erwinia herbicola*), *Pseudomonas amyloclavata*, *Psycrobacter immobilis*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Staphylococcus simulans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, y *Xanthomonas axonopodis* pv. *vasculorum* (Zapata et al., 2011). De este grupo las del género *Bacillus* son de reacción gram positiva y forman endósporas. Es probable que las cepas 4918 y 4865 pertenezcan a este género ya que la tinción de esporas fue positiva y son Gram positivas.

De las cepas obtenidas de plantas asintomáticas el 53% fueron Gram negativas, tres cepas (5043, 5011 y 5151) fueron de comportamiento fastidioso (Gram- TSA- PW+) (tabla 5). De plantas asintomáticas, el 47% de las cepas obtenidas fueron Gram positivas. Este comportamiento fue detectado también por Zinniel et al., (2002) quienes encontraron en aislamientos de bacterias endofíticas de plantas de praderas, mayores valores de cepas Gram negativas frente a las Gram positivas. De las cepas de plantas sintomáticas el 56% fueron Gram negativas. De este grupo cinco cepas fueron de crecimiento fastidioso (Gram- TSA- PW+) (tabla 5).

La proporción de cepas de los grupos G-TSA+, G+TSA-, y G+TSA+, fueron muy cercanas para plantas sintomáticas versus asintomáticas.

En el estudio I donde se contrastan poblaciones de bacterias endofíticas de árboles asintomáticos versus sintomáticos, se observa que existe mayor predominancia de cepas Gram negativas en ambos grupos con un 53% y 56% respectivamente. Estos resultados fueron similares a los encontrados por Vega et al., (2005) quienes obtuvieron 68% de aislados Gram negativos en Colombia, México y Hawaii.

Las bacterias Gram negativas así como las Gram positivas, pueden encontrarse en distintos ecosistemas, las bacterias Gram negativas se distinguen por tener una capa delgada de péptidoglicano en la pared celular alrededor de la membrana plasmática. También poseen una doble capa alrededor del citoplasma que se enlazada a lipoproteínas lo cual les permite la sobrevivencia de estas en distintas condiciones adversas (Prescot et al., 2002).

Algunas bacterias Gram positivas pueden formar endósporas que les permiten sobrevivir a condiciones adversas como desecación, falta de nutrientes. Sin embargo, la mayoría de las bacterias fitopatógenas son Gram negativas (Hayward, 1983).

Estudio II: Efecto de Localidad, Manejo de Sombra, Época y Año sobre Bacterias Aisladas en Cafeto y Árboles de Sombra.

Bacterias Endofíticas Aisladas de Cafetos:

Análisis de varianza por Época-Año:

Número de Log (UFC/ml):

Durante la época seca en el año1, no se detectaron diferencias significativas en el factor localidad para Log UFC/ml en nervaduras de hojas de cafeto (tabla 10). Para muestras de ramas se observó un efecto significativo de localidad con mayores Log UFC/ml en Las Marías versus Adjuntas y Yauco ($\alpha=0.05$).

Se detectaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) para Log UFC/ml de nervaduras de hojas de cafeto para los diferentes tipos de sombra en el año 1. Se encontraron mayor Log UFC/ml en cafeto de las parcelas a sol versus los tratamientos con sombra.

En el año 2, no se detectaron diferencias significativas para los factores localidad y tipo de sombra. Además, no hubo interacción sombra por localidad en nervaduras de hojas y en ramas de cafeto (tabla 10).

Tabla 10.- Medias, significancia de la prueba de F y valor de la diferencia mínima significativa para el logaritmo del número de UFC/ml (Log UFC/ml) de árboles de cafeto en Puerto Rico.

Efecto	Log UFC/ml							
	2010-2011				2011-2012			
	Época seca		Época lluviosa		Época seca		Época lluviosa	
	Hojas	Ramas	Hojas	Ramas	Hojas	Ramas	Hojas	Ramas
<i>Localidad</i>								
Adjuntas	1.26	1.05b	1.82	2.90	1.20	1.40	2.33a	2.39a
Jayuya	1.35	1.81ab	1.50	2.42	1.41	1.42	2.14a	2.69a
Las Marías	1.81	2.17a	1.91	2.46	0.66	1.28	1.26b	1.51b
Yauco	0.84	1.05b	1.42	3.23	1.17	1.25	0.71b	0.58c
Prueba de F	NS	**	NS	NS	NS	NS	**	**
DMS	n/a	0.63	n/a	n/a	n/a	n/a	0.62	0.64
<i>Manejo de sombra</i>								
Baja diversidad de árboles	1.15b	1.53	2.05	2.91	1.02	1.51	1.62	1.71
Alta diversidad de árboles	0.85b	1.22	1.77	2.86	1.00	1.33	1.31	1.82
A sol	1.95a	1.82	1.16	2.48	1.31	1.18	1.90	1.86
Prueba de F	**	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS
DMS	0.63	n/a	n/a ²	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Localidad x tipo de sombra</i>								
Prueba de F	NS	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS

DMS= Diferencia mínima significativa a nivel de probabilidad de $\alpha=0.05$. En los casos donde la prueba de F no fue significativa, no se reporta el valor de DMS.

En la misma columna por cada factor, medias seguidas por la misma letra no son diferentes al nivel de $\alpha=0.05$.

¹Transformación de los valores de conteo de viables en placa Y: $[[Y' = \log(Y + 1)]]$.

n/a: No aplica. No se utilizó la prueba de DMS en los casos donde la prueba de F fue no significativa.

n/a²: no aplica rangos porque la interacción fue no ordenada.

En el año 1, en la época lluviosa en nervaduras de las hojas de cafeto hubo interacción tipo de sombra por localidad para Log UFC/ml (tabla 10 y figura 1). Para parcelas al sol, Log UFC/ml fue menor en Adjuntas y Jayuya versus Las Marías y Yauco. En parcelas con árboles de sombra de baja o alta diversidad no hubo diferencias entre las localidades de Adjuntas, Jayuya y Las Marías pero si entre Adjuntas y Yauco en parcelas de alta diversidad de especies de sombra.

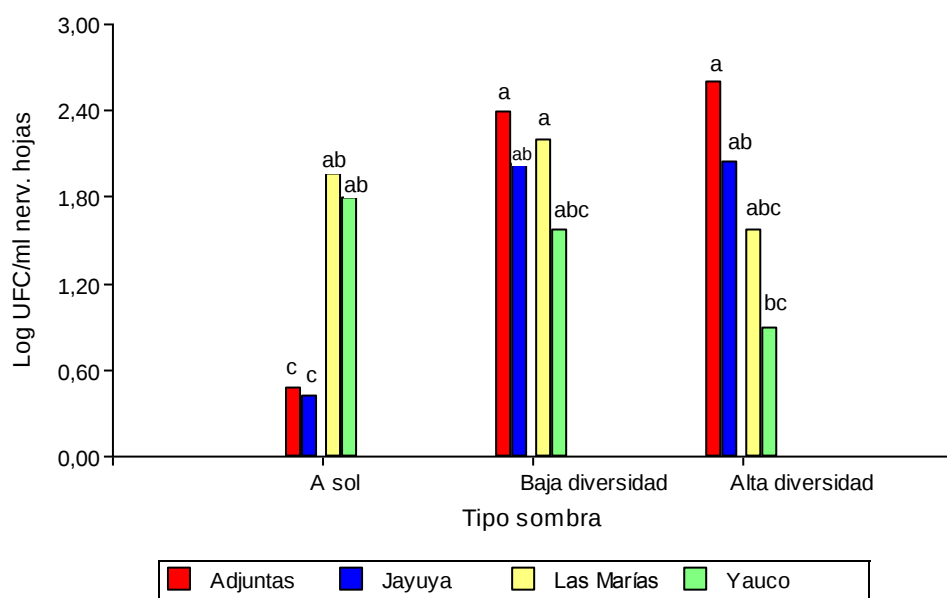


Figura 1.- Medias de Log UFC/ml de nervaduras de las hojas de cafeto en la época lluviosa período 2010-2011. Medias seguidas por la misma letra no son diferentes al nivel de $\alpha=0.05$.

En el año 1, no se detectaron diferencias significativas en los factores tipo de sombra, localidad. No hubo interacción sombra por localidad en ramas de cafeto (tabla 10).

En el año 2, hubo diferencias ($\alpha=0.05$) entre localidades en Log UFC/ml de nervaduras de hojas y ramas de cafetos. Los Log UFC/ml fueron más altos en Adjuntas y Jayuya, mientras que los Log UFC/ml fueron menores para Las Marías y Yauco.

En ambos años se observó un mayor UFC/ml en ramas versus nervaduras de hojas de árboles de cafeto ($p<0.0001$). 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 rama. Estos valores se encuentran dentro del rango obtenido por Kobayashi y Palumbo (2000) para bacterias endofíticas en alfalfa, maíz dulce, remolacha, algodón y papa con promedios desde 100 hasta 100000 UFC.

Cepas Fenotípicamente Diferentes por Árbol:

El número de cepas fenotípicamente diferentes por árbol es una medida de la diversidad bacteriana presente en los árboles de cafeto en el estudio, la cual fue baja para este experimento (tabla 11).

En la época seca de ambos años no se detectaron diferencias para el número de cepas fenotípicamente diferentes por árbol obtenidas de nervaduras de hojas y ramas de cafeto (tabla 11).

Para la época lluviosa en el año 1, los mayores valores de diversidad bacteriana en ramas se detectaron en Las Marías con 3.33 cepas diferentes por árbol (tabla 10). Aunque no hubo diferencias significativas para número de cepas en las nervaduras de las hojas en el año 1, se observó la misma tendencia que en ramas con los valores de diversidad más altos en Las Marías.

En el año 1, los mayores valores de diversidad bacteriana en nervaduras de las hojas se detectaron para los tratamientos de sombra (1.90 a 2.05 cepas fenotípicamente diferentes por árbol) (tabla 11). Árboles de cafeto a sol generaron solamente 0.9 cepas diferentes por árbol. En ramas se observó el mismo patrón, pero con mayor número de cepas. Es necesario destacar que en las parcelas a sol los niveles de bacterias endofíticas (UFC/ml) fueron menos consistentes (tabla 10) y a la vez menos diversos (tabla 11).

Tabla 11.- Medias, significancia de la prueba de F y valor de la diferencia mínima significativa para el total de cepas fenotípicamente diferentes por (árbol) placa para cafeto *Coffea arabica* en Puerto Rico.

Efecto	Cepas fenotípicamente diferentes por árbol							
	2010-2011				2011-2012			
	Época seca		Época lluviosa		Época seca		Época lluviosa	
	Hojas	Ramas	Hojas	Ramas	Hojas	Ramas	Hojas	Ramas
<i>Localidad</i>								
Adjuntas	0.67	0.93	1.20	1.80b	1.00	1.20	1.07ab	0.93ab
Jayuya	1.20	1.67	1.73	1.87b	1.00	1.07	1.33a	1.27a
Las Marías	1.13	1.00	2.07	3.33a	0.47	0.80	0.87bc	0.87b
Yauco	0.80	1.27	1.47	1.73b	0.80	1.13	0.53c	0.40c
Prueba de F	NS	NS	NS	**	NS	NS	**	**
DMS	n/a	n/a	n/a	1.01	n/a	n/a	0.45	0.37
<i>Manejo de sombra</i>								
Baja diversidad de árboles	1.00	1.20	2.05a	2.50a	0.90	1.05	0.90	0.70b
Alta diversidad de árboles	0.95	1.60	1.90a	2.50a	0.70	1.15	1.20	1.10a
A sol	0.90	0.85	0.90b	1.55b	0.85	0.95	0.75	0.80ab
Prueba de F	NS	NS	**	**	NS	NS	NS	**
DMS	n/a	n/a	0.66	0.87	n/a	n/a	n/a	0.32
<i>Localidad x tipo de sombra</i>								
Prueba de F	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

DMS= Diferencia mínima significativa a nivel de probabilidad de $\alpha=0.05$. En los casos donde la prueba de F no fue significativa, no se reporta el valor de DMS.

En la misma columna por cada factor, medias seguidas por la misma letra no son diferentes al nivel de $\alpha=0.05$.

n/a: no aplica: No se utilizó la prueba de DMS en los casos donde la prueba de F fue no significativa.

En la época lluviosa del año 2 los patrones cambiaron. Hubo la tendencia de registrar en hojas y ramas de árboles de Yauco la menor diversidad bacteriana con solamente 0.53 y 0.40 cepas por árbol, respectivamente. Los árboles de Las Marías también mostraron poca diversidad. La diversidad de cepas fue más alta en Jayuya frente al resto de localidades.

Para las parcelas de baja diversidad de especies de sombra se obtuvo promedios más altos de diversidad frente a tratamientos de sombra de alta diversidad y parcelas a sol ($\alpha=0.05$).

Las cepas fueron asignadas a códigos numéricos (cepario de bacterias perteneciente al laboratorio de bacteriología agrícola UPRM). En ambos años, en general, se observó mayor diversidad bacteriana en ramas versus nervaduras de hojas de árboles de cafeto ($p=0.0014$). Se encontró un total de 260 cepas aisladas a partir de nervaduras de las hojas y 319 cepas aisladas a partir de ramas de cafeto.

La diversidad de cepas aisladas en este trabajo fue mayor a lo reportado por Vega et al. (2005) quienes encontraron un total de 87 cepas endofíticas cultivables de 19 géneros en aislamientos realizados en Colombia (julio 2003), Hawaii (enero- marzo 2003) y México (febrero 2003), a partir de hojas y frutos de cafeto. Ellos encontraron predominancia de los géneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia* y *Stenotrophomonas*.

Los totales de cepas aisladas de nervaduras de las hojas y ramas de cafeto fueron similares a lo encontrado por Nunes (2004) quien reportó un total de 252 cepas, entre ellas las pertenecientes a *Bacillus lentimorbus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *Pseudomonas sp.*, *Pantoea sp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Kluyvera cryocrescens*, *Escherichia coli*, *Enterobacter sp.*, *Serratia sp.*, *Kocuria kristinae* entre otras.

Mariño- Cárdenas (2008), Mariño-Cárdenas y Zapata (2009) informaron 178 cepas bacterianas diferentes a partir de posibles vectores potenciales de los géneros: *Microbacterium*, *Bacillus*, *Pantoea*, *Providencia*, *Vibrio*, *Brevundimonas*, *Paenibacillus*, *Rhizobium*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Clavibacter*, *Kocuria*, *Pectobacterium*, *Chryseobacterium*, *Kluyvera*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Curtobacterium* y *Pasteurella*. Algunos de estos géneros podrían estar relacionados a los obtenidos en el presente estudio por envolver al cultivo del cafeto.

Análisis por Localidad de cafeto:

ADJUNTAS:

Log UFC/ml en Adjuntas:

En la variable Log UFC/ml en hojas hubo interacción de sombra por época (tabla 12 y figura 2). En los tratamientos de sombra (baja y alta diversidad de árboles) hubo mayor Log UFC/ml en la época lluviosa. Al contrario, en las parcelas a sol no hubo una diferencia en Log UFC/ml entre épocas. En ramas se observó una interacción ordenada de época por año (tabla 12 y figura 3) con mayores valores de Log UFC/ml en la época lluviosa frente a la seca en ambos años.

Tabla 12.- Medias, prueba de F y DMS (Fisher $\alpha=0.05$) para el logaritmo del número de UFC/ml y cepas fenotípicamente diferentes por árbol en nervaduras de las hojas y ramas de cafeto en Adjuntas, PR.

Efecto	Log UFC/ml ¹		Cepas /árbol	
	Hojas	Ramas	Hojas	Ramas
<i>Manejo de sombra</i>				
Baja diversidad de árboles	1.91	1.99	1.10	1.30
Alta diversidad de árboles	1.72	1.78	1.10	1.35
A sol	1.32	2.05	0.75	1.00
Prueba de F	NS	NS	NS	NS
DMS	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Época</i>				
Seca	1.23b	1.23b	0.83	1.13
Lluviosa	2.07a	2.65a	1.07	1.37
Prueba de F	**	**	NS	NS
DMS	0.55	0.53	n/a	n/a
<i>Año</i>				
Año1	1.54	1.3	0.93	1.37
Año2	1.76	1.2	1.03	1.07
Prueba de F	NS	NS	NS	NS
DMS	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Tipo de sombra x época</i>				
Prueba de F	*	NS	NS	NS
<i>Tipo de sombra x año</i>				
Prueba de F	NS	NS	NS	NS
<i>Época x año</i>				
Prueba de F	NS	**	NS	NS
<i>Tipo de sombra x época x año</i>				
Prueba de F	NS	NS	NS	NS

DMS= Diferencia mínima significativa a nivel de probabilidad $\alpha=0.05$. En los casos donde la prueba de F no fue significativa, no se reporta el valor de DMS. En la misma columna por cada factor, medias seguidas por la misma letra no son diferentes al nivel de $\alpha=0.05$.

¹Transformación de los valores de conteo de viables en placa Y: $[Y' = \log(Y + 1)]$ n/a: No se utilizó la prueba de DMS en los casos donde la prueba de F fue no significativa.

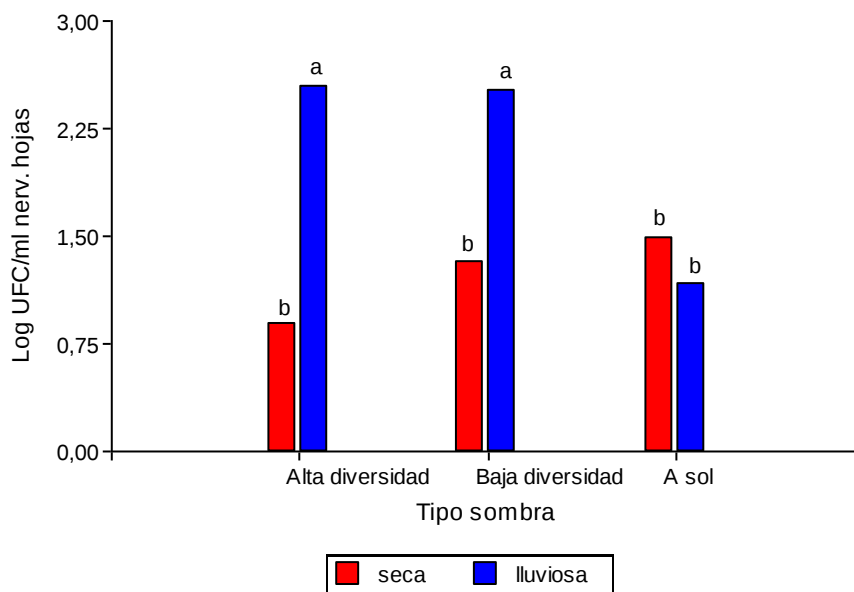


Figura 2.- Medias del Log UFC/ml de nervaduras de hojas de cafeto en siembras de Adjuntas, PR período 2010-2012. Medias seguidas por la misma letra no son diferentes al nivel de $\alpha=0.05$

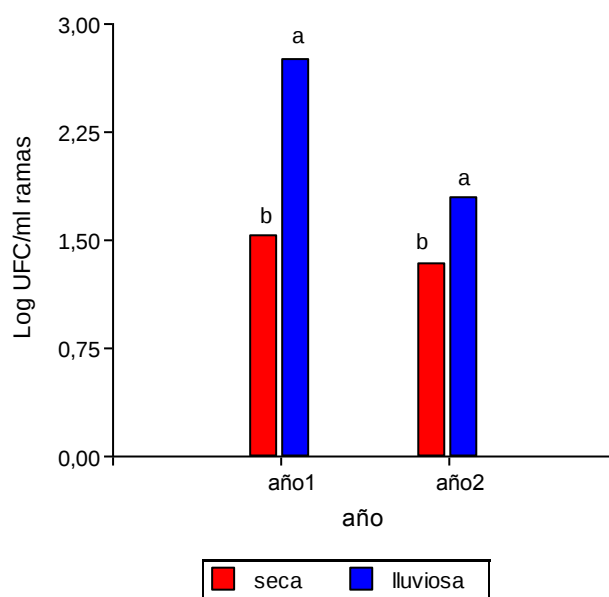


Figura 3.- Medias del Log UFC/ml de ramas de cafeto en siembras de Adjuntas, PR período 2010-2012. Medias seguidas por la misma letra no son diferentes al nivel de $\alpha=0.05$

Hubo efecto significativo ($\alpha=0.05$) para época en ramas de cafeto, con el mayor UFC para la época lluviosa frente a la época seca. Esto es acorde a lo encontrado por Irizarri (2010) en un estudio de aislamiento de bacterias endofíticas de *Coccoloba uvifera* en la localidad de Cabo Rojo - Puerto Rico, quien reportó un mayor porcentaje de colonización de bacterias endófitas en la época lluviosa frente a la seca.

El incremento en los valores de UFC/ml en la época lluviosa podría relacionarse al incremento de las poblaciones de insectos vectores (Mariño y Zapata, 2009). Además, en la época lluviosa existe mayor presencia de malezas, las cuales pueden actuar como hospederas de los insectos vectores y como reservorios de agentes fitopatógenos tal como bacterias fastidiosas endofíticas. Al respecto, *X. fastidiosa* ha sido encontrada en distintas especies de malezas y tiene la misma capacidad de colonizar plantas herbáceas y leñosas (Harakava, 2000).

Para la época lluviosa en las fincas del estudio Cruz y Zapata (2011) evidenciaron que los niveles de malezas asociadas al cultivo de café eran más altos frente a la época seca. Las malezas actúan como reservorio de las plagas y enfermedades, lo que se relaciona con el incremento de bacterias endofíticas aisladas de estos nichos.

El incremento de las lluvias hace que los árboles de café y de otras especies leñosas asociadas en el agro-ecosistema generen nuevos brotes, lo cual atrae a los insectos fitófagos que pueden estar infectados con bacterias fitopatógenas que se mantienen en las malezas asociadas al agro-ecosistema del café. Al respecto Brodbeck y Andersen (2006) mencionan que ciertos vectores potenciales de *X. fastidiosa* se alimentan principalmente de las malezas y pueden ocasionalmente alimentarse del café u otras especies leñosas.

Cepas fenotípicamente diferentes por árbol en Adjuntas:

En la variable de diversidad (cepas fenotípicamente diferentes por árbol) no se detectó diferencias significativas para los factores ni hubo interacción de los factores en estudio en nervaduras de hojas y ramas de café (tabla 12).

JAYUYA:

Log UFC/ml en Jayuya:

Hubo interacción entre localidad, época y año para Log UFC/ml de nervaduras de hojas y ramas (tabla 13, figuras 4 y 5). Probablemente las diferencias se deban a un efecto no estudiado que esté relacionado con el manejo de la parcela.

En ambos años, hubo mayor Log UFC/ml en la época lluviosa en cafetos en parcelas con sombra. En parcelas a sol, hubo mayor Log UFC/ml en la época seca año1, pero no hubo diferencias en año2 (figura 4).

Tabla 13.- Medias, prueba de F y DMS (Fisher $\alpha=0.05$) para el logaritmo del número de UFC/ml y cepas fenotípicamente diferentes por árbol en nervaduras de las hojas y ramas de cafeto en Jayuya, PR.

Efecto	Log UFC/ml ¹		Cepas /árbol	
	Hojas	Ramas	Hojas	Ramas
<i>Manejo de sombra</i>				
Baja diversidad de árboles	1.47	2.01	1.35ab	1.25
Alta diversidad de árboles	1.58	2.00	1.70a	1.00
A sol	1.75	2.25	0.70b	1.15
Prueba de F	NS	NS	*	NS
DMS	n/a	n/a	0.62	n/a
<i>Época</i>				
Seca	1.38	1.62	1.10	1.47
Lluviosa	1.82	2.55	1.53	1.17
Prueba de F	NS	**	NS	NS
DMS	n/a	n/a ²	n/a	n/a
<i>Año</i>				
Año1	1.42	2.12	1.37	1.77
Año2	1.78	2.06	1.57	1.17
Prueba de F	*	NS	NS	NS
DMS	n/a ²	n/a	n/a	n/a
<i>Manejo de sombra x época</i>				
Prueba de F	**	**	NS	NS
<i>Manejo de sombra x año</i>				
Prueba de F	NS	NS	NS	NS
<i>Época x año</i>				
Prueba de F	NS	NS	NS	NS
<i>Manejo de sombra x época x año</i>				
Prueba de F	*	**	NS	NS

DMS= Diferencia mínima significativa a nivel de probabilidad $\alpha=0.05$. En los casos donde la prueba de F no fue significativa, no se reporta el valor de DMS. En la misma columna por cada factor, medias seguidas por la misma letra no son diferentes al nivel de $\alpha=0.05$.

¹Transformación de los valores de conteo de viables en placa Y: $[Y' = \log(Y + 1)]$ n/a: No se utilizó la prueba de DMS en los casos donde la prueba de F fue no significativa.

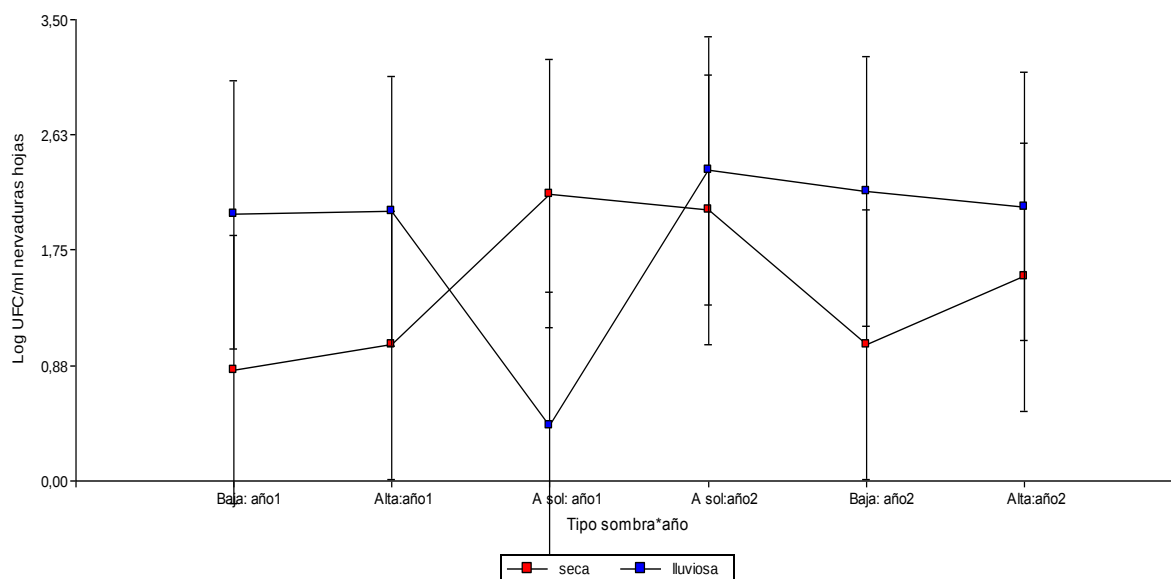


Figura 4.- Medias de Log UFC/ml de nevaduras de hojas en siembras a sol y bajo distintos tipos de sombra de Jayuya-PR. período 2010-2012. Líneas representan la diferencia mínima significativa sobre la media ($\alpha=0.05$).

En ramas hubo mayor Log UFC/ml en la época lluviosa frente a la seca para los cafetos en parcelas con sombra. En parcelas a sol hubo mayor Log UFC/ml en la época seca en el año1, pero no hubo diferencias en el año2, esto fue similar a lo ocurrido con nevaduras de las hojas de cafeto (figura 5).

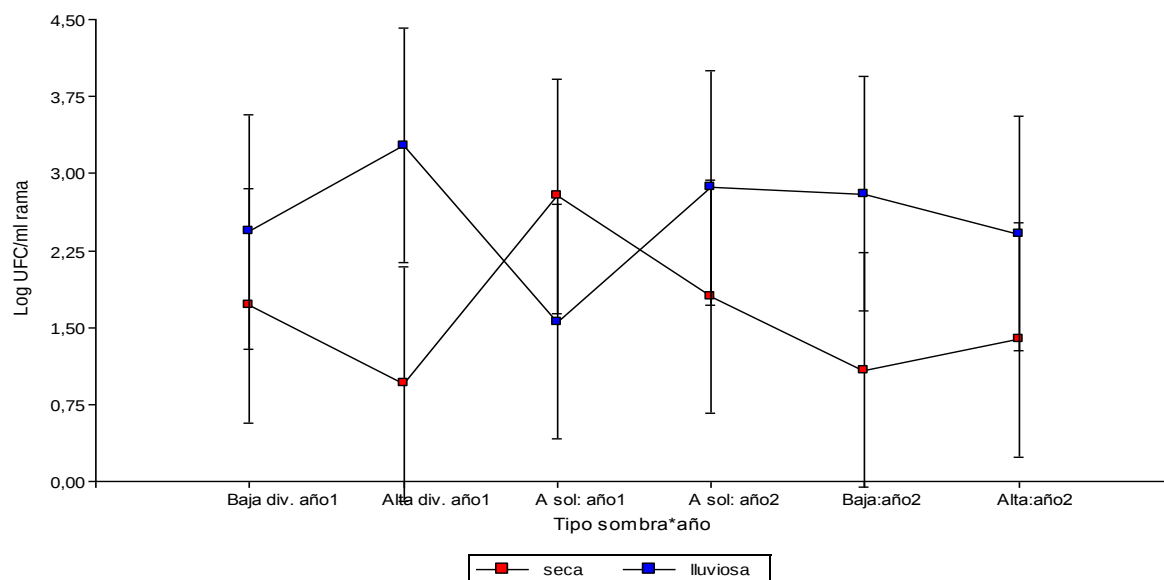


Figura 5.- Medias de Log UFC/ml de ramas de cafeto en siembras a sol y bajo distintos tipos de sombra de Jayuya, PR. período 2010-2012. Líneas representan la diferencia mínima significativa sobre la media ($\alpha=0.05$).

Cepas fenotípicamente diferentes por árbol en Jayuya:

La variable de diversidad para los datos de la localidad de Jayuya, mostraron diferencias ($p < 0.05$) para el efecto del factor tipo de sombra con el promedio mayor de cepas por árbol para las parcelas de sombra de alta diversidad frente a las parcelas a sol (tabla 13). Probablemente los niveles de bacterias endofíticas en las plantas del control a sol fueron menos consistentes y menos diversos. El Log UFC/ml fue muy variable y los efectos de los factores podrían estar enmascarados por la interacción sombra por localidad por época.

Se puede atribuir este comportamiento a las diferencias en el manejo de las parcelas en la zona. De las visitas a campo para la recolección de muestras, se pudo evidenciar que en el año 1 no hubo un buen manejo de malezas en las parcelas con los tratamientos de sombra. Al respecto, las malezas juegan un papel muy importante en el desarrollo de la enfermedad porque pueden ser hospederos secundarios de bacterias de tipo fastidioso, entre ellas *X. fastidiosa* (Lopes et al., 2003). Por otro lado, las parcelas a sol de la localidad de Jayuya presentaban altos niveles de erosión, por lo cual en estas parcelas los niveles de malezas fueron menores (Cruz y Zapata, 2011). En el estudio realizado por estos autores, las malezas predominantes en cafeto fueron *Spathodea campanulata* (meaito), *Dieffenbachia seguine* (rábano), *Commelina diffusa* (cohítre), *Fimbristylis miliacea* (yerba de chino), *Brachiaria purpurascens* (malojillo) *Impatiens walleriana* (miramelinda).

LAS MARÍAS:

Log UFC/ml en Las Marías:

Hubo interacciones de sombra por año y sombra por época para Log UFC/ml de nervaduras de hojas de cafeto (tabla 14). La interacción sombra por año, en nervaduras de cafeto fue no ordenada, con mayores valores de Log UFC/ml para las parcelas a sol en el año 1, mientras que en el año 2 las mismas parcelas presentaron los valores de Log UFC/ml menores (figura 6).

Tabla 14.- Medias, prueba de F y DMS (Fisher $\alpha=0.05$) para el logaritmo del número de UFC/ml y cepas fenotípicamente diferentes por árbol en nervaduras de las hojas y ramas de cafeto en Las Marías, PR.

Efecto	Log UFC/ml		Cepas /árbol	
	Hojas	Ramas	Hojas	Ramas
<i>Manejo de sombra</i>				
Baja diversidad de árboles	1.42	2.03	1.45	1.18
Alta diversidad de árboles	1.29	1.85	1.00	1.50
A sol	1.52	1.68	0.95	1.20
Prueba de F	NS	NS		NS
DMS	n/a	n/a		n/a
<i>Época</i>				
Seca	1.23	1.73	0.80b	0.90b
Lluviosa	1.59	1.98	1.47a	2.10a
Prueba de F	NS		**	**
DMS	n/a	n/a	0.37	0.51
<i>Año</i>				
Año1	1.86	2.32	1.60a	2.17a
Año2	0.96	1.40	0.67b	0.83b
Prueba de F	*	NS	**	**
DMS	n/a ²	n/a	0.37	0.51
<i>Manejo de sombra x época</i>				
Prueba de F	*	NS	NS	NS
<i>Manejo de sombra x año</i>				
Prueba de F	**	NS	NS	NS
<i>Época x año</i>				
Prueba de F	NS	NS	NS	**
<i>Manejo de sombra x época x año</i>				
Prueba de F	NS	NS	NS	NS

DMS= Diferencia mínima significativa a nivel de probabilidad de $\alpha=0.05$. En los casos donde la prueba de F no fue significativa, no se reporta el valor de DMS.

En la misma columna por cada factor, medias seguidas por la misma letra no son diferentes al nivel de $\alpha=0.05$.

¹Transformación de los valores de conteo de viables en placa Y: $[[Y' = \log(Y + 1)]]$ n/a²: no aplica rangos porque la interacción fue no ordenada.

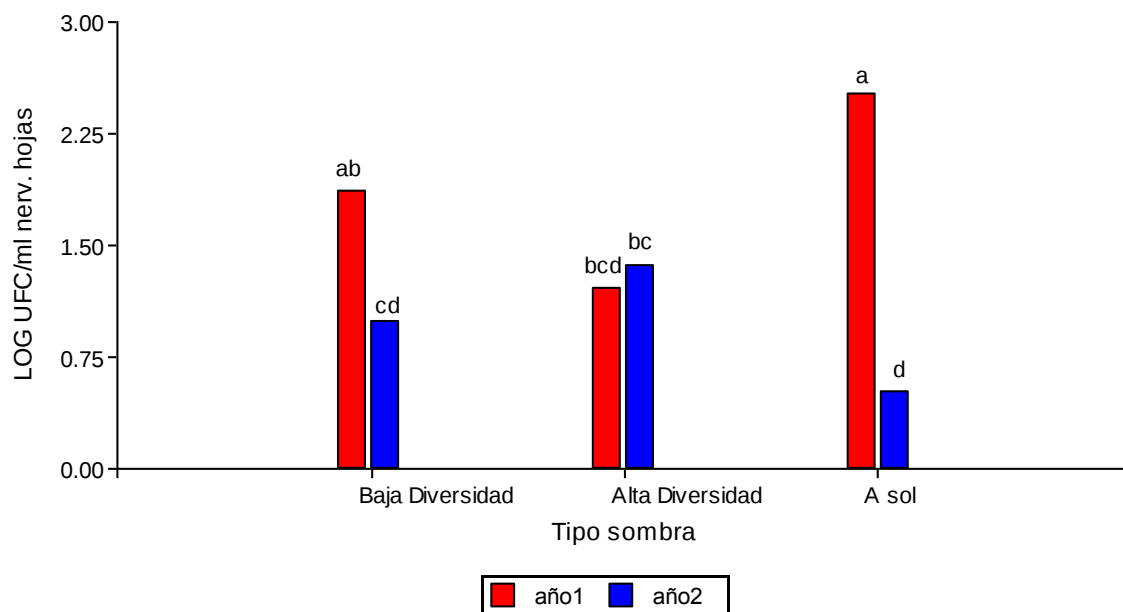


Figura 6.- Medias de Log UFC/ml de nevaduras de hojas en siembras de Las Marías- PR. período 2010-2012. Medias seguidas por la misma letra no son diferentes al nivel de $\alpha=0.05$.

En la interacción sombra por época, se detecta que los promedios para las parcelas de sombra fueron más altos en la época lluviosa frente a la seca. Esta tendencia no se mantuvo para las parcelas a sol con mayores promedios de Log UFC/ml en la época seca frente a la lluviosa (figura 7).

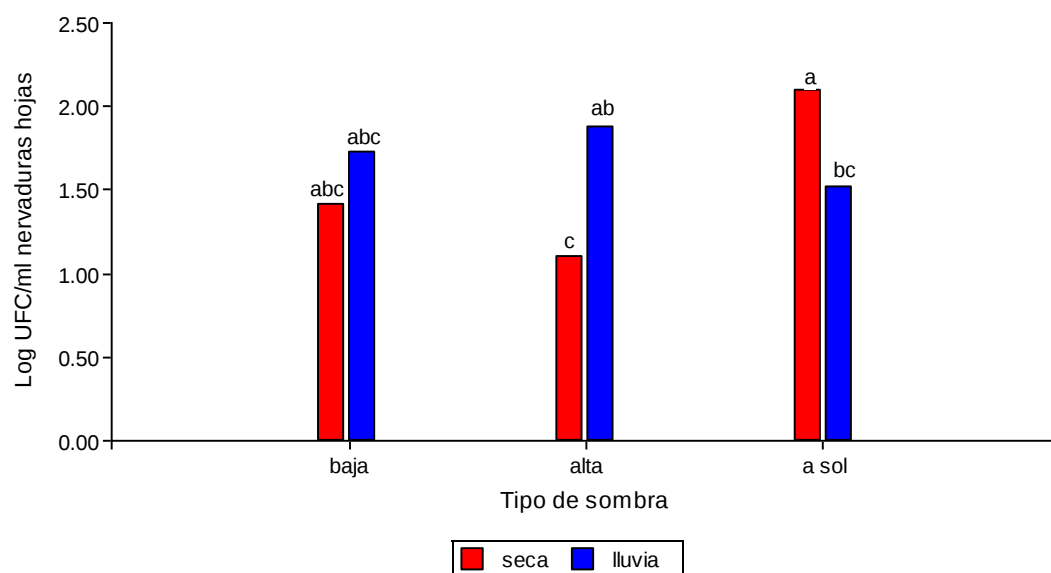


Figura 7.- Medias de Log UFC/ml de nevaduras de hojas en siembras de Las Marías- PR. período 2010-2012. Medias seguidas por la misma letra no son diferentes al nivel de $\alpha=0.05$.

Estas interacciones pueden estar relacionadas al manejo de las plantaciones. En el caso de las parcelas a sol se encuentran ubicadas en una plantación comercial que difiere en las prácticas de abonamiento, control de las malezas con aspersiones de glifosato, y tratamientos con insecticidas y de fungicidas. En la finca con sombra de alta diversidad de especies, se busca la certificación orgánica; por lo tanto el manejo de malezas es mecánico, no se utilizan plaguicidas y la fertilización es acorde a lo permitido por la agricultura orgánica. Probablemente las diferencias y la presencia de las interacciones (figuras 6 y 7) estén relacionadas a ciertas prácticas agronómicas que no se estudian en el presente trabajo.

Por otro lado, en el control a sol se determinaron diferencias para el porcentaje de cobertura (92,3%) medidos con el GRS densitómetro (tabla 3). La estructura de la canopia para el control a sol en Las Marías, es más compacta y la cantidad de sol que ingresa al dosel de donde se toma la muestra es menor en comparación a las otras parcelas de sol. Probablemente las diferencias que se observaron en el presente ensayo para el control a sol se deban a las características propias de la especie y de las prácticas agronómicas que difieren en estas parcelas.

Los Log UFC/ml de nervaduras de hojas y ramas de cafeto en la localidad de Las Marías fueron bajos. Además se registraron menores conteos de insectos vectores potenciales (Brent Brodbeck comunicación personal 2011) por lo que se considera que al no existir el vector potencial ni la bacteria, la probabilidad de tener la enfermedad es baja en esta localidad.

Cepas fenotípicamente diferentes por árbol en Las Marías:

Para las cepas fenotípicamente diferentes por árbol de ramas, hubo interacción época por año (figura 8).

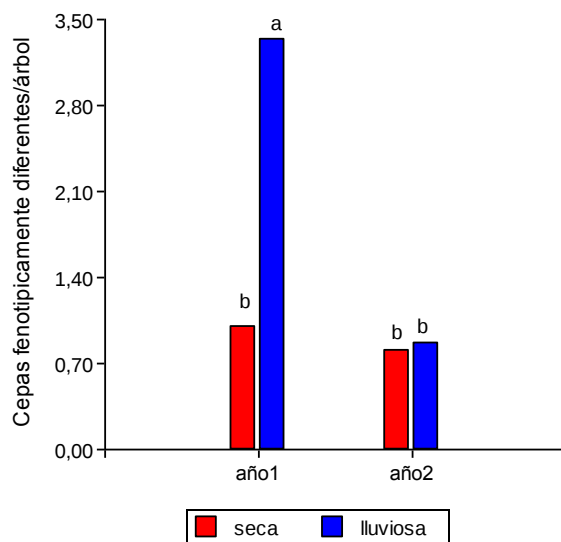


Figura 8.- Medias de cepas fenotípicamente diferentes por árbol de ramas de cafeto en siembras de Las Marías- PR. período 2010-2012. Medias seguidas por la misma letra no son diferentes al nivel de $\alpha=0.05$.

La diversidad de cepas de nervaduras de hojas fue afectada significativamente por la época y el año (tabla 14). Se encontraron mayores niveles de bacterias en la época lluviosa frente a la época seca en los dos años de investigación. Además, los datos para el año 1 fueron mayores que en el año2 en la diversidad de cepas de nervaduras de las hojas y ramas.

YAUCO:

Log UFC/ml en Yauco:

Hubo interacción época por año de Log UFC/ml en ramas de cafeto (tabla 15) esta fue de tipo no ordenada, con mayores Log UFC/ml en la época lluviosa del año1, mientras que en el año 2 la tendencia fue inversa (figura 9).

El año1 (2010-2011) fue un año atípico con los valores de precipitación total más altos en comparación al año 2. Los mayores valores de precipitación desencadenan diferencias en el manejo agronómico entre años. El control de malezas y de insectos, varía de un año a otro lo que podría estar causando las interacciones en esta localidad.

Tabla 15.- Medias, prueba de F y DMS (Fisher $\alpha=0.05$) para el logaritmo del número de UFC/ml y cepas fenotípicamente diferentes por árbol en nervaduras de las hojas y ramas de cafeto en Yauco, PR.

Efecto	Log UFC/ml		Cepas /árbol	
	Hojas	Ramas	Hojas ¹	Ramas
<i>Manejo de sombra</i>				
Baja diversidad de árboles	1.03	1.64	0.95	1.10
Alta diversidad de árboles	0.94	1.63	0.95	1.50
A sol	1.14	1.31	0.80	0.80
Prueba de F	NS	NS	NS	*
DMS	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Época</i>				
Seca	1.00	1.15	0.80	1.20
Lluviosa	1.06	1.91	1.00	1.07
Prueba de F	NS	**	NS	NS
DMS	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Año</i>				
Año1	1.13	2.14	1.13	1.50
Año2	0.94	0.92	0.67	0.77
Prueba de F	NS	**	NS	**
DMS	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Manejo de sombra x época</i>				
Prueba de F	NS	NS	NS	NS
<i>Manejo de sombra x año</i>				
Prueba de F	NS	NS	NS	NS
<i>Época x año</i>				
Prueba de F	NS	**	NS	**
<i>Manejo de sombra x época x año</i>				
Prueba de F	NS	NS	NS	NS

DMS= Diferencia mínima significativa a nivel de probabilidad $\alpha=0.05$. En los casos donde la prueba de F no fue significativa, no se reporta el valor de DMS. En la misma columna por cada factor, medias seguidas por la misma letra no son diferentes al nivel de $\alpha=0.05$.

¹Transformación de los valores de conteo de viables en placa Y: $[Y' = \log(Y + 1)]$ n/a²: no aplica rangos porque la interacción fue no ordenada.

En la misma columna por cada factor, medias seguidas por la misma letra no son diferentes al nivel de $\alpha=0.05$ ¹para el modelo p=0.1674.

Además, vale considerar que cada finca presenta diferencias de altitud, ubicación, manejo de malezas, fertilización y aplicaciones de plaguicidas lo cual podría estar relacionado con las interacciones de los factores en estudio sombra y localidad.

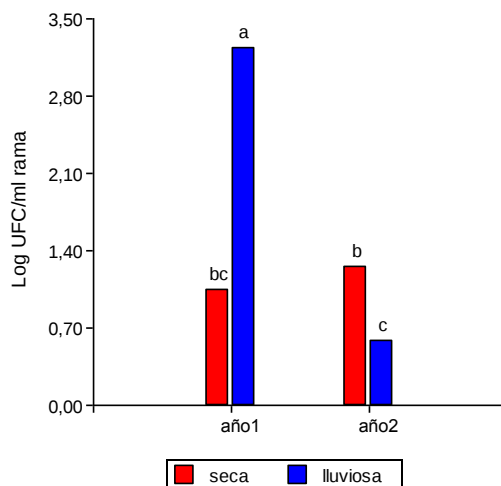


Figura 9.- Medias de Log UFC/ml de ramas de cafeto en siembras de Yauco- PR. período 2010-2012. Medias seguidas por la misma letra no son diferentes al nivel de $\alpha=0.05$.

Cepas fenotípicamente diferentes por árbol en Yauco:

La interacción de año por época de cepas fenotípicamente diferentes por árbol en ramas fue no ordenada, con mayores conteos de cepas por árbol en la época lluviosa del año1, mientras que en el año 2 la tendencia fue inversa (tabla 15, figura 10).

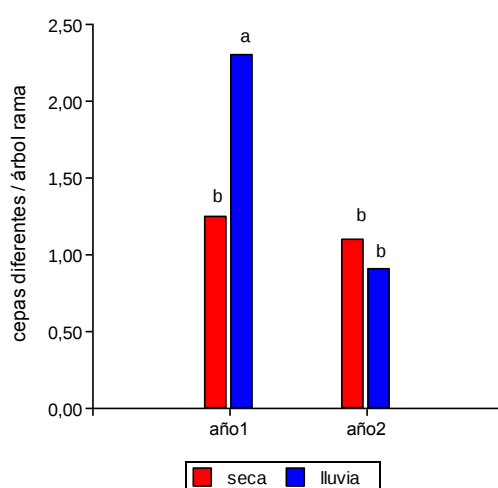


Figura 10.- Medias de cepas fenotípicamente diferentes por árbol de ramas de cafeto en siembras de Yauco- PR. período 2010-2012. Medias seguidas por la misma letra no son diferentes al nivel de $\alpha=0.05$.

Análisis serológico en Muestras vegetales de Cafeto:

Efecto de la Época:

En general, muy pocos ($< 5\%$) de los árboles de cafeto tuvieron lecturas de absorbancia dentro de los valores sospechosos (≥ 0.7) (tabla 1). Hubo una diferencia ($p < 0.0001$, χ^2) en la proporción de árboles de cafeto sospechosos de estar infectados por *X. fastidiosa* (absorbancia ≥ 0.7) en la época seca versus la lluviosa. Más de 9.2% de los árboles muestreados en la época seca tuvieron una absorbancia ≥ 0.7 mientras que menos de 1% de los árboles sospechosos se detectaron en la época lluviosa (tabla 16). Probablemente esto se deba a que en la época seca el muestreo fue más eficiente porque los síntomas son más evidentes. Esto es acorde a lo mencionado por Andersen (2005), quien en un proyecto llevado a cabo en Puerto Rico desde el 2003 al 2005 encontró que muchas plantas de cafeto aparecían sintomáticas para CLS durante la época seca (febrero a mayo).

Vale destacar que *X. fastidiosa* es un patógeno restringido al xilema, por lo que algunas investigaciones sugieren que los síntomas son atribuibles a una disfunción del sistema de conducción de agua relacionada a la oclusión de los vasos del xilema (Esau, 1948, Mircetich et al., 1976, Mollenhauer y Hopkins, 1976 en: Queiroz-Voltan et al. 2007), de ahí que los síntomas sean más visibles en la época de sequía.

Además, en Puerto Rico las fincas de cafeto bajo sombra o a sol no utilizan riego, por lo que las plantas sufren estrés hídrico durante los meses de diciembre a mayo, y ciertos problemas bióticos como CLS podrían ser más notorios porque se afecta el sistema vascular de los árboles.

Tabla 16.- Frecuencia de árboles de cafeto seropositivos (≥ 0.7) o seronegativos (< 0.7) en la prueba DAS-ELISA para *X. fastidiosa*, distribuidos por época.

Absorbancia ¹	Número de árboles de cafeto muestreados		
	Época lluviosa	Época seca	Total
< 0.7	238	218	456
≥ 0.7	2	22	24
Total	240	240	480

Efecto de Localidad:

El porcentaje de árboles sospechosos con *X. fastidiosa* (absorbancia ≥ 0.7) varió dependiendo de la localidad muestreada ($p < 0.05$, χ^2) (tabla 17). El mayor porcentaje de árboles sospechosos se obtuvo para Adjuntas y Jayuya. Zapata y colaboradores en estudios realizados durante 2003-2006 encontraron una alta incidencia de árboles sospechosos de estar enfermos en Adjuntas versus otras localidades (datos no publicados). Las diferencias podrían estar relacionadas a otros factores no analizados como: climatología, edad del árbol, podas fitosanitarias, control de malezas, fertilización, aplicación de pesticidas o fungicidas, prácticas agrícolas que fueron variables entre las fincas.

Tabla 17.- Frecuencia de árboles de café seropositivos (≥ 0.7) o seronegativos (< 0.7) en la prueba DAS-ELISA para *X. fastidiosa*, distribuidos por localidad.

Absorbancia ¹	Número de árboles de café muestreados				
	Adjuntas	Jayuya	Las Marías	Yauco	Total
< 0.7	108	112	118	118	456
≥ 0.7	12	8	2	2	24
Total	120	120	120	120	480

En un trabajo previo se encontró mayor abundancia de insectos vectores potenciales de transmitir *X. fastidiosa* (orden: Homoptera, familia: *Cicadellidae*) en Adjuntas con 4931 capturas, que representó el 66.4% de todos los insectos colectados por localidad (Mariño-Cárdenas, 2008). En Jayuya, en otro estudio del proyecto ZTS-51 con enfoque entomológico se encontró que las densidades del vector, *Caribovia coffeacola*, fueron mayores en las parcelas de mayor altitud entre ellas las de Jayuya (Brent Brodbeck, comunicación personal).

La alta proporción de árboles sospechosos de estar infectados con *X. fastidiosa* observada en Jayuya en el presente estudio puede ser explicada por la alta ocurrencia del vector en dicha localidad. Desde el punto de vista fitopatológico, al existir el vector potencial, el hospedero susceptible, y el agente causal, se reúnen todos los elementos necesarios para el desarrollo de una enfermedad, por lo cual labores de monitoreo y prevención deben centrarse en Adjuntas y Jayuya.

Efecto del año:

Hubo diferencias significativas para año ($p < 0.01$) con el mayor porcentaje de casos en el año1 (tabla 18). En este año también se encontraron muchas diferencias en Log UFC/ml y en cepas diferentes por árbol. Se debe considerar también que el año1 fue atípico con totales de precipitación mayores al año 2 (tabla 2).

Tabla 18.- Frecuencia de árboles de cafeto seropositivos (≥ 0.7) o seronegativos (< 0.7) en la prueba DAS-ELISA para *X. fastidiosa*, distribuidos por año.

Absorbancia ¹	Número de árboles de cafeto muestreados		
	Año1	Año2	Total
< 0.7	218	238	456
≥ 0.7	22	2	24
Total	240	240	480

No hubo efecto significativo ($p = 0.88$) para las siembras a sol y con diferentes tipos de sombra (datos no incluidos). Por esta razón se considera que no hubo asociación entre la proporción de árboles sospechosos ($p = 0.76$) y el tipo de sombra utilizada.

Hubo diferencias altamente significativas ($p < 0.01$, prueba t pareada) para la absorbancia de nervaduras de las hojas versus ramas de cafeto. La absorbancia promedio para nervaduras fue de 0.44 mientras que para rama fue de 0.34, indicando que las hojas tienen mayor cantidad de bacterias que las ramas.

Los valores de absorbancia encontrados en ramas y hojas de cafeto fueron menores a los encontrados por Zumbado (2007) en Costa Rica, quien obtuvo valores de absorbancia en plantas con sintomatología de “crespera” entre 0.8 y 1.2 valores de absorbancia.

Contrastación de Poblaciones de Bacterias Endofíticas Aisladas de Cítricos:

Log UFC/ml Muestras de Árboles de Cítrico:

Para la época seca en el año 1 no se detectaron diferencias para los factores en estudio, no hubo interacción tipo de sombra por localidad en nervaduras de hojas y en ramas de *Citrus* sp. (tabla 19).

Para el año 2 época seca, hubo interacción sombra por localidad en Log UFC/ml de rama (tabla 19). De la figura 11 se detecta que la interacción no fue ordenada. Los log UFC/ml de rama fueron menores en la localidad de Las Marías, mientras que los valores más altos se detectaron en la localidad de Jayuya en parcelas de baja diversidad de sombra, mientras que en parcelas de alta diversidad los Log UFC/ml más altos se detectaron en Adjuntas (figura 11).

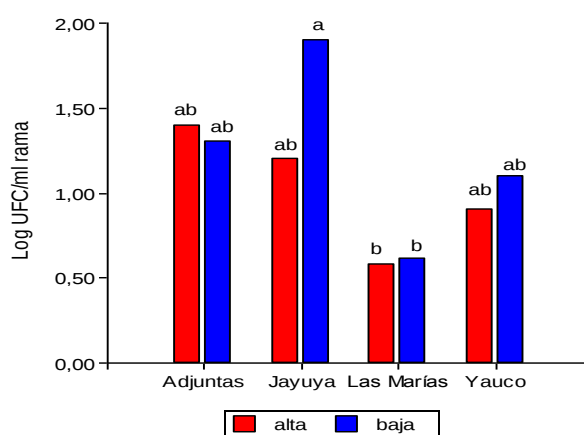


Figura 11.- Medias de Log UFC/ml de ramas de cafeto muestreadas en la época lluviosa del período 2010-2011 en parcelas de cuatro localidades de Puerto Rico. Medias seguidas por la misma letra no son diferentes al nivel de $\alpha=0.05$.

Tabla 19.- Medias, significancia de la prueba de F y valor de la diferencia mínima significativa para el logaritmo del número de UFC/ml de árboles de *Citrus* sp. En Puerto Rico.

Efecto	2010-2011				2011-2012			
	Época seca		Época lluviosa		Época seca		Época lluviosa	
	Hojas	Ramas	Hojas	Ramas	Hojas	Ramas	Hojas	Ramas
<i>Localidad</i>								
Adjuntas	0.61	1.07	0.64	0.89b	1.36	0.79	1.41	1.31ab
Jayuya	1.00	0.83	1.26	0.27b	1.53	0.97	1.66	2.01a
Las Marías	1.73	1.74	0.63	0.83b	1.02	1.50	0.59	1.20ab
Yauco	1.08	0.74	1.85	2.10a	0.59	0.72	1.12	0.97b
Prueba de F	NS	NS	NS	*	NS	*	NS	*
DMS	n/a	n/a	n/a	0.30	n/a	n/a ²	n/a	0.09
<i>Manejo de sombra</i>								
Baja diversidad de árboles	1.31	1.26	1.11	0.91	1.03	0.90	1.31	1.30
Alta diversidad de árboles	0.90	0.93	1.07	1.14	1.22	1.08	1.08	1.44
Prueba de F	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
DMS	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Localidad x tipo de sombra</i>								
Prueba de F	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS

DMS= Diferencia mínima significativa a nivel de probabilidad de $\alpha=0.05$. En los casos donde la prueba de F no fue significativa, no se reporta el valor de DMS.

En la misma columna por cada factor, medias seguidas por la misma letra no son diferentes al nivel de $\alpha=0.05$.

¹Transformación de los valores de conteo de viables en placa Y: $[[Y' = \log(Y + 1)]]$

n/a: No aplica. No se utilizó la prueba de DMS en los casos donde la prueba de F fue no significativa.

n/a²: no aplica rangos porque la interacción fue no ordenada.

En Las Marías, para las parcelas de alta diversidad de especies, el propietario busca maximizar la diversidad por lo que la cantidad árboles de *Citrus* sp en esta finca es menor en comparación a los otros tratamientos de alta diversidad, de ahí que la presión de la enfermedad en estos sea mínima.

Para la época lluviosa, hubo efecto significativo de localidad para Log UFC/ml de ramas, en los años 1 y 2 (tabla 19). En el año 1, hubo más Log UFC/ml en Yauco; mientras que en el año 2 hubo más Log UFC/ml en Jayuya. Estos datos fueron similares a lo ocurrido con el vector donde las densidades poblacionales fueron más altas en Jayuya y Yauco, que corresponden a las localidades de mayor altitud del estudio (Brent Brodbeck, comunicación personal, 2011).

Para *Citrus* sp., los promedios generales del experimento fueron de 287 UFC/ml en nervaduras de hoja y 199 UFC/ml en rama para la época seca, 167 UFC/ml en nervaduras de hoja y 142 UFC/ml en rama para la época lluviosa. Estos promedios son mayores a los reportados por Rivera (2006), quien encontró un promedio general de 102 bacterias, en aislamientos de endofíticos de *Citrus* sp., en Puerto Rico.

Al comparar los efectos significativos encontrados en cafeto versus los efectos significativos encontrados en cítricos para Log UFC/ml, se encontraron menores diferencias estadísticas para cítrico. Probablemente esto se debe a que en cítricos el factor tipo de sombra no compara parcelas a sombra frente a parcelas a sol. La presencia de una comunidad biológica muy diferente como son las parcelas a sol en los ANOVAS para cafeto podría estar causando más interacciones.

Para *Citrus* sp., las bacterias que generalmente se han aislado en Puerto Rico son: *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *M. mesophylicum*, *P. putida*, *Staphylococcus warneri*, *Stenotrophomonas maltophilia*, y *X. axonopodis* pv. *vasculorum* (Zapata et al., 2011). Dentro de la comunidad de microorganismos endofíticos aislados de cítricos en el presente ensayo es probable que esté incluida en las especies mencionadas.

La lluvia puede enmascarar los síntomas observados en cítricos, por lo cual la recolección de plantas con sintomatología de amarillamiento intervenal o daño de insecto podría estar relacionada con otros factores, como deficiencias nutricionales o la enfermedad del enverdecimiento de los cítricos.

En un estudio de interacción de cepas endofíticas aisladas a partir de cítricos infectados con la bacteria *Xylella fastidiosa* llevado a cabo por Lacava et al. (2004), aislaron bacterias endofíticas a partir de hojas y ramas de naranjo dulce y mandarina.

Ellos mostraron una incidencia baja de endofíticas, y encontraron como géneros comunes a *Bacillus pumilus*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Enterobacter cloacae*, *Methylobacterium extorquens*, *M. mesophilicum*, *Nocardia sp.*, *Pantoea agglomerans*, *Streptomyces sp.* y *Xanthomonas campestris*.

Dentro de la comunidad endofítica aislada por Lacava et al., (2004), ellos encontraron a *Streptomyces sp.* Este género también pudo ser aislado en el presente ensayo, donde la cepa de codificación 5357 formó sobre el medio de cultivo colonias compactas de consistencia algodonosa y olor a tierra. Se observó también que la cepa forma “falsas hifas” que constituyen células actinomicetales muy juntas lo que da apariencia de hifas esto es un arreglo especial de las células característico de los actinomicetos (Madigan et al., 1998).

Cepas Fenotípicamente Diferentes por Árbol:

No se evidenciaron muchas diferencias para las cepas fenotípicamente diferentes por árbol de *Citrus sp.* (tabla 20)

Para cepas fenotípicamente diferentes por árbol en la época seca, hubo efecto significativo para el factor tipo de sombra en nervaduras de hojas en el año 2, con el promedio mayor para las parcelas de baja diversidad frente a las parcelas de alta diversidad (tabla 20).

Para cepas fenotípicamente diferentes por árbol en la época lluviosa, no se detectaron diferencias para los factores en estudio ni para la interacción.

Tabla 20.- Medias, significancia de la prueba de F y valor de la diferencia mínima significativa para el total de cepas diferentes por árbol de *Citrus* sp. en Puerto Rico.

Efecto	2010-2011				2011-2012			
	Época seca		Época lluviosa		Época seca		Época lluviosa	
	Hojas	Ramas	Hojas	Ramas	Hojas	Ramas	Hojas	Ramas
<i>Localidad</i>								
Adjuntas	0.70	1.40	1.00	1.10	0.40	0.80	1.20	1.30
Jayuya	0.90	0.90	1.10	1.20	1.20	0.90	0.80	0.20
Las Marías	0.70	0.90	0.80	0.40	0.90	1.40	0.40	1.20
Yauco	0.60	0.60	1.00	1.20	1.10	0.90	1.40	1.90
Prueba de F	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
DMS	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Manejo de sombra</i>								
Baja diversidad de árboles	0.70	1.05	0.85	1.00	1.20a	1.10	0.90	1.45
Alta diversidad de árboles	0.75	0.85	1.10	0.95	0.60b	0.90	1.00	0.85
Prueba de F	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS
DMS	n/a	n/a	n/a	n/a	0.50	n/a	n/a	n/a.
<i>Localidad x tipo de sombra</i>								
Prueba de F	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

DMS= Diferencia mínima significativa a nivel de probabilidad de $\alpha=0.05$. En los casos donde la prueba de F no fue significativa, no se reporta el valor de DMS.

En la misma columna por cada factor, medias seguidas por la misma letra no son diferentes al nivel de $\alpha=0.05$.

¹Transformación de los valores de conteo de viables en placa Y: $[[Y' = \log(Y + 1)]]$.

n/a: No aplica. No se utilizó la prueba de DMS en los casos donde la prueba de F fue no significativa.

n/a²: no aplica rangos porque la interacción fue no ordenada.

Análisis serológico para X. fastidiosa en Muestras de Citrus sp.

La absorbancia a 650 nm en la prueba DAS-ELISA para *X. fastidiosa* en muestras de cítricos fue baja. Solo se detectaron 3 árboles sospechosos (absorbancia ≥ 0.7) (tabla 24).

Hubo diferencias significativas para la absorbancia proveniente de nervaduras de hojas de *Citrus* sp. (0.43) versus ramas (0.32) (t pareada; $p < 0.001$). Esto es acorde a lo obtenido en cafeto. Estos datos concuerdan con lo obtenido por Lacava et al. (2004) quienes determinaron que las nervaduras de las hojas son el nicho preferencial para la multiplicación de la bacteria.

No hubo muchas diferencias en la diversidad cepas presentes en el sistema vascular de cítricos, probablemente al usar técnicas moleculares se podrían obtener diferencias. Dentro de los métodos moleculares para auscultar las poblaciones microbianas se dispone de técnicas como “Length heterogeneity PCR” que proporciona un perfil de la diversidad de amplicones en mezclas complejas de productos de PCR (Mills et al., 2006) siendo un método rápido, reproducible y muy útil para la evaluación rápida de la diversidad natural de comunidades microbianas. T-RFLP “Terminal restriction fragment length polymorphism” ha sido usada como una herramienta efectiva para auscultar comunidades microbianas (Reddy, et al., 2007). El protocolo incluye aislamiento del ARN o ADN de la comunidad, amplificación por PCR del amplicon objetivo, digestión con enzimas de restricción y la separación por tamaño de los fragmentos de restricción.

La técnica molecular más avanzada hasta el momento para obtener información de comunidades ambientales complejas es las genotecas ambientales, las cuales crean una base de clones que contienen “todos” los genes secuenciados de una comunidad a partir de ADN meta genómico extraído (National Academy of Science, 2007).

Estos métodos constituyen una buena alternativa para determinar con mayor precisión el efecto de los factores en estudio en la comunidad microbiana endófito de *Citrus* sp. La utilidad práctica de realizar una caracterización molecular de los endófitos consiste en determinar las posibles interacciones microbianas que pueden contribuir al control de CVC.

Contrastación de Poblaciones de Bacterias Endofíticas Aisladas de *Inga* sp.

Log UFC/ml Muestras de Árboles de Inga sp:

Para *Inga* sp., al igual que en *Citrus* sp., se detectó menores efectos significativos en comparación al cafeto (tabla 21). Hubo mayor efecto de la interacción tipo de sombra por localidad para *Inga* sp.

En la época seca para el año 1, hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) para los factores tipo de sombra y localidad en nervaduras de las hojas de *Inga* sp. Para el tipo de sombra el promedio más alto se detectó en la parcela de alta diversidad, mientras que el menor promedio se obtuvo en las parcelas de baja diversidad. Para localidad se detectó más Log UFC/ml para la localidad de Jayuya y Yauco, mientras que los promedios menores se detectaron en las localidades de Las Marías y Adjuntas (tabla 21).

En el año 2, para la época seca hubo una interacción sombra por localidad de Log UFC/ml de ramas no ordenada (tabla 21, figura 12).

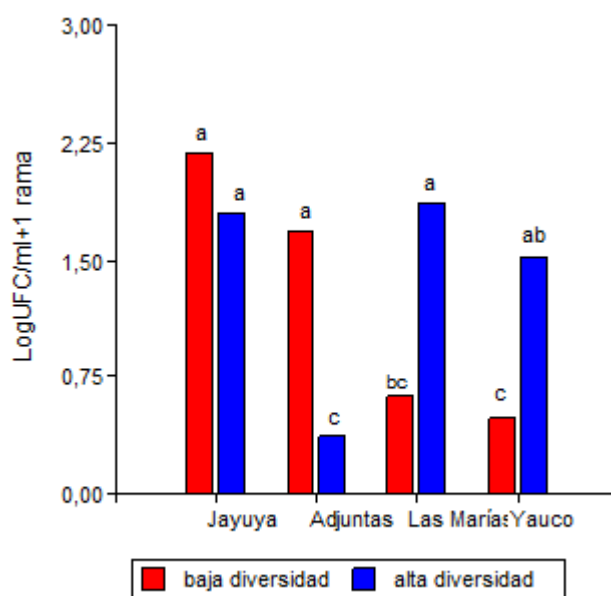


Figura 12.- Medias de Log UFC/ml de ramas de *Inga* muestreadas en la época seca del período 2010-2011. Medias seguidas por la misma letra no son diferentes al nivel de $\alpha = 0.05$.

Tabla 21.- Medias, significancia de la prueba de F y valor de la diferencia mínima significativa para el logaritmo del número de UFC/ml de árboles de *Inga* sp. en Puerto Rico.

Efecto	2010-2011				2011-2012			
	Época seca		Época lluviosa		Época seca		Época lluviosa	
	Hojas	Ramas	Hojas	Ramas	Hojas	Ramas	Hojas	Ramas
<i>Localidad</i>								
Adjuntas	0.26b	0.21	0.35	0.92	1.02	1.03	1.56	1.85
Jayuya	0.77a	0.52	0.68	1.18	1.42	1.99	1.93	1.31
Las Marías	0.33b	0.35	0.68	0.91	1.37	1.25	2.14	2.66
Yauco	0.49ab	0.59	0.55	0.56	0.64	1.00	1.56	1.94
Prueba de F	*	NS	NS	NS	NS	*	NS	*
DMS	0.11	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a ²	n/a	n/a
<i>Manejo de sombra</i>								
Baja diversidad de árboles	0.31b	0.45	0.73	1.23a	1.16	1.24	1.86	2.14
Alta diversidad de árboles	0.61a	0.39	0.40	0.55b	1.06	1.39	1.74	1.74
Prueba de F	*	NS	NS	**	NS	NS	NS	NS
DMS	0.21	n/a	n/a	0.28	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Localidad x tipo de sombra</i>								
Prueba de F	NS	NS	NS	*	NS	**	NS	**

DMS= Diferencia mínima significativa a nivel de probabilidad de $\alpha=0.05$. En los casos donde la prueba de F no fue significativa, no se reporta el valor de DMS.

En la misma columna por cada factor, medias seguidas por la misma letra no son diferentes al nivel de $\alpha=0.05$.

¹Transformación de los valores de conteo de viables en placa Y: $[[Y' = \log(Y + 1)]]$.

n/a: No aplica. No se utilizó la prueba de DMS en los casos donde la prueba de F fue no significativa.

n/a²: no aplica rangos porque la interacción fue no ordenada.

En el año 1 época lluviosa, los promedios de Log UFC/ml de ramas en las parcelas de baja diversidad fueron más del doble en comparación a las parcelas de alta diversidad de especies (tabla 21). Estos datos fueron similares a lo obtenido en el vector *Caribovia coffeacola* por Brodbeck et al., (2011) quienes encontraron que en las parcelas de baja diversidad donde se utiliza *Inga* sp., como única especie de sombra las poblaciones de los saltones de hoja pueden incrementarse significativamente.

En el año 2 época lluviosa, hubo interacción tipo de sombra por localidad de los Log UFC/ml de rama de *Inga*. De la figura 13 se deduce que la interacción es no ordenada.

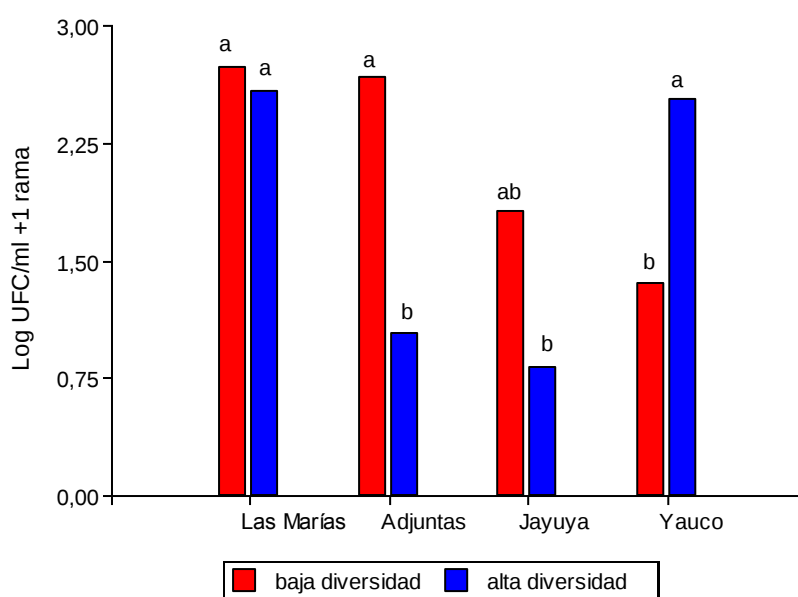


Figura 13.- Medias de Log UFC/ml de ramas de *Inga* muestreadas en la época seca del período 2011-2012. Medias seguidas por la misma letra no son diferentes al nivel de $\alpha=0.05$.

Cepas Fenotípicamente Diferentes por Árbol de Inga sp.:

En el año 1 época seca, hubo efecto significativo de la localidad sobre la diversidad bacteriana (tabla 22). El promedio más alto se obtuvo en las localidades de Jayuya y Yauco, mientras que el promedio menor se obtuvo en las localidades de Adjuntas y Las Marías. Estos resultados fueron similares a lo encontrado en el vector *Caribovia coffeacola* (Brent Brodbeck comunicación personal, 2011) donde la densidad de saltones de hoja fue mucho más alta en Yauco y Jayuya que a la vez corresponden a las localidades de mayor altitud en el estudio.

Tabla 22.- Medias, significancia de la prueba de F y valor de la diferencia mínima significativa para cepas fenotípicamente diferentes por árbol de *Inga* sp. en Puerto Rico.

Efecto	2010-2011				2011-2012			
	Época seca		Época lluviosa		Época seca		Época lluviosa	
	Hojas	Ramas	Hojas	Ramas	Hojas	Ramas	Hojas	Ramas
<i>Localidad</i>								
Adjuntas	0.60b	0.90	1.00	1.30	0.70	0.40	0.50b	1.10
Jayuya	1.18a	1.60	0.90	0.80	1.10	0.90	1.50a	1.80
Las Marías	0.24b	1.20	1.50	1.10	1.80	0.40	0.50b	1.60
Yauco	0.74ab	0.60	1.00	1.10	0.80	1.30	0.70b	1.30
Prueba de F	*	NS	NS	NS	NS	*	*	NS
DMS	0.22	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	0.42	n/a
<i>Manejo de sombra</i>								
Baja diversidad de árboles	1.05	1.05	1.05	1.23 ^a	1.05	1.20	1.00	2.14
Alta diversidad de árboles	1.15	1.15	1.15	0.55b	1.15	0.95	1.00	1.74
Prueba de F	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
DMS	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Localidad x tipo de sombra</i>								
Prueba de F	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS

DMS= Diferencia mínima significativa a nivel de probabilidad de $\alpha=0.05$. En los casos donde la prueba de F no fue significativa, no se reporta el valor de DMS.

En la misma columna por cada factor, medias seguidas por la misma letra no son diferentes al nivel de $\alpha=0.05$.

Hubo interacción significativa (sombra por localidad) para la diversidad de cepas obtenidas de ramas de *Inga* sp., (figura 14). Se detecta que la interacción es no ordenada

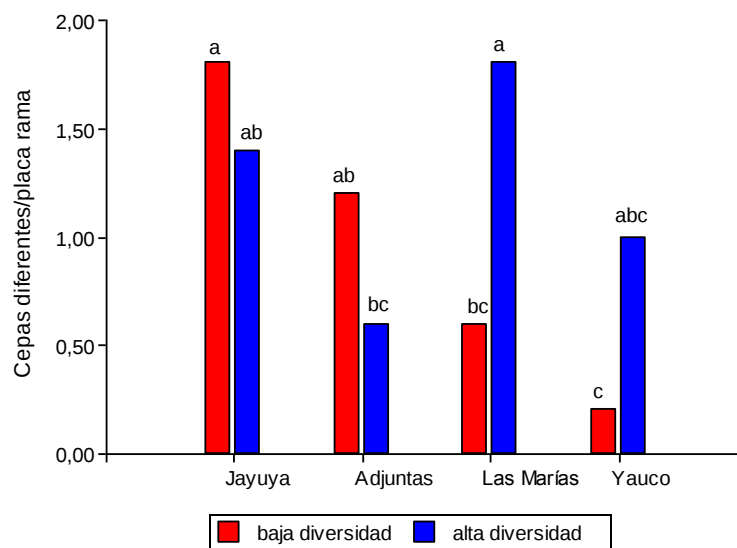


Figura 14.- Medias de Cepas fenotípicamente diferentes por árbol de ramas de *Inga* muestreadas en la época seca del período 2011-2012. Medias seguidas por la misma letra no son diferentes al nivel de $\alpha=0.05$.

En la época lluviosa para el año 1 no se detectaron diferencias. Para el año 2 se detectaron diferencias en el factor localidad con el promedio mayor en la localidad de Jayuya seguido por Yauco (tabla 22) este comportamiento estuvo relacionado a lo que ocurrió con el vector con mayor densidad poblacional en Yauco y Jayuya (Brodbeck et al., 2011).

Los estudios preliminares realizados por Brodbeck et al., (2011) muestran que *Inga* sp., es el hospedero preferido por el vector potencial *Caribovia coffeacola*. Ellos encontraron que la abundancia de *Caribovia coffeacola* fue extremadamente alta en plántulas de *Inga* sp., con fluctuaciones de 25 a 40 individuos por árbol.

Análisis serológico para X. fastidiosa en Muestras de Inga sp.

No se evaluaron los efectos de los factores analizados en cafeto, debido a que hubo muy pocos árboles sospechosos de enfermedad (tabla 24). Hubo diferencias altamente significativas ($P<0.01$, t pareada) para la nervaduras de hojas versus ramas de *Inga* sp. Este resultado fue similar a lo ocurrido en cafeto y *Citrus* sp.

Contrastación de poblaciones para otras especies de sombra:

Se obtuvieron datos de UFC/ml de ramas y nervaduras, y el total de cepas fenotípicamente diferentes por placa de Moca (*Andira inermis*), Gliricidia o Saman (*Gliricidia* sp.) y Carbonero (*Misantropus carbonarum*). No se midieron los efectos de los factores analizados en cafeto, *Citrus* sp., e *Inga* sp. debido a que estos árboles solo se encontraron en las localidades de Jayuya (moca y *Gliricidia* sp.) y Adjuntas (carbonero).

Los valores de población y diversidad de bacterias endofíticas para las especies moca, Gliricidia y carbonero fueron bajos en comparación a las especies *Inga* sp, *Citrus* sp, y árboles de cafeto. Esto es similar al comportamiento encontrado para vectores potenciales donde las poblaciones de estos fueron bajas o nulas para las capturas realizadas en las parcelas que contenían estas especies (Brent Brodbeck comunicación personal, 2011). Los Log UFC/ml más altos entre estas tres especies, se detectaron para *Gliricidia* sp. (tabla 23).

Tabla 23.- Resumen del log UFC/ml y cepas fenotípicamente diferentes/placa para tres especies de árboles de sombra en el agro-ecosistema del cafeto.

Nombre	Variable	Valores promedio
Carbonero <i>Misantropus carbonarum</i>	Cepas diferentes/ placa Hoja	1.33
	Cepas diferentes/ placa Rama	1.50
	Log UFC/ml Nervadura	1.63
	Log UFC/ml Rama	2.51
Gliricidia o samán <i>Gliricidia</i> sp.	Cepas diferentes/ placa Hoja	1.10
	Cepas diferentes/ placa Rama	1.30
	Log UFC/ml Nervadura	2.76
	Log UFC/ml Rama	2.90
Moca <i>Andira inermis</i>	Cepas diferentes/ placa Hoja	0.80
	Cepas diferentes/ placa Rama	0.70
	Log UFC/ml Nervadura	1.00
	Log UFC/ml Rama	0.93

Estudio III: Distribución Espacial de Árboles Sospechosos de enfermedad evaluados con la Prueba DAS ELISA para *Xylella fastidiosa* (Xf)

Se geo-referenciaron 348 árboles en el agro-ecosistema de cafeto en las parcelas de Adjuntas (18°09'30", W66°45'27"), Jayuya (N18°09'35''; W66°38'45''), Las Marías (N18°13'14''; W66°01'38'') y Yauco (N18°09'57''; W66°49'36'') y Usando la prueba DAS-ELISA específica para *X. fastidiosa*, se detectaron un total de 31 casos sospechosos para la bacteria, que corresponde al 9% del total de arboles georeferenciados (tabla 18).

Tabla 24.- Lecturas de Absorbancia a 650 nm en la prueba DAS ELISA para *X f.* de nervaduras de las hojas y ramas de árboles sospechosos de enfermedad con valores ≥ 0.7 A.

Planta	Tejido	Manejo	Localidad	Síntomas	Absorbancia
cafeto	hoja	Baja div.	Adjuntas	Amarillamiento intervenal	0.78
cafeto	hoja	A sol	Adjuntas	Clorosis de hojas	0.79
citrus	hoja	Baja div.	Adjuntas	Amarillamiento intervenal	0.84
cafeto	hoja	Alta div.	Adjuntas	Roseta	0.90
cafeto	hoja	A sol	Adjuntas	Hojas aparentemente normales	1.04
cafeto	hoja	A sol	Adjuntas	Amarillamiento de hojas y clorosis	1.14
cafeto	hoja	Baja div.	Adjuntas	Roseta	0.72
cafeto	hoja	Alta div.	Adjuntas	Árbol muriéndose	0.77
cafeto	rama	A sol	Adjuntas	Amarillamiento hojas	0.89
cafeto	rama	Baja div.	Adjuntas	Roseta	1.29
cafeto	hoja	A sol	Adjuntas	Amarillamiento intervenal	0.78
cafeto	hoja	Alta div.	Adjuntas	Roseta	0.89
cafeto	rama	Alta div.	Adjuntas	Amarillamiento de hojas	1.51
cafeto	rama	Baja div.	Jayuya	Amarillamiento de hojas	0.73
cafeto	rama	Alta div.	Jayuya	Necrosis apical	0.98
cafeto	hoja	Baja div.	Jayuya	Acortamiento entrenudos	0.81
cafeto	hoja	Baja div.	Jayuya	Hojas anormales, quemado bordes	0.84
cafeto	hoja	Baja div.	Jayuya	Roseta	1.31
cafeto	hoja	Alta div.	Jayuya	Roseta	0.76
cafeto	rama	Alta div.	Jayuya	Roseta	0.79
cafeto	rama	Baja div.	Jayuya	Acortamiento entrenudos	0.84
cafeto	hoja	Alta div.	Jayuya	Necrosis apical	0.92
cafeto	hoja	Baja div.	Jayuya	Clorosis y amarillamiento hojas	0.91
citrus	hoja	Alta div.	Jayuya	Hojas normales	0.73
citrus	rama	Alta div.	Jayuya	Amarillamiento intervenal	0.92
inga	hoja	Baja div.	Jayuya	Necrosis apical, venas oscuras	0.90
cafeto	hoja	A sol	Las Marías	Roseta	0.94
cafeto	hoja	Baja div.	Las Marías	Amarillamiento hojas	0.79
cafeto	hoja	Baja div.	Yauco	Necrosis apical	0.82
cafeto	hoja	A sol	Yauco	Necrosis apical	1.02
cafeto	rama	Baja div.	Jayuya	Hojas anormales, grandes	0.70

Se encontraron árboles sospechosos de enfermedad mayormente en Adjuntas y Jayuya con 43% y 45% de los casos respectivamente. Brodbeck 2011 (comunicación personal) encontró que las densidades del vector potencial, *Caribovia coffeacola*, fueron mayores en las parcelas de Jayuya y Yauco, las dos localidades más elevadas en el estudio.

En Adjuntas, se encontraron 13 casos sospechosos (12 de cafeto y 1 de Citrus) de árboles con valores de absorbancia ≥ 0.7 A, los cuales estuvieron distribuidos entre fincas de alta diversidad (3 casos), baja diversidad (5 casos) de especies de sombra y en parcelas a sol (5 casos) (figura 15).

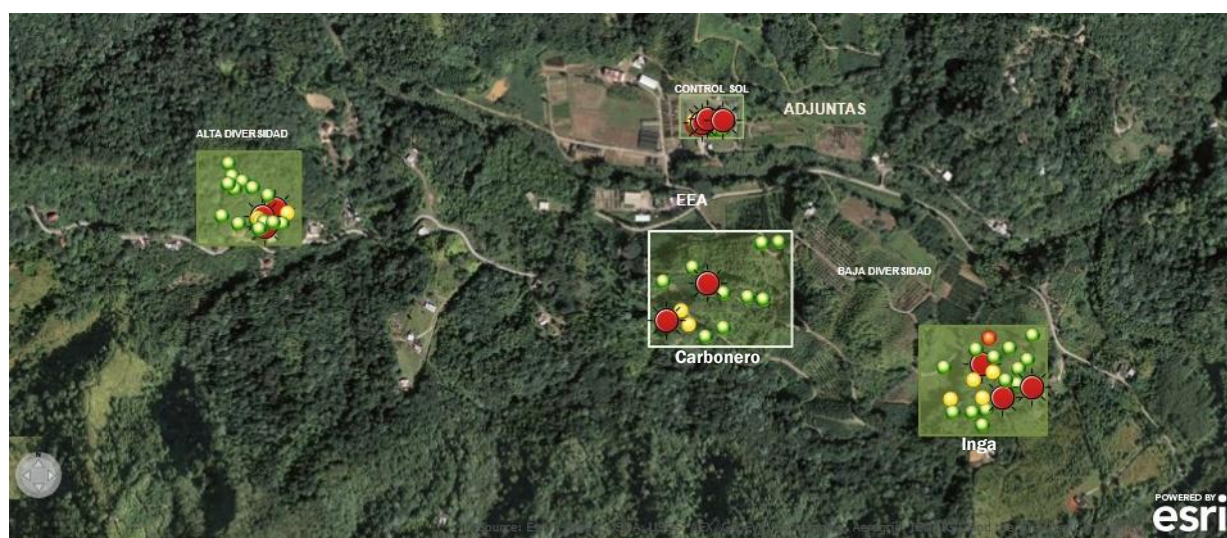


Figura 15- Geo-referenciación de árboles muestreados en Adjuntas, según los valores de absorbancia a 650 nm en la prueba DAS- ELISA para Xf. verde (0.02-0.10 A) amarillo (0.11-0.40 A) naranja (0.41-0.69 A) rojo (≥ 0.7 A). No se puede observar todos los casos en las parcelas a sol debido a que se utilizó la versión online del programa ARCGIS.

En un estudio llevado a cabo por Mariño (2007), se encontró el mayor porcentaje de captura de vectores potenciales de Xf. en fincas de Adjuntas (66%). Esta información corrobora lo observado en el presente estudio con alta densidad de vectores potenciales y mayor presencia de casos de árboles con síntomas de la enfermedad.

En la localidad de Jayuya, las fincas de muestreo estuvieron más separadas en comparación a otras localidades. Para las parcelas de alta diversidad de especies de sombra frente al control a sol y sombra de baja diversidad de especies, hubo una distancia de más de 12 kilómetros. Para la zona de Jayuya se detectaron 14 casos sospechosos de árboles con valores de absorbancia ≥ 0.07 (figuras 16 y 17).

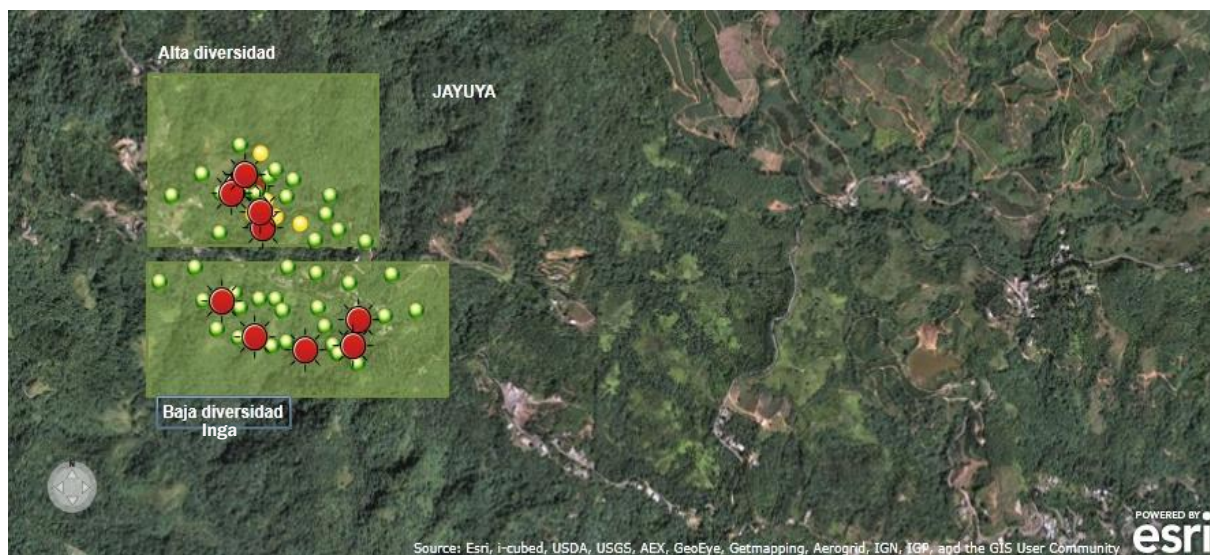


Figura 16.- Geo-referenciación de árboles muestreados en Jayuya, según los valores de absorbancia a 650 nm en la Prueba DAS- ELISA para *X. fastidiosa*: verde (0.02-0.10 A) amarillo (0.11-0.40 A) naranja (0.41-0.69 A) rojo (≥ 0.7 A).

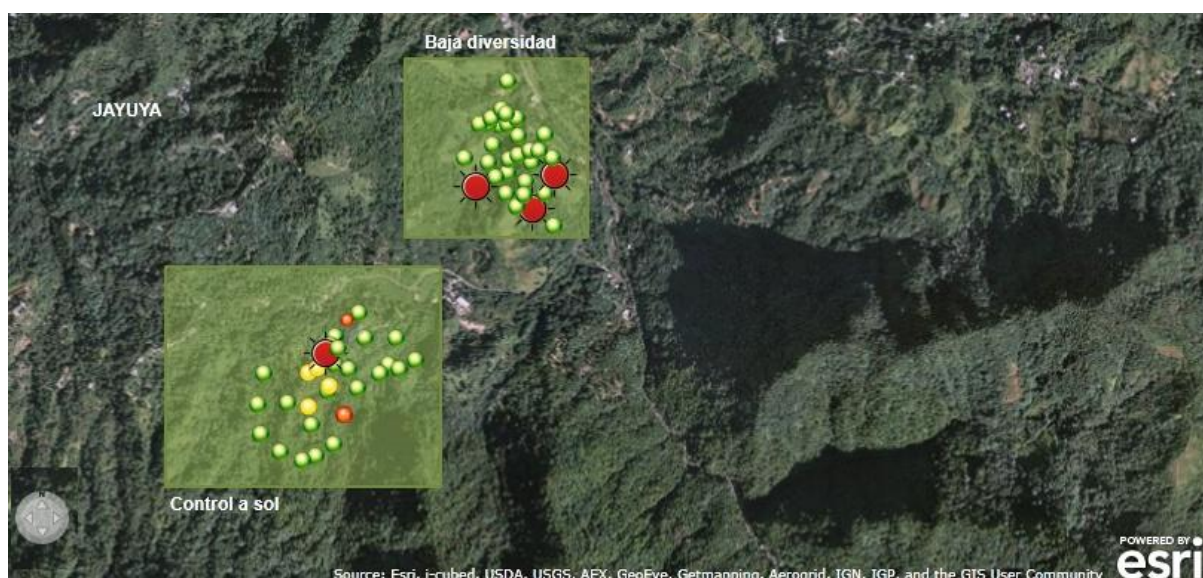


Figura 17.- Geo-referenciación de árboles muestreados en Jayuya, según los valores de absorbancia a 650 nm en la Prueba DAS- ELISA para *X. fastidiosa*: verde (0.02-0.10 A) amarillo (0.11-0.40 A) naranja (0.41-0.69 A) rojo (≥ 0.7 A).

En la zona de Las Marías, se detectaron dos casos de árboles con absorbancia ≥ 0.7 en una parcela a sol y otra parcela de baja diversidad de especies de sombra (figura 18). No se detectaron casos en la finca de alta diversidad de especies (figura 19). Cabe destacar que esta finca busca certificación orgánica, por esta razón el control de malezas es mecánico lo que constituye una gran diferencia con las otras fincas de la localidad donde el manejo de malezas se realiza con aspersiones de glifosato.



Figura 18.- Geo-referenciación de árboles muestreados en Las Marías, según los valores de absorbancia a 650 nm en la Prueba DAS-ELISA para *X. fastidiosa*: verde (0.02-0.10 A) amarillo (0.11-0.40 A) naranja (0.41-0.69 A) rojo (≥ 0.7 A).

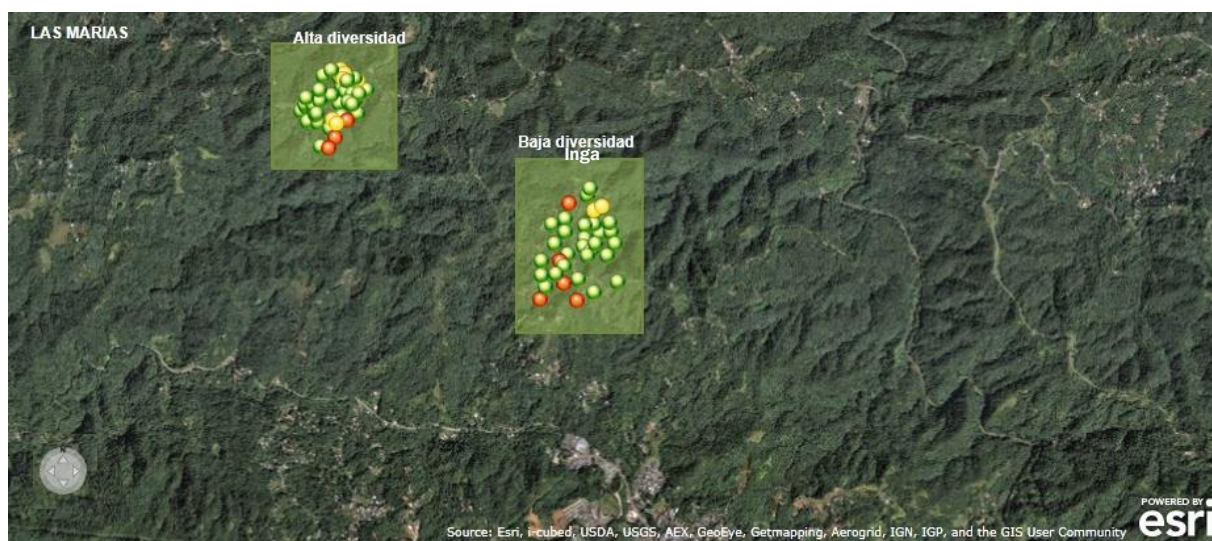


Figura 19.- Geo-referenciación de árboles muestreados en Las Marías, según los valores de absorbancia a 650 nm en la Prueba DAS-ELISA para *X. fastidiosa*: verde (0.02-0.10 A) amarillo (0.11-0.40 A) naranja (0.41-0.69 A) rojo (≥ 0.7 A).

En Yauco, se detectaron dos casos sospechosos de árboles con absorbancia ≥ 0.7 . La finca que contiene el tratamiento de alta diversidad de especies de sombra es un cultivo abandonado en sucesión secundaria de especies de bosque. Por lo tanto, se considera difícil encontrar una alta incidencia de la enfermedad en esta plantación debido a que la presión de la enfermedad sobre este cultivo es mínima.

En el estudio de Mariño (2007) encontró el menor porcentaje de captura de vectores potenciales en las fincas de esta localidad (8%) por lo tanto las capturas baja de vectores y la presencia baja de casos estuvo relacionada para esta zona.

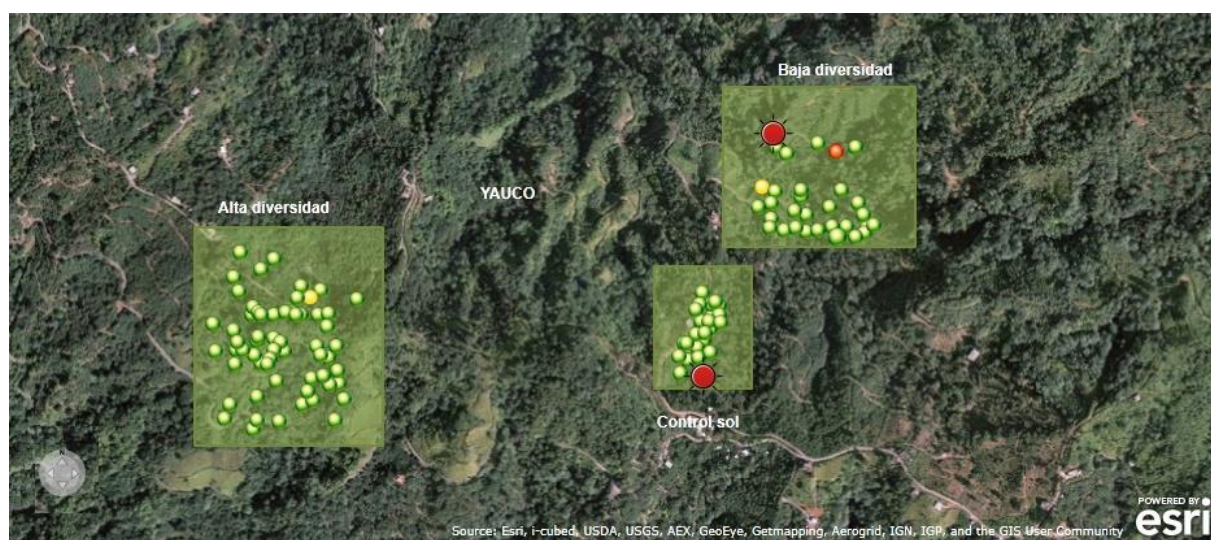


Figura 20.- Geo-referenciación de árboles muestreados en Yauco, según los valores de absorbancia a 650 nm en la Prueba DAS-ELISA para *X. fastidiosa*: verde (0.02-0.10) amarillo (0.11-0.40) naranja (0.41-0.69) rojo (≥ 0.7).

El análisis de distribución espacial hecho con el programa SatScan (Kulldorff, 2009) permitió generar dos conglomerados: el conglomerado principal y el conglomerado secundario. Para la distribución espacial del conglomerado principal, se encontró un total de 351 valores de absorbancia y 29 casos sospechosos con absorbancia ≥ 0.7 . El conglomerado generó las coordenadas 18.160200° N, 66.646200° E con un radio de 16.84 km.

Dentro del radio establecido por el programa SatScan se determinó un riesgo relativo de 14.95. El riesgo relativo considera la probabilidad de un evento (riesgo) en relación a la exposición del individuo a la bacteria (Sistrom y Garvan, 2004). Por lo tanto, hay 14.95 veces más probabilidad de encontrar una planta sospechosa dentro del conglomerado que fuera de este ($P < 0.001$). El conglomerado principal agrupó a los árboles muestreados de las zonas de Adjuntas, Jayuya y Yauco (figura 21).

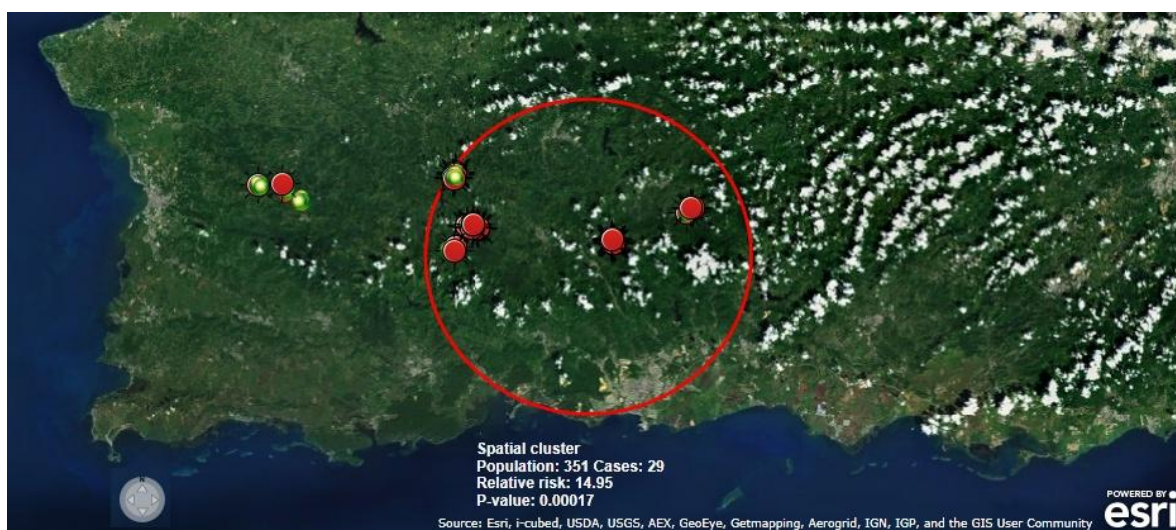


Figura 21.- Conglomerado espacial principal de los árboles sospechosos con la prueba DAS-ELISA para *X. fastidiosa* en Puerto Rico.

Dicho conglomerado agrupa también a los municipios de Utuado, Lares y Guánica, localidades no muestreadas pero donde se esperaría que exista un número elevado de casos.

Para el conglomerado secundario se detectó un total de 342 valores de absorbancia y un total de 2 casos. El conglomerado generó las coordenadas 18.202300° N, 67.137400° E con un radio de 35.23 km. El riesgo relativo fue de 0.075. Por lo tanto la probabilidad de encontrar árboles sospechosos de enfermedad en el conglomerado secundario es casi nula ($P < 0.001$). El conglomerado secundario agrupó a los árboles muestreados en Las Marías (Figura 22).

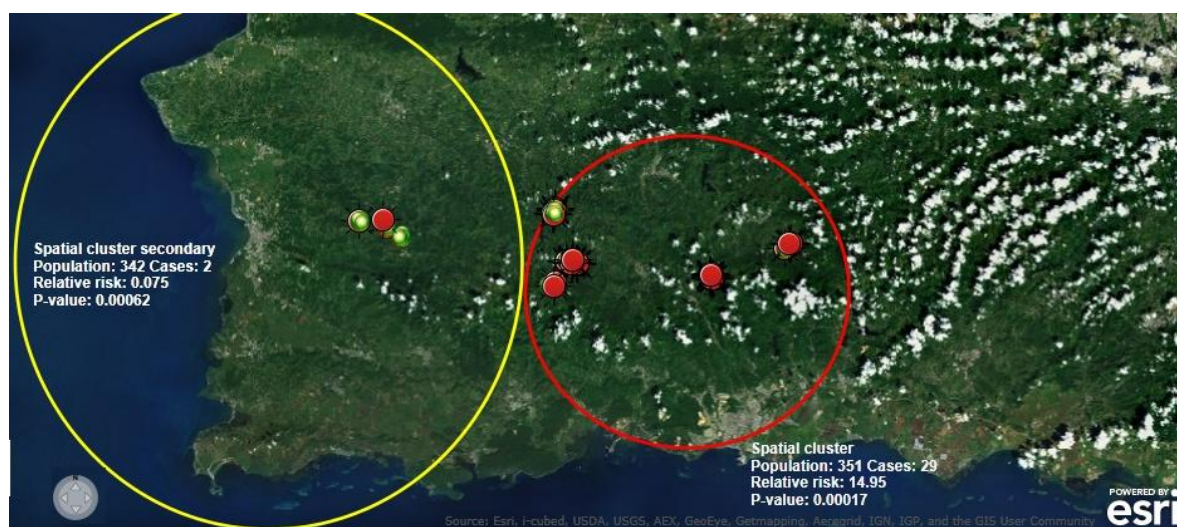


Figura 22.- Conglomerado espacial secundario (amarillo) de los árboles sospechosos con la prueba DAS - ELISA para *X. fastidiosa* en Puerto Rico.

El conglomerado secundario agrupa a los municipios de Aguadilla, Aguada, Rincón, Añasco, Moca, San Sebastián, Cabo Rojo, Hormigueros, Lajas y Sabana Grande, donde se espera en las plantaciones cafetaleras tener baja probabilidad de la enfermedad.

Vale destacar que el conglomerado secundario separa a la localidad de Las Marías de menor altitud frente a las localidades de mayor altitud (Adjuntas, Yauco y Jayuya) que se agruparon en el conglomerado principal.

Los sistemas de información geográfica y los conglomerados espaciales permitieron asociar con un alto riesgo relativo la presencia de árboles sospechosos de la enfermedad en las localidades de mayor altitud (Adjuntas, Jayuya y Yauco) frente a la localidad de Las Marías de menor altitud. También permitieron asociar con un mayor riesgo relativo árboles sospechosos en las localidades de Adjuntas, Yauco y Jayuya por lo tanto los estudios de monitoreo y las medidas de prevención para las posibles enfermedades infecciosas tal como CVC y CLS deben centrarse en las zonas donde se ubicó el mayor riesgo de la enfermedad.

Estudio IV Análisis Conglomerado

Se separaron las cepas bacterianas de reacción Gram negativa y crecimiento fastidioso (Gram-,TSA- PW-) cuya morfología fue colonias pequeñas (<1mm), de forma redonda, color blanquecino que se detallan en la figura 23.

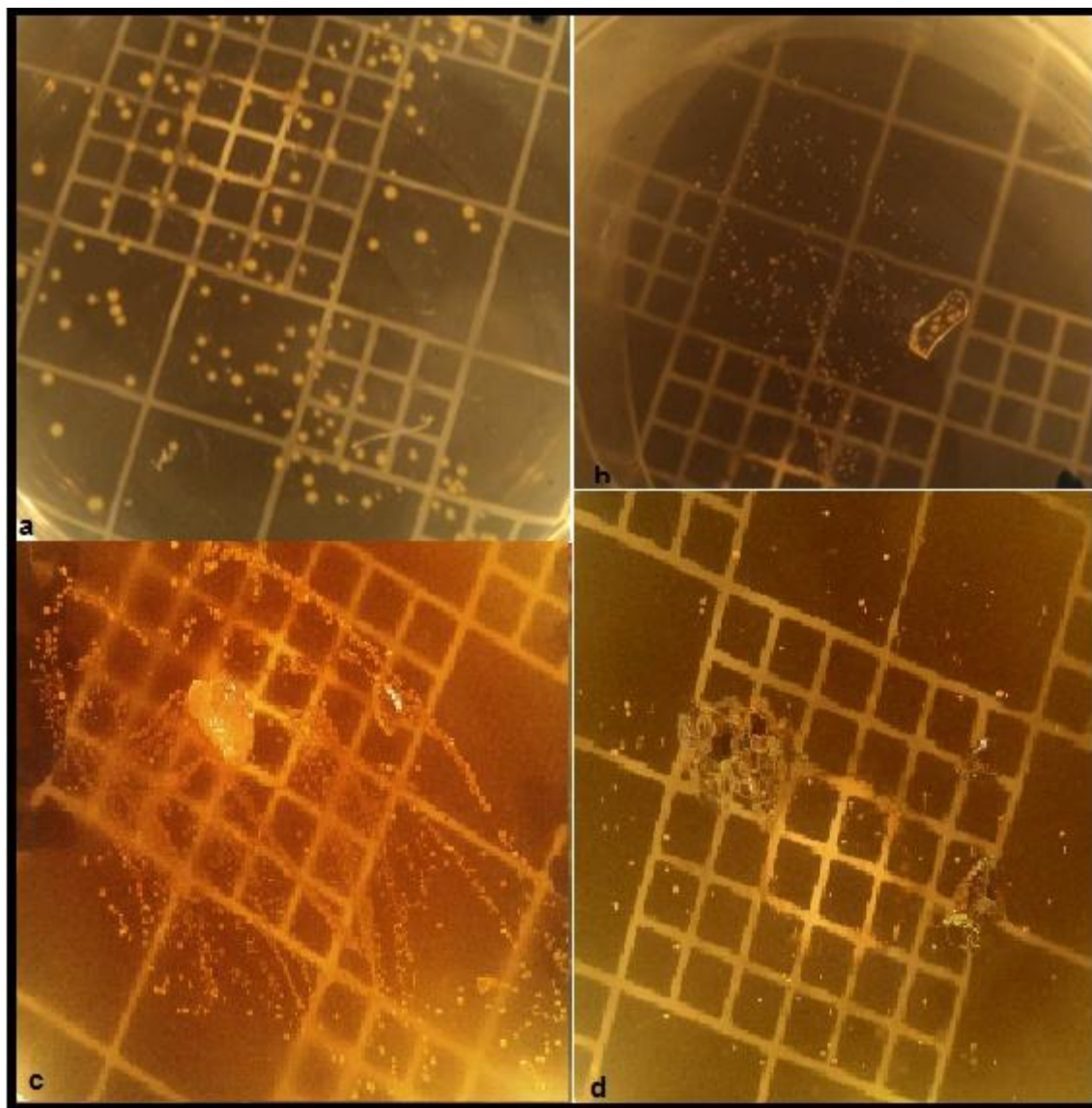


Figura 23.- Morfología de las cepas sospechosas de *Xylella fastidiosa* sobre medio periwinkle (PW) (a: 5221, b:5040, c: 5151, y d:5029).

En el grupo se detectaron 80 cepas sospechosas para *Xylella fastidiosa* que presentan las características de crecimiento fastidioso (PW+, TSA-) de reacción Gram -, Catalasa+ y Oxidasa -. El 51% de las cepas sospechosas se detectaron en árboles de cafeto (Figura 24).

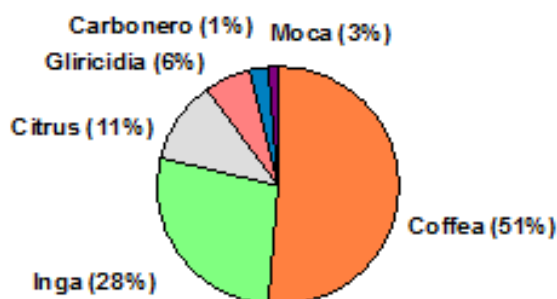


Figura 24.- Porcentajes del total de cepas de comportamiento fastidioso aisladas a partir de diferentes especies vegetales en Puerto Rico.

Al realizar el corte arbitrario a la distancia de 1.24 que corresponde al 50% de la distancia máxima, las cepas se agrupan en 9 conglomerados. El conglomerado 1 agrupó 6 cepas desde la 7006 hasta la 5427 (figura 25), de ellas cuatro se aislaron de la localidad de Jayuya, tres de ellas fueron de parcelas a sol y las otras tres de parcelas de alta diversidad, cinco cepas del conglomerado uno fueron de árboles de cafeto y una de *Inga* sp. Para el conglomerado dos se agruparon seis cepas desde la 5511 hasta la 4865. Cinco cepas se aislaron de árboles de cafeto una cepa de *Inga* sp., y tres de las parcelas de alta diversidad.

El conglomerado tres agrupó 11 cepas desde la 5493 hasta la 4862, donde no existe un patrón de asociación de localidad tipo de sombra o especie, esto demuestra que las cepas que se agrupan en los conglomerados pueden ser de orígenes diversos y mostrar alta variabilidad en cuanto a su origen, sin embargo la caracterización fenotípica es similar. De ahí que el análisis de conglomerados sea una herramienta poderosa para poder asociar cepas de distintos orígenes y especies vegetales.

El conglomerado cuatro agrupó siete cepas desde la 7019 hasta la 5029. De estas cepas cinco se aislaron a partir de cafetos, una fue de *Inga* sp. y otra de *Citrus* sp. Vale destacar que en este conglomerado se agrupó a las cepas 5029 y 5151 las cuales se determinaron inicialmente como cepas positivas para *Xyella fastidiosa* según las pruebas de ELISA y PCR con los iniciadores 272 1-2, realizada en el USDA-Agricultural Research Center de Beltsville, Maryland, USA (Mildred Zapata, 2011, comunicación personal).

El conglomerado cinco agrupó a 13 cepas desde la 5462 hasta la 5010, de ellas siete provienen de la localidad de Las Marías. El conglomerado seis agrupó 12 cepas desde la 5406 hasta la 4868 las cuales fueron de origen variable, de diferentes tipos de manejo y de diferente especie. En el conglomerado siete se agruparon ocho cepas desde la 7013 hasta la 4856 de distinto origen tipo o manejo de sombra y de diferentes especies. En el conglomerado ocho se agruparon nueve cepas desde la 5438 hasta la 4853, de ellas seis fueron de parcelas de alta diversidad de especies de sombra. En el conglomerado nueve se agruparon ocho especies desde la 4986 hasta la 4852. De estas seis fueron aisladas a partir de muestras de cafeto (figura 25).

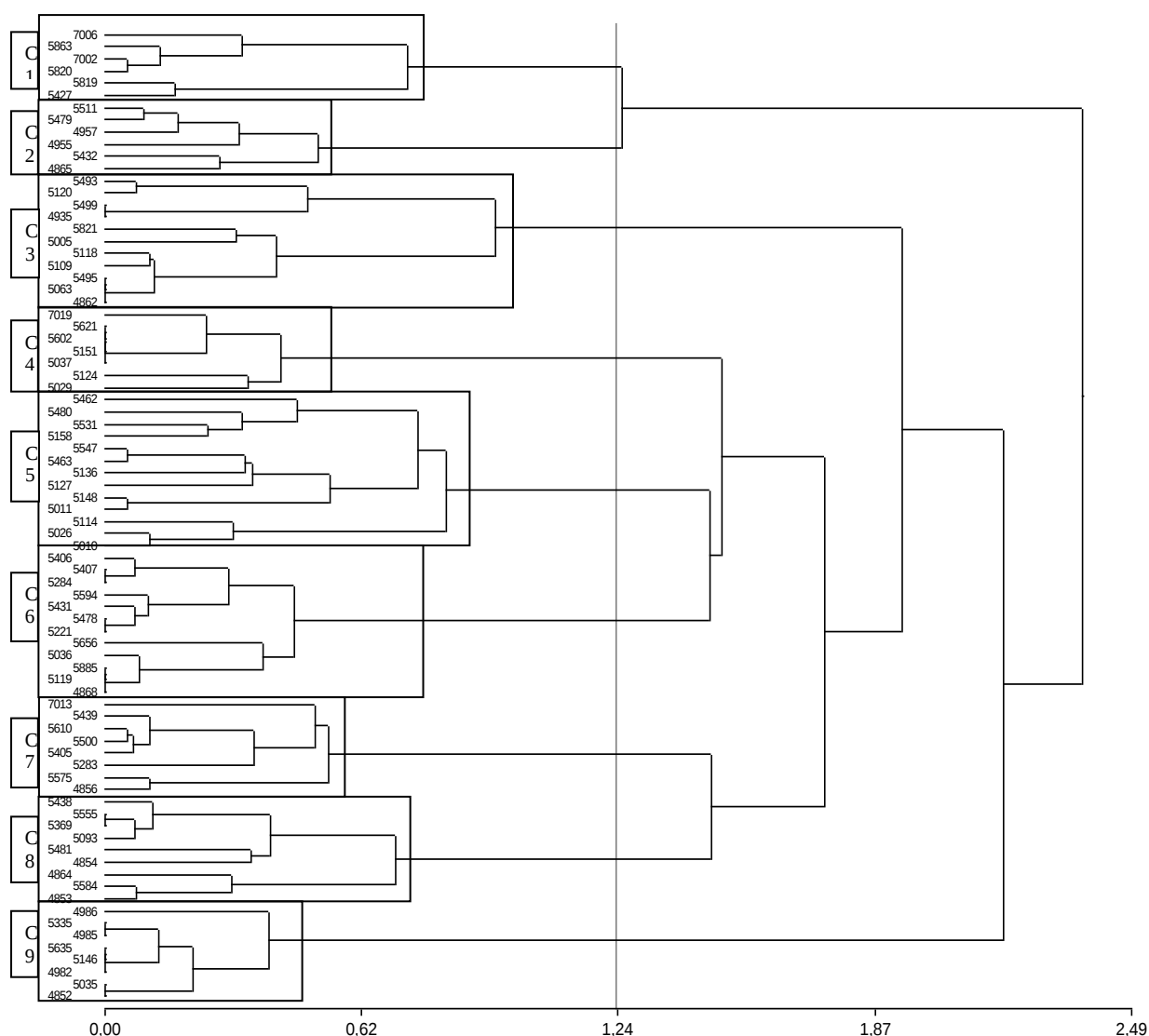


Figura 25.- Dendrograma para cepas aisladas en el agro-ecosistema de cafeto de reacción Gram negativa y que no crecen en medio TSA. Se utilizó la distancia de Gower y el método de aglomeración de Ward.

C= conglomerado

Estudio V: Aislamiento de ADN y Técnica de PCR de Bacterias y Muestras Vegetales Sospechosas para *Xylella fastidiosa*:

Las cepas de comportamiento fastidioso, de códigos: 4852, 4854, 4859, 4861, 4865, 4985, 4986, 5026, 5029, 5118, 5127, 5146, 5151, 5221, 5415, 5621, y 5635 se extrajo ADN usando el Kit “capture column de la compañía Qiagen”. Posteriormente se realizó PCR usando iniciadores código 272 1-2 (Pooler y Hartung, 1995) recomendados para *X. fastidiosa*, e iniciadores codificados como 1492R y 27F que amplifican el gen 16S rDNA (Lane, 1991).

En la figura 26 se observa el producto de PCR usando primers CVC 2721-2, donde las cepas 4985, 4986, 5029 y 5635 amplificaron bandas de aproximadamente 700 - 800 pares de bases, que es el tamaño de banda esperado para *X. fastidiosa* (Pooler et al., 1997). Las cepas que amplificaron bandas con los primers CVC 272 1-2, resultaron con valores promedio de absorbancia de 0.204 para la 4985, 0.213 para la 4986 y 0.109 para la 5029.

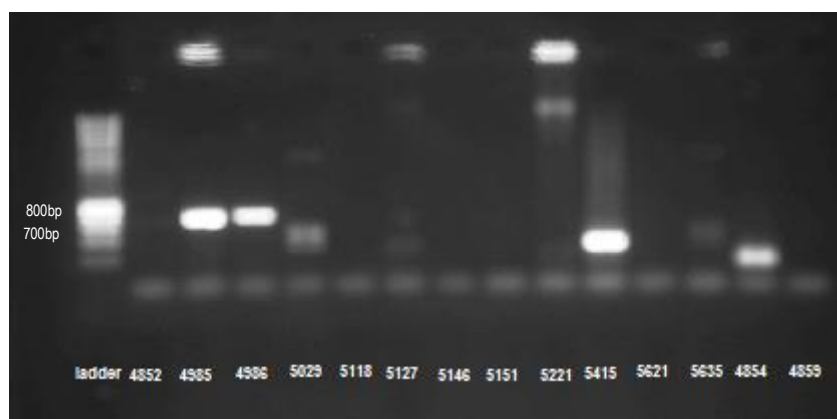


Figura 26.- Producto de PCR para cepas potenciales de *Xylella fastidiosa* con iniciadores 272 1-2 (Pooler y Hartung, 1995) marcador “Hiperladder (Bioline)” de 10 kbp.

A las cepas 4852, 5221, 5151, 5029, 4986 se les realizó PCR con el protocolo CVC Cox en el laboratorio de John Hartung (USDA - ARS, Beltsville, Maryland) sin detectarse resultados positivos para *X. fastidiosa*. Se repitió el PCR usando el protocolo XF 16S Cox, sin encontrar resultados positivos para *X. fastidiosa*.

El producto de PCR con iniciadores universales (Figura 27), produjo una banda de aproximadamente 1500 pares de bases para la cepa 5415.

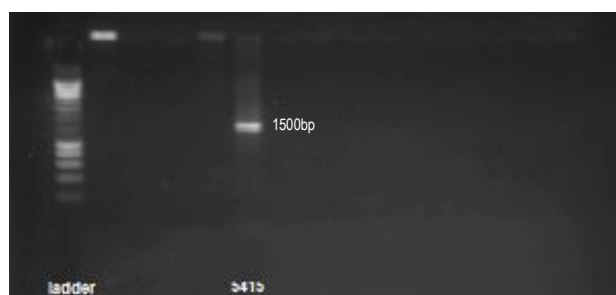


Figura 27.- Producto de PCR para cepas potenciales de *Xylella fastidiosa* con iniciadores 1492R y 27F. Marcador “Hiperladder (Bioline)” de 10 kbp.

Para las muestras vegetales obtenidas en las parcelas experimentales, se realizó prueba de DAS ELISA para *X. fastidiosa*. El promedio de los valores de densidad óptica a una absorbancia a 650 nm fue 0.24. El valor máximo fue de 1.51 (tabla 26) que presentaba síntomas de roseta que son similares a los reportados por otros autores para la crespada del café (Rodríguez et al., 2001).

Las muestras vegetales que presentaron valores iguales o superiores a 0.70 (tabla 24) fueron enviadas al laboratorio de John Hartung (USDA - ARS, Beltsville, Maryland) para la identificación molecular, sin detectarse resultados positivos para *X. fastidiosa*. Se repitió, el PCR usando el protocolo F 16S Cox, sin encontrar resultados positivos para *X. fastidiosa*.

Para los valores de absorbancia obtenidos a partir de muestras de café, en la prueba de DAS ELISA, se han detectado valores variables. Cabe resaltar que la prueba para *Xylella fastidiosa* que produce la compañía Agdia (Inc.) está compuesta de una mezcla de anticuerpos serológicamente distintos que detectan aislados de *X. fastidiosa* de varios cultivos que no incluyen al café ni a las especies del género *Inga* sp.

Para la prueba DAS ELISA para *X. fastidiosa* de la compañía Agdia Inc., no se detectaron valores superiores o iguales al testigo positivo ni en hojas y ni en ramas de los árboles ensayados. El promedio en las pruebas realizadas en el presente estudio fue 2.4 A para el testigo positivo sin diluir y para los testigos positivos diluidos a 10^{-1} y 10^{-2} fueron 0.7 A y 0.4 A respectivamente.

Para la extracción de ADN a partir de ramas y nervaduras de las hojas de café se obtuvo baja eficacia (50%). Probablemente la oxidación del tejido y la degradación enzimática del ADN de la muestra fue alta durante el proceso de pulverización. Se pudo observar que la muestra luego de ser triturada se tornaba oscuro rápidamente. Esta oxidación en tejido de café probablemente causó el bajo rendimiento en la extracción de ADN.

Para las muestras vegetales el gel de calidad para el producto de extracción generó bandas de aproximadamente 12000 pares de bases (figura 28)

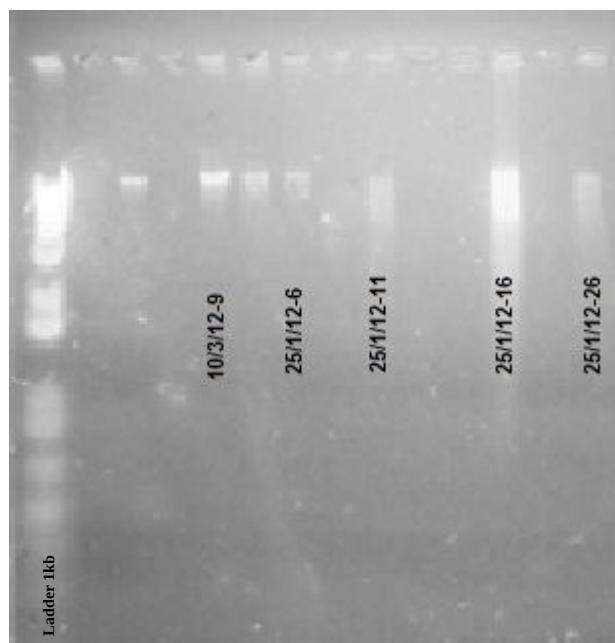


Figura 28.- Producto de extracción de ADN para muestras vegetales colectadas en el período enero a marzo 2012.

Para la bacteria *X. fastidiosa*, no se han detectado resultados consistentes sobre la presencia de la bacteria en las muestras de plantas de cafeto, *Citrus* sp., e *Inga* sp., que se han ensayado, de igual manera para las bacterias Gram negativas endofíticas de comportamiento fastidioso (PW+TSA-) que se han aislado en los dos años de investigación.

Se detectaron resultados positivos con PCR para las bacterias de códigos 5029, 4986 y 5151 en el primer año de investigación (2010-2011) con los primers 272 1-2 (Laboratorio de John Hartung). En el 2012 (en el laboratorio de la Dra. Consuelo Estévez) se pudo volver a corroborar este resultado para las cepas 4985, 4986 y 5029 (Figura 26). Sin embargo, al presente se ha desarrollado otra metodología con los iniciadores XF 16S Cox que indican que estas cepas son falsos positivos a *X. fastidiosa* (Zapata, comunicación personal, 2012).

Es necesario considerar que el “DAS-ELISA para *X. fastidiosa*” está diseñado bajo una mezcla de anticuerpos que pueden detectar una amplia gama de aislados de *X. fastidiosa*, en la que no incluye aislados de Cafeto ni de *Inga* sp. (Agdia, 2012). Al realizar la prueba con anticuerpos más específicos en el laboratorio de John Hartung (USDA - ARS, Beltsville, Maryland) se detectaron resultados positivos para las muestras vegetales enviadas.

En este estudio se detectaron plantas de cafeto con la sintomatología característica de CLS causado por *X. fastidiosa* tal como se ha detectado en café en estudio es Costa Rica y Colombia, con alto grado de defoliación, entrenudos cortos, bajo rendimiento, hojas cloróticas y pequeñas. Además de observarse reducción del tamaño de las hojas, entrenudos cortos, quema de los bordes de las hojas más viejas y posterior caída de estas, muerte descendente, formación de grupos de hojas terminales pequeñas, hojas deformadas y cloróticas, reducción del tamaño y cantidad de la fruta, debilitamiento general de las plantas más afectadas, y muerte. Los síntomas expuestos son similares a los descritos por Beretta (1996) y Meneguim (2000) en los cultivos de cafeto de Brasil, afectados por la *X. fastidiosa*.

En el 2003 Rodríguez-Solís et al. mencionan que a través de una serie de investigaciones descartaron la relación de virus, viroides, fitoplasmas y deficiencias nutricionales con la patología de crespada, obteniendo resultados positivos con la prueba de DAS- ELISA para la bacteria *X. fastidiosa*.

En cuanto a las enfermedades clorosis variegada de los cítricos (CVC) y encorchamiento de la hoja del cafeto (CLS) se estima que las condiciones son adecuadas para el desarrollo de la enfermedad al tener los vectores potenciales *Caribovia coffeacola* y *Hortensia similis* (Mariño y Zapata, 2009), los hospederos principales *Coffea arabica*, y *Citrus sp.* y los hospederos secundarios como *Persea americana* y malezas.

La falta de consistencia en los resultados obtenidos en la prueba DAS-ELISA para *X. fastidiosa* y PCR que confirmen la presencia de *X. fastidiosa* podría estar relacionada a bajas poblaciones de la bacteria en la planta (Goldberg, 2007) por lo que la prueba de ELISA podría estar dando valores inferiores al control positivo por la baja titulación de la bacteria en el tejido. Sin embargo esta explicación no es adecuada cuando se usan cultivos puros ya que se esperaría una absorbancia mayor. La sensibilidad del análisis por PCR es mayor que ELISA. Sin embargo, existen varios problemas con la reacción de PCR como la presencia de fenoles y compuestos aromáticos del cafeto que pueden interferir con la reacción, la falta de una proteinasa que permita romper las membranas celulares eficientemente, y degradar las proteínas liberadas al medio donde se está produciendo la reacción.

Por otro lado, las poblaciones de la bacteria varían de hoja a hoja (Goldberg, 2007) siendo esta la razón probable de que no se obtengan los mismos resultados al regresar al mismo árbol para tomar muestras nuevas.

Se debe considerar también que la sintomatología no es indicativo de la presencia de *Xylella fastidiosa*, ya que se han hecho estudios donde se descarta la relación de virus, viroides, fitoplasmas y deficiencias nutricionales con la patología de crespada (Rodríguez-Solís et al., 2003). Sin embargo, los resultados muestran que no existe relación entre el síntoma y valores altos de absorbancia y resultados positivos de PCR.

En cuanto a la extracción de la bacteria a partir de los vasos del xilema es necesario mencionar que resulta bastante complicada, los tejidos son duros y se oxidan con facilidad, por lo tanto los niveles fueron variables e inconsistentes en las diferentes fechas de muestreo.

Por otro lado, la población de la bacteria fluctúa con la época del año (Goldberg, 2007) y el efecto de época varía de acuerdo a las parcelas que se estén analizando, de ahí que hubo significación para la interacción tipo de sombra por época en la mayoría de variables analizadas.

La secuenciación de los productos de PCR procedentes del ADN de las muestras que amplificaron con los iniciadores recomendados han resultado negativas a *X. fastidiosa*. Estos resultados indican la posibilidad de bacterias distintas a *X. fastidiosa* asociadas a los árboles enfermos detectados durante este estudio.

CONCLUSIONES

1. En la época lluviosa se observó mayor cantidad y diversidad de bacterias endofíticas en las nervaduras de hojas y ramas de los árboles de *Coffea arabica*, *Citrus* sp., e *Inga* sp., versus la época seca.

2. La interacción de sombra por época fue la más frecuente, indicando que el efecto de época dependerá del tipo de sombra utilizado en la parcela.

3. Existe menor diversidad de bacterias endofíticas en condiciones a sol versus sombra.

4. Se obtuvieron 1278 cepas bacterianas asociadas a árboles de cafeto, cítricos y árboles de sombra, que fueron caracterizadas morfológica y fisiológicamente. El fenotipo de las colonias encontrado con mayor frecuencia fue: morfología redonda, margen liso y aplanadas, de reacción Gram positiva, Catalasa positiva, Oxidasa negativa y con habilidad de crecer en medio TSA.

5. A partir del análisis de conglomerados usando el método de encadenamiento de Ward con la distancia de Gower, en las muestras de plantas sintomáticas se encontraron aproximadamente el doble (63%) de colonias Gram negativas, Catalasa positivas, Oxidasa negativas de crecimiento fastidioso versus el número de cepas encontradas en plantas asintomáticas (37%) ($p=0.88$).

6. Se agruparon 80 cepas de tipo fastidioso en nueve conglomerados. Las cepas de códigos 4985, 4986, 5029 y 5151 amplificaron en la reacción de PCR con los iniciadores 272-1-2 recomendados para *X. fastidiosa*., los cuales resultaron no específicos a *X. fastidiosa*.

7. Los conglomerados espaciales permitieron asociar con mayor riesgo relativo a posibles casos de la enfermedad CLS en las localidades de mayor altitud Adjuntas, Yauco y Jayuya (Riesgo Relativo 14.95; $p<0.001$). Esto tiene relevancia a nivel preventivo para el control de la enfermedad.

RECOMENDACIONES

- 1.- Realizar el experimento considerando tipo de sombra como un factor separado, debido a las grandes diferencias en las comunidades biológicas del cafeto bajo sombra versus el cafeto en plantación comercial “a sol”.
- 2.- Realizar el ensayo en plantaciones que usen el sistema de “cafeto a sol” y evaluar el efecto de las prácticas culturales sobre los niveles de bacterias endofíticas.
- 3.- Auscultar las poblaciones microbianas con técnicas como “Length heterogeneity PCR”, T-RFLP “Terminal restriction fragment length polymorphism” o genotecas ambientales, para poder determinar las posibles interacciones microbianas que pueden contribuir al control de *X. fastidiosa* en Puerto Rico.
- 4.- Secuenciar las cepas de crecimiento fastidioso de reacción Gram negativa, catalasa positiva y oxidasa negativa, con el fin de conocer los géneros y especies de las cepas sospechosas de ser *X. fastidiosa* aisladas en el presente estudio.
- 5.- Continuar investigando para identificar el agente causal asociado a los síntomas de enfermedad observados en el cafeto en P.R.

LITERATURA CITADA

- Aguilar, E. Moreira, y C. Rivera, 2008. Confirmation of *Xylella fastidiosa* infecting grapes *Vitis vinifera* in Costa Rica. Trop. Plant Pathol. 33: 445-448.
- Alcamo, I., 2001. Fundamentals of microbiology. 6 ed. Jones & Bartlett. Menlo Park, California. 832 pp.
- Alvarez, A., 2004. Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. Annu. Rev. Phytopathol. 42: 339-366.
- Alves, E., B. Leite, R. C. Marucci, S. Pascholati, J. Lopes y P. Andersen, 2008. Retention sites for *Xylella fastidiosa* in four sharpshooter vectors (*Cicadellidae*) analyzed by scanning electron microscopy. Curr. Microbiol. 56:531-538.
- 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 cafeto 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.
- Aranguren, J., G. Escalante, y R. Herrera, 1982. Nitrogen cycle of tropical perennial crops under shade trees and coffee. Plant Soil. 67: 247-258.
- Araújo, W., J. Marcon, W. Maccheroni, J. Van Elsas, J. Van Vuurde, y J. Azevedo, 2002. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. Appl. Environ. Microbiol. 68(10): 4906-14.
- 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.
- Bolaños, C. y M. Zapata, 2012. Spatial distribution of coffee and shade trees identified with endophytic bacteria using DAS-ELISA for *Xylella fastidiosa* En: <http://cohemis.uprm.edu/prysig/2012/prysig12pres.html>
- Bou, G., A. Fernández-Olmos, C. García, J. Sáez-Nieto, y S. Valdezate, 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 29(8): 601-608.

- Brodbeck, B., y P. Andersen, 2006. Status of xylem limited bacterium *Xylella fastidiosa* in Puerto Rico. NFREC NEWS. North Florida Research and Education Center, University of Florida. 8(19): 3.
- Brodbeck, B., P. Andersen, E. Schoder, C. Bolaños, y M. Zapata, 2011. Potential effects of cicadellinae leafhoppers on shade and sun coffee in Puerto Rico. ESA-SEB APS meeting. San Juan Puerto Rico. March 2011.
- Buchanan, R., y N. E. Gibbons, 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology: 8th edition. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, Maryland. 1246 pp.
- BIOLOG[®], 2001. GP2 Microplate (Instructions for use). Hayward, California. 8 pp.
- Bradford, M., N. Fierer, y R. Jackson, 2006. Toward an ecological classification of soil bacteria. Ecol. 88: 1354-1364.
- Brown, C., L. Lynch, y D. Zilberman, 2002. The economics of controlling insect-transmitted plant diseases. Amer. Journ. of Agric Econ. 84: 279-291.
- Chacón, R., 2008. Identificación de organismos endógenos en cicadélidos y endófitos asociados a la crespeta del cafeto en el valle central de Costa Rica. Tesis BsC. Instituto tecnológico de Costa Rica. 187 pp.
- Chelius, M. y E. Triplett, 2001. The diversity of Archaea and bacteria in association with roots of *Zea mays* L. Microb. Ecol. 41: 252-263.
- Ciccarrelli, F., X. Mourichon, y J. Carlier, 2006. Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. Science. 311: 1283-1287.
- Colby, J., 1997. Introduction to evolutionary biology. The talks origin archive. En: <http://www.ugr.es/jmgreyes/evolsynop.pdf>.
- Cruz, A. y M. Zapata, 2011. Prevalent weeds and insects on shaded coffee plantations in two localities of Puerto Rico. ESA-SEB APS 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.
- DeLong, E. y N. Pace, 2001. Environmental diversity of bacteria and archaea. Syst. Biol. 50: 470-78.
- Del Río, J., A. González, M. Fuster, J. Botia, P. Gomez, V. Frias, y A. Ortuño, 2002. Formación de tilosas y cambios en los compuestos fenólicos de raíces de viña infectadas con *Phaeoacremonium chlamydospora* y *Phaeoacremonium* sp. Fitop Mediterr. 4:1-10.
- Denecke, A., 2005. Temporal and spatial analyses of citrus variegated chlorosis and coffee leaf scorch, caused by *Xylella fastidiosa*. Tesis M.S. Universidad de Hanover. Alemania. 138 pp.

- Departamento de Agricultura de Puerto Rico., 2010. Ingreso bruto agrícola 2007-2008. Oficina Estadísticas Agrícolas. Estado Libre Asociado de Puerto Rico.
- Ekkehard, B., 1992. Actividades agroforestales y silviculturales en la región amazónica ecuatoriana. PROFORS - Red Agroforestal Ecuatoriana. Quito, Ecuador. 26 pp.
- Flores, C., 2010. Informe empresa del cafeto. Colegio de Ciencias Agrícolas EEA. Río Piedras. Puerto Rico. 30 pp.
- Flores, C., 2011. Informe empresa del cafeto. Colegio de Ciencias Agrícolas EEA. Río Piedras. Puerto Rico. 29 pp.
- Freitag, J. H., 1951. Host range of the Pierce's disease virus of grapes as determined by insect transmission. *Phytopathol.* 41: 920- 934.
- Fritschi, F., H. Lin, y M. Walker, 2008. Scanning electron microscopy reveals different response pattern of four *Vitis* genotypes to *Xylella fastidiosa* infection. *Plant Dis.* 92: 276-286.
- Goldberg, N., 2007. Pecan bacterial leaf scorch. Pecan conference, march, 2007. New Mexico State University. 22 pp.
- Fundecitrus., 2009. Manual técnico CVC clorose variegada dos citros. Fundo de Defesa da Citricultura. En:
<http://www.fundecitrus.com.br/ImageBank/PageFlip/pageflip.aspx?idPage=137>
- Harakava, R., 2000, Citrus variegated chlorosis: development of transgenic resistance and molecular studies of pathogenesis. Tesis PhD. Universidad de Florida. USA. 79 pp.
- Harmon, C., y T. Schubert, 2007. Preparation for citrus variegated chlorosis: Diagnostics and the NPDN. National plant diagnostic network National meeting. En:
www.plantmanagementnetwork.org/proceedings/npdn/2007/posters/04Chlorosis.pdf.
- Hayward, A., 1983. Primary differentiation of the genera of plant pathogenic bacteria. En: *Plant Disease a Diagnostic Guide*. P.C. Fahay and G.J. Persley. Academic Press, Sidney, Australia. 13-26.
- Hayward, A., y R. Mariano, 2006. Mecanismos de virulencia e patogenicidade de procariotos em plantas. *Revisão Anual de Patologias de Plantas.* 5:199-234.
- Hernández, L., y F. Ochoa, 1997. Detección de *Xylella fastidiosa* Wells et al. Por ELISA-DAS en vid (*Vitis vinifera* L) y malezas en viñedos del municipio Mara, estado Zulia, Venezuela. *Rev. Fac. Agron. (LUZ).* 14: 297-306.
- Infostat., 2006. Infostat, versión 2006. Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Primera Edición. Editorial Brujas. Córdoba, Argentina. 332 pp.

- Irrizari, I., 2010. A Study of bacterial endophytes of *Coccoloba uvifera* at Cabo Rojo, Puerto Rico. Tesis M.sC. Universidad de Puerto Rico. Recinto Universitario de Gurabo. 91 pp.
- Jones, J., G. Somodi, y J. Scott, 1997. Increased ELISA sensitivity using a modified extraction buffer for detection of *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* in leaf tissue. *J. Appl. Microbiol.* 83: 397–401.
- 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.
- Kulldorff, M., 2009. SaTScan v9.1.1. Software for the spatial and space-time scan statistics. En: <http://www.satscan.org/>
- 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.
- Lane, D. J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing: 115–175. En: E. Stackebrandt y M. Goodfellow (Eds.). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, Chichester. 370 pp.
- Li, W., W. Pridmore, 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.
- Lutge, U. M. Manfred, y G. Bauer, 1993. *Botanik*. 1era ed. McGraw Hill. Madrid. 646 pp.
- Macario, A., y E. Macario, 1985. *Monoclonal antibodies against bacteria*. Vol. 1. Academic Press. New York. 332 pp.
- Madigan, M., J. Martinko, y J. Parker, 1998. *Biología de los microorganismos*. 8 ed. 701 pp.
- Mariño-Cárdenas, Y., 2007. Identificación de insectos (*Hemiptera: Auchenorrhyncha*) vectores potenciales de *Xylella fastidiosa* Wells et al. en plantas de café de tres localidades de Puerto Rico. Foro sobre café sostenible en Puerto Rico. UPRM.
- 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: 101-121.
- McElrone A., J. Sherald y N. Forseth, 2001. Effects of water stress on symptomatology and growth of *Parthenocissus quinquefolia* infected by *Xylella fastidiosa*. Plant Dis. 85: 1160–64.
- Méndez, V. E. y C. Bacon, 2005. Medios de vida y conservación de la biodiversidad arbórea: las experiencias de las cooperativas cafetaleras en El Salvador y Nicaragua. *LEISA Revista de Agroecología*. 20: 27-30.
- Meneguim, A.M., L. Akemi-Kimura, y R. Pereira-Leite, 2000. Levantamento da fauna de homópteros vetores de *Xylella fastidiosa* em viveiros de mudas de cafeeiro. XIX Simposio Lationoamericano de Caficultura, Costa Rica. 1490 pp.
- Mills, D., K. Entry, A. Gillevet, y K. Manthee, 2006. Assesing microbial community diversity using aplicon length heterogeneity polymerase chain reaction. Soil Sci. Soc. of Amer. Journ. 71 (2): 572-587.
- 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.
- Miranda, V., P. Silva, S. Rufo, y P. Magalhães, 2007. Genetic characterization of *Xylella fastidiosa* isolated from citrus and coffee plants. Sci. Agric. 64: 482-485.
- Nair, P., 1997. Agroforestería: Centro de agroforestería para el desarrollo sostenible. Chapingo, México: Universidad Autónoma de Chapingo. 543 pp.
- NAS National Academy of Science., 2007. Understanding our microbial planet: The new science of metagenomics. En:
http://delsold.nas.edu/dels/rpt_briefs/metagenomics_final.pdf
- Nunes, F., 2004. Isolation and identification of endophytic bacteria of coffee (*Coffea arabica* and *Coffea robusta*) and their biotechnological applications. Tesis M.S. Universidade de São Paulo (USP). Instituto de Ciências Biomédicas. 98 pp.
- OIC Organización internacional del café., 2010. History of coffee. En:
http://www.ico.org/coffee_story.aspsection=About_Coffee.
- Ospina, A., 2006. Agroforestería. Aportes conceptuales metodológicos y prácticos para el estudio agroforestal. 1ed. Serie agroforestería. El bando creativo. Cali Colombia. 238 pp.

- Ovod, V., K. Rudolph, y K. Krohn, 1997. Serological classification of *Pseudomonas syringae* pathovars based on monoclonal antibodies towards the lipopolysaccharide O-chains: 526–531. En: K. Rudolph, T. Burr, J. Mansfield, D. Stead, A. Vivian, J. von Kietzell (Eds) *Pseudomonas syringae Pathovars and Related Pathogens*: Kluwer, Dordrecht. 433 pp.
- Paradela Filho, O., M. Sugimori, y I. Ribeiro, 1995. Occurrence of *Xylella fastidiosa* in coffee plants in Brazil. *Summa Phytop.* 23: 46-49.
- Perfecto, I., R. A. Rice, R. Greenberg, y M. E. Van Der Voort, 1996. Shade coffee: a disappearing refuge for biodiversity. *Bioscience*. 46: 598-608.
- Philpoot, S., A. Wayne, A. Inge, P. Bichier, T. Diestch, C. Gordon, y I. Perfecto, 2008. Biodiversity loss in latin american coffee landscapes: Review of the evidence on ants, birds, and trees. *Conser. Biol.* 22: 1093-1105.
- Piarroux, R., R. Barrais, B. Faucher, R. Haus, M. Piarroux, J. Gaudart, R. Magloire y D. Raoult, 2011. Understanding the cholera epidemic, Haiti. *Emerging infectious diseases*. 17(7): 1161-1168.
- Piacentini, R., 1997. Vector transmission of *Xylella fastidiosa* to plants. Tesis PhD. Universidade de Sao Paulo. Brasil. 157 pp.
- Poole, A. y D. Penny, 2007. Evaluating hypotheses for the origin of eukaryotes. *Bioassays* 29 (1): 74–84. En: <http://www.wikipedia.org/wiki/Bacteria>.
- Pooler, M., y J. Hartung, 1995. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *Curr. Microbiol.* 31: 377–381.
- Pooler, M., I.S. Myung, J. Bentz, J. Sherald y J.S. Hartung, 1997. Detection of *Xylella fastidiosa* in potential insect vectors by immunomagnetic separation and nested polymerase chain reaction. *Lett. in App. Microbiol.* 25: 123–126.
- Prescott, L., J. Harley y D. Klein, 2002. *Microbiology: Gram negatives bacteria*. 5 ed. McGraw-Hill Science, New York, NY. 1088 pp.
- Purcell, A. y D. Hopkins, 1996. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Ann. Rev. of Phytopa.* 34: 131-151.
- Purcell, A., 2005. A scientific and community Internet resource on plant disease caused by the bacterium *Xylella fastidiosa*. En: <http://www.cnr.berkeley.edu/xylella>.
- Queiroz-Voltan, R., L. Cabral, O. Paradela-Filho, y L. Fazuoli, 2007. Efeito da poda do tipo decote no controle da *Xylella fastidiosa* em cultivares de cafeeiro. *Bragantia* 66 (1): 69-80.

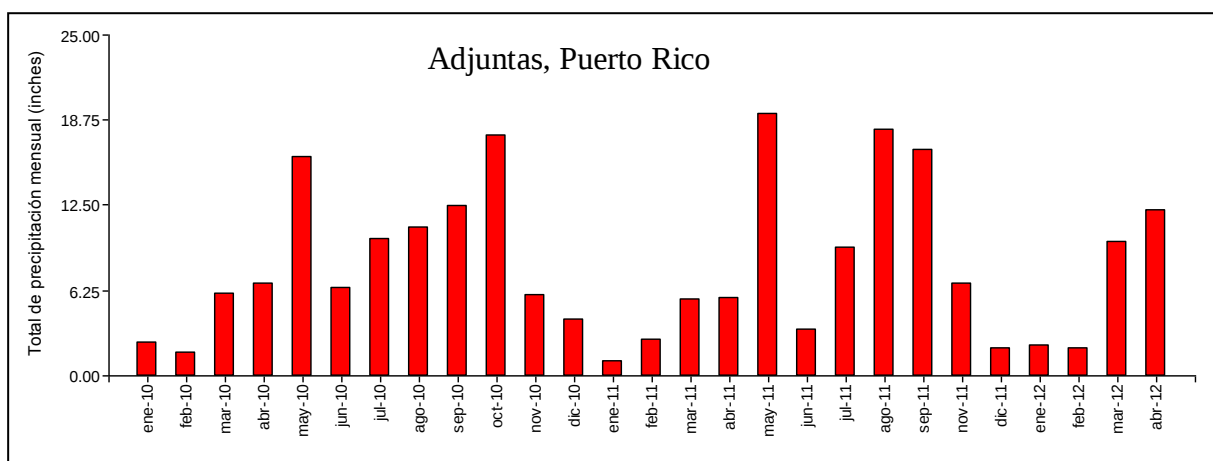
- Reddy, C., T. Beveridge, J. Breznak, G. Marzluf, T. Schmidt, R. Loren, y S. Snyder, 2007. Methods for general and molecular microbiology. 3d. ASM press. Herdon EU. 1000 pp.
- Reinhold-Hurek, B. y T. Hurek, 1998. Life in grasses: Diazotrophic endophytes. Trends Microbiol. 6: 139-44.
- Rivera, G., 2006. Bacterias presentes en el sistema vascular de algunos cítricos en Puerto Rico. Tesis M.S. Departamento de Biología. Universidad de Puerto Rico. Recinto Universitario de Mayagüez. 85 pp.
- Romero, Y., L. Soto, L. García, y J. Barrera, 2001. Coffee yields and soil nutrients under the shades of *Inga* sp. vs. multiple species in Chiapas, Mexico. Agrof. Systems. 54:215-224 pp.
- Rodríguez, C., J. Obando, W. Villalobos, y C. Rivera, 2001. First report of *Xylella fastidiosa* infecting coffee in Costa Rica. Plant Dis. 85: 1027.
- Rodríguez- Solís, C., M. Sánchez-Saborío, F. Villalobos-Müller, W. Garita-Cambronero, C. Godoy-Cabrera, C. Rivera M. Montero-Astúa y L. Moreira-Carmona, 2003. *Xylella fastidiosa* como patógeno del cafeto y otras especies tropicales en Costa Rica. V Congreso Iberoamericano de Agroplasticultura/ IV Congreso Nacional de Suelos/ V Congreso Nacional de Fitopatología. Memoria, San José, CR.
- Romesburg, H., 1984. Cluster analysis for researchers. Lifetime Learning Publications. Belmont, California. 334 pp.
- Rosenblueth, M., y M. Martínez-Romero, 2006. The bacterial endophytes and their interactions with hosts. Molecular plant microbe interactions. 19(8): 827-837.
- Roskoski, J., 1982. Importancia de la fijación de nitrógeno en la economía del cafetal. En: Ávila J.E. y Gómez-Pompa A (Eds.). Estudios ecológicos del agroecosistema cafetalero. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos. Xalapa, México 32-38p.
- Ryan, R. P., G. Kieran, A. Franks, D. J. Ryan y D. N. Dowling, 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. Federation of European Microbiological Societies Microbiological Letters. 278: 1-9.
- Sapp, J., 2006. Two faces of the prokaryote concept. International Microbiology. 9: 367-371.
- 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.

- Schaad, N.W., R. Frederick, J. Shaw, W. Schneider, y R. Hickson, 2003. Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41:305–324.
- Schulz, H. y B. Jorgensen, 2000. Big bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55: 105–37.
- Sistrom, C. y C. Garvan, 2004. Proportions, odds, and risk. *Radiology*. 230(1): 12–9. doi:10.1148/radiol.2301031028. PMID 14695382.
- Snyder, L. y W. Champness, 1997. Molecular genetics of bacteria. 1era ed. ASM Press. Washington, D.C. USA. 504 pp.
- Strobel, G., B. Daisy, U. Castillo, y J. Harper, 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *J. Nat. Prod.* 2004. 67:257–268.
- Souza, A., M. Takita, H. Coletta-Filho, R. Barata, L. Camargo, y M. Machado, 2006. Genoma funcional de bactérias fitopatogênicas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 14: 1-55.
- Stahl, D., T. David, J. Lane, J. Olsen, y N. Pace, 1985. characterization of a yellowstone hot spring microbial community by 5s rRNA sequences. *Applied and environmental microbiology*. 49(6): 1379-1384.
- 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.
- Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., Garcia, N., Willems, A., DeLajudie, P., Prin, Y., Neyra, M., Gillis, M., Boivin-Masson, C., y B. Dreyfus, 2001. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J. Bacteriol.* 183(1): 214-220.
- Taghavi, S., C. Garafola, S. Monchy, L. Newman, A. Hoffman, N. Weyens, T. Barac, J. Vangronsveld, y D. van der Lelie, 2009. Genome Survey and Characterization of Endophytic Bacteria Exhibiting a Beneficial Effect on Growth and Development of Poplar Trees. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(3): 748-757.
- The Nature Conservancy., 2011. Cafeto de sombrero ayuda a proteger hábitat de aves. <http://espanol.tnc.org/dondetrabajamos/colombia/descubre/cafe.html>
- Thomson, R. y H. Bertram, 2001. Laboratory diagnosis of central nervous system infections. *Infect Dis Clin North Am* 15(4): 1047–71. <http://www.wikipedia.org/wiki/Bacteria>.
- U.S. Fish and Wildlife Service., 2009. Cafetales sembrados bajo sombra una forma sustentable de mantener la vida silvestre. En: http://library.fws.gov/Pubs4/Shade_Coffee.pdf.

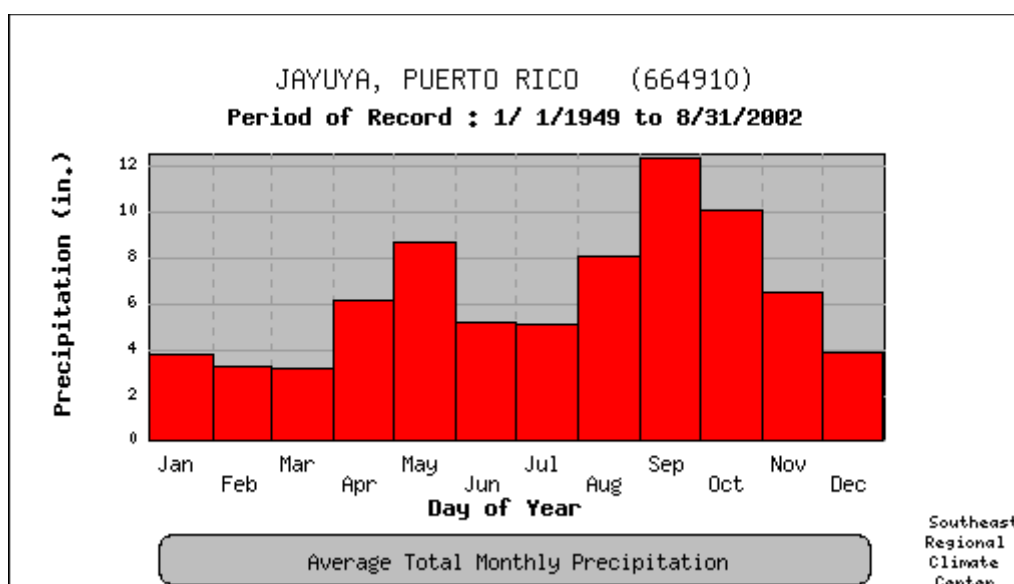
- Van derWolf, J., L. Hyman, D. Jones, C. Grevesse, y J. van Beckhoven, 1996. Immunomagnetic separation of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* from potato peel extracts to improve detection sensitivity on a crystal violet pectate medium or by PCR. *J. Appl. Bacteriol.* 80:487–495.
- Van der Wolf, J., y D. Schoen, 2004. Bacterial pathogens: detection and identification methods. New York: Marcel Dekker. 1–5 pp.
- Van derWolf, J., V. Sledz, J. Van Elsas, L. Van Overbeek, y J. Van Bergervoet, 2004. Flow cytometry to detect *Ralstonia solanacearum* and to assess viability. En: Bacterial Wilt: The Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. C. Allen, P. Prior, APS Press. St. Paul, MN.
- Vega, F., M. Pava, F. Posada, y J. Buyer, 2005. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. *Journ. Bas. Microbiol.* 45:371–380p.
- Venkata, M., V. Prabhakaran, T. Jayaraman, J. Muliyl, A. Oommen, P. Dorny, J. Vercruysse, y V. Rajshekhar, 2010. Detecting spatial clusters of *Taenia solium* infections in a rural block in South India. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 104: 601–612.
- Vicente-Chandler, J., Abruña, F., Bosque Lugo, R. y S. Silva, 1968. Intensive coffee culture in Puerto Rico. *Agric. Exp. Stn. Univ. P.R. Bull.* 211.
- Ward, B., 2002. How many species of prokaryotes are there?. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(16): 10234–10236.
- 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.
- Whitman, W., D. Coleman, y W. Wiebe, 1998. "Prokaryotes: the unseen majority". *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (12): 578–83. <http://www.wikipedia.org/wiki/Bacteria>.
- Wickert, E., M. Machado, y E. Lemos, 2007. Evaluation of genetic diversity of *Xylella fastidiosa* strains from citrus and coffee hosts by single-nucleotide polymorphism markers. *Phytopathol.* 97:1543–1549.
- Woods, G. y D. Walker, 1996. Detection of infection or infectious agents by use of cytologic and histologic stains. *Clin. Microbiol. Rev.* 9: 382–404.
- Woese, C., 1987. Bacterial Evolution. *Microbiol Rev.* 51(2): 221–271 pp.
- Youkhana, A., 2010. Carbon sequestration, growth and yield in a *Coffea-Leucaena* agroecosystem in Hawaii. Tesis PhD. University of Hawaii. 170 pp.

- 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.
- Zinniel, D., P. Lambrecht, N. Beth, F. Zhengyu, D. Kuczmarski, P. Higley, C. Ishimaru, A. Alahari, R. Barletta, y A. Vidaver, 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *App. Environ. Microbiol.* 68: 2198–2208.
- Zumbado, S., 2007. Dinámica de la sintomatología de crespada del café y su relación con la presencia de la bacteria *Xylella fastidiosa* (Wells *et al*). Informe BsC. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago CR. 74 pp.

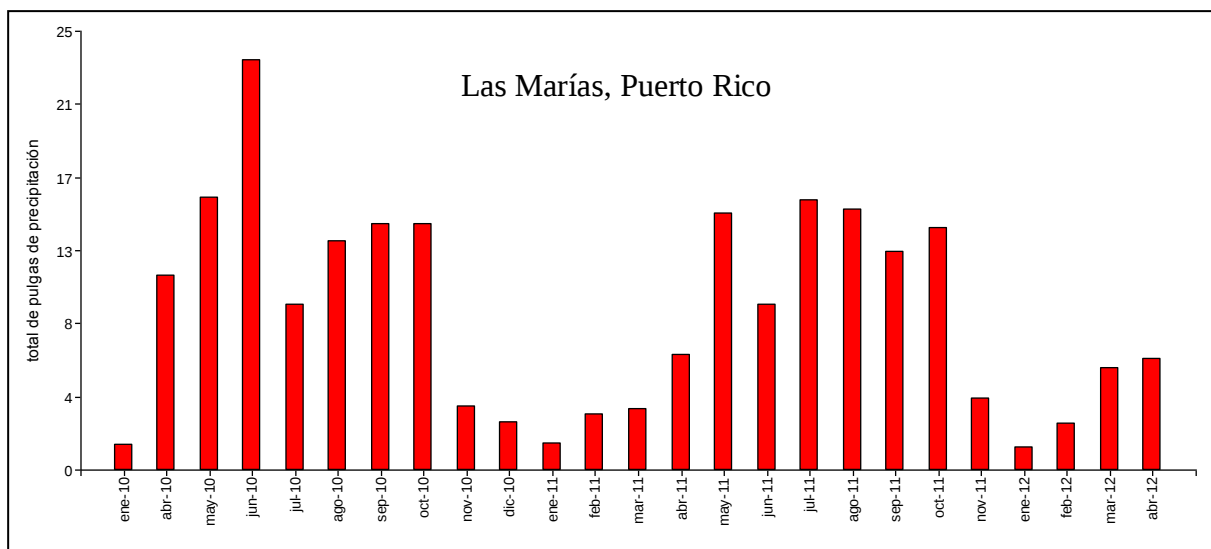
ANEXOS



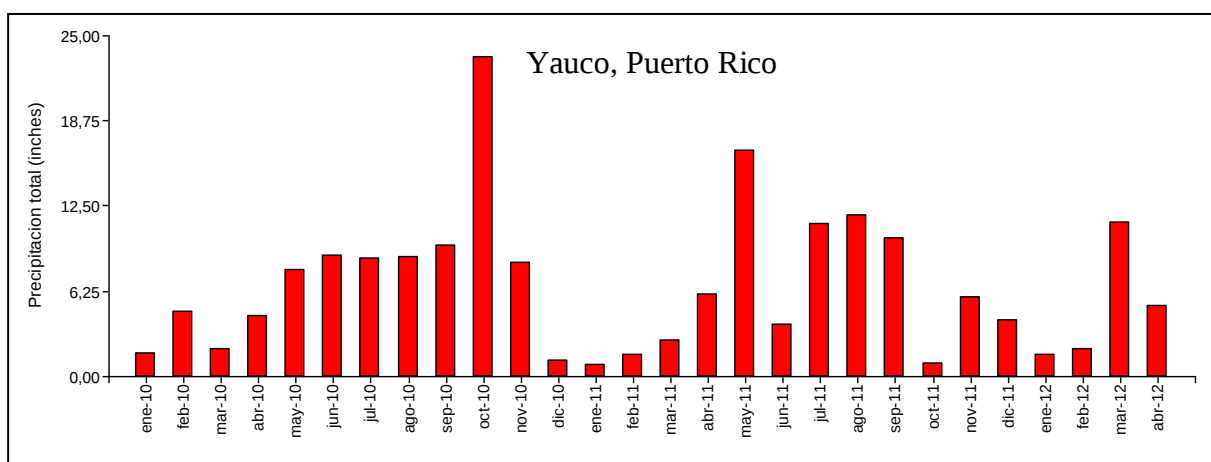
Anexo1.- Precipitación registrada en la Estación Experimental Agrícola de Adjuntas, Puerto Rico durante el período en estudio 2010-2012.



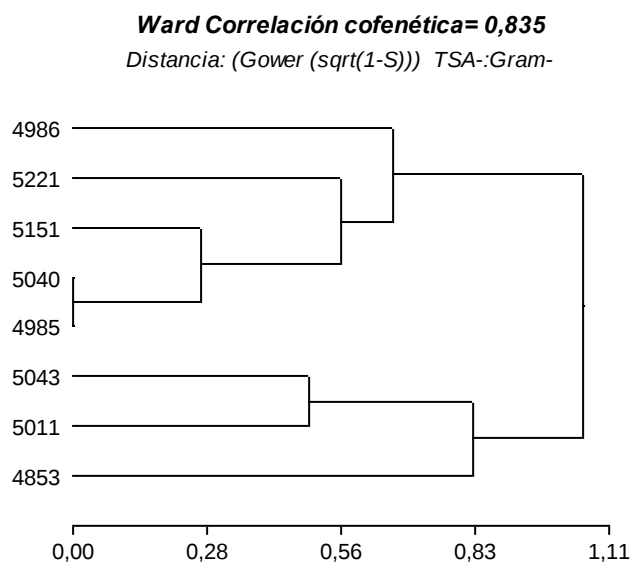
Anexo 2.- Precipitación total (pulg.) para la estación Jayuya, Puerto Rico promedio del período 1949-2002



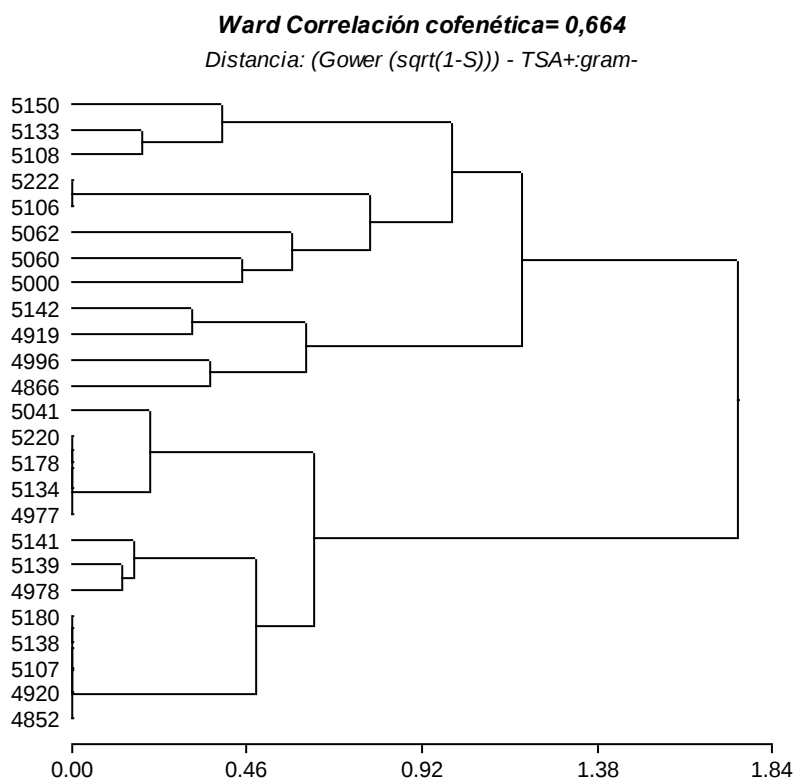
Anexo 3.- Precipitación total por mes en la localidad de Las Marías (Hacienda Constanza) para el período en estudio 2010-2012 (fuente NOAA).



Anexo 4.- Precipitación total (pulg.) para la estación Corral Viejo en Yauco- Puerto Rico para el período en estudio 2010-2012 (Fuente NOAA).



Anexo 5.- Dendrograma para cepas aisladas de cafeto (*Coffea arabica*) de reacción Gram negativa y que no crecen en medio TSA.



Anexo 6.- Dendrograma para cepas aisladas de cafeto (*Coffea arabica*), de reacción Gram negativa y que crecen en medio TSA.