

## Hallazgos ultraestructurales en lesiones foliares asociadas a ‘vena roja’ en helecho hoja de cuero\*

### Ultrastructural findings in foliar lesions associated with ‘red vein’ in leather leaf fern

María del Milagro Granados-Montero<sup>1§</sup>, Ethel Sánchez-Chacón<sup>2</sup>, Maribel Vargas-Montero<sup>2</sup> y Cinthya Barboza-Aguilar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Costa Rica- Centro de Investigación en Protección de Cultivos. Sede Central Rodrigo Facio. Escuela de Agronomía. San José, Costa Rica. Tel. 506 2511 4214. C. P. 12060. San José. <sup>2</sup>Universidad de Costa Rica-Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas. Ciudad de la Investigación. San José, Costa Rica. (ethel.sanchez@ucr.ac.cr; cynthia.barboza@ucr.ac.cr; maribelle.vargas@ucr.ac.cr). §Autora para correspondencia: maria.granadosmontero@ucr.ac.cr.

#### Resumen

La vena roja del helecho hoja de cuero (*Rumora adiantiformis*) se cataloga como una enfermedad de etiología desconocida, ya que no se conoce cuál es su agente o factor causal. Ésta alteración, al igual que el síndrome de Sterloff (SS), se ha venido presentando desde hace varios años en Costa Rica, lo que ha producido situaciones económicas desfavorables, reduciendo el área sembrada en 60% y provocando una disminución en los puestos de trabajo 70%. Se registra muy poca investigación a nivel mundial que caracterice ambas patologías, por lo que es imposible realizar una estrategia de manejo apropiada, lo que conlleva al aumento del costo económico, social y ambiental del cultivo. Con el fin de describir ultraestructuralmente los síntomas de la enfermedad, se colectó tejido foliar por un período de dos años (2007 y 2008) en Poás de Alajuela, Costa Rica, y se realizaron observaciones mediante microscopía electrónica de barrido y transmisión. Los tejidos con síntomas revelaron la presencia de cristales laminados en las células del mesófilo esponjoso y acumulaciones cristalinas amorfas en el parénquima del haz vascular, así como gran cantidad de cristales en las vacuolas del mesófilo esponjoso. Éstos cristales, aparentemente, están compuestos por oxalato de calcio, no se evidenció presencia de cristales en tejidos asintomáticos. Este artículo describe los hallazgos ultraestructurales en follaje con y sin síntomas

#### Abstract

The red vein leather leaf fern (*Rumora adiantiformis*) is classified as a disease of unknown etiology, and it is not known what its agent or causal factor. This alteration, like Sterloff syndrome (SS) has been presenting for several years in Costa Rica, which has produced unfavorable economic conditions, reducing the area planted in 60% and causing a decrease in jobs 70%. Very little is recorded worldwide research that characterizes both conditions, so it is impossible to make an appropriate management strategy, which leads to increased economic costs, social and environmental dimensions of culture. In order to describe ultrastructural symptoms of the disease, leaf tissue was collected for a period of two years (2007 and 2008) in Poas, Alajuela, Costa Rica, and observations were made by scanning electron microscopy and transmission. Tissues with symptoms revealed the presence of laminated glass in spongy mesophyll cells and amorphous crystalline accumulations in the parenchyma of the vascular bundle, as well as lots of crystals in the spongy mesophyll vacuoles. These crystals are apparently calcium oxalate compounds, no evidence of crystals in the presence of asymptomatic tissues. This article describes the ultrastructural findings foliage with and without symptoms of red vein fern plants and mentioned as a possible cause stress conditions nutritional imbalances.

\* Recibido: julio de 2013  
Aceptado: octubre de 2013

de vena roja en plantas de helecho y menciona como una posibilidad de la causa condiciones de estrés por desbalances nutricionales.

**Palabras clave:** *Rumorah adiantiformis*, ultraestructura, cristales, microscopía electrónica.

## Introducción

El helecho hoja de cuero (*Rumorah adiantiformis* (G. Forst.) Ching) durante más de 20 años ha generado divisas importantes para Costa Rica, debido a sus altos niveles de exportación. Para el 2010 generó US\$52 millones; así, el sector helechero aportó alrededor de 80% de las exportaciones de follaje en el país (Rainforest Alliance, 2010; Chaves, 2010). De acuerdo con Torres-Tamayo (1998), este follaje tiene gran presencia en el mercado de ornamentales verdes como complemento de los ramos de flores por su mayor vida útil, color más llamativo y su fronda coriácea de larga duración.

Desde sus inicios, este cultivo ha permitido la creación de fuentes de trabajo con mano de obra mixta y con niveles de salario superiores a cualquiera de las otras actividades agrícolas. Según González *et al.* (1998) y Gil (2003), hasta inicios de la década anterior se consideraba a nivel mundial que Costa Rica era el primer país productor de este follaje, superando a Estados Unidos de América quien inició con la actividad, ya que no producía los volúmenes de exportación como los registrados en Costa Rica.

Las principales razones por las que el helecho producido en Costa Rica desplazó al de Florida del mercado europeo, son la calidad, tomando en cuenta la apariencia fresca, la ausencia de manchas y daños mecánicos, así como, la consistencia en la producción (volumen similar a lo largo de todo el año), además, los productores de Florida han tenido serios problemas para mantener su nivel de productividad, debido a la aparición de nuevas enfermedades y catástrofes climáticas, como los huracanes (Berrocal, 1996; González *et al.*, 1998).

En Costa Rica, la producción de helechos se ha visto disminuida. Berrocal (1996), indica que la aparición de problemas fitosanitarios se ha multiplicado hasta convertirse en una de las limitantes más grandes de este cultivo. Dentro de los patógenos identificados que afectan el helecho están los hongos *Pythium* sp., *Thielaviopsis* sp. y *Rhizoctonia* sp., los cuales atacan la parte subterránea de la planta; *Alternaria* sp., *Cercospora* sp.,

**Key words:** *Rumorah adiantiformis*, ultrastructure, crystals, electron microscopy.

## Introduction

The leather leaf fern (*Rumorah adiantiformis* (G. Forst.) Ching) for over 20 years has created major currencies for Costa Rica, due to high export levels. For 2010 generated \$ 52 million, so the fern industry contributed about 80% of exports of foliage in the country (Rainforest Alliance, 2010; Chaves, 2010). According to Torres-Tamayo (1998), the foliage has a strong presence in the market of ornamental green to complement the bouquets for their longer life, more vibrant color and long lasting leathery foliage.

Since its inception, this crop has enabled the creation of jobs with joint labor and wage levels higher than any of the other agricultural activities. According to González *et al.* (1998) and Gil (2003), until the beginning of the previous decade was seen worldwide that Costa Rica was the first country in the foliage, surpassing the United States of America who initiated the activity, and that did not produce the volumes export as recorded in Costa Rica.

The main reasons that the fern produced in Costa Rica moved to Florida from the European market, are quality, taking into account the fresh appearance, the absence of staining and mechanical damage, as well as consistency in production (similar volume along all year) also Florida growers have had serious trouble keeping your productivity level, due to the emergence of new diseases and climatic catastrophes such as hurricanes (Berrocal, 1996; González *et al.*, 1998).

In Costa Rica, the production of ferns has been diminished. Berrocal (1996) indicates that the occurrence of plant health problems has grown to become one of the biggest limitations of this crop. Among the pathogens identified are affecting fungi fern *Pythium* sp., *Thielaviopsis* sp. and *Rhizoctonia* sp., which attack the underground parts of the plant, *Alternaria* sp., *Cercospora* sp., *Colletotrichum* sp., *Cylindrocladium* sp. and *Ascochyta* sp. that cause leaf spots and the bacterium *Pseudomonas* sp. that produces a disease known as yellow vein. Also, the nematode *Pratylenchus penetrans* (Cobb) although no significant damage occurs in the plant, cause discoloration of the frond, in addition

*Colletotrichum* sp., *Cylindrocladium* sp. y *Ascochyta* sp. que producen manchas foliares y la bacteria *Pseudomonas* sp. que produce una enfermedad conocida como vena amarilla. También, el nematodo *Pratylenchus penetrans* (Cobb) que aunque no produce daños importantes en la planta, causa decoloración de la fronda; además existen varias especies de *Aphelenchoides* que atacan la hoja produciendo manchas negras y *Paratrichodorus acutus* (Bird) (López y Vilchez, 1991).

Sin embargo, en Costa Rica los problemas fitosanitarios restrictivos para alcanzar la productividad demandada de rollos por hectárea son dos enfermedades de etiología desconocida, a saber, el Síndrome de Sterloff (SS), caracterizado por la deformación y maduración prematura de las frondas, así como estrías cloróticas en las pinnas; y la Vena Roja (VR), cuyos síntomas incluyen clorosis intervenal seguida de necrosis parda rojiza en el ápice de las hojas y la vena principal o secundarias (lo que da origen al nombre de la alteración), luego se presentan manchas o pecas rojizas sin patrón definido en la lámina foliar, las que muchas veces se inician de la punta de la pinna hacia el centro, por último marchitez y muerte prematura de la fronda. La incidencia y la severidad de los síntomas de VR se incrementan luego de períodos lluviosos y pueden llegar a alcanzar 50% de daño (Flores, 2010. Com. Per.).

Como se dijo antes, se registra muy poca información acerca de estas alteraciones. Este punto se hace notable, ya que, al no contar con un diagnóstico preciso y confiable, es imposible efectuar una estrategia de manejo apropiada. Hasta ahora los productores utilizan medidas de combate inadecuadas y por ende ineficaces. Desde su aparición han intentado diversas maneras de combate, sin éxito, lo que les provoca grandes pérdidas económicas.

De acuerdo a (Cerdas, 2010. Com. Per.) en los últimos 5 años muchas de las empresas dedicadas al cultivo han cesado funciones. Mientras algunos productores han invertido grandes sumas de dinero en programas de erradicación y resiembra, otros han decidido cambiar de cultivo; han eliminado lotes de helecho y renovando con aralia (*Fatsia japonica* (Thunb.) Decne & Planch.)), aunque reciben menos ingresos por la venta de este follaje, estos son constantes y con menor margen de pérdidas.

La VR se maneja por medio de aplicaciones de agroquímicos, ya que los productores asumen que el agente causal es un fitoplasma; no obstante, los resultados de las aplicaciones son erráticos y no se cuenta con evidencia científica que confirme su presencia.

there are several *Aphelenchoides* species that attack the black spots producing sheet *Paratrichodorus acutus* (Bird) (López and Vilchez 1991).

However, in Costa Rica restrictive phytosanitary problems to productivity demanded of rolls per hectare are two diseases of unknown etiology, namely Sterloff Syndrome (SS), characterized by deformation and premature ripening of the fronds and chlorotic streaks in the pinnae, and Red vein (VR), whose symptoms include chlorosis followed by necrosis reddish brown at the apex of the leaves and the main or secondary vein (which gives rise to the name of the alteration), then reddish spots or freckles have no definite pattern in the leaf blade, which often begins at the tip of the pinna toward the center, finally wilting and premature death of the foliage. The incidence and severity of the symptoms of VR increased after rainy periods and can reach 50% damage (Flores, 2010. Per. Com.).

As stated earlier, there is very little information about these changes. This point is significant, because, not having a reliable and accurate diagnosis is impossible to make a proper management strategy. So far the producers use inadequate measures and thus combat ineffective. Since its emergence have tried various ways to combat unsuccessfully what causes them great economic losses.

According to Cerdas, (2010, Pers. Com.) in the last five years many companies have ceased cultivated functions. While some producers have invested large sums of money on eradication and replanting programs, others have decided to change crops, have eliminated lots of fern and renewing with Aralia (*Fatsia japonica* (Thunb.) Decne & Planch.)), although they receive less income from the sale of this foliage, these are constant and less margin losses.

The VR is handled through application of agrochemicals, as producers assume that the causative agent is a phytoplasma; however, the application results are erratic and there is no scientific evidence to confirm their presence.

Globally, there is only a report of a similar disease Sterloff syndrome called syndrome Fern distortion, FDS for short in English, which according to Kloepper (2007) and Kloepper *et al.* (2010) is present in 60% of the fern farms of Costa Rica and is twisting and distortion of the foliage, sometimes with chlorotic streaks and tan. This

A nivel mundial, solamente existe el reporte de una enfermedad similar al síndrome de Sterloff, denominada síndrome de la distorsión del helecho, FDS por sus siglas en inglés, la cual de acuerdo a Kloepper (2007) y Kloepper *et al.* (2010) está presente en 60% de las fincas helecheras de Costa Rica y consiste en el torcimiento y distorsión de las frondas, algunas veces con estrías cloróticas y bronceadas. Esta enfermedad está asociada a la presencia de una bacteria endofítica a nivel de rizoma, la cual incrementa sus poblaciones luego de repetidas aplicaciones del fungicida sistémico benlate (Kloepper *et al.*, 2012).

De acuerdo a (Kopler, 2010. Com. Per.) uno de los síntomas que pueden estar asociados al FDS es la vena roja, pero no se ha hallado evidencia de su relación con la presencia de la bacteria. Menciona además, que no se conoce el grado de asociación de ambos síntomas (FDS y VR), pero que son problemas complejos, en los que intervienen muchos factores e interacciones entre ellos.

Debido a la incertidumbre del origen de la enfermedad y de su epidemiología, se desarrolló esta investigación, como una primera etapa descriptiva, con la finalidad de proveer información útil para un posterior entendimiento de la causa, su desarrollo espacio-temporal y manejo.

## Material y métodos

Las muestras se colectaron en una finca ubicada en Poasito de Alajuela con coordenadas 10° 10' 0" latitud norte 84° 12' 0" longitud oeste y con una altitud aproximada a los 1 200 msnm y con suelos del orden andisol. Se realizaron seis muestreos en dos años consecutivos (2007 - 2008). Cada muestra constó de 600 g de tejido foliar, el cual se dividió para ser procesado para observación en microscopía electrónica, para análisis fitopatológico de hongos y bacterias, y para análisis de la concentración de nutrientes. Las observaciones microscópicas estuvieron focalizadas en la revisión de las venas principales de las frondas (con o sin síntomas).

### Caracterización en campo

Se visitó 4 veces (2 en estación seca y 2 en estación lluviosa) el área de la finca que reiteradamente presentaba síntomas de la alteración, se determinó su distribución espacial y se colectó una gama de síntomas foliares asociados a la alteración. También, se visitaron áreas sin problemas y se tomaron muestras de frondas asintomáticas. Se trató

disease is associated with the presence of endophytic bacteria rhizome level, which increases their populations after repeated applications systemic fungicide Benlate (Kloepper *et al.*, 2012).

According to (Kopler, 2010. Pers. Com.) one symptom that may be associated the FDS is red vein, but no evidence has been found of their relationship to the presence of bacteria. Mention also is not known the degree of association of both symptoms (FDS and UI), but are complex problems that involve many factors and interactions between them.

Due to the uncertainty of the origin of the disease and its epidemiology, this research was developed as an initial descriptive phase, in order to provide useful information for further understanding of the causes, development and management spacetime.

## Materials and methods

Samples were collected from a farm in Alajuela Poasito with coordinates 10° 10' 0" North latitude 84° 12' 0" West longitude and at an elevation of about 1 200 meters above sea level the soil and andisol order. Six samplings were conducted in two consecutive years (2007-2008). Each sample consisted of 600 g of leaf tissue, it which was divided to be processed for electron microscopy observation for analysis of fungal and bacterial plant pathology, and for analysis of the concentration of nutrients. Microscopic observations were focused on the review of the main veins of the fronds (with or without symptoms).

### Field characterization

Was visited 4 times (2 in dry season and wet season 2) the area of the farm that repeatedly showed signs of alteration, its spatial distribution was determined and collected a range of foliar symptoms associated with the alteration. Also, smooth areas were visited and sampled fronds asymptomatic. Ordering treated symptoms gradually according to the amount of tissue affected by frond (severity), in order to have an idea of the developmental stages of the disease. The samples were transported to the laboratory where procedures were performed as described below. For purposes of this study, the material was divided



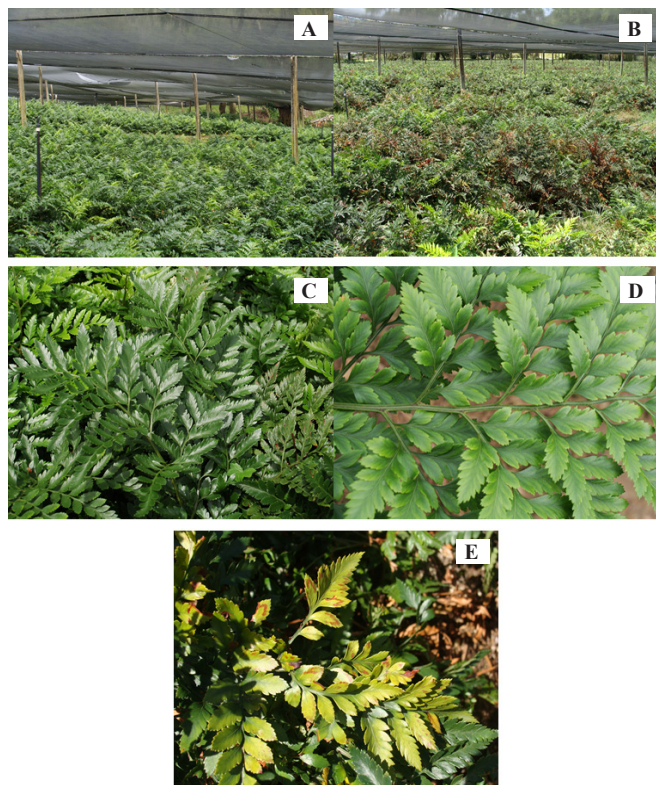
de ordenar los síntomas de manera gradual de acuerdo a la cantidad de tejido afectado por fronda (severidad), con el fin de tener una idea de las etapas de desarrollo de la enfermedad. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio donde se realizaron los procedimientos descritos más adelante. Para fines de este estudio, el material se dividió solamente en, "sano" si no presentaba ningún síntoma visible y en "vena roja" cuando las pinnas presentaban coloración rojiza en las venas principales o secundarias. No se tomó material con daños muy avanzados, ya que en estos casos es imposible determinar si sus características ultraestructurales se deben a la alteración en estudio o a procesos de senescencia Figura 1.

### Microscopia electrónica de barrido y transmisión (MEB y MET)

Las muestras se procesaron tanto para ser observadas en microscopia electrónica de barrido como de transmisión. Las secciones de frondas procesadas para microscopia de barrido, fueron fijadas en solución de glutaraldehído 2.5% y paraformaldehído 2% en amortiguador de fosfato de sodio (0.1M pH 7.4), posteriormente se lavaron en amortiguador, se pos-fijaron con tetraóxido de osmio 2%, se lavaron con agua destilada y se colocaron en sacarosa 2M (como crioprotector), para congelarlas en nitrógeno líquido. Luego se procedió a seccionarlas y se descongelaron en sacarosa 2 M, se lavaron cinco veces con agua destilada y se deshidrataron en una gradiente ascendente de etanol (30% - 100%). Posteriormente se realizaron cuatro cambios con alcohol terbutílico y se secaron en un Sublimador marca Eiko ID-2, Japón. Una vez secas, las muestras se orientaron y montaron en bases de aluminio utilizando cinta adhesiva doble cara de carbón, se cubrieron con 30 nm de oro en un cobertor iónico marca Eiko-ID-2, Japón. Se observaron con el microscopio electrónico de barrido Hitachi, S-570 (Japón), a un voltaje de 15 Kv. Las micrografías se tomaron utilizando cámara digital modelo Pentax K 100 acoplada al microscopio electrónico.

Las muestras procesadas para microscopia electrónica de transmisión se fijaron y pos-fijaron de la misma forma que para microscopia de barrido, seguidamente se deshidrataron en el gradiente de etanol, se infiltraron con resina Spurr y se polimerizaron a 70 °C durante 72 h. Se realizaron cortes para microscopia de luz (0.35  $\mu$ m) y cortes ultrafinos (60-70 nm) utilizando un ultramicrotomo marca Reichert Ultracut, luego se contrastaron con acetato de uranilo al 4% en metanol y con hidróxido de plomo. Se prepararon aproximadamente 150 rejillas con cortes y fueron observadas a 100 Kv con

only "healthy" but had no visible symptoms and "red vein" when the pinnae had reddish in primary or secondary veins. No damage was taken very advanced material, since in these cases it is impossible to determine whether ultrastructural characteristics are due to the alteration in study or senescence processes Figure 1.



**Figura 1. A. Plantación sana. Se observa el crecimiento de frondas nuevas (color verde claro); B. Plantación con síntomas. Se observan parches de plantas enfermas (color pardo); C. Frondas sanas; D. Frondas con síntomas de clorosis; y E. Frondas con uno de los síntomas de "VR".**

**Figure 1. A. Planting healthy. It shows the growth of new fronds (light green); B. Planting with symptoms. Patches were observed diseased plants (dun); C. Healthy fronds; D. Fronds with chlorosis symptoms, and E. Fronds with one of the symptoms of "VR".**

### Scanning electron microscopy and transmission (TEM and SEM)

Samples were processed both to be observed in scanning electron microscopy and transmission. Fronds sections processed for scanning microscopy were fixed in 2.5% glutaraldehyde solution and 2% paraformaldehyde in sodium phosphate buffer (0.1M pH 7.4), then washed in buffer, is post- fixed in osmium tetroxide 2%, washed with

microscopios electrónicos de transmisión marca Hitachi modelos H-7000 y H-7100. Las micrografías fueron tomadas utilizando placas fotográficas Fuji (Japón).

### **Análisis fitopatológico**

A cada muestra se le realizó un análisis fitopatológico el cual consistió en hacer aislamientos en medios de crecimiento básicos y registrar cuáles hongos o bacterias se recuperaron; se utilizó la metodología propuesta por Agrios (2005). Una vez que se obtuvo el cultivo puro del microorganismo aislado, se procedió a realizar su identificación a nivel morfológico; en el caso de hongos de acuerdo a sus características en cultivo y estructuras microscópicas, y según el perfil bioquímico por medio de la prueba API-20, en el caso de bacterias.

### **Análisis químico foliar**

De cada muestra de tejido se tomó una submuestra de 500 g para realizar análisis químico completo y conocer el estado nutricional de las plantas. Se determinaron las concentraciones de N, P, Ca, Mg, K, S, Fe, Cu, Zn, Mn y B.

## **Resultados y discusión**

De acuerdo a las observaciones realizadas en campo, se determinó que la alteración estaba distribuida de forma uniforme en el área de la finca donde se colectaron las muestras y que se presentaba alta diversidad de síntomas en la misma planta, principalmente en época lluviosa, lo que no permitió desarrollar una adecuada descripción del progreso de la alteración, ni relacionar la severidad del problema con el estado de las plantas. Se observaron síntomas desde clorosis intervenales iniciales (sin coloración rojiza de venas) hasta necrosis total de las frondas (senescencia prematura) con venas completamente rojas, en la misma planta.

Aunque se presume que la alteración puede ser debida a un fitoplasma, como en el caso del crisantemo, se consideró importante conocer la presencia de hongos o bacterias, para tratar de asociar la aparición de los síntomas con presencia de estos organismos. A partir de los análisis fitopatológicos de tejido dañado se recuperaron los hongos *Pestalotia* sp., *Alternaria* sp. y *Glomerella* sp., así como las bacterias

distilled water and placed in 2M sucrose (as cryoprotectant) to freezing in liquid nitrogen. Then, using a sectioning and thawed in 2 M sucrose, washed five times with distilled water and dehydrated in an ascending ethanol gradient (30% - 100%). Subsequently there were four changes Butyl alcohol and dried in a sublimator mark Eiko ID -2, Japan. Once dry, the samples were oriented and mounted on aluminum bases using double sided tape coal, covered with 30 nm of gold in a blanket ion brand Eiko -ID-2, Japan. We observed with the Hitachi scanning electron microscope, S-570 (Japan), at a voltage of 15 kV. The micrographs were taken using digital camera Pentax K model 100 coupled to the electron microscope.

Samples processed for transmission electron microscopy were fixed and post-fixed in the same way as for scanning microscopy, then dehydrated in the gradient of ethanol, infiltrated with Spurr resin and polymerized at 70 °C for 72 h. Sections were prepared for light microscopy (0.35 µm) and ultrathin (60-70 nm) using a Reichert Ultracut ultramicrotome mark, then contrasted with uranyl acetate at 4% methanol and with lead hydroxide. Approximately 150 grids were prepared with cuts and were observed at 100 Kv transmission electron microscopes Hitachi Model H-7000 and H-7100. The micrographs were taken using photographic plates Fuji (Japan).

### **Phytopathologic analysis**

Each sample was phytopathologic analyzed which isolates was to make basic growth media and record what fungi or bacteria were recovered, we used the methodology proposed by Agrios (2005).

Once obtained the pure culture of the organism isolated we proceeded to perform at morphological identification, in the case of fungi according to their characteristics in culture and microscopic structures, and according to the biochemical profile using API-20 test, in the case of bacteria.

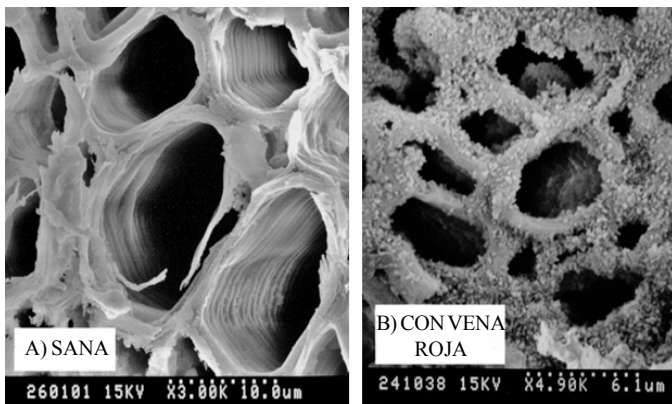
### **Foliar chemical analysis**

From each tissue sample was taken a subsample of 500 g for complete chemical analysis and the nutritional status of the plants. The concentrations of N, P, Ca, Mg, K, S, Fe, Cu, Zn, Mn and B.

*Pseudomonas luteola* (Kodoma) y *P. fluorescens* (Migula), *Sphingomonas paucimobillis* (Holmes), *Burkholderia cepacia* (Palleroni & Holmes) y *Xanthomonas* sp. Sin embargo, estos organismos fueron aislados también a partir de follaje asintomático para vena roja.

Los hongos *Pestalotia* sp. y *Alternaria* sp., así como las bacterias del género *Pseudomonas* son mayormente oportunistas, lo que significa que se alojan en un hospedero que generalmente presenta condiciones de estrés, el cual puede deberse a desbalances nutricionales por deficiencia o toxicidad, inadecuado contenido de agua (estrés hídrico por inundación o sequía), temperaturas extremas o cambios bruscos, así como cualquier otro factor que debilite la fisiología normal de la planta.

El estudio por medio de microscopía electrónica de barrido (MEB) a las muestras asintomáticas mostró que los haces vasculares se encuentran normales y sin ningún tipo de alteración ultraestructural. Mientras que, en el sistema vascular de las frondas enfermas se presentan alteraciones morfológicas, los conductos son más pequeños que los de una planta sana y presentan un recubrimiento en las paredes externas con un material de apariencia friable y cristalina, del cual no se conoce su composición. No se observó ninguna estructura propia de hongos o bacterias (Figura 2).



**Figura 2.** A. Planta sana. Elementos de los vasos del xilema. Note la ornamentación escalariforme y la gruesa pared lignificada. No se observa alteración alguna. Esc. 10  $\mu$ m; y B. Planta con síntomas. Los elementos de los vasos presentan una consistencia laxa y un material granular que no fue identificado. Esc. 6.1  $\mu$ m.

**Figure 2.** A. Healthy plant. Elements xylem vessels. Note the decoration scalariform thick and lignified wall. No alteration is observed. Esc 10 microns, and B. Plant with symptoms. The elements of the glasses have a loose consistency, and a granular material was not identified. Esc 6.1 microns.

## Results and discussion

According to field observations it was determined that the alteration was evenly distributed in the area of the farm where the samples were collected and presented high diversity of symptoms in the same plant, mainly in the rainy season, which not possible to develop an adequate description of the progress of the alteration, or relate the severity of the problem with the state of the plants. Symptoms were observed from initial interveinal chlorosis (without reddish veins) to total frond necrosis (premature senescence) with fully red veins, on the same floor.

Although it is presumed that disruption may be due to a phytoplasma, as in the case of chrysanthemums, it was considered important to know the presence of fungi or bacteria, to try to associate the appearance of symptoms with the presence of these organisms. From the analysis of damaged tissue phytopathological fungi recovered *Pestalotia* sp. *Alternaria* sp. and *Glomerella* sp. and bacteria *Pseudomonas luteola* (Kodoma) and *P. fluorescens* (Migula), *Sphingomonas paucimobillis* (Holmes), *Burkholderia cepacia* (Palleroni & Holmes) and *Xanthomonas* sp. However, these organisms were also isolated from asymptomatic foliage for red vein.

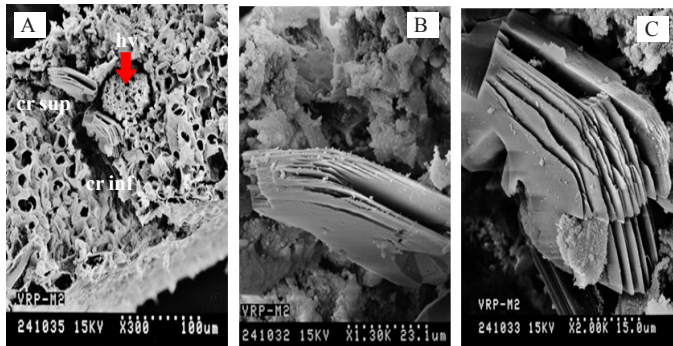
*Pestalotia* sp fungi. and *Alternaria* sp., and bacteria of the genus *Pseudomonas* are mostly opportunistic, which means staying in a host which is generally stressful conditions, which may be due to nutritional imbalances deficiency or toxicity, inadequate water content (stress water flood or drought), extreme temperatures or sudden changes, and any other factor that weakens the normal physiology of the plant.

The study using scanning electron microscopy (SEM) to samples showed asymptomatic vascular bundles are normal without any ultrastructural alteration. While in the vascular system of the fronds are diseased morphological alterations ducts are smaller than those of healthy plants and have a coating on the outer walls of a friable material and crystalline appearance, which is not known composition. There was no specific structure of fungi or bacteria (Figure 2).

The presence of laminated glass was shown next to the vascular presenting morphological changes was observed similar to an intermediate state of crystallization, with similarity to a friable material accumulation in the damaged spongy mesophyll fronds resembling the final shape laminated glass (Figures 3 and 4).

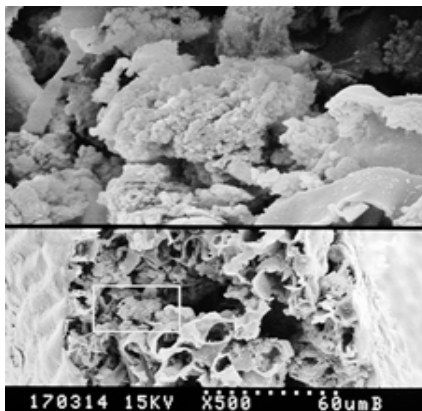


Se observó la presencia de cristales laminados junto a los haces vasculares que presentaban alteraciones morfológicas, se pudo observar algo similar a un estado intermedio de cristalización, con similitud a una acumulación de material friable en el mesófilo esponjoso de frondas dañadas que asemejan la forma final de un cristal laminado (Figuras 3 y 4).



**Figura 3.** Micrografías mostrando presencia de cristales en fronda con síntomas típicos de vena roja. A) Se nota el haz vascular (hv) con material friable y dos cristales (cr) adyacentes a él; B) Acercamiento del cristal superior (cr sup); y C) Acercamiento de cristal inferior, se notan las láminas que componen los cristales.

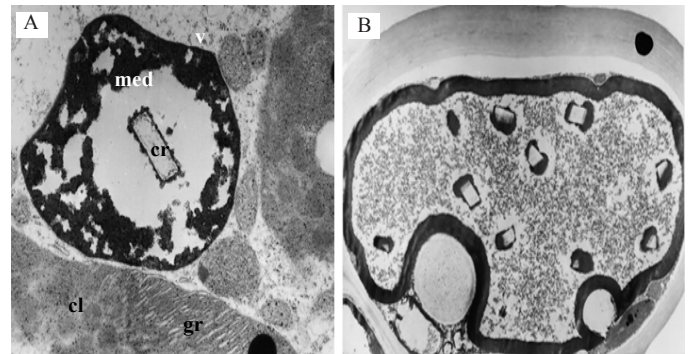
**Figure 3.** Micrographs showing presence of crystals in frond with typical symptoms of red vein. A) Note the vascular bundle (hv) friable material and two crystals (cr) adjacent to it; B) Bringing the top glass (cr sup); and C) Bringing lower glass sheets are noticed crystals comprising.



**Figura 4.** Micrografía mostrando proceso de cristalización en mesófilo esponjoso de muestras de helecho con síntomas de vena roja. En la parte superior de la micrografía se detalla este material en proceso de cristalización, es el material encerrado en el recuadro de la micrografía inferior.

**Figure 4.** Micrograph showing crystallization process spongy mesophyll fern samples with red vein symptoms. At the top of the micrograph is detailed crystallization process material is the material contained in the box in the lower micrograph.

Also, crystals were found in samples from diseased tissue observed through transmission electron microscopy (Figure 5). Asymptomatic in samples no crystals were observed.



**Figura 5.** Micrografías mostrando presencia de cristales en el interior de las vacuolas de las células del mesófilo esponjoso de frondas con síntomas típicos de vena roja. A) Se nota un cristal (cr) dentro de una vacuola (v) de gran tamaño con material electrodens (med) en su interior; y B) Célula mesofilica con vacuola de gran tamaño que ocupa casi la totalidad del espacio intracelular, en la vacuola se notan al menos 9 cristales. cl= cloroplasto; gr= grana; pc= pared celular; mv= membrana vacuolar.

**Figure 5.** Micrographs showing presence of crystals within the vacuoles of spongy mesophyll cells with typical symptoms fronds red vein. A) It shows a crystal (cr) in a vacuole (v) with large electron-dense (med) therein, and B) mesophyll cell with large vacuoles which occupies almost the entire intracellular space, in the vacuole are noted at least 9 glasses. cl= chloroplast; gr= grana; pc= cell wall; mv= vacuolar membrane.

Although, in this work not performed any analysis to determine the composition of the crystals, according to the morphological descriptions given by Vincent and Nakata (2005), it is possible that these crystals are of oxalate. Possibly the friable coating observed in the vascular bundle is a type of crystal called sand and glass are laminated glass prism type. There are reports of accumulations of oxalate crystals in cultures with symptoms like red vein fern, e.g. Maldonado-Torres *et al.* (2006) reported that on leaves of *Citrus aurantifolia* (Christm.) affected by chlorosis oxalate crystals were found both on the surface of the abaxial and in the adaxial, these authors suggested that the number and length of the crystals increased with increased severity of iron deficiency, in those leaves were imbalances in the levels of potassium (K), manganese (Mn) and phosphorus (P) as well as in the relations P/Fe and K/Ca.



También, se hallaron cristales en las muestras de tejido enfermo observadas por medio de microscopia electrónica de transmisión (Figura 5). En las muestras asintomáticas no se observaron cristales.

Aunque, en este trabajo no se realizó ningún análisis para determinar la composición de los cristales, de acuerdo a las descripciones morfológicas dadas por Vincenty y Nakata (2005), es posible que estos cristales sean de oxalato. Posiblemente, el recubrimiento friable observado en el haz vascular sea un tipo de cristal llamado cristal de arena y los cristales laminados sean del tipo prismático. Existen reportes de acumulaciones de oxalato en forma de cristales en cultivos que presentan patologías parecidas a la vena roja del helecho; por ejemplo, Maldonado-Torres *et al.* (2006) reportan que en hojas de *Citrus aurantifolia* (Christm.) afectadas por clorosis férrica se hallaron cristales de oxalato, tanto en la superficie adaxial como en la abaxial, estos autores indican que la cantidad y longitud de los cristales aumentó conforme aumentó la severidad de la deficiencia de hierro; en esas hojas se registraron desbalances en los niveles de potasio (K), manganeso (Mn) y fósforo (P), así como en las relaciones P/Fe y K/Ca.

Se han reportado algunas enfermedades similares a la vena roja, tanto en helecho como en otros cultivos. Por ejemplo, en cowpea se producen estrías pardas en hojas maduras debido a la toxicidad de manganeso en su forma oxidada (Wissemeier y Horst, 1992). En algodón se forman manchas necróticas oscuras en las hojas nuevas, luego se producen arrugas, moteados y se tornan cuerosas, y muchas veces se produce abscisión prematura; además, se nota un retardo general del crecimiento, también debido a la toxicidad por manganeso (Sirkar y Amin, 1974).

En crisantemo, Lawson y Dienelt (1991), estudiaron una necrosis foliar caracterizada por pecas necróticas en las hojas bajas asociadas con clorosis y senescencia prematura, la cual fue observada por más de 20 años, sin conocer su causa, pero la relacionaban con la necrosis del floema del crisantemo, enfermedad relacionada a un fitoplasma, debido a que, los síntomas de la necrosis foliar parecían idénticos a los reportados para la necrosis del floema. Los autores utilizaron microscopia electrónica de barrido (MEB) y microanálisis de rayos X (EDX) para estudiar los síntomas y lograron concluir que la necrosis foliar del crisantemo está asociada a una toxicidad por manganeso, ya que el análisis de rayos X reveló acumulaciones del elemento en las lesiones necróticas, pero no en tejido asintomático. En helecho, Lijalad (1990) informó de una alteración que

Diseases have been reported similar to red vein in both fern like in other crops. For example, in cowpea brown streaks occur in mature leaves due to the toxicity of manganese in its oxide form (Wissemeier and Horst, 1992). In cotton dark necrotic spots form new leaves, then produce wrinkles, mottled and become leathery, and often premature abscission occurs; also notice a general retardation of growth, also due to manganese toxicity (Sirkar and Amin, 1974).

In chrysanthemum, Lawson and Dienelt (1991) studied a freckle leaf necrosis characterized by necrotic lower leaves associated with chlorosis and premature senescence, which was observed for over 20 years without knowing its cause, but related to necrosis chrysanthemum phloem a disease related phytoplasma because the symptoms of leaf necrosis appeared identical to those reported for the phloem necrosis. The authors used scanning electron microscopy (SEM) and X-ray microanalysis (EDX) to study and succeeded symptoms conclude that chrysanthemum foliar necrosis is associated with manganese toxicity, since the X-ray analysis revealed accumulation of the element on necrotic lesions, but not in asymptomatic tissue.

In fern, Lijalad (1990) reported an alteration that occurs interveinal discoloration of the fronds, which evolve in brown spots, indicating that seem to be related to imbalances in relative humidity levels. Furthermore, González *et al.* (1998) refer to A disorder called red edge of the blade, whose symptoms are reddish edges on the blade of the leaf, as if he had suffered an oxidation. This appearance is common at the beginning of spring and appears to be related to a deficiency of calcium levels in the leaf.

According to the results of chemical analysis foliar shown in Table 1, the plants which have symptoms calcium levels three times higher than plants without symptoms, as well as, half of the concentration of nitrogen and phosphorous. Furthermore, potassium levels of symptomatic plants are approximately one-third of the amount of the element in the asymptomatic. Regarding microelements iron levels were higher in the tissue symptoms, is of utmost importance to note the calcium and manganese concentrations in the diseased tissue sampled in 2007, and that are the highest for these elements and it is these samples were showed crystals in electron microscopic study.

Considering the above, it is speculated that, alterations expressed in foliage imbalances may be due to internal concentrations of trace elements such as iron, manganese

produce decoloraciones intervenales de las frondas, que evolucionan en manchas color pardo-marrón; indica que parece estar relacionado con desequilibrios en los niveles de humedad relativa. Por otro lado, González *et al.* (1998) hacen referencia a una fisiopatía, llamada borde rojo de la hoja, cuyos síntomas son bordes color rojizo en la lámina de la hoja, como si hubiese sufrido una oxidación. Su aparición es frecuente al inicio de la primavera y parece estar relacionado con una deficiencia de los niveles de calcio en la hoja.

De acuerdo a los resultados de los análisis químicos foliares, mostrados en el Cuadro 1, las plantas que presentan síntomas tienen niveles de calcio tres veces más altos que las plantas sin síntomas, así como, la mitad de la concentración de nitrógeno y fósforo. Por otro lado, los niveles de potasio de las plantas con síntomas son aproximadamente la tercera parte de la cantidad del elemento en las asintomáticas. Con respecto a los microelementos, los niveles de hierro fueron mayores en el tejido con síntomas; es de suma importancia notar las concentraciones de manganeso y calcio en el tejido enfermo muestreado en el 2007, ya que son las más altas para estos elementos y precisamente estas fueron las muestras que mostraron los cristales en el estudio de microscopía electrónica.

or calcium absorption due to oxidative states elements toxic to the plant. This can occur when the roots in flooded soils where conditions of hypoxia or anoxia in a few hours, as a depletion of oxygen in the soil is accompanied by an increase in CO<sub>2</sub> levels, anaerobic decomposition of organic matter and increased solubility of minerals, especially iron and manganese, as well as the decrease in the redox potential, which results in production and accumulation of potentially toxic compounds (Parolin and Wittmann, 2010).

The conditions described are frequently present in the cultivation of leather leaf fern. Traditionally, the producer believes it must maintain its culture as wet as possible, in order to reproduce their natural habitat, so it is easy to observe conditions of continuous flooding, which is not recommended, since González *et al.* (1998) indicated that there is damage to the rhizome, especially when exceeding 24 h above field capacity.

Both productivity growth as fern are markedly dependent micrometeorological factors, especially the amount of water available to the crop, which varies with their stage of development, soil type and depth of the root zone,

**Cuadro 1. Concentraciones de elementos a nivel foliar de muestras de tejido asintomático y con síntomas de vena roja.**  
**Table 1. Elemental concentrations at tissue samples foliar asymptomatic and symptoms red vein.**

Tipo de tejido	Año de muestreo	N	P	(%)				mg/kg				
				Ca	Mg	K	S	Fe	Cu	Zn	Mn	B
Asintomático	2007	2.30	0.25	0.42	0.19	2.25	0.26	50	6	65	55	22
	2008	2.61	0.27	0.47	0.21	2.62	0.26	63	10	49	95	23
Con síntomas	2007	1.20	0.10	1.55	0.10	0.70	0.27	104	4	102	144	23
	2008	1.60	0.10	1.30	0.07	1.01	0.26	89	5	55	76	27

Tomando en cuenta lo anterior, se especula que, las alteraciones expresadas en el follaje pueden deberse a desbalances en las concentraciones internas de microelementos, tales como hierro, manganeso o calcio, debido a la absorción de elementos en estados oxidativos tóxicos para la planta. Esto puede ocurrir cuando las raíces se encuentran en suelos inundados que presentan condiciones de hipoxia o anoxia en pocas horas, pues un agotamiento de oxígeno en el suelo se acompaña de un incremento en los niveles de CO<sub>2</sub>, descomposición anaeróbica de la materia orgánica y del incremento en la solubilidad de minerales, especialmente de hierro y manganeso, así como de la disminución del potencial redox, lo cual resulta en la producción y acumulación de compuestos potencialmente tóxicos (Parolin y Wittmann, 2010).

the Similarly, manganese toxicity symptoms are strongly influenced by environmental factors and leaf development status at the time of exposure to high levels of the element (Horst, 1988, cited by González and Lynch, 1999; Stamps, 2006).

Furthermore, it is known that many plant species can compartmentalize (ability to divide the cytoplasm into compartments by endomembrane systems), vacuoles in their element when under stress due to toxicity and are capable of forming crystals, as a detoxification mechanism and manganese in excess oxalic acid joins to form oxalates, e.g. hyperaccumulators (Memon and Yatazawa 1984; González and Lynch, 1999).

Las condiciones descritas se presentan con frecuencia en el cultivo del helecho hoja de cuero. Tradicionalmente, el productor cree que debe mantener su cultivo lo más húmedo posible, con el fin de reproducir su hábitat natural, por lo que es fácil observar condiciones de encharcamiento continuo, situación que no es recomendable, ya que González *et al.* (1998) indican que se producen daños en el rizoma, especialmente cuando se superan las 24 h por encima de la capacidad de campo.

Tanto el crecimiento como la productividad del helecho son marcadamente dependientes de los factores micrometeorológicos, sobre todo de la cantidad de agua disponible para el cultivo, la cual varía con su estado de desarrollo, el tipo de suelo y la profundidad de la zona radical, del mismo modo, los síntomas de toxicidad por manganeso están fuertemente influenciados por los factores ambientales y por el estado de desarrollo foliar al momento de la exposición a altos niveles del elemento (Horst 1988, citado por González y Lynch, 1999; Stamps 2006).

Por otro lado, se conoce que muchas especies de plantas pueden compartimentalizar (capacidad de dividir el citoplasma en compartimentos por medio de sistemas de endomembranas), en sus vacuolas el elemento cuando se encuentran bajo estrés por toxicidad y son capaces de formar cristales, como un mecanismo de detoxificación, así el manganeso en exceso se une al ácido oxálico para formar oxalatos, por ejemplo en plantas hiperacumuladoras (Memon y Yatazawa, 1984; González y Lynch, 1999).

Conociendo lo anterior, es posible que bajo las condiciones actuales de manejo agronómico del cultivo, caracterizado por sustratos de siembra con alto contenido de materia orgánica y niveles de humedad constantemente altos; se esté favoreciendo un ambiente hipóxico que desencadene la producción de formas de manganeso en estados oxidados, los cuales al ser absorbidos por las raíces y translocados al follaje, provocan condiciones internas de estrés oxidativo, a lo que la planta responde por medio de la formación de cristales, los que pueden obstruir los haces vasculares y producir los síntomas descritos antes.

Al respecto, Vargas-González (1998) indica que en Costa Rica enfermedades como la vena roja, la vena amarilla y el mongolismo del helecho hoja de cuero fueron controladas mediante suplementos de boro, calcio y manganeso. Lo que indica que la causa de las alteraciones podrían ser desbalances nutricionales.

Knowing this, it is possible that under current conditions agronomic crop management, seed substrates characterized by high organic matter content and consistently high levels of humidity, it is favoring a hypoxic environment that triggers the production of forms of manganese in oxidized states, which when absorbed by the roots and translocated to the foliage, causing internal conditions of oxidative stress, to which the plant responds by the formation of crystals, which can block the vascular and produce the symptoms described above.

In this regard, Vargas-González (1998) indicated that in Costa Rica vein diseases such as red and yellow vein mongolism leather leaf fern were controlled by boron supplements, calcium and manganese. Indicating that the cause of the disturbance may be nutritional imbalances.

It is found that the red vein is due to a nutritional imbalance, the strategy of disease management would be based on cultural practices aimed at reducing the amount of substrate water levels and balance of minerals in the ground, avoiding the use of bactericides and therefore the risk to human health and environmental degradation. Which is of utmost importance because helechera activity is one that presents major ecotoxicological impacts and significant risks that workers suffer acute or chronic poisoning by pesticide exposure (Mo-Lee, 2001).

Definitely, it is important to continue research to generate knowledge about the real cause of this disease, so it is possible to develop, validate and implement appropriate management strategies and focused from an integrated perspective, in order to reduce volumes of chemical applied.

## Conclusions

The results suggest that the symptoms of red vein leather leaf fern is related to ultrastructural alterations in the vascular bundles and the presence of crystals in the mesophyll of diseased fronds.

Concentration data foliar level elements reveal nutritional imbalances that exist associated with tissue symptoms.

*End of the English version*





De comprobarse que la vena roja es debida a un desbalance nutricional, la estrategia de manejo de la enfermedad estaría basada en prácticas culturales tendientes a reducir la cantidad de agua del sustrato y a equilibrar los niveles de minerales en la planta, lo que evitaría el uso de bactericidas y por ende el riesgo a la salud humana y el deterioro ambiental. Lo cual es de suma relevancia, porque la actividad helechera es una de las que presenta mayores impactos ecotoxicológicos, así como riesgos significativos de que los trabajadores padezcan envenenamiento agudo o crónico por la exposición a plaguicidas (Mo-Lee, 2001).

Definitivamente, es importante que se continúe con investigaciones que generen conocimiento acerca de la causa real de esta enfermedad, de manera que sea posible elaborar, validar e implementar estrategias de manejo apropiadas y enfocadas desde un punto de vista integrado, con la finalidad de disminuir los volúmenes de insumos químicos aplicados.

## Conclusiones

Los resultados permiten concluir que la sintomatología de la vena roja del helecho hoja de cuero está relacionada con alteraciones ultraestructurales en los haces vasculares y presencia de cristales en el mesófilo de las frondas enfermas.

Los datos de concentración de elementos a nivel foliar dejan ver que existen desbalances nutricionales asociados con el tejido que presenta síntomas.

## Literatura citada

- Agrios, G. N. 2005. Plant pathology. 5<sup>th</sup>. Ed. Elsevier Academic Press Publications. USA. 922 p.
- Berrocal, D. 1996. Producción de follajes para la exportación. Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales (10). Congreso Nacional de Fitopatología (3). Congreso Nacional de Suelos (2). San José, CR. ¿Puede la agricultura sostenible ser competitiva? *In*: memoria. (Eds.). Bertsch, F.; Rivera, G.; Mora, F.; Navarro, J. R. y Badilla, W. San José, CR, EUNED/EUNA. 2:149.
- Chaves, G. 2010. Estadísticas de comercio exterior 2009. San José, CR: PROCOMER. (consultado junio, 2010). Disponible en <http://www.procomer.com>.
- Gil, G. J. 2003. Sistema integral para el manejo de nutrición en las plantaciones de helecho hoja de cuero (*Rumohra adiantiformis*) en Costa Rica. Tesis de Licenciatura Ingeniero Agrónomo. Guácimo, Limón, CR, EARTH. 73 p.
- González, A; Bañón, S. y Fernández, J. A. 1998. Helecho de cuero. *In*: cultivos ornamentales para complementos de ramo de flor. Ediciones Mundi Prensa. 157-195 p.
- González, A. and Lynch, J. 1999. Subcellular and tissue Mn compartmentation in bean leaves under Mn toxicity stress. *Aust. J. Plant Physiol.* 26:811-822.
- Kloepper, J. W. 2007. Fern distortion syndrome: a new described disease of Leatherleaf fern. *Phytopathology* 97:S181.
- Kloepper, J. W.; Saborío, F.; Bustamante, E.; Polston, J. E.; Sánchez, E. and Umaña, G. 2010. Fern distortion syndrome of Leatherleaf fern in Costa Rica: symptoms, incidence and severity. *Plant Dis.* 94:940-951.
- Kloepper, J.W.; Hu, CH.; Burkett- Cadena, M.; Liu, K.; Xu, J. and Mc Inroy, J. 2012. Increased populations of deleterious fluorescent pseudomonads colonizing rhizomes of leatherleaf fern (*Rumohra adiantiformis*) and expression of symptoms of fern distortion syndrome after application of Benlate systemic fungicide. *Appl. Soil Ecol.* 61:236-246.
- Lawson, R. H. and Dienelt, M. M. 1991. *Chrysanthemum* foliar necrosis: symptoms, histochemistry and X-ray analysis of leaf lesions. *Phytopathology* 81:1071-1078.
- Lijalad, C. 1990. *Gypsophila*, flor de cera y helecho de cuero. *Horticultura* 58:54-60.
- López, R. y Vilchez, H. 1991. *Paratrichodorus acutus* (Nemata: Trichodoridae) asociado al helecho hoja de cuero (*Rumohra adiantiformis*) en Costa Rica. *Agron. Costarricense.* 15(1/2):193-195.
- Maldonado-Torres, R.; Etchevers- Barra, J. D.; Alcántar-González, G.; Rodríguez-Alcázar, J. and Colinas- León M. T. 2006. Morphological changes in leaves of Mexican lime affected by iron chlorosis. *J. Plant Nutrit.* 29:615-628.
- Memon, A. R. and Yatazawa, M. 1984. Nature of manganese accumulator plant *Acantopanax sciadophylloides*. *J. Plant Nutrit.* 7:961-974.
- Mo-Lee, C. 2001. Impacto ambiental de las fincas de helecho hoja de cuero en Costa Rica. Tesis, Ph.D. Universidad Nacional. Programa Regional en Manejo de Vida Silvestre. 132 p.
- Rainforest Alliance. 2010. Helechos y flores. (consultado junio, 2010). Disponible en <http://www.rainforest-alliance.org>.
- Sirkar, S. and Amir, A. 1974. The manganese toxicity of cotton. *Plant Physiol.* 54:539-543.
- Stamps, R. H. 2006. Irrigation and nutrient management practices for commercial leatherleaf fern production in Florida. 2<sup>nd</sup>. Instituto de alimentación y Ciencias Agrícolas de la Universidad de Florida. 28 p.
- Torres-Tamayo, J. F. 1998. Análisis del mercado internacional de helechos de Costa Rica en Europa. Tesis Licenciatura Ingeniero Agrónomo. Guácimo, Limón, CR, EARTH.
- Parolin, P. and Wittmann, F. 2010. Struggle in the flood: tree responses to flooding stress in four tropical floodplain systems. *AoB PLANTS*. plq003, doi:10.1093/aobpla/plq003.
- Vargas- González, E. 1998. Manejo de la salud de la raíz y la nutrición para el combate de enfermedades de plantas. Seminario Agrícola Internacional. I, CR, 22-23 abril. Editorial San José, Fertica/ PROCHILE Centroamérica.
- Vincent, F. and Nakata, P. 2005. Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56:41-71.
- Wissemeier, A.H. and Horst, W. J. 1992. Effect of light intensity on manganese toxicity symptoms and callose formation in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Plant and Soil* 143:299-309.