

RESISTENCIA DEL CAFETO A *Hemileia vastatrix*. I. ACUMULACION DE FITOALEXINAS^{1/*}

Elmer G. García **

ABSTRACT

Resistance to *Hemileia vastatrix* in coffee plants. I. Accumulation of phytoalexins. Coffee plants (*Coffea* sp.) of the cultivars "Catuaí Rojo" and "Catimor T-5298" were inoculated with uredospores of *Hemileia vastatrix*. After this inoculation, foliar extracts were obtained with organic solvents at 6, 12, 24, 48, 96 and 192 h. The chromatographic analysis showed a carotenoid and an aliphatic ester that increased in concentration, according to time of infection. The increase of these phytoalexins-like substances was greater and more rapid in "Catimor T-5298", which could be related to resistance to coffee leaf rust.

INTRODUCCION

El combate por resistencia genética de la roya del café, causada por el hongo *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., es uno de los métodos más eficientes para controlarla. Sin embargo, se conoce poco respecto a los factores y mecanismos fisiológicos involucrados en la resistencia a esta enfermedad.

Martins *et al.* (1985) señalaron que la penetración y el desarrollo inicial de *H. vastatrix* en las hojas, ocurre tanto en plantas resistentes como en susceptibles, y que hasta después de los primeros días de infección, en las resistentes se inhibe el crecimiento del patógeno. Martins *et al.* (1986) y Medeiros y Rodrigues (1978), relacionaron esto con la liberación de fitoalexinas. No obstante, es poco lo que se conoce respecto a las características de estos compuestos y sus variaciones de acuerdo con el genotipo del hospedero y el tiempo de infección con el patógeno.

En el presente trabajo se investigó la variación en la acumulación de sustancias tóxicas, en hojas de café de los cultivares "Catimor T-298" y "Catuaí Rojo", luego de la inoculación con *H. vastatrix*.

MATERIALES Y METODOS

Los experimentos se realizaron en los invernaderos y laboratorios de la Escuela de Biología y del Centro de Investigaciones en Productos Naturales de la Universidad de Costa Rica, en San Pedro de Montes de Oca, Costa Rica. Se utilizaron plantas de aproximadamente 15 meses de edad, de los cultivares "Catuaí Rojo" y "Catimor T-5298", susceptibles y resistentes, respectivamente, a la mayoría de las razas de *H. vastatrix*. Estas procedieron de selecciones efectuadas por el Centro de Investigaciones en Café, del Instituto del Café de Costa Rica, ubicado en San Pedro de Barva, Heredia, Costa Rica. Pruebas preliminares efectuadas con hojas por separado, garantizaron la resistencia o susceptibilidad a la enfermedad. Las plantas se sembraron en suelo franco arenoso y se mantuvieron bajo condiciones de invernadero, en bolsas plásticas negras de 15 X 25 cm.

Obtención de las uredósporas e inoculación

Las uredósporas pertenecientes a la raza II del patógeno, se obtuvieron de hojas de cafetos Caturra. Estas se removieron de las pústulas con un pincel. Para la inoculación se preparó una suspensión de aproximadamente 20,000 uredósporas por ml de agua destilada, la cual se asperjó sobre las plantas con un atomizador de Vilbis conectado a un compresor con presión constante. Posteriormente las plantas se cubrieron con una bolsa

1/ Recibido para publicación el 20 de noviembre de 1992.

* Financiado parcialmente por la Oficina Regional de Ciencia y Tecnología para América Latina y el Caribe, UNESCO.

** Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

negra de polietileno por un período máximo de 24 h. A las 6, 12, 24, 48, 96 y 192 h después de la inoculación, se recolectó material foliar, el cual se extrajo por maceración en frío con etanol de 95°.

El diseño experimental fue de bloques al azar con arreglo factorial 2 X 2 X 6. El primer factor correspondió al cultivar, el segundo a la inoculación y el tercero al período de infección. A cada combinación de factores se le consideró como un tratamiento. El número de repeticiones fue de 5.

Preparación de los extractos

Se tomaron 8 g de hojas frescas y sanas que correspondieran al tercer y cuarto par a partir del ápice. Este material se licuó por 30 s con 100 ml de etanol de 95°. El licuado se transfirió a Erlenmeyers y se agitó por 20 h con un agitador mecánico, a baja velocidad. Previa filtración, este proceso se repitió 3 veces y en cada caso los extractos se concentraron casi hasta sequedad en un rotavapor, a presión reducida y a 40°. El concentrado se transfirió a viales y con etanol de 95° se ajustó hasta 16 ml.

La mitad de ese extracto se sometió a partición, primero con hexano y después con acetato de etilo, repitiéndose el proceso por 5 veces en cada caso. Se obtuvieron así 3 clases de extracto: hexánico, de acetato de etilo y remanente alcohólico acuoso. Cada uno de estos se concentró hasta un volumen de 2 ml, usando el mismo equipo y condiciones indicadas anteriormente.

Análisis cromatográfico

Los extractos en acetato de etilo se investigaron mediante cromatografía unidireccional en capa fina, usando como soporte gel de sílice y aplicando aproximadamente 20 microlitros de muestra en cada caso. Estos se eluyeron con cloroformo: metanol (7:3). Los cromatogramas previamente secos se observaron bajo luz ultravioleta de 254 y 366 nm y posteriormente se revelaron con vapores de yodo o de amoníaco.

Se determinó el área de las manchas de cada uno de los cromatogramas desarrollados, para tener una estimación de la concentración de las sustancias detectadas. Aquellas manchas que variaron la concentración según el tratamiento, fueron concentradas y purificadas, utilizando cromatografía preparativa de gel de sílice y caracterizadas parcialmente con espectroscopía de luz ultravioleta e infrarroja.

Fungitoxicidad de las sustancias aisladas

A las sustancias que incrementaron la concentración, de acuerdo con el período de infección, se les determinó el efecto sobre la germinación de las uredósporas. Para esto, primeramente se preparó una solución de agar en concentración de 15 g por 1000 ml de agua destilada, la que se esterilizó a 120°C por 15 min. Luego 20 ml de esta solución se colocaron en una placa de Petri, junto con 1 ml de la muestra a evaluar. La muestra empleada para hacer la evaluación fungitóxica se aisló del cromatograma de extractos de "Catimor T-5298" con 192 h de inoculado, raspando la porción correspondiente del cromatograma. Después de eliminar el gel de sílice por filtración, la muestra se evaporó hasta sequedad y se disolvió en 10 ml de una mezcla de agua destilada y etanol (99:1).

Luego se tomó una muestra y se diluyó al doble o al triple del volumen. A las concentraciones obtenidas mediante estas diluciones se les denominó 1, 2 y 3, siendo 1 la menor y 3 la mayor.

Antes de la solidificación del agar, se colocaron en cada placa de Petri 5 anillos de vidrio de 1,5 cm de altura por 1,8 cm de diámetro, para delimitar las áreas donde se colocarían las uredósporas. Después de la solidificación del agar se colocó 0,03 ml de una suspensión de aproximadamente 4000 uredósporas por ml de agua destilada y se cubrieron las placas con un plástico negro. A las 18 h después se determinó la germinación de las uredósporas, tomando como base la presencia del tubo germinativo. Se obtuvo el cociente de germinación por cada área demarcada (número de uredósporas germinadas entre número total), y se calculó el porcentaje de inhibición respecto al testigo, utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{CT - CI}{CT} \times 100$$

CT: cociente de germinación del testigo.
CI: cociente de germinación del tratamiento.

Los valores porcentuales de inhibición de la germinación se transformaron a arcoseno, para posteriormente someterlos al análisis de varianza para experimentos factoriales, al igual que las áreas de las manchas. Como prueba de comparación posterior se utilizó la de Tuckey.

RESULTADOS

El análisis permitió detectar 2 sustancias que aumentaron la concentración según el tratamiento. Mediante análisis por espectroscopía de luz ultravioleta e infrarroja, se evidenció la posible estructura de un carotenoide y un éster alifático.

El carotenoide se acumuló en ambos cultivos conforme aumentó el período de infección, tanto en los testigos como en los inoculados (Figura 1). Durante las primeras 24 h la acumulación fue bastante acelerada, si se compara con los períodos posteriores. No obstante, con la excepción del tratamiento "Catimor T-5298" inoculado, en todos los extractos descendió su acumulación en el período de 48 h. Al comparar entre si tanto los testigos como los inoculados, en ambos cultivos, se encontró que en todos los períodos de infección, excepto el inoculado de 24 h, el área del carotenoide fue mayor en "Catimor T-5298" que en "Catuái Rojo" ($p < 0,05$). La comparación de los testigos con los inoculados, indicó que en "Catuái Rojo" hubo diferencias a favor de la inoculación, sólo con los períodos de infección de 6 y 12 h, mientras que en "Catimor T-5298" esto ocurrió sólo a las 6 h ($p < 0,05$). Estos resultados parecen indicar que las primeras horas de

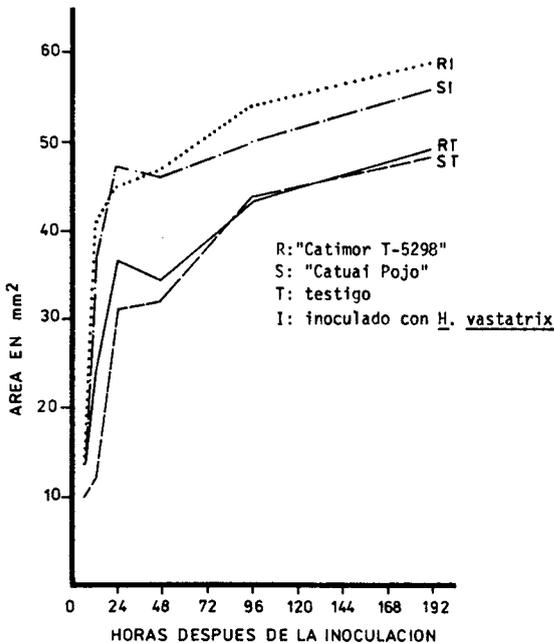


Fig. 1. Variación del área de la mancha del carotenoide en los cromatogramas de los extractos de acetato de etilo.

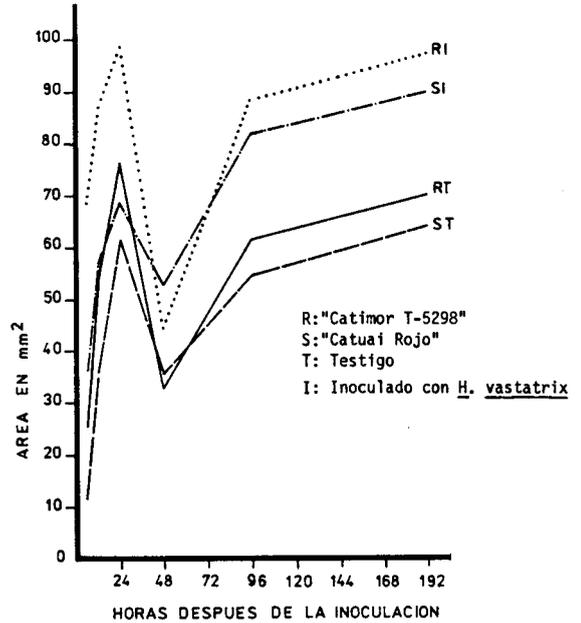


Fig. 2. Variación del área de la mancha del éster en los cromatogramas de los extractos de acetato de etilo.

infección fueron críticas en la producción del carotenoide y que su acumulación durante el período inicial, fue más lenta en "Catuái Rojo" testigo y más acelerada en "Catimor T-5298" inoculado. La diferencia entre testigos e inoculados se acentuó posteriormente (48, 96 y 192 h).

El éster alifático se detectó en todos los extractos, pero el tamaño de su mancha en el cromatograma varió entre cultivos, inoculación y período de infección ($p < 0,05$). Este se acumuló rápidamente durante las primeras 24 h, pero a las 48 h ocurrió una disminución de la concentración (Figura 2). En "Catimor T-5298" testigo, con la excepción del período de 24 h, la concentración de dicha sustancia fue mayor que en "Catuái Rojo" ($p < 0,05$). En los extractos de plantas inoculadas, la concentración fue mayor en "Catimor T-5298" que en "Catuái Rojo", excepto a las 48 h. En "Catuái Rojo", el área de la mancha del éster no varió entre testigos e inoculadas, excepto a las 6 h. En el caso de "Catimor T-5298" estas diferencias ocurrieron en los 3 primeros períodos. Esto indica que su acumulación fue mayor y más acelerada en las plantas de "Catimor T-5298" inoculadas.

Tanto el carotenoide como el éster alifático inhibieron la germinación de las uredósporas de *H. vastatrix* ($p < 0,05$), pero esta inhibición fue más

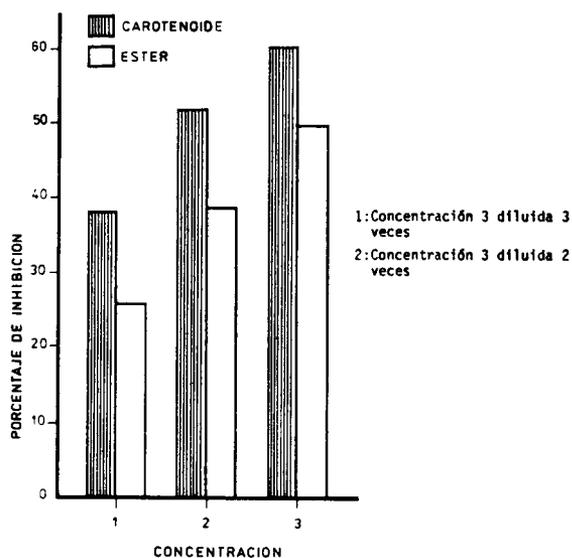


Fig. 3. Efecto de la concentración del carotenoide y del éster en la germinación de las uredósporas de *H. vastatrix*.

acentuada cuando la concentración fue mayor (Figura 3).

DISCUSION

El incremento en la concentración del carotenoide y del éster alifático, de acuerdo con el período de infección, y la capacidad que poseen para inhibir la germinación de las uredósporas de *H. vastatrix*, según la concentración, puede indicar que son sustancias con características de fitoalexinas. La acumulación de fitoalexinas en café, había sido demostrada previamente por Medeiros y Rodríguez (1978), pero según estos autores, éstas sustancias son liberadas únicamente por las plantas resistentes. Sin embargo, en esta investigación se demostró que tanto las plantas resistentes, como las susceptibles a la roya, acumulan fitoalexinas, pero la velocidad de incremento y la magnitud de la concentración fueron mayores en "Catimor T-5298", lo cual podría contribuir a explicar su mayor resistencia al patógeno. Esto ha sido sugerido también para otras interacciones entre hospederos y patógenos (Ebel, 1986). Probablemente, si la concentración y velocidad de producción de estas sustancias son altas, los mecanismos de los patógenos son insuficientes para bloquear su efecto, por lo tanto no podrán invadir la planta. Por el contrario, si las fitoalexinas incre-

mentan la concentración tardíamente, el patógeno podría invadir más rápidamente al hospedero con mayor facilidad, como en "Catuaí Rojo".

La acumulación del éster y del carotenoide en los extractos de las plantas testigo de ambos cultivares, sugiere que la bolsa empleada para cubrir las plantas ocasionó un efecto inductor de su síntesis. Esto puede tener alguna relación con lo encontrado por Martins *et al.* (1986), quienes encontraron que organismos no patogénicos, pueden inducir la acumulación de compuestos tóxicos en las hojas del cultivar "Mundo Novo". También en otras especies se ha observado que algunos factores ambientales ajenos a los patogénicos, son capaces de inducir la síntesis de fitoalexinas (Bayley y Mansfield, 1982; Darvill y Albersheim, 1984; Kúc y Preisig 1984). Esto permite sugerir que las fitoalexinas detectadas en esta investigación son un mecanismo general de defensa de las plantas. Con respecto a los carotenos, Thommen (1979) informó que diversos factores externos pueden afectar su contenido en las plantas. Además, estas pueden proteger la clorofila contra la fotooxidación durante la fotosíntesis (Krinsky, 1971; Young, 1991). Así una menor concentración de carotenoides en las plantas de "Catuaí Rojo", podría volverlas fotosintéticamente menos eficientes, lo que reduciría las posibilidades de defensa contra un patógeno. Otro posible mecanismo de acción de los carotenoides es que sirvan como esqueleto carbonado para la síntesis de reguladores del crecimiento, como el ácido abscísico, el cual se acumula en respuesta a varios factores externos adversos y regula una serie de procesos relacionados con la resistencia de las plantas a éstos (Kienzle *et al.*, 1978; Kuc y Preisig, 1984; Pegg, 1976).

La disminución en el contenido del carotenoide y del éster a las 48 h posteriores a la inoculación, es algo difícil de explicar. Tal vez se debió al retiro de la bolsa empleada para cubrir las plantas. Esto pudo ocasionar un aumento de temperatura, deshidratación temporal o cambios de luminosidad, que afectaron el metabolismo. La actividad de algunas enzimas, como las respiratorias y fotosintéticas pudo alterarse, lo que repercutió en la acumulación de las sustancias mencionadas. Otra probable causa de esa disminución pudo haber sido el mismo autocontrol de la planta.

Se ha demostrado en otras especies, que las plantas poseen un límite en la capacidad de síntesis de sustancias producidas en respuesta al ataque

de algún patógeno, y que después de un máximo de concentración, tienen la capacidad de degradarla, pues éstas podrían volverse tóxicas contra las mismas (Jones *et al.*, 1975; VanEtten *et al.*, 1989).

Los resultados anteriores señalan que son muchos los factores involucrados en el mecanismo de resistencia de las plantas de café a la roya; no obstante, debe continuarse con la investigación, para tratar de determinar la estructura química de las sustancias detectadas y explicar mejor su posible función en relación con la resistencia a dicha enfermedad.

RESUMEN

Plantas de cafeto (*Coffea* sp.) de los cultivares "Catuaí Rojo" y "Catimor T-5298", se inocularon con uredósporas de *Hemileia vastatrix* y a las 6, 12, 24, 48, 96 y 192 h posteriores, se realizaron extracciones foliares con solventes orgánicos. El análisis cromatográfico de estos extractos permitió detectar un carotenoide y un éster alifático, con características de fitoalexinas, que incrementaron la concentración, de acuerdo con el período de infección, pero esto fue mayor y más rápido en las "Catimor T-5298", lo cual puede estar relacionado con su mayor resistencia a la roya.

LITERATURA CITADA

- BAYLEY, J.A.; MANSFIELD, J.W. 1982. Phytoalexins. London, Holsted Wiley. 780 p.
- DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. 1984. Phytoalexin and their elicitors: A defense against microbial infection in plant. *Annual Review of Plant Physiology* 35:243-275.
- EBEL, J. 1986. Phytoalexins synthesis: The biochemical analysis of the induction process. *Annual Review of Phytopathology* 24:235-264.
- JONES, D.R.; UNWIN, C.H.; WARD, E.W. 1975. The significance of capsidiol induction in pepper fruit during incompatible interaction with *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 65:1286-1288.
- KIENZLE, F., MAYER, H.; MINDER, R.E.; THOMMEN, H. 1978. The Carotenoids. *Helvetica Chimica Acta* 61:2616-2627.
- KRINSKY, N.I. 1971. Function of carotenoids. *In* Carotenoids. Ed. by O. Isler. Basel, Birkhauser, Basilea. P. 669-716.
- KUC, J.; PREISIG, C.L. 1984. Regulation of sesquiterpenoids-eliciting activity of fatty acids in potato by carbohydrate isolated from *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 73:831-838.
- MARTINS, E.M.; DE MARIA, A.; GRUNEWALDT, G.; MORAES, W.B.C. 1985. Histological studies of compatible interaction of coffee leaves and *Hemileia vastatrix*. *Fitopatologia Brasileira* 10(3):627-636.
- MARTINS, E.M.; ROVERATTI, D.S.; MORAES, W.B.C. 1986. Elicitation of stress metabolites in coffee leaves by a non-pathogen. *Fitopatologia Brasileira* 11(3):683-694.
- MEDEIROS, E.; RODRIGUEZ, C.J. 1978. Produção de substâncias do tipo das fitoalexinas em folhas de *Coffea arabica* L. inoculadas com ferrugens não patogênicas para o cafeeiro. García de Orta, Série de Estudios Agronômicos 5(1-2):15-18.
- PEGG, G.T. 1976. Endogen inhibitors in healthy and disease plants. *In* Physiological Plant Pathology. Ed. by R. Heitefuss; P.H. Williams. Heidelberg, Springer-Verlag. P. 607-616.
- RJO, L.; MEDEIROS, E.; RODRIGUES, C.J. 1982. Immunity on coffee-orange rust association: Histopathological aspects. García de Orta, Série de Estudios Agronômicos 9(1):101-103.
- THOMMEN, H. 1979. The role of carotenoids in plant physiology. *In* Carotenoids 5. Ed. by T.H. Goodwin. London, Pergamon Press. P. 867-869.
- VANETTEN, H.D.; MATTHEUS, D.E.; MATTHEUS, P.S. 1989. Phytoalexins detoxification: Importance for pathogenecity and practical implications. *Annual Review of Phytopathology* 27:143-164.
- YOUNG, A.J. 1991. The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Physiologia Plantarum* 83(7):702-708.