

Estudio sobre la resistencia química del café a la mancha mantecosa causada por **Colletotrichum** spp. I - Actividad fungistática de metabolitos presentes en el tejido laminar y capa de cera de hojas<sup>\*1/</sup> \_\_\_\_\_ EDGAR VARGAS C. \*\*

ABSTRACT

*It was determined the ether extracts from laminar tissues and cuticular wax of coffee leaves of the immune cultivar 'Híbrido Tico and the susceptible 'Cubujuquí' are fungitoxic to Colletotrichum spp, the causal agent of Mancha Mantecosa. The phenolic substances extracted with acetone showed no fungitoxic activity. The extracts obtained from immune old leaves were more fungitoxic than those from young leaves of the susceptible cultivar. There was no difference between the ether extract of cuticular wax from both types of leaves; the presence of two metabolites with fungitoxic activity in this extract was determined by uni-dimensional paper chromatographic technique. It is possible there are other dynamics mechanisms of post-penetration, as a complement to the resistant factors determined in the laminar tissues and cuticular wax.*

Introducción

LA resistencia mostrada por las plantas a la infección por hongos se debe probablemente a factores morfológicos o bioquímicos (4). Se considera que el potencial bioquímico del hospedero es de mayor importancia y se expresa por medio de la inhibición del crecimiento y desarrollo del parásito, por la restricción en la producción o distribución dentro del hospedante de metabolitos que inducen la enfermedad o por la falta de respuesta a esos metabolitos. En algunas enfermedades las características morfológicas y bioquímicas están estrechamente integradas para conferir resistencia (4). La cutícula, además de funcionar como

barrera mecánica, puede tener sustancias que inhiben el desarrollo de los hongos (6). Lampard (5) determinó un factor fungitóxico presente en la capa de cera de cerezas verdes y hojas de cultivares de café, con actividad contra *Colletotrichum coffeanum*, causante de la enfermedad de las cerezas (CBD) y sugiere que este principio juega un papel importante en la resistencia a la enfermedad.

Los síntomas así como la etiología de la Mancha Mantecosa han sido descritos anteriormente (8). La forma localizada de las lesiones típicas, no necróticas, sugiere que estos síntomas son el producto de una reacción de defensa, ya que el hospedante está limitando el desarrollo del hongo, bajo ciertas condiciones, puede penetrar la barrera que le impone el hospedante y producir lesiones necróticas. Esto ocurre en el segundo par de hojas jóvenes, no así en las hojas más viejas las cuales no se infectan (8).

\* Recibido para publicación 9 de setiembre de 1977.

1/ El autor agradece al Dr. Eduardo Jiménez por las valiosas sugerencias sobre el manuscrito.

\*\* Laboratorio de Fitopatología, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria, San José, Costa Rica

## Materiales y métodos

Para la extracción de las sustancias se usó hojas jóvenes (segundo par) de plantas adultas de los cultivares 'Híbrido Tico' que es inmune y 'Cubujuquí', susceptible. De cada muestra se tomó cuatro gramos de tejido laminar y se puso en un Soxhlet de 50 ml, haciendo primero una extracción con éter de petróleo durante tres horas para extraer las sustancias no fenólicas, no polares y luego con acetona durante el mismo tiempo con el fin de obtener las sustancias fenólicas. Una vez separado el extracto acuoso de la fracción etérea por medio de un embudo separador los demás extractos se concentraron a 10 ml por evaporación a condiciones ambientales, posteriormente se puso 10 gotas de cada extracto en portaobjetos a los cuales se le había puesto una película de papa-dextrosa-agar (PDA); las gotas se pusieron en tal forma que al evaporarse el éter o la acetona, el residuo quedara localizado. Posteriormente se puso una gota de una suspensión concentrada de esporas del hongo y se colocó los portaobjetos en cámaras húmedas pequeñas en condiciones de laboratorio; los testigos llevaban diez gotas de éter o acetona. Para la prueba del extracto acuoso se colocó diez gotas en la depresión de un portaobjetos y se hizo la suspensión de esporas directamente. En todas las pruebas se usó tres portaobjetos por repetición. Las lecturas se hicieron a las 24 horas, tomando una en el borde y otra en el centro de la mancha; los resultados se presentan en el Cuadro 1. También se hizo una prueba para fenoles con solución acuosa de cloruro de hierro III al 2%. Los extractos obtenidos con acetona dieron una coloración pardo-rojizo y los extractos acuosos, verde oscuro; esto indica que había alta concentración de fenoles. Por otra parte, los extractos etéreos dieron coloración verde tenue. La coloración de los diferentes fenoles está dada por el grado de polarización de la molécula (3). Como sólo los extractos etéreos resultaron con acción fungitóxica, se hizo una prueba de dilución poniendo de dos hasta ocho gotas por portaobjetos y se usó la misma metodología que en la prueba anterior.

De acuerdo con los resultados obtenidos había gran actividad fungitóxica en los extractos etéreos del cultivar inmune 'Híbrido Tico' y una menor actividad en los extractos del cultivar susceptible 'Cubujuquí'. Los extractos obtenidos con acetona no mostraron ninguna actividad fungitóxica a pesar de haber dado la prueba positiva para o-dihidroxifenoles, lo que pareciera indicar que estas sustancias, a pesar de que ocurren en altas concentraciones en las hojas jóvenes de café (2), no confieren resistencia contra el patógeno.

Sin embargo, el hecho de que los extractos etéreos dieran una coloración verde tenue, indica la presencia de algún fenol o fenoles con pocos grupos hidroxilos, eterificados, esterificados o glicosidados, solubles en éter, que podrían tener alguna función en la resistencia (3). En la prueba de la serie de dilución, los extractos etéreos de los dos cultivares inhibieron completamente la germinación a nivel de ocho gotas de extracto por cubreobjetos; sin embargo, la inhibición fue mayor con el extracto del cultivar 'Híbrido Tico' al nivel de seis gotas (Cuadro 2).

Para la prueba de extractos etéreos de hojas jóvenes (segundo par) y viejas (sexto par), según numeración acropétala, se hizo uso de platos Petri con A.P.D., poniendo previamente en cada plato cuatro gotas de una suspensión concentrada de esporas; esto se hizo debido a que así se puede notar mejor el efecto de la concentración de toxinas. En el centro de cada plato se colocó un cilindro de porcelana al cual se le puso 0,5 ml de extracto; los testigos llevaban igual cantidad de éter de petróleo. Se usó tres platos por repetición y se incubó a 26°C, la lectura se hizo a las 48 horas midiendo el diámetro de la zona de inhibición. Se notó una mayor acción fungitóxica aunque no estadísticamente significativa de los extractos de hojas viejas que de las jóvenes (Cuadro 3).

Cuando se inyecta subepidérmicamente una suspensión de esporas en hojas jóvenes y viejas, se producen lesiones necróticas sólo en las hojas jóvenes (8); esto sugiere la presencia de algún factor de resistencia en la epidermis de hojas jóvenes y en los demás tejidos de hojas viejas.

Cuadro 1.—Efecto de extractos etéreos, acuosos y de acetona de hojas de café de los cultivares 'Híbrido Tico' y 'Cubujuquí' en la germinación de esporas de *Colletotrichum spp*

Repetición	Porcentaje de germinación de esporas						Testigo
	Híbrido Tico inmune			Cubujuquí susceptible			
	extracto etéreo	extracto acuoso	extracto acetona	extracto etéreo	extracto acuoso	extracto acetona	
1	0	100	100	22,5	100	100	100
2	0	97,1	91,5	18,1	97,1	97,1	89,5
3	0	98,3	98,3	17,6	98,3	98,3	94,6
4	0	89,3	99,2	8,3	89,3	89,3	96,7

Cuadro 2.—Efecto de diferentes concentraciones de extractos etéreos de hojas de los cultivares 'Híbrido Tico' y 'Cubujuquí' en la germinación de esporas de *Colletotrichum spp*

Concentración (número de gotas por cubre objeto)	Porcentaje de germinación de esporas	
	Híbrido Tico inmune	Cubujuquí susceptible
2	90,11	92,86
4	39,42	35,06
6	4,93	14,21
8	0	0
0	91,11	96,35

Con base en esto se hizo extracciones con éter sulfúrico de la capa de cera de hojas viejas de los cultivares 'Híbrido Tico' y 'Cubujuquí'. Para esto se escogió diez hojas de igual tamaño y edad que no presentaran daños aparentes. Cada hoja se lavó dos veces por el haz con sucesivas porciones de 5 ml de éter, según el método de Fernández *et al* (1), en tal forma que los tejidos internos no resultaran afectados. El extracto se dejó evaporar al ambiente hasta la sequedad y luego se redisolvió en 10 ml de éter de petróleo. Esto se hizo debido a que el éter sulfúrico extrae mayor cantidad de cera, pero inhibe la germinación de las esporas. La prueba se hizo en platos Petri, usando la misma metodología que en el caso anterior. De acuerdo con los resultados obtenidos (Cuadro 4), se notó una mayor inhibición, con los extractos de hojas de 'Cubujuquí' (susceptible) que en 'Híbrido Tico' (inmune) pero las diferencias no fueron significativas. Tampoco se obtuvo diferencias con extractos de la capa de cera de hojas jóvenes y viejas del cultivar 'Cubujuquí' (Cuadro 5), aunque se obtuvo una mayor cantidad de cera de las hojas viejas, esto por simple observación visual. El hecho de que las hojas viejas de plantas susceptibles sean inmunes podría interpretarse como una transformación de la epidermis, que resulta en una mayor concentración de metabolitos que impiden el desarrollo del hongo y a un mayor grosor de la capa de cera que funciona como barrera mecánica. Aún así, se considera en general (6), que el grosor de la capa de cera no siempre está correlacionado con la resistencia; pero puede ser importante en algunos casos, como la mayor resistencia observada al aumentar la edad de la hoja de lima (*Citrus aurantiifolia*) a *Gloeosporium limeticola* (7).

Cuadro 3.—Efecto de extractos etéreos de hojas jóvenes y viejas de café del cultivar 'Cubujuquí' en la germinación de esporas de *Colletotrichum spp*.

Repetición	Diámetro zona de inhibición en cm.*		
	Hojas jóvenes susceptibles	Hojas viejas inmunes	Testigo
1	3,5	4,8	0
2	4,2	4,0	0
3	2,8	5,1	0
4	4,3	5,3	0
Promedio	3,7	4,8	

\* Lectura a las 48 horas

Para la prueba cromatográfica-biológica se distribuyó 0,1 ml de extracto etéreo de la capa de cera de hojas jóvenes de Cubujuquí, en tiras de 30 X 5 cm de papel de cromatografía Whatman N° 1 que había sido previamente tratado con alcohol y secado al ambiente; luego se puso las tiras en cilindros de vidrio de 30 cm de alto por 6 cm de diámetro; se usó como solvente la fase orgánica de un sistema de alcohol butílico terciario, ácido fórmico y agua (4:1:3) en método ascendente (5): Se agregó 30 ml de solución en el fondo del cilindro y se dejó saturar a temperatura

Cuadro 4.—Inhibición de la germinación de esporas de *Colletotrichum* por extractos etéreos de la capa de cera de hojas de café de los cultivares 'Híbrido Tico' y 'Cubujuquí'.

Repetición	Diámetro zona de inhibición en cm.		
	Híbrido Tico inmune	Cubujuquí susceptible	Testigo
1	2,6	2,5	0
2	2,5	3,0	0
3	3,0	3,0	0
4	2,2	3,2	0
Promedio	2,58	2,94	

ambiente (18-23°C). Después de 24 horas se sacó las tiras y se les puso a secar. Finalmente cada tira se cortó en pedacitos de un centímetro (23 en total), que fueron numeradas en orden ascendente y colocados individualmente en platos Petri, donde fueron sembrados con una suspensión de esporas; se usó PDA como medio de cultivo. La incubación se hizo a 26°C y la lectura a las 48 horas. Hubo inhibición del crecimiento del hongo en los trozos de papel (13 y 14); sin embargo, estos extractos no dieron ninguna reacción de color con cloruro de hierro III para o-dihidroxifenoles

Cuadro 5.—Efecto del extracto etéreo de la capa de cera de hojas jóvenes y viejas de plantas adultas del cultivar 'Cubujuquí' en la germinación de esporas de *Colletotrichum spp.*

Repetición	Diámetro de la zona de inhibición en cm		
	Hojas jóvenes susceptibles	Hojas viejas inmunes	Testigo
1	2,6	2,5	0
2	2,5	3,0	0
3	3,0	3,0	0
4	2,2	3,2	0
Promedio	2,58	2,9-i	

Es posible que como complemento a los factores de resistencia determinados en el tejido foliar y capa de cera, también estén involucrados otros mecanismos dinámicos de resistencia de post-penetración.

#### Literatura citada

- 1 FERNANDEZ, A.M.S., BAKER, E.A. y MARTIN, J.I. Studies of plant cuticle. VI The isolation and fractionation of cuticular waxes. *Annals of Applied Biology* 53: 43-58. 1964.
- 2 GOPAL, N.H. y RAMAIAH, P.K. Polyphenolic compounds in the leaves of coffee plants. I. Acid phenols. *Turrialba* 19: 126-128. 1969.
- 3 HARBORNE, J. B. *Biochemistry of phenolics compounds*. London, Academic Press, 1963.
- 4 KUC, J. Resistance of plants to infectious agents. *Annual Review of Microbiology* 20: 337-370. 1966.
- 5 LAMPARD, J.F. y CARTER, G.A. Chemical investigations on resistance to coffee berry disease in *Coffea arabica*. An antifungal compound in coffee cuticular wax. *Annals of Applied Biology* 73: 31-37. 1973.
- 6 MARTIN, J.I. Role of cuticle in the defense against disease. *Annual Review of Phytopathology* 2: 81-100. 1964.
- 7 ROBERTS, M.F. y MARTIN, J.I. Withertip disease of lime (*Citrus aurantifolia*) in Zanzibar. III. The leaf cuticle in relation to infection by *Gloeosporium limeticola* Chausen. *Annals of Applied Biology* 51: 411-413. 1963.
- 8 VARGAS, E. y GONZALEZ, L.C. La mancha mantecosa del café causada por *Colletotrichum spp.* *Turrialba* 22: 129-135. 1972.