

ALGUNAS DIFERENCIAS METABOLICAS ENTRE DOS RAZAS DEL HONGO

Fusarium rigidiuscula (Brick) Sny. y Hans.

Por:

Felipe Wong Ley

INSTITUTO INTERAMERICANO DE CIENCIAS AGRICOLAS DE LA O.E.A.

Centro de Enseñanza e Investigación

Escuela para Graduados

Turrialba, Costa Rica

Enero, 1967

ALGUNAS DIFERENCIAS METABOLICAS ENTRE DOS RAZAS DEL HONGO

Fusarium rigidiuscula (Brick) Sny. y Hans.

Tesis

Presentada al Consejo de la Escuela para Graduados
como requisito parcial para optar al grado

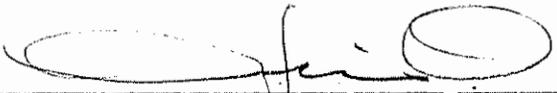
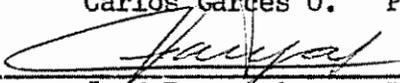
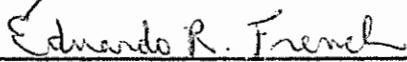
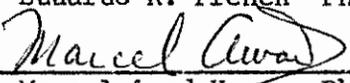
de

Magister Scientiae

en el

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A.

Aprobada:

	Presidente
Carlos Garcés O. Ph. D.	
	Comité
José Fargas A. Ph. D.	
	Comité
Eduardo R. French Ph. D.	
	Comité
Marcel Awad Ph. D.	

Enero, 1967

A la memoria de mi Padre,
a mi Madre y Hermanos

BIOGRAFIA

El autor nació en la Ciudad de Ica, Perú, en el año 1937.

Cursó sus primeros estudios en el Colegio San Luis Gonzaga, de Ica, y luego continuó sus estudios secundarios en el Colegio Militar "Leoncio Prado", en La Perla, Callao.

Realizó sus estudios superiores en la Universidad Agraria de La Molina, en Lima, Perú, graduándose de Ingeniero Agrónomo en el año 1961.

De 1962 a 1964 trabajó en la Estación Experimental Agrícola en Tingo María, Perú como Fitopatólogo Adjunto, cargo que desempeñó hasta el momento de ingresar a la Escuela para Graduados del IICA, en Turrialba.

En setiembre de 1964 ingresó al Centro de Enseñanza e Investigación del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, para realizar estudios postgraduados en Fitotecnia, mediante una beca otorgada por la Organización de Estados Americanos (O.E.A.), graduándose en enero de 1967.

CONTENIDO

	<u>Página N°</u>
Lista de Cuadros	vi
Lista de Figuras	vii
Introducción	1
Revisión de Literatura	3
Materiales y Métodos	8
Ubicación del Trabajo	8
Razas usadas	8
Cultivo en Solución Nutritiva	8
Esterilización	10
Inóculo	10
Incubación	11
Experimentos Preliminares	11
1. Influencia de la concentración de glucosa en el crecimiento del hongo <u>F. rigidiúscula</u>	11
2. Consumo de glucosa por el hongo en función del tiempo	13
3. Determinación del período óptimo de metabolización de la glucosa ¹⁴ C:	14
Alimentación del hongo con glucosa radiactiva	16
Preparación del supernatante y del extracto metanólico del hongo	17
Identificación de los metabolitos formados por el hongo	17
Resultados y Discusión	21
Conclusiones	28
Resumen	29
Summary	30
Literatura Citada	31

LISTA DE CUADROS

<u>Cuadro N°</u>		<u>Página N°</u>
1	Composición mineral de la solución nutritiva para el hongo	9
2	Composición mineral de los elementos menores	10
3	Promedio de peso seco en mg como medida del crecimiento de dos razas de <u>F. rigidiuscula</u> en función de la concentración de glucosa añadida a la solución nutritiva :	12
4	Consumo (en %) de una solución al 0,5% de glucosa por las razas C-97 y 323 de <u>F. rigidiuscula</u> , en función del tiempo	13
5	Liberación de $^{14}\text{CO}_2$ en c.p.m. por las razas C-97 y 323 de <u>F. rigidiuscula</u> , alimentadas con glucosa marcada uniformemente	15
6	Distribución relativa de la radiactividad y valores "Rf" de los compuestos presentes en los extractos metanólicos de las razas C-97 y 323 de <u>F. rigidiuscula</u> , alimentadas con glucosa ^{14}C durante 5 horas	23
7	Distribución relativa de la radiactividad y valores "Rf" de los compuestos presentes en los supernatantes de las razas C-97 y 323 de <u>F. rigidiuscula</u> , alimentadas con glucosa ^{14}C durante 5 horas	25

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura N°</u>		<u>Página N°</u>
1	Bubas de puntos verdes: (a) cotiledonar y (b) secundarias (en la base del peciolo)	2
2	Bubas de puntos verdes en cacao, provocadas artificialmente por inoculación	4
3	Dispositivo diseñado para el estudio de la evolución del $^{14}\text{CO}_2$ desprendido por el hongo . .	18

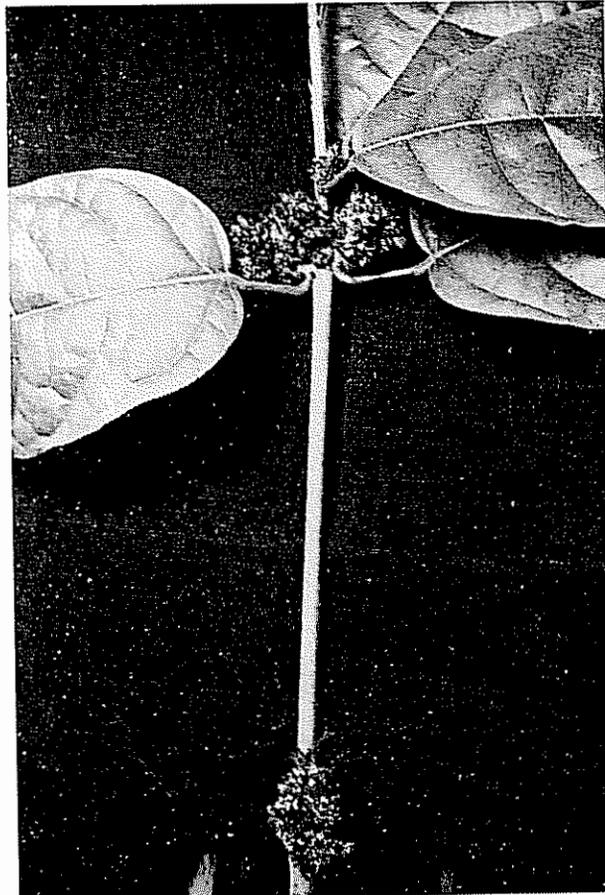
INTRODUCCION

Muy poco o nada se conoce acerca de la fisiología del hongo Fusarium rigidiuscula (Brick) Sny. y Hans., que aparentemente causa la enfermedad llamada buba de puntos verdes en cacao (13, 14). Esta enfermedad se manifiesta principalmente en forma de una multiplicación excesiva de las yemas vegetativas axilares. Las semillas de cacao peladas, escarificadas, e inoculadas con suspensiones acuosas de macroconidias de aislamientos de este hongo desarrollan plantas que tienen agallas típicas de puntos verdes en las axilas cotiledonares (Fig. Nº 1). Este hecho se ha considerado como prueba satisfactoria de la transmisibilidad de la enfermedad (15). La inoculación de árboles adultos solamente tuvo éxito cuando se usaron como inóculo pedazos de agar con micelio de F. rigidiuscula (15). Hay también evidencia de que existen razas de F. rigidiuscula que no causan la enfermedad (19).

Actualmente existen dos hipótesis que tratan de explicar el mecanismo de inducción y desarrollo de la buba de puntos verdes en cacao. Según la primera, el estado conidial del hongo transmite un virus que se supone es el verdadero agente infeccioso (19). La segunda hipótesis es que el hongo tal vez produce una sustancia reguladora del crecimiento, la cual actúa sobre el metabolismo del hospedero (15, 22).

El presente trabajo está relacionado con la segunda hipótesis, o sea que la investigación se efectuó con miras al mecanismo fisiológico de la enfermedad. Se estudiaron los productos excretados, tanto por una raza patógena como por otra no patógena de F. rigidiuscula, las cuales fueron alimentadas con glucosa uniformemente marcada con ^{14}C . Además, se trató de esclarecer algunas transformaciones metabólicas de la glucosa radiactiva en el propio hongo.

FIG. Nº 1 Bubas de puntos verdes: (a) cotiledonar y (b) secundarias (en la base del peciolo).



..... (b)

..... (a)

REVISION DE LITERATURA

La buba de puntos verdes es una enfermedad que ataca tanto árboles jóvenes como adultos de cacao. Fué descrita por HUTCHINS en 1958 (18), aunque aparentemente ha existido en América desde 1905 (1). Se ha estudiado últimamente su presencia y distribución en América Latina (17) y también en Africa (5, 6).

Los síntomas de la agalla de puntos verdes se han descrito en América Latina como "hipertrofias" o abultamientos en forma de agallas ... más o menos hemisféricas y con apariencia de coliflor (17), y como "excrecencias irregularmente redondeadas, algunas veces nodulares ... formadas por inflorescencias muy hipertrofiadas", consistentes de "miriadas de flores verduscas, pocas de las cuales se abren" (1), Fig. Nº 2.

Con relación a su influencia en la producción de cacao, HUTCHINS (21) opina que puede suprimirla parcial o totalmente. SILLER (28), demostró el efecto de las agallas en la cosecha de árboles de cacao matina, encontrando que al cabo de 21 meses de observación las plantas sanas habían producido 773 libras de cacao seco y las enfermas solamente 310 libras.

El hongo Fusarium rigidiuscula (Brick) Sny. y Hans. ha sido aislado de agallas de puntos verdes en Costa Rica y Venezuela (16), y se le considera como la forma conídica o asexual de Calonectria rigidiuscula (Berk y Br.) Sacc. Existen varias sinónimas que a continuación se especifican:

Spicaria colorans VAN HALL DE JONGE

Fusarium spicariae colorans (V. HALL DE JONGE) Sacc. y Trott.

Fusarium theobromae Lutz (Nec. App. y Strk)

Fusarium decemcellulare (Brick).

FIG. Nº 2. Bubas de puntos verdes en cacao, provocadas artificialmente por inoculación.



Este organismo se caracteriza por producir las macroconidias en mayor cantidad que las microconidias (9). Las macroconidias son ligeramente falcadas, pediceladas en su base, con un diámetro más o menos uniforme; frecuentemente poseen de 3 a 8 septas (29). Una colonia bien desarrollada sobre un medio de cultivo artificial, muestra un micelio aéreo abundante y algodonoso, aparentemente coloreado por reflejo del sustrato. Las microconidias se forman en cadenas, son elípticas y generalmente no tienen septas (30, 31).

HANSEN (15) sostiene que el mecanismo de inducción y desarrollo de la buba todavía no es claro, y continúa diciendo que existe la probabilidad de que un tercer agente, ya virus o un bacterio, sea transmitido por el hongo. El mismo investigador recalca que tampoco puede descartarse la posibilidad de que el virus o el bacterio produzcan una sustancia que interfiera con el metabolismo del regulador de crecimiento de la planta hospedera e induzca la formación de la buba.

HUTCHINS (19) encontró que el principio activo que induce la buba de puntos verdes desaparece cuando la forma conidial del hongo pasa por el estado perfecto (Calonectria rigidiuscula), quizás debido a cambios fisiológicos asociados con la metamorfosis. Igualmente, al referirse a este problema, el mismo investigador manifiesta que existe la posibilidad de que el estado conidial transmita un virus infeccioso.

HUTCHINS (20), posteriormente, hace conocer que la patogenicidad de ciertas razas de F. rigidiuscula se pierde por interferencia de una raza no patogénica del mismo organismo. Por ejemplo: cuando se mezclan por corto tiempo las suspensiones acuosas de macroconidias de la raza C-97 (patogénica) y de la FG-24 (no patogénica)^{*}, o bien, cuando

* La raza FG-24 se obtuvo de bubas florales (20).

sucesivamente se inoculan semillas de cacao con las macroconidias de las razas antes mencionadas.

En trabajos realizados por investigadores del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (27) encontraron que el extracto de buba de puntos verdes, el cual fue parcialmente purificado por medio de cromatografía de capa fina, indujo el crecimiento de yemas en un número limitado de ensayos, cuando se aplicó a las axilas de las hojas de plantas jóvenes y sanas de cacao. Dichos investigadores concluyeron que la sustancia extraída de la buba era capaz de acelerar el crecimiento de yemas existentes, pero que carece del poder de iniciarlas o diferenciarlas.

GREENE (12) trabajó con varias razas del hongo patogénico Dybotryon morbosum (Schw. Th y Syd.), el cual causa el nudo negro en cerezo. Cuando este organismo crece en medios sintéticos produce sustancias capaces de inducir la división y elongación celular en distintos segmentos de vástagos de Prunus.

JIMENEZ y DIAZ-ROMEY (24) piensan como HANSEN (15), que existe la posibilidad de que la proliferación anormal de las yemas vegetativas, o florales, sea el resultado de algún desorden metabólico inducido por una sustancia reguladora del crecimiento, ya que hay evidencia experimental que muestra que la buba floral es más severa en árboles abonados con nitrógeno (22).

Por medio de ensayos de abonamiento con nitrógeno, fósforo, potasio y boro (25), se ha demostrado que la aplicación de dosis crecientes de nitrógeno a plantas jóvenes de cacao, provenientes de semillas inoculadas con la raza patogénica 101 de F. rigidiuscula provoca aumentos proporcionales en el peso fresco de la buba de puntos verdes, pero reduce a su vez el peso fresco de la planta. Además, se encontró que la

aplicación de potasio no tiene efecto en el crecimiento de la buba, pero inhibe el de la planta. En cuanto al fósforo y al boro, las cantidades añadidas no afectaron el peso de la buba ni el de la planta.

En un estudio preliminar realizado por JIMENEZ (23), con bubas de puntos verdes aisladas y alimentadas con varios sustratos marcados uniformemente con ^{14}C durante 90 minutos, encontró que la buba es capaz de metabolizar el ácido glutámico y la glucosa en mayor cantidad que la alanina y el ácido aspártico. Parece que los tejidos bubosos carecen de las enzimas necesarias para transformar la glicina. El mismo autor concluyó que aparentemente el ciclo de Krebs y la glicólisis operan normalmente en las células de la buba, pero no así la vía del glicolato.

MATERIALES Y METODOS

Ubicación del Trabajo

La investigación se llevó a cabo en los Laboratorios de Fitofisiología, Fitopatología y Radioisótopos del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A, en Turrialba, Costa Rica.

Razas Usadas

Se utilizaron dos razas del hongo Fusarium rigidiuscula (Brick) Sny. y Hans., o sea la raza C-97 patogénica y la 323 no patogénica, las cuales se propagaron en papa dextrosa agar (PDA) a la temperatura de laboratorio (20 a 24°C). Estas razas fueron gentilmente proporcionadas por el Dr. Lee M. Hutchins.+

Cultivo en Solución Nutritiva

Se preparó la solución nutritiva, cuya composición se da a conocer en el Cuadro N° 1. Como puede verse, esta solución contenía glucosa no radioactiva, de acuerdo con las condiciones experimentales que se explicarán en cada experimento. Además, en el mismo medio se incluyeron elementos menores, (Cuadro N° 2). Se vertieron 10 ml de este medio en frascos Erlenmeyer de 125 ml., cantidad que sirvió para cultivar el hongo bajo las diferentes condiciones experimentales.

+ Fitopatólogo Principal del Programa de Cacao del Centro de Enseñanza e Investigación, IICA, Turrialba, Costa Rica.

CUADRO Nº 1

COMPOSICION MINERAL DE LA SOLUCION NUTRITIVA PARA EL HONGO

		Concentración
Nitrato de potasio	KNO_3	0,002 M
Nitrato de calcio	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,003 M
Fosfato de potasio	KH_2PO_4	0,008 M
Sulfato de magnesio	MgSO_4	0,001 M
Cloruro de calcio	Cl_2Ca	0,003 M
Cloruro de magnesio	MgCl_2	0,001 M
Cloruro de potasio	KCl	0,002 M
Glucosa se añadió de acuerdo a las condiciones experimentales		
Tiamina 200 mg/l		
Elementos menores:	5 ml de la fórmula por litro de solución nutritiva	

CUADRO Nº 2

COMPOSICION MINERAL DE LOS ELEMENTOS MENORES

		Concentración
Cloruro de manganeso	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1,8 g/l
Acido bórico	H_3BO_3	3,0 g/l
Sulfato de zinc	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,3 g/l
Sulfato de cobre	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,1 g/l
Acido molíbdico	H_2MoO_4	0,1 g/l

Esterilización

Los frascos Erlenmeyer con los 10 ml de la solución nutritiva fueron esterilizados en un autoclave durante 15 minutos y a 15 libras de presión.

Inóculo

Una vez que el hongo hubo esporulado en un medio de PDA, se tomó el inóculo de la parte aérea de la colonia, con una aza, tratando de obtener una cantidad uniforme. Se prepararon asépticamente diferentes suspensiones de macroconidias, en agua estéril. Esta operación se efectuó en el cuarto de aislamiento. Luego se procedió a determinar las concentraciones respectivas de macroconidias usando

un hematocímetro. De las suspensiones se tomaron alícuotas para inocular los frascos Erlenmeyer, los que contenían los 10 ml del medio de cultivo ya esterilizado.

Incubación

Durante el experimento, los cultivos se mantuvieron en una incubadora a 25°C. Las observaciones para determinar el crecimiento y peso de la colonia del hongo se hicieron cada 24 horas, durante el período de 6 días. Todas las determinaciones se efectuaron en duplicados.

Experimentos Preliminares

Por tratarse de un estudio dentro de un campo nuevo, fué necesario realizar trabajos preliminares que nos permitieran determinar la concentración más adecuada de glucosa no radiactiva para el buen crecimiento del hongo, sin que en el medio quedara residuo de ésta, la cual podría interferir con la glucosa ^{14}C en el período de metabolización.

1. Influencia de la concentración de glucosa en el crecimiento del hongo *F. rigidiuscula*

Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de glucosa, v.g., 0,25, 0,50, 0,75 y 1% en el crecimiento de las razas patogénica C-97 y no patogénica 323, ambas cultivadas en solución nutritiva. Cada frasco se inoculó con 0,2 ml de una suspensión de macroconidias que tenía la siguiente concentración por mililitro.⁺

Raza C-97	:	480,000
Raza 323	:	1,000.000

A partir del tercer día de incubación, se hicieron las pesadas de las colonias.

⁺ En trabajos preliminares se comprobó que empleando las cantidades de inóculo ya citados se lograron:

- Consumir la glucosa no radiactiva en el mismo período de tiempo con ambas razas.
- Llegar a aproximadamente el mismo peso seco de micelio, con ambas razas, en dicho período de tiempo.

CUADRO Nº 3

PROMEDIO DE PESO SECO EN mg COMO MEDIDA DEL CRECIMIENTO DE DOS RAZAS DE F. rigidiuscula EN FUNCION DE LA CONCENTRACION DE GLUCOSA AÑADIDA A LA SOLUCION NUTRITIVA

Glucosa	Raza	Período de incubación (en días)			
		3	4	5	6
1,0%	C-97	24	38	38	38
	323	8	20	29	29
0,75%	C-97	20	39	40	40
	323	8	20	39	39
0,5%	C-97	33	40	40	40
	323	30	39	39	39
0,25%	C-97	20	26	28	29
	323	10	25	28	28

Los datos son promedios de 2 repeticiones.

Examinando el Cuadro Nº 3 se deduce que las concentraciones de glucosa más adecuadas para el crecimiento del hongo F. rigidiuscula fueron las de 0,5 y 0,75%, obteniéndose un crecimiento más rápido con respecto a ambas razas en la solución de 0,5%.

Es posible que el ritmo de crecimiento inicial más lento observado a niveles de glucosa más altos, refleje algún efecto adverso de la presión osmótica del medio, el cual desapareció después del tercer día, cuando el consumo de azúcar había rebajado dicha presión.

En cuanto al nivel inferior de glucosa, 0,25%, es obvio que fue deficiente.

2. Consumo de glucosa por el hongo en función del tiempo

Esta prueba se llevó a cabo con el objeto de medir el tiempo requerido por el hongo para agotar la glucosa no radiactiva de la solución nutritiva y de esta manera conocer el momento oportuno para agregar la glucosa ¹⁴C. Se usaron las razas C-97 y 323 de F. rigidiuscula. Se distribuyeron 10 ml de la solución nutritiva con glucosa al 0,5% por cada frasco Erlenmeyer. La inoculación se efectuó agregando 0,1 ml de las siguientes suspensiones de macroconidias:

Raza C-97 : 300.000/ml

Raza 323 : 280.000/ml.

CUADRO Nº 4

CONSUMO (EN %) DE UNA SOLUCION AL 0,5% DE GLUCOSA
POR LAS RAZAS C-97 Y 323 DE F. rigidiuscula,
EN FUNCION DEL TIEMPO

Raza	Días transcurridos desde su inoculación	
	3	4
C-97	99,2%	100%
323	99,6%	100%

En el Cuadro Nº 4 se presentan los resultados del estudio del consumo de glucosa. Es evidente que al tercer día de incubación, tanto la raza C-97 como la 323, habían consumido el 99% de la solución de glucosa al 0,5%. Estos resultados concuerdan con los del tratamiento al 0,5% del ensayo anterior, en el cual el crecimiento cesó al cuarto día por agotamiento de la glucosa en el medio. Por lo tanto, se consideró que después de un período de crecimiento de 3 días, las colonias estaban listas para proceder con la experimentación con glucosa radiactiva.

3. Determinación del período óptimo de metabolización de la glucosa ^{14}C

Para esta determinación se usaron frascos Erlenmeyer de 125 ml, colocándose en cada frasco 10 ml del cultivo con glucosa al 0,5% y se inocularon con macroconidias de las razas C-97 ó 323 en suspensiones acuosas. Las soluciones de macroconidias usadas para esta determinación fueron:

Raza C-97 : 50.000/ml

Raza 323 : 80.000/ml.

Después de incubar los cultivos por 3 días, hasta que se había consumido más del 99% de su contenido de glucosa, se agregaron 25 lambdas de una solución de glucosa radiactiva (aproximadamente 1,25 microcurios). Se trabajó a temperatura de laboratorio (aproximadamente 24°C). Los frascos se agitaron periódicamente para que hubiera buen contacto entre el micelio y el medio, y por ende una mejor utilización del sustrato radiactivo. A intervalos de 1, 2, 3, 4 y 5 horas se midió la radiactividad desprendida en forma de $^{14}\text{CO}_2$ por cada colonia. Para esto se usó la trampa de hidróxido de potasio (Fig: Nº 3).

CUADRO Nº 5

LIBERACION DE $^{14}\text{CO}_2$ EN c.p.m. POR LAS RAZAS C-97 Y 323 DE F. rigidiuscula, ALIMENTADAS CON GLUCOSA MARCADA UNIFORMEMENTE

Raza	Tiempo en horas				
	1	2	3	4	5
C-97	132	159	174	252	159
323	1.318	2.711	1.711	1.329	2.414

Al estudiar la evolución del $^{14}\text{CO}_2$ por las razas C-97 y 323 en función del tiempo (Cuadro Nº 5), en el primer caso pudo observarse que la producción fue en aumento hasta la cuarta hora. Con relación a la raza 323, la liberación de $^{14}\text{CO}_2$ fue variable a través del período de observación de 5 horas. La mayor producción de anhídrido carbónico radiactivo por esta raza pudo deberse a la mayor cantidad del inóculo, ó a la posibilidad de que existiera diferencia fisiológica en favor de una mejor utilización de la glucosa por parte de la raza no patogénica.

En todo caso, para fines de este estudio, se consideró satisfactoria de 4 ó 5 horas para la metabolización de la glucosa radiactiva.

Alimentación del hongo con glucosa radiactiva

Los cultivos se desarrollaron en una incubadora durante 3 días en la solución nutritiva, la cual contenía una cantidad limitada de glucosa no radiactiva (0,5%). Esta glucosa era suficiente para que el hongo pudiera crecer vigorosamente por el tiempo señalado, sin que quedara residuo considerable que pudiera diluir la glucosa radiactiva. Después se agregó a cada colonia 25 lambdas (aproximadamente 1,25 microcurios) de glucosa ^{14}C . La metabolización de los productos radiactivos se estudió en un sistema cerrado (Fig. N° 3). Este consistió de un frasco Erlenmeyer de 125 ml de capacidad. En el fondo se vertió el medio de cultivo. Luego se suspendió en el centro un tubo corto de vidrio, que contenía dos tiras de papel de filtro Whatman N° 1, impregnado con una solución acuosa al 12% de hidróxido de potasio. Estos frascos Erlenmeyer se agitaron periódicamente para favorecer un buen contacto entre el hongo y el medio. El $^{14}\text{CO}_2$ desprendido por cada colonia se precipitó como carbonato en las tiras de papel de filtro. El conteo de carbonato radiactivo se efectuó por medio de un tubo Geiger Müller acoplado a un contador. +

+ Fabricado por la Casa Nuclear Chicago, División Nuclear Chicago Corporation, 333 E. Howard Avenue Des Plaines, Illinois 60018 mod. 151 A. Densidad de la ventana del tubo Geiger: 1,8 mg/cm².

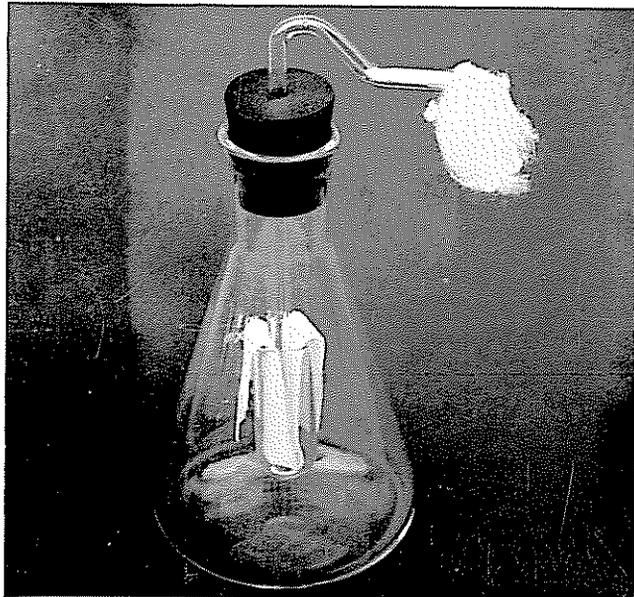
Preparación del supernatante y del extracto metanólico del hongo

Una vez concluido el período de metabolización, cada uno de los diferentes cultivos fue filtrado al vacío, para lo cual se utilizó un embudo de porcelana Büchner conectado a una trompa de agua. El micelio se lavó con suficiente agua destilada, y tanto el supernatante como el agua de lavado fueron recogidos en tubos cónicos de 15 ml de capacidad. Después de cambiar el tubo receptor, se mató el hongo con metanol caliente, se filtró nuevamente y se lavó el micelio con un poco de agua destilada. En adelante, a estas dos fracciones se les denominará acuosa y metanólica, respectivamente. Ambas soluciones fueron evaporadas pasando una corriente de aire frío sobre la superficie líquida, hasta un mililitro aproximadamente.

Identificación de los metabolitos formados por el hongo

La separación de las sustancias presentes en las fracciones acuosa y metanólica, se hizo por medio de cromatografía bidimensional de papel (4, 10). Para este objeto se colocó poco a poco en el punto de origen en el papel cromatográfico (Whatman Nº 1 de 46 x 57 cm) de 50 a 100 microlitros de las respectivas fracciones concentradas. Mientras se efectuó esta operación, se hizo circular una corriente de aire frío sobre el punto de origen, con el objeto de acelerar la evaporación del agua. La radiactividad del material aplicado en el cromatograma siempre fue mayor de 1.000 cuentas por minuto. Para el desarrollo de los

FIG. Nº 3. Dispositivo diseñado para el estudio de la evolución del $^{14}\text{CO}_2$ desprendido por el hongo. En el fondo se aprecia la colonia.



cromatogramas se usó como primer solvente una solución acuosa de fenol al 80%; para la segunda dimensión se utilizó una mezcla de partes iguales de una solución de n-butanol (1.246 ml de n-butanol y 84 ml de agua destilada) y de una solución de ácido propiónico (620 ml de ácido propiónico y 720 ml de agua destilada) (2, 7). En adelante, a estos solventes se les llamará solventes I y II, respectivamente. Una vez desarrollados los cromatogramas, éstos fueron puestos en contacto con placas de rayos "X",^{*} a fin de obtener las correspondientes autoradiografías. El período de exposición fue de 15 días. Después se dibujaron fielmente las manchas sobre el mismo cromatograma, se calcularon los valores "Rf" de las sustancias con mayor radiactividad, así como la distribución relativa de la radiactividad en base al total de cada cromatograma. Esta radiactividad se midió con el mismo tubo Geiger Müller y contador, como ya se había mencionado anteriormente.

La identificación final de los productos marcados con ¹⁴C se hizo de acuerdo con los criterios siguientes:

- a) Por comparación de los valores "Rf" con aquéllos de sustancias conocidas, las cuales fueron tratadas en forma análoga a las muestras^{**} (3, 8).

El "Rf" se define como la distancia del material que se había movido del punto de origen, dividido por la distancia del frente del solvente.

El factor de resolución es:

$$\text{"Rf"} = \frac{\text{Distancia recorrida por la sustancia}}{\text{Distancia recorrida por el solvente.}}$$

* Curix-X ray film (blue base) de 35,5 x 43,2 cm Gevaert Photo-production N.V. Mortsel. Bélgica.

** Se hicieron cromatogramas patrones con productos obtenidos en forma químicamente pura, procedentes de la Casa "Nutritional Biochemicals Corporation", Cleveland, Ohio, Estados Unidos.

- b) Por medio de la reacción con ninhidrina y nitrato de cobre (34, 35), después de asperjar con la solución de ninhidrina y nitrato de cobre al 4% disuelta en etanol al 95%. El nitrato de cobre sirvió para evitar el cambio de color, o sea se usó como preservativo. Los colores se desarrollaron dentro de una estufa a 105°C durante 5 minutos.
- c) Por cocromatografía (4, 26). La cocromatografía consiste en colocar 2 compuestos en el mismo punto de origen. Uno conocido y otro que se supone sea la misma sustancia. Si ambos compuestos coinciden en la autoradiografía, esto indica que es la misma sustancia, lo cual queda identificado en esta forma.

RESULTADOS Y DISCUSION

Es bien conocido que el metabolismo es un ciclo ininterrumpido de síntesis y degradaciones de las sustancias orgánicas que tiene a-siento en los organismos vivos.

El principal motivo de este trabajo fué investigar la diferencia metabólica entre las razas de F. rigidiuscula, problema de máxima importancia para entender el mecanismo fisiológico de la enfermedad llamada buba de puntos verdes en cacao, producida por el hongo F. rigidiuscula.

En el Cuadro N° 6 se presentan los resultados obtenidos en los extractos metanólicos, los cuales ilustran la distribución relativa (en porcentaje, tomando en cuenta la radiactividad total de un cromatograma como 100%) de la radiactividad asociada con los compuestos extraídos con metanol y agua. Además, se muestran los valores "Rf" de los principales metabolitos calculados para cada uno de los solventes utilizados y el color producido a través de la reacción de la ninhidrina con el nitrato de cobre.

Según se infiere de los resultados (Cuadro N° 6), la raza C-97 formó 6 compuestos a partir de la glucosa ^{14}C , mientras que la raza 323 produjo 15, después de 5 horas de metabolización, lo cual sugiere que la capacidad para utilizar la glucosa agregada al medio es menor en la raza C-97 que en la 323. Esto puede explicarse de dos maneras (a) una absorción mas lenta por parte de la raza C-97; y (b) que la raza patogénica, es en realidad fisiológicamente distinta a la no patogénica, debido a que carece de ciertos sistemas enzimáticos necesarios para una mayor transformación de la glucosa.

De los 6 compuestos producidos por la raza C-97, 4 eran aminoácidos y el resto carbohidratos. Los primeros se identificaron como asparagina, cistina, serina y aspartato. Los dos compuestos que no reaccionaron con la ninhidrina fueron identificados como sacarosa y fructosa.

Con relación a las posibles rutas metabólicas que dieron origen a las mencionadas sustancias, puede adelantarse lo siguiente: el ácido oxalacético, que es uno de los productos intermedios en la degradación de la glucosa, dió ácido aspártico por transaminación; luego, el aspartato se transformó en asparagina por medio de una reacción de descarboxilación. La cistina probablemente se formó del piruvato, a través de una serie de reacciones que resultaron en la síntesis del ácido cisteinsulfínico, finalmente, por medio de una reacción de descarboxilación de éste se formó la cistina (11). La síntesis de la serina quizás se inició a partir del ácido 3 fosfoglicérico, el cual fue transformado en ácido 3 fosfo-hidroxi pirúvico; por acción de una transaminasa, éste se convirtió en fosfo serina y por último en serina por intervención de una fosfatasa (11).

Entre los 15 metabolitos producidos por la raza 323, se identificó la asparagina, cistina, serina, aspartato, alanina, prolina y arginina.

CUADRO Nº 6

DISTRIBUCION RELATIVA DE LA RADIACTIVIDAD Y VALORES "RF" DE LOS COMPUESTOS PRESENTES
EN LOS EXTRACTOS METANOLICOS DE LAS RAZAS C-97 Y 323 DE F. rigidiuscula,
ALIMENTADAS CON GLUCOSA ¹⁴C DURANTE 5 HORAS

Metabolitos producidos	Distribución relativa del ¹⁴ C (en %)		Valores "Rf"				Color
	Raza 323		Raza C-97		Raza 323		
	Raza C-97	Raza 323	I	II	I	II	
"Aminoácidos"							
Asparagina	17,1	17,7	0,53	0,28	0,56	0,27	Café anaranjado
Cistina	13,0	11,9	0,32	0,16	0,33	0,15	Café negruzco
Serina	3,9	19,2	0,30	0,25	0,32	0,24	Púrpura oscuro
Aspartato	1,9	3,3	0,20	0,22	0,21	0,21	Café grisáceo
Alanina	-	1,2	0,76	0,35	0,74	0,38	Púrpura
Prolina	-	0,9	-	-	0,83	0,33	Verde con halo gris
Arginina	-	14,8	-	-	0,58	0,21	Púrpura oscuro
"Carbohidratos"							
Sacarosa	35,0	-	0,38	0,21	-	-	
Glucosa no metabolizada	17,8	22,3	0,45	0,25	0,47	0,23	
Fructosa	11,3	-	0,51	0,23	-	-	
Di-fosfato de hexosa (HDP)	-	1,2	-	-	0,10	0,05	
Fosfoglicerato (PGA)	-	0,9	-	-	0,11	0,08	
Triosa-P	-	0,2	-	-	0,18	0,12	
Tartarato	-	0,6	-	-	0,11	0,27	
Glicerato	-	0,5	-	-	0,19	0,29	
Desconocido 1	-	3,0	-	-	0,20	0,05	
Desconocido 2	-	0,6	-	-	0,76	0,42	
Desconocido 3	-	1,7	-	-	0,93	0,39	

- 24 -

Los 8 compuestos que no reaccionaron con la ninhidrina fueron identificados como: di-fosfato de hexosa (HDP), fosfoglicerato (PGA), triosa-P, tartarato, glicerato y 3 compuestos desconocidos que recibieron los números 1, 2 y 3 respectivamente.

La formación de la alanina a partir de la glucosa tal vez ocurrió por medio de una serie de reacciones enzimáticas que resultaron en la desaminación del glutamato y el dos descarboxilaciones de los correspondientes ácido dicarboxílicos formados (alfa-cetoglutarico y oxalacético) para dar ácido pirúvico; finalmente, el piruvato fué transformado en alanina por medio de una transaminasa (23).

La formación de la prolina tal vez ocurrió a través de una serie de reacciones que dieron el semi-aldehído glutámico, éste se convirtió en prolina por intermedio del ácido delta 1-pirrolin 5 carboxílico (11). La síntesis del ácido tartárico es difícil explicar, pues es muy poco lo que se sabe actualmente al respecto. Sin embargo, es posible que en el micelio del hongo exista una enzima capaz de hidrolizar alguno de los ácidos dicarboxílicos de 4 carbonos pertenecientes al ciclo de Krebs, con lo cual se obtendría el tartarato (23). Por otra parte, la síntesis del ácido glicérico quizás ocurrió por una oxidación del gliceraldehído. La formación de la arginina tal vez ocurrió por medio de una serie de reacciones que dieron el ácido alfacetoglutarico y de éste pasó a glutamato por acción de una transaminasa, y después a semialdehído glutámico y de éste se originó la arginina.

CUADRO Nº 7

DISTRIBUCION RELATIVA DE LA RADIOACTIVIDAD Y VALORES "RF" DE LOS COMPUESTOS PRESENTES
 EN LOS SUPERNATANTES DE LAS RAZAS C-97 Y 323 DE F. rigidiuscula,
 ALIMENTADAS CON GLUCOSA ¹⁴C DURANTE 5 HORAS

Metabolitos producidos	Distribución relativa del ¹⁴ C (en %)		Valores "Rf"		Color
	Raza C-97	Raza 323	Raza C-97	Raza 323	
" <u>Aminoácidos</u> "					
Desconocido 4	39,1	-	0,19	0,21	-
Desconocido 5	-	62,1	-	0,12	0,16
" <u>Carbohidratos</u> "					
Residuo de glucosa	60,9	29,5	0,35	0,23	0,34
Glicerato	-	8,5	-	-	0,22
					0,27

En la raza C-97, la acumulación del ^{14}C en serina y aspartato fue relativamente pequeña en comparación con la raza 323. Esto y la acumulación exclusiva de sacarosa y fructuosa en la raza C-97 (con 35 y 11.2% del ^{14}C , respectivamente), quizás tenga alguna conexión con la patogenicidad de dicha raza del hongo F. rigiduscula. Esta hipótesis, sin embargo, aún necesita ser investigada más a fondo en futuros trabajos.

Respecto a los compuestos no radiactivos producidos por el hongo, la raza C-97 produjo una sustancia que dio reacción positiva con la ninhidrina y fue identificada como alanina. El significado de esta observación no se discutirá por el momento.

En el Cuadro Nº 7 aparecen los resultados de los análisis cromatográficos de los supernatantes correspondientes a cada una de las razas del hongo. Puede observarse que la raza C-97 excretó el 39,1% de la radiactividad en forma de una sustancia que produjo una mancha azul como reacción a la ninhidrina. A esta sustancia desconocida se le asignó el Nº 4. Además, en el mismo cromatograma se detectó otra sustancia que no reaccionó con la ninhidrina y se supone que fuera el residuo de la glucosa no absorbida por el hongo. Por otra parte, la raza 323 excretó el 62,1% del ^{14}C en forma de una sustancia que dio color violeta con la ninhidrina, y dos sustancias que no reaccionaron, de las cuales, una de ellas podría ser glucosa no metabolizada; a la otra, tentativamente se le dio el nombre de glicerato.

Estos resultados indican que en efecto hay diferencias metabólicas entre las razas patogénicas y no patogénicas de F. rigiduscula, y

ambas son capaces de excretar diferentes compuestos en el medio de cultivo. Hasta qué punto la sustancia excretada por la raza patogénica puede estar relacionada con el mecanismo inductor de la buba de puntos verdes, aún no se conoce. Sin embargo, los resultados en discusión sugieren que tal vez el desconocido N^o 4 tenga algún efecto regulador en el crecimiento de las yemas vegetativas del cacao. En conexión con ésto, cabe mencionar que esta sustancia desconocida es nitrogenada.

JIMENEZ et al (24, 25) determinan que los abonamientos nitrogenados son estimulantes en el crecimiento de la buba de puntos verdes. Si tomamos en cuenta la opinión de estos autores, nos preguntamos, cuál sería la función que desempeñan las sustancias no nitrogenadas (carbohidratos), ya que los resultados obtenidos en el presente estudio nos están indicando la posibilidad de que tanto las sustancias nitrogenadas (desconocido N^o 4) como las no nitrogenadas (carbohidratos), podrían ser estimulantes en el crecimiento de la buba de puntos verdes.

Lo que no podemos señalar es si estas sustancias actúan conjuntamente. En el presente estudio fueron obtenidas, como sustancias excretadas, el desconocido N^o 4; y secretadas por el micelio, los carbohidratos. Cabe también la posibilidad de que estas sustancias en contacto con el hospedero produzcan compuestos nuevos, los que serían responsables del mecanismo fisiológico. de la enfermedad llamada buba de puntos verdes en cacao.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo, puede afirmarse que, en efecto, existen diferencias metabólicas entre la raza C-97 patógena y la 323 no patógena, y que éstas son capaces de excretar diferentes compuestos en el medio de cultivo.

Respecto a las transformaciones celulares, se puede afirmar que las razas C-97 y 323 produjeron diferentes compuestos marcados con ^{14}C , y que ambas razas tienen diferente capacidad para usar el sustrato radiactivo. Sin embargo, aún necesita investigarse más a fondo en futuros trabajos, para poder llegar a una conclusión definitiva.

RESUMEN

Se investigó la diferencia metabólica entre la raza patogénica C-97 y la no patogénica 323 del hongo F. rigidiuscula, el cual causa la enfermedad llamada buba de puntos verdes en cacao.

Se estudiaron los productos excretados por las dos razas, las cuales fueron alimentadas con glucosa uniformemente marcada con ^{14}C .

Se investigó en algún detalle la transformación del sustrato con glucosa radiactiva en otras sustancias celulares.

Se concluyó que existen diferencias metabólicas bien marcadas entre las razas C-97 y 323, que tal vez puedan llegar a relacionarse con el mecanismo de la patogenicidad de F. rigidiuscula.

SUMMARY

Metabolic differences between a pathogenic race C-97 and other non-pathogenic race 323 of Fusarium rigidiuscula were investigated. This fungus causes the disease called green-point gall of cacao.

The excretion products of the two races were studied after growing them on glucose which was uniformly labelled with ^{14}C .

The transformation of the radioactive substrate into other substances was investigated in some detail.

Conclusive results were obtained with respect to the metabolic differences between race C-97 and 323, which might be related to the mechanism of pathogenicity of F. rigidiuscula.

LITERATURA CITADA

1. BARTLETT, A. W. Item 30 and 31 Official Gasette of British Guiana July 1905 p. 232. (original no consultado; citado por Hansen, A. J., Reyes, L. Agallas de puntos verdes en cacao de Venezuela y Costa Rica. Turrialba (Costa Rica) 13(2):128-132. 1963).
2. BASSHAM, J. A. The path of carbon in photosynthesis. Englewood Cliffs, New Jersey, Prentice Hall, 1957. 104 p.
3. BENSON, A. A. et al. The path of carbon in photosynthesis. Paper chromatography and radioautography of products. Journal Chemistry Society 72:1710-1718. 1950.
4. BLOCK, R. J. et al. Paper chromatography and paper electrophoresis. 2nd ed. New York, Academic Press Incorporated Publishers. 1950. 710 p.
5. BRUNT, A. A. F. Transmission of a gall disease of cocoa. Nature 187(4731):80-81. 1960.
6. _____ y WHARTON, A. L. A gall disease of cocoa (Theobroma cacao L.) in Ghana. In Commonwealth Mycological Conference, 6th Report. London, 1960. pp. 148-156.
7. CALVIN, M. The path of carbon in photosynthesis. Journal Chemistry Education 26(12):639-657. 1949.
8. _____ y BENSON, A. A. The path of carbon in photosynthesis. IV. The identity and sequence of the intermediates in sucrose synthesis. Science 109:140-142. 1949.
9. CARRERA, C. J. M. El género Fusarium, estudio e identificación de especies de la República Argentina y países limítrofes. Buenos Aires. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Publicación Miscelánea 8(4):378-379. 1954.
10. CONSDEN, R. et al. Qualitative analysis of proteins: a partition chromatographic method using paper. Biochemistry Journal 38:224-232. 1944.
11. GRAS, J. Fundamentos de bioquímica. Barcelona, Toray, 1962. 304 p.
12. GREENE, G. L. Physiological basis of gall formation in blacknot disease of Prunus. Phytopathology 52(9):880-883. 1962.
13. HANSEN, A. J. Estudios para la determinación del organismo causal de las agallas de cacao. Cacao (Costa Rica) 7(3):4. 1962.
14. _____. Fusaria as agents of cacao green-point cushion gall in the Caribbean and in Latin America. Plant Disease Report 50(4):229-233.

15. _____. The role of Fusarium decemcellulare and Fusarium roseum in the green-point cushion gall complex of cacao. Turrialba (Costa Rica) 13(2):80-87. 1963.
16. _____ y REYES, L. Agalla de puntos verdes en el cacao de Venezuela y Costa Rica. Turrialba (Costa Rica) 13(2):128-130. 1963.
17. HUTCHINS, L. M. Current surveys for cushion gall. In Conferencia Interamericana de Cacao, 7a., Palmira, Colombia, 1958. Bogotá, Ministerio de Agricultura de Colombia, 1960. pp. 137-148.
18. _____. Cushion gall in cacao. In Inter-American Cacao Conference, 8th, Port of Spain, Trinidad, 1960. Proceedings. Port of Spain, Trinidad, 1960. pp. 281-289.
19. _____. Loss of gall inducing capacity on cacao, when Calonectria rigidiuscula passes from the conidial (fusarium) stage through the perfect (ascospore) stage. Plant Disease Report 49(7): 564-565. 1965.
20. _____. Loss of gall inducing capacity of Fusarium rigidiuscula on cacao by interference from another Fusarium clone. Plant Disease Report 50(4):219-222. 1966.
21. _____. La buba del cacao. In Hardy, F., ed. Manual de Cacao. Edición española. Turrialba, Costa Rica, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, 1961. p. 292.
22. INSTITUTO INTERAMERICANO DE CIENCIAS AGRICOLAS. Informe Técnico 1964. San José, Costa Rica. 1965. pp. 116-117.
23. JIMENEZ, E. Estudio preliminar del metabolismo de la alanina, glicina, ácido aspártico, ácido glutámico y glucosa uniformemente marcada con carbono-14 por bubas de puntos verdes de cacao. Turrialba (Costa Rica) 16(2):190-192. 1966.
24. _____ y DIAZ-ROMEU, R. Efecto del nitrógeno, fósforo y potasio en el crecimiento de la buba de puntos verdes en cacao. Turrialba (Costa Rica) 16(1):44-47. 1966.
25. _____ et al. Efecto del nitrógeno, potasio y boro en el crecimiento de la buba de puntos verdes en cacao. Proceedings of the American Society for Horticultural Sciences (Caribbean Region) 9. 1965. (En prensa).
26. KATZ, J. y CHAIKOFF, I. L. A chromatography radioautography method for study of acetate. Utilization in animal tissues. Journal Biological Chemistry 206(2):887-900. 1954.

27. MITCHELL, J.W et al. Sustancias reguladoras del crecimiento en extractos de la buba de puntos verdes y el efecto de algunas sustancias reguladoras sobre el crecimiento de yemas del cacao. Cacao (Costa Rica) 10 (1): 10-14. 1965.
28. SILLER, L. Efecto de las agallas en la cosecha de plantas de cacao. Cacao (Costa Rica) 7 (3):5. 1962.
29. SNYDER, W. C. The species concept in Fusarium with reference to section Martiella. American Journal of Botany 28(9):738-742. 1941.
30. _____. The species concept in Fusarium with reference to Discolor and other sections. American Journal of Botany 32(10): 657-666. 1945.
31. _____ y HANSEN, H. N. The species concept in Fusarium. American Journal of Botany 27(2):64-67. 1940.
32. STEPKA, W. et al. The path of carbon in photosynthesis. II. Amino acids. Science 108-304. 1948.
33. THOMPSON, J. F. y STEWARD, F. C. Investigations on nitrogen compounds and nitrogen metabolism in plants. II. Variables in two directional paper chromatography of nitrogen compounds. A quantitative procedure. Plant Physiology 26(3):421-440. 1951.