

LA IMPORTANCIA DE LAS SUSTANCIAS POLIFENOLICAS EN EL MECANISMO FISIOLÓGICO DE
LA RESISTENCIA DE CACAO (Theobroma cacao L.) A Phytophthora palmivora
(Butl.) Butl.

Tesis

por

Hermínio Maia Rocha

ORTON MEMORIAL
LIBRARY

1 JUL 1966

IIAS

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 OEA

APROBADA


FARSANTE


Eduardo Jiménez, Ph.D.

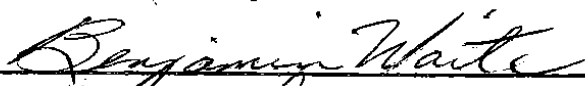
Consejero


Allan G. Newhall, Ph.D.

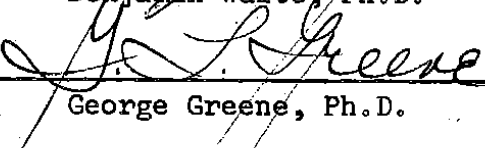
Comité


Eddie Echandi, Ph.D.

Comité


Benjamin Waite, Ph.D.

Comité


George Greene, Ph.D.

Comité

Junio, 1966

ORTON MEMORIAL
LIBRARY

1 JUL 1966

IIAS

A mis padres, mi esposa
y mi hija

AGRADECIMIENTOS

El autor desea expresar su agradecimiento al Consejero Principal, Dr. Eduardo Jiménez, por su constante orientación y participación directa en el planeamiento y ejecución de la presente investigación. A los miembros del Comité Consejero, Drs. Allan G. Newhall, Eddie Echandi, Benjamin Waite y George Green por su asesoramiento y difusión de conocimientos básicos. Al Dr. Jorge Soria e Ing. Roberto Díaz-Romeu, por sus valiosos consejos.

El autor también expresa su agradecimiento a las siguientes instituciones: "American Cocoa Research Institute" (ACRI), "Comissão Executiva do Plano de Recuperação Económico Rural da Lavoura Cacaueira" (CEPLAC), "Conselho Nacional de Pesquisas" y "Ministerio das Relações Exteriores do Brasil", por haberle proporcionado la oportunidad de realizar el presente estudio.

BIOGRAFIA

El autor nació en la ciudad de Patú, Estado de Río Grande do Norte, Brasil, en el año 1935.

Realizó sus estudios universitarios en la "Escola Nacional de Agronomía da Universidade Rural do Brasil", Río de Janeiro, graduándose de Ingeniero Agronomo en el año 1961.

De 1962 a 1963 trabajó en el Instituto Biológico de Sao Paulo, Saõ Paulõ.

En el año 1963 fue contratado por la "Comissao Executiva do Plano de Recuperaçao Economico Rural da Lavoura Cacaueira" (CEPLAC) y actualmente trabaja en el "Centro de Pesquisas do Cacau" (CEPEC) de esta "Comissao", en Itabuna-Ilheus, Bahia, Brasil.

Realizó sus estudios postgraduados en el Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA, Turrialba, Costa Rica, desde octubre de 1964 a junio de 1966, mediante una beca concedida por "American Cocoa Research Institute" (ACRI).

TABLA DE CONTENIDO

	Página
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
INTRODUCCION	1
REVISION DE LITERATURA	3
MATERIALES Y METODOS	7
1. Inoculación de frutos de cacao con <u>Phytophthora palmivora</u>	7
2. Estudio bioquímico	8
3. Pruebas de germinación de <u>Phytophthora palmivora</u> en extractos de las manchas localizadas en los cromatogramas	10
4. Efecto del pH y de la concentración de diferentes cationes y aniones sobre la germinación indirecta de <u>Phytophthora palmivora</u>	10
5. Pruebas de germinación de <u>Phytophthora palmivora</u> en soluciones de compuestos fenólicos conocidos	11
RESULTADOS	13
1. Inoculación de frutos de cacao con <u>Phytophthora palmivora</u>	13
2. Distribución de las sustancias fenólicas en los tejidos del fruto de cacao	14
3. Variación de la concentración de sustancias fenólicas del epicarpio con la maduración del fruto de cacao	14

4. Separación cromatográfica de las sustancias polifenólicas presentes en el epicarpio de frutos jóvenes y maduros de cacao	15
5. Pruebas de germinación de <u>Phytophthora palmivora</u> en los extractos acuosos de las manchas presentes en los cromatogramas	16
6. Efecto del pH y de la concentración iónica en la germinación indirecta de <u>Phytophthora palmivora</u>	17
7. Efecto inhibitor de algunos compuestos fenólicos conocidos en la germinación indirecta y en la formación y crecimiento del tubo germinativo de las zoosporas de <u>Phytophthora palmivora</u>	17
DISCUSION	31
CONCLUSIONES	38
RESUMEN	40
SUMMARY	41
LITERATURA CITADA	42

LISTA DE CUADROS

<u>Cuadro N^o</u>		<u>Página</u>
1	Reacción de frutos intactos, jóvenes, intermedios y maduros de cacao a la inoculación con una suspensión de zoosporas de <u>Phytophthora palmivora</u>	20
2	Distribución de sustancias fenólicas totales y de <u>orto</u> -dihidroxifenoles en el epicarpio, mesocarpio y endocarpio de frutos intermedios de los cultivares UF-613, UF-29 y UF-221	21
3	Concentración de sustancias fenólicas totales y de <u>orto</u> -dihidroxifenoles en el epicarpio de frutos jóvenes, intermedios y maduros de cacao	22
4	Caracterización de las sustancias fenólicas del extracto etanólico del epicarpio de cacao, según el valor R _f , la <u>flu</u> orescencia bajo luz ultra-violeta y el porcentaje de <u>inhi</u> bición de la germinación de <u>Phytophthora palmivora</u> *.....	23
5	Efecto del pH y de la concentración iónica sobre la <u>germina</u> ción indirecta de <u>Phytophthora palmivora</u>	24
6	Efecto fungitóxico diferencial de distintos compuestos fenólicos en la germinación indirecta y el desarrollo del tubo germinativo de las zoosporas de <u>Phytophthora palmivora</u>	25
7	Diferencia en la respuesta de los cultivares UF-613 y UF-221 a la <u>infección</u> con <u>Phytophthora palmivora</u> . bajo condiciones de <u>campo</u> .*	32
8	Concentración de sustancias fenólicas totales y de <u>orto</u> -dihidroxifenoles en el epicarpio de frutos jóvenes, intermedios y maduros de <u>Theobroma mammosum</u>	37

LISTA DE FIGURAS

Figura N ^o		Página
1	Inoculación de frutos intactos de cacao con <u>Phytophthora palmivora</u> bajo condiciones de campo	26
2	Influencia de la edad del fruto (UF-29) sobre el grado de tolerancia a <u>Phytophthora palmivora</u> . Inoculación de frutos intactos:(a) joven; (b) maduro	26
3	Relación entre la concentración de sustancias fenólicas (mg/g de peso fresco) del epicarpio y susceptibilidad a <u>Phytophthora palmivora</u> (promedio de lesiones/fruto) en función de la edad del fruto de cacao	27
4	Separación cromatográfica de las sustancias fenólicas presentes en los extractos etanólicos del epicarpio de frutos jóvenes de cacao: (a) UF-613, (b) UF-29, (c) UF-221.....	28
5	Separación cromatográfica de las sustancias fenólicas presentes en los extractos etanólicos del epicarpio de frutos maduros de cacao: (a) UF-613, (b) UF-29, (c) UF-221	29
6	Germinación de los zoosporangios y zoosporas de <u>P. palmivora</u> en el extracto acuoso de una faja del cromatograma la cual no contenía manchas	30
7	Germinación de las zoosporangios y zoosporas, de <u>P. palmivora</u> en el extracto acuoso de la sustancia correspondiente a la mancha N ^o 3 (Cultivar UF-221).	30
8	Efecto inhibitor de la sustancia polifenólica correspondiente a la mancha N ^o 6 (Cultivar UF-613) en la germinación de <u>P. palmivora</u>	30

INTRODUCCION

La enfermedad llamada "mazorca negra del cacao", causada por Phytophthora palmivora (Butl.) Butl., es ~~una~~ de las principales enfermedades de dicho cultivo, y debido a su gran distribución geográfica provoca grandes pérdidas en la producción mundial de cacao (14).

El hongo ataca los frutos, cojines, hojas y tronco del árbol, pero los mayores daños se deben a la infección de los primeros.

Es posible combatir la enfermedad con éxito parcial por medio de prácticas preventivas, tales como la remoción de los frutos enfermos y cosechas frecuentes. El empleo de productos químicos como fungicidas cúpricos ha dado resultados satisfactorios, pero el alto costo de los materiales y accesorios, y en algunas regiones de la mano de obra, limitan su aplicación.

Por lo tanto, la medida preventiva más eficaz para el combate de la enfermedad consiste en utilizar cultivares resistentes o tolerantes. La existencia de tales plantas se ha reportado en diversas regiones productoras de cacao. En efecto, muchos investigadores se han dedicado a la tarea de seleccionar plantas resistentes a P. palmivora (32).

Un conocimiento claro, preciso, del mecanismo de la resistencia es de vital importancia a fin de poder establecer el método de selección más adecuado.

Un intento en este sentido ya fué realizado por investigadores de Trinidad y Africa quienes relacionaron la resistencia con la actividad del sistema enzimático polifenol oxidosa en los tejidos de cacao. Al respecto cabe destacar que mientras los primeros encontraron que tal actividad es un factor preponderante en la determinación de la resistencia, los segundos obtuvieron resultados que demuestran lo contrario.

En este trabajo se investigó el mecanismo de la resistencia a P. palmivora desde el punto de vista fisiológico. Se estudió el contenido y la actividad fungitóxica de las sustancias fenólicas presentes en los distintos tejidos de mazorcas de los cultivares UF-613, UF-29 y UF-221, los cuales se consideran resistente, tolerante y susceptible, respectivamente, a P. palmivora (15,35). Además se investigó el poder inhibidor de algunas sustancias conocidas sobre la germinación de los zoosporangios y los zoosporas, así como sobre el crecimiento del tubo germinativo de las últimas.

REVISION DE LITERATURA

La concepción de la idea de que las plantas pueden oponer resistencia a la infección fungosa por medio de principios tóxicos presentes en los tejidos, posiblemente se remonta a la época en que el hombre notó por primera vez que las plantas difieren en cuanto a la resistencia a las enfermedades. Los investigadores rusos han empleado el término "Phytoncides" para describir los principios tóxicos que ocurren naturalmente en los tejidos vegetales (8). MÜLLER (28) describió como "Phytoalexins" las sustancias que se forman en tejidos de la epidermis de mazorcas de frijol (Phaseolus vulgaris) infectados por Sclerotinia fructicola (Wint). Rehm., y Phytophthora infestans (Mont.) de Bary y que son capaces de inhibir la actividad de dichos organismos.

Sin embargo, WALKER y colaboradores (42) fueron los primero en explicar satisfactoriamente la naturaleza química de la resistencia a fitopatógenos específicos. Entre los compuestos químicos que determinan la resistencia de las plantas a las enfermedades están las sustancias fenólicas (8). En efecto, ANGEL, WALKER & LINK (1) demostraron que el hongo que causa la antracnosis de la cebolla, Colletotrichum circinans (Berk.) Volg., así como algunas especies de Botrytis responsables de la pudrición del bulbo de la misma planta, no se desarrollan en bulbos coloreados debido a la presencia de catecol y de ácido protocatechuico.

Asimismo, WALKER & LINK (41) demostraron que la toxicidad de los compuestos fenólicos varía considerablemente de acuerdo con la estructura del compuesto y que los orto-fenoles son los más tóxicos. Resultados similares fueron encontrados por CHRISTIE (6) cuando estudió el efecto de varios compuestos fenólicos en el crecimiento de Phytophthora parasitica Dast. y Phytophthora cactorum (Leb. & Cohn.) Schroet., siendo el catecol y el ácido cinámico los compuestos fungitóxicos más activos.

Los diferentes grados de resistencia de la papa a P. infestans y la resistencia a Verticillium albo-atrum Reinke & Berth., han sido bien estudiados en detalle y se ha encontrado que están relacionados con la presencia de ácido clorogénico en los tejidos del hospedero (24, 25, 26, 30, 40). A su vez, ECHANDI & FERNANDEZ (9) demostraron que la resistencia de Coffea canephora, Coffea liberica y del híbrido C. dewevrei C. arabica a Ceratocystis fimbriata (Ell. & Halst.) Hunt., está asociada con la concentración de ácido clorogénico en la corteza de las referidas especies; según estos autores, la concentración de ácido clorogénico en los tejidos corticales de los tres grupos de plantas, es de 9,0,4,8 y 4,0 mg/g respectivamente.

FIGARI (10) determinó un compuesto fenólico en hojas de caucho que inhibe la germinación de esporas del hongo Dothidella ulei P. Henn., y concluyó diciendo que la resistencia del cultivar IAN-710 está relacionada con la presencia de dicho compuesto en las hojas. El ácido clorogénico y otros orto-dihidroxifenoles son tóxicos a Streptomyces scabies (Thaxt.) Waks. Henrici, y fueron relacionados con la resistencia de los tubérculos de papa a este patógeno (22,33). KUC & colaboradores (23) demostraron que los ácidos clorogénico y cafeico tienen acción fungistática sobre el hongo Helminthosporium carbonum Ullstrup, cuando se le cultiva en tubérculos de papa.

BYRDE, FIELDING & WILLIAMS (4) encontraron en manzano que la oxidación de los polifenoles que se produce en las heridas del fruto, inactiva las enzimas pectolíticas de Sclerotinia fructigena Aderh. & Ruh. e impide el progreso de la enfermedad. HULME & EDNEY (19) investigaron la acción de los compuestos fenólicos sobre la germinación de esporas y el establecimiento de la infección causada por Gloeosporium perennans Zeller & Childs en frutos de manzano, y hallaron que existe una

correlación entre el decremento de la cantidad de ácido clorogénico y de antocianinas en los tejidos de la corteza de los frutos y el incremento en la susceptibilidad a G. perennans. También en manzano y en pera, FLOOD & KIRKHAM (11) encontraron que algunos compuesto fenólicos presentes en los extractos de tejidos, tales como ácido clorogénico y neoclorogénico, inhibieron la esporulación y disminuyeron el crecimiento de Venturia pyrina Aderh y Venturia inaequalis (Cooke) Wint.

Con respecto a la resistencia de algunos cultivares de cacao a P. palmivora, algunos investigadores ya han intentado explicar el mecanismo de la resistencia. El primer esfuerzo en este sentido lo hizo ORELLANA (29) quien encontró diferencias en crecimiento del micelio de P. palmivora cuando cultivó el hongo en extractos de tejidos de mazorcas de diferentes cultivares de cacao. Posteriormente, investigaciones realizadas por SPENCE (37) sugirieron la importancia que tiene el sistema polifenol oxidasa en tejidos de cacao en relación con el parasitismo de P. palmivora. Este autor demostró que las enzimas pectolíticas de P. palmivora son inactivadas por la actividad del sistema polifenol oxidasa del hospedero, y encontró que dicha actividad era mayor en el cultivar SCA-6 que en ICS-1, los cuales se consideran como resistente y susceptible respectivamente. Sin embargo, los resultados obtenidos por TURNER (38) en un estudio realizado con selecciones de cacao resistentes, tolerantes y susceptibles a P. palmivora, no indican que hubieran diferencias significativas con respecto a la actividad del sistema polifenol oxidasa en esos tres tipos de plants. Por lo tanto, el citado autor concluyó diciendo que la actividad de la polifenol oxidasa no es un factor que confiera resistencia al fruto de cacao contra el hongo en referencia.

No obstante, en un artículo más reciente, PRENDERGAST & SPENCE (31) reitera

ron que la actividad de la polifenol oxidasa es un factor determinante de la resistencia, pues actúa produciendo compuestos fenólicos oxidados que limitan rápidamente la actividad pectolítica de P. palmivora e impiden que se propague la pudrición.

MATERIALES Y METODOS

1. Inoculación de frutos de cacao con Phytophthora palmivora.

Se inocularon 45 frutos de cada uno de los cultivares UF-613, UF-29 y UF-221, de los cuales 15 eran jóvenes, 15 intermedios y 15 maduros, con una cepa de P. palmivora previamente seleccionada entre diversos aislamientos, obtenidos de frutos enfermos que fueron recogidos en las plantaciones de cacao del IICA en Turrialba y en La Lola. Se preparó un cultivo monozoospórico en PDA, y a partir de éste se cultivó el hongo en medio V-8 a fin de obtener abundante esporulación. Después de 8 días de cultivo en dicho medio se preparó una suspensión acuosa de zoosporangios, la cual fue sometida a un ambiente saturado de humedad con el objeto de acelerar la germinación indirecta. La suspensión de zoosporangios y zoosporas fue filtrada a través de papel de filtro Whatman Nº 2, encontrándose que el filtrado sólo contenía zoosporas a una concentración de 400.000 por ml. Con esta suspensión se inocularon todos los frutos intactos, para lo cual se empleó un atomizador DeVilbiss. Se asperjó los dos tercios inferiores del fruto, evitando que se acumulara el inóculo en la depresión peduncular. Después de la inoculación se recubrieron los frutos con una bolsa de polietileno que contenía 10 ml de agua destilada para mantener el ambiente saturado de humedad, según recomendación de MEDEIROS (27)(Fig. 1).

Cuarenta y ocho horas más tarde se contó el número de frutos enfermos y el número de lesiones por fruto. Esta operación se repitió diariamente hasta que las lesiones se juntaron; sin embargo, el número de frutos enfermos sólo se registró hasta el sétimo día.

Cabe señalar que como fruto enfermo se consideró todo aquél que tuviera alguna lesión de Phytophthora, aunque ésta fuera incipiente.

2. Estudio bioquímico

A) Extracción de los polifenoles

A fin de determinar la distribución de sustancias fenólicas en los tejidos del fruto de cacao, se tomaron muestras quintuplicadas de 1,0 gramo (peso fresco) del epicarpio, mesocarpio y endocarpio de mazorcas de los cultivares UF-613, UF-29 y UF-221. Además se investigó el contenido de polifenoles en el epicarpio de tres clases de frutos de los referidos cultivares, a saber: jóvenes, intermedios y maduros, los cuales eran de 2, 4 y 6 meses de edad respectivamente. A efecto de prevenir la contaminación de los tejidos, se tomaron pequeños pedazos repetidas veces hasta completar el peso deseado. Luego se colocó el tejido en un mortero con 10 ml de etanol del 95% caliente, se maceró y se transfirió a un vaso de vidrio donde permaneció a una temperatura de más o menos 75°C por 10 minutos. Al final de este período se filtró a través de papel Whatman N° 2; el filtrado se recolectó en frascos volumétricos de 100 ml y se llevó a volumen con agua destilada.

B) Determinación cuantitativa.

Se empleó el método usado por JOHNSON y SCHAAL en papa (21), al cual se le hicieron algunas modificaciones para usarlo con los tejidos de cacao. El método incluye el reactivo FOLIN-DENIS (2) para la determinación de fenoles totales y el reactivo de ARNOW (21) para la determinación de orto-dihdroxifenoles.

a) Fenoles totales

Alícuotas de 0,5 ml del extracto etanólico fueron transferidas a frascos volumétricos de 50 ml, los cuales contenían 35 ml de agua destilada; luego se añadieron los reactivos en el siguiente orden: 1,0 ml del reactivo Folin-Denis; des

pués de tres minutos en reposo, 10 ml de solución de carbonato de sodio al 10% (p/v); finalmente se llevó a volumen con agua destilada. La solución resultante, de color azul, permaneció en reposo durante una hora a fin de que el color se desarrollara al máximo; luego se determinó el porcentaje de transmisión de luz de 660m μ de longitud onda en un colorímetro Colleman modelo 6-A.

En el blanco usado para ajustar el colorímetro a 100% de transmisión, se sustituyó el extracto etanólico por agua destilada. Las lecturas se refirieron a una curva patrón preparada con ácido clorogénico a diferentes concentraciones molares.

b) Orto-dihidroxiifenoles

En la cubeta o tubo de colorímetro se colocó 1,0 ml del extracto etanólico y luego se agregó los siguientes reactivos: 1,0 ml de ácido clorhídrico 0,5 N, 1,0 ml del reactivo de Arnou, 10,0 ml de agua destilada y 2,0 ml de hidróxido de sodio 1,0 N. Treinta segundos después se midió la transmisión de luz de longitud de onda de 515m μ . Al igual que en el caso anterior, se preparó una curva patrón.

El análisis de las diferencias en el contenido de sustancias fenólicas entre los cultivares, así como entre frutos de 3 edades de un mismo cultivar, se hizo empleando la prueba "t" de Student (34).

C) Análisis cromatográfico

Se prepararon extractos etanólicos del epicarpio de frutos jóvenes y maduros de los tres cultivares, para lo cual se usó 2,0 gramos de tejido fresco, y la misma técnica descrita anteriormente. Los extractos fueron evaporados hasta que se redujo el volumen a 2,0 ml. Luego se empleó el método de cromatografía bidimensional (16), utilizando papel Whatman N° 1 de 46 x 57 cm, y como solven-

tes, agua en el sentido más largo y Butanol:Acido acético:Agua (4:1:2, V:V;V) en la segunda dirección. En el origen se colocó 10 microlitros de los correspondientes extractos concentrados. Una vez desarrollados, los cromatogramas fueron examinados bajo luz ultravioleta de 350 m μ .

3. Pruebas de germinación de Phytophthora palmivora en extractos de las manchas localizadas en los cromatogramas.

A fin de estudiar el efecto fungitóxico de las distintas sustancias encontradas en los cromatogramas, se recortaron las respectivas manchas fluorescentes (en tiras de más o menos ocho centímetros de largo) y se les sometió a un proceso de lavado con agua destilada en una cámara saturada con vapor de agua. Como testigo se usó el lavado de una faja del papel del mismo cromatograma, pero que no contenía manchas. Cuando se hubo recogido aproximadamente 0,5 ml de líquido, éste fue puesto en un portaobjetos y se le colocó encima una cantidad constante de zoosporangios de P. palmivora, los cuales provenían de un cultivo de 10 días de edad hecho en medio V-8. Después de una hora se determinó microscópicamente el porcentaje de germinación indirecta, con base en la observación de 200 zoosporangios tomados al azar en varios campos.

4. Efecto del pH y de la concentración de diferentes cationes y aniones sobre la germinación indirecta de Phytophthora palmivora.

El objetivo de este ensayo fue determinar el rango de valores pH óptimos para la germinación indirecta de P. palmivora, y la influencia que pudieran tener los iones utilizados para ajustar el pH sobre el fenómeno biológico en referencia. Sin esta información no se hubiera podido investigar posteriormente la

actividad fungitóxica de ciertas sustancias fenólicas conocidas, en vista de que la mayoría de ellas sólo son solubles en agua a pH elevado.

Para variar el pH entre 3,2, y 5,0 se usó disoluciones de ácido fosfórico (9×10^{-4} a 9×10^{-7} M) y de ácido acético (5×10^{-2} a 5×10^{-7} M) y para conseguir valores entre pH 5,8 y 11,9 se utilizó hidróxido de sodio, hidróxido de calcio e hidróxido de potasio, todos a concentraciones que oscilaron entre $2,5 \times 10^{-5}$ y $2,5 \times 10^{-2}$ M.

El porcentaje de germinación indirecta se determinó como en el ensayo anterior.

5. Pruebas de germinación de Phytophthora palmivora en soluciones de compuestos fenólicos conocidos.

Para este ensayo se utilizaron compuestos fenólicos conocidos (grado A)*, los cuales ocurren normalmente en tejidos de cacao (13). Los compuestos usados fueron: ácido clorogénico, quercetina, cianidina y D-catequina. Como testigo se usó agua destilada. Todos los compuestos fueron probados a concentraciones de 0,5, 1,0 y 2,0 mM, observándose que el pH fuera adecuado para la germinación indirecta de P. palmivora. Las observaciones sobre germinación indirecta se hicieron una hora después de haber colocado los zoosporangios en las respectivas soluciones.

Además del porcentaje de germinación indirecta, también se valió el efecto de las referidas sustancias en la germinación de las zoosporas, para lo cual se midió el largo de 20 tubos germinativos. Después de 2 1/2 horas de sumersión de los zoosporangios, se agregó 3 gotas de bicloruro de mercurio al 0,1% a fin de parar la germinación de las zoosporas.

* CALBIOCHEM. California Corporation for Biochemical Research
3625 Medford Street. Los Angeles 63, California (USA).

El largo de los tubos germinativos se midió por medio de un micrómetro ocular de 8x y objetivo 10x, el cual fue debidamente calibrado con un micrómetro objetivo.

RESULTADOS

1. Inoculación de frutos de cacao con Phytophthora palmivora.

Los resultados de este ensayo muestran claramente los diferentes grados de tolerancia de los 3 cultivares de cacao a Phytophthora palmivora (Cuadro 1). El análisis estadístico de las diferencias entre los números de lesiones/fruto producidas en los distintos cultivares, el cual se hizo según el método de comparaciones de valores provenientes de una distribución de POISON (3) reveló que en efecto los frutos UF-221 son los más susceptibles. Entre los frutos UF-613 y UF-29, las diferencias fueron significativas solamente cuando se compararon los números de lesiones causadas a frutos maduros. Dentro del mismo cultivar se encontró que las diferencias entre grados de madurez fueron altamente significativas cuando se comparó los frutos jóvenes e intermedios contra los maduros, ya fuera en el caso UF-221 o el UF-29. En cuanto al cultivar UF-613 no hubo diferencias significativas entre las 3 clases de frutos.

Respecto al número de frutos infectados, las diferencias fueron altamente significativas solamente cuando se compararon los frutos maduros UF-613 con los de los otros cultivares. Al comparar el número de frutos infectados dentro de un mismo cultivar, únicamente se encontró diferencias significativas cuando se comparó los frutos UF-29 maduros con los jóvenes y los intermedios. El hecho de que se considera como fruto infectado todo aquél que tenía por lo menos una lesión de grado incipiente, influyó para que no se registraran más casos de diferencias significativas entre cultivares.

En efecto, aunque los frutos jóvenes UF-613 y UF-29 mostraban lesiones, éstas eran generalmente muy pequeñas y no se desarrollaron apreciablemente hasta siete días después de hecha la inoculación. También se observó que las lesiones de este tipo eran superficiales (Fig. 2).

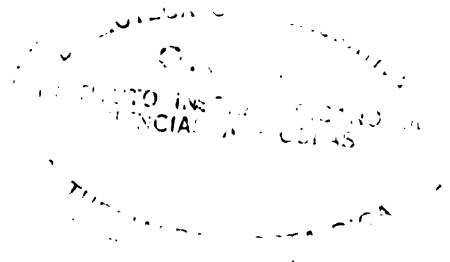
2. Distribución de las sustancias fenólicas en los tejidos del fruto de cacao.

Según CUATRECASAS (7), el fruto de Theobroma cacao L., tiene el pericarpio formado por 3 capas sobresalientes: el epicarpio que es carnososo y grueso; el mesocarpio vascular que es papiroso, rígido, delgado y leñoso, y el endocarpio que es carnososo y más o menos grueso.

A efecto de estudiar la distribución de las sustancias fenólicas en el pericarpio de frutos de cacao, se tomaron muestras de cada una de las 3 capas mencionadas. Los resultados obtenidos (Cuadro 2) indican que las sustancias fenólicas están distribuidas irregularmente en la cáscara, correspondiendo al epicarpio la mayor concentración de fenoles totales y orto-dihidroxifenoles; por otra parte, los contenidos en el mesocarpio y el endocarpio son relativamente bajos.

3. Variación de la concentración de sustancias fenólicas del epicarpio con la maduración del fruto de cacao.

Los resultados de este ensayo ilustran (Cuadro 3, Fig. 3) el cambio que ocurrió en la concentración de las sustancias fenólicas del epicarpio con el crecimiento de los frutos de 3 cultivares de cacao. En general se encontró que la cantidad de fenoles totales y orto-dihidroxifenoles era significativamente superior (a un nivel de probabilidades menor del 1%) en frutos jóvenes (± 2 meses de edad) que en frutos intermedios (± 4 meses de edad) o maduros (± 6 meses de edad). Las diferencias entre frutos intermedios y maduros, alcanzaron significancia estadística al 5% solamente en el caso de los fenoles totales.



Por otra parte, al analizar estadísticamente las diferencias entre los contenidos de polifenoles totales y de orto-dihidroxifenoles en función del cultivar de cacao, en general se encontró que las concentraciones de las mencionadas sustancias en el epicarpio eran significativamente más altas en todos los frutos UF-613 que en los UF-29 y UF-221. Asimismo, en lo pertinente a estos dos últimos cultivares se constató que sólo en el caso de los frutos jóvenes hubo diferencias significativas.

4. Separación cromatográfica de las sustancias polifenólicas presentes en el epicarpio de frutos jóvenes y maduros de cacao.

El análisis cromatográfico de los extractos etanólicos de epicarpio puso de manifiesto las diferencias de orden cualitativo que existen, tanto entre cultivares como entre frutos de distinto estado de desarrollo que pertenezcan al mismo cultivar, en cuanto a su composición química (Figuras N° 4 y 5).

En los frutos jóvenes UF-613 se encontró siete manchas bien definidas, fluorescentes bajo luz ultravioleta, a las cuales se les asignó los números de 1 a 7 para efecto de identificación. Por otra parte, en los frutos maduros del mismo cultivar se hallaron dos manchas nuevas, las N° 9 y 10.

Con relación a los frutos jóvenes UF-29, en los cromatogramas respectivos aparecieron cinco manchas, las N° 2, 3, 4, 7 y 8 y en el caso de los frutos maduros, la mancha N° 11.

Finalmente, en el extracto de frutos jóvenes UF-221 únicamente se detectó la mancha N° 3, y en el de frutos maduros la N° 12.

Al respecto cabe hacer la observación de que sólo una de las manchas corres-

pondientes a las sustancias con actividad fungitóxica, la N^o 8 en particular, era de color azul claro brillante bajo luz ultravioleta; las demás eran de color púrpura oscuro.

5. Pruebas de germinación de P. palmivora en los extractos acuosos de las manchas presentes en los cromatogramas.

Los resultados de este ensayo se resumen en el Cuadro 4, y la capacidad inhibidora de algunas sustancias polifenólicas sobre la germinación de los zoosporangios y la germinación de las zoosporas, se ilustra en las Figuras 6, 7 y 8.

El aspecto más importante de estos resultados es que demuestran como sólo unas pocas de las sustancias polifenólicas presentes en el epicarpio de algunos frutos de cacao, son las responsables de la inhibición del crecimiento de P. palmivora. Consecuentemente, al hablar del mecanismo de resistencia a dicho patógeno debe entenderse que el papel desempeñado por la totalidad de compuestos fenólicos es secundario, y que lo correcto es relacionar ese fenómeno biológico con las propiedades fungitóxicas individuales de las sustancias.

Es interesante destacar algunos aspectos de los resultados en referencia, como por ejemplo: (i) que la sustancia fungitóxica N^o 8 aparentemente es exclusiva del cultivar UF-29, mientras que las N^o 5 y 6 lo son del UF-613. (ii) Entre las sustancias con poder inhibidor, la que corresponde a la mancha N^o 7 es la más potente de todas y se encuentra tanto en frutos jóvenes UF-613 como UF-29. (iii) La sustancia correspondiente a la mancha N^o 3 se encuentra en los frutos jóvenes de los tres cultivares estudiados y carece de efecto fungitóxico.

6. Efecto del pH y de la concentración iónica en la germinación indirecta de P. palmivora.

De acuerdo con los resultados de esta prueba (Cuadro 5), es notorio que los zoosporangios germinan libremente en un medio acuoso cuya reacción oscila entre pH 4,8 y 11,2, siendo los límites del rango óptimo 5,5 y 9,1. A pH 3,2 y 11,8 se encontró que la inhibición del proceso germinativo fue total.

Respecto del efecto de la calidad y cantidad de iones presentes en el medio acuoso, no se observó que hubiera diferencias significativas.

7. Efecto inhibidor de algunos compuestos fenólicos conocidos en la germinación indirecta y en la formación y crecimiento del tubo germinativo de las zoosporas de P. palmivora.

Como se explicó antes, para realizar este ensayo se escogieron varias sustancias de estructura conocida, cuya presencia en los frutos de cacao ha sido demostrada (13), pero sobre las cuales nada se sabía con relación a su actividad fungitóxica por cuanto aún no se les había sometido a una prueba biológica como la empleada en el presente trabajo.

En lo que respecta al efecto de dichas sustancias en la germinación de los zoosporangios (Cuadro 6), los resultados sugieren que el ácido clorogénico y la quercetina, sobre todo el primero, tienen un alto poder inhibidor a una concentración 2,0 mM, pero que su actividad fungitóxica disminuye marcadamente a niveles inferiores. En efecto, a la concentración 1,0 mM, el ácido clorogénico permitió la germinación indirecta en un 71 por ciento de los casos, y la quercetina en un 47 por ciento. Por otra parte, y de nuevo a alta concentración, la cianidi

na y la D-catequina solamente inhibieron en un 48 y 37 por ciento, respectivamente.

Con relación a la inhibición de la germinación de las zoosporas en sí, el cuadro indica que los compuestos fenólicos más activos fueron la quercetina y la cianidina a las tres concentraciones estudiadas, llegando a impedir totalmente la germinación de las zoosporas al nivel 2,0 mM. La D-catequina, aplicada a la misma concentración sólo tuvo un ligero efecto tóxico, y lo mismo puede decirse del ácido clorogénico cuando éste se encontraba a una concentración menor que 2,0 mM.

Una observación de carácter cualitativo pero que reviste alguna importancia biológica es la que se refiere al efecto de los polifenoles investigados en la motilidad de las zoosporas. Según se dijo arriba, excepto el ácido clorogénico a 2 mM, las demás sustancias permitieron en mayor o menor grado la liberación de zoosporas en el medio acuoso. Sin embargo, a la vez pudo observarse que la motilidad de estas estructuras fué seriamente afectada y que en muchas ocasiones llegó a cesar del todo, provocando la aglutinación de aquellas muy cerca del opérculo a través del cual habían salido. Esto podría interpretarse como una manifestación más del poder fungitóxico de las sustancias polifenólicas, y su importancia estriba en el hecho de que no obstante algunas de ésta pueden carecer de actividad inhibidora sobre la germinación de los zoosporangios, aún así pueden ayudar a prevenir el establecimiento de la infección fungosa, impidiendo la dispersión y el crecimiento subsecuente de las zoosporas.

Que el efecto fungitóxico de las sustancias polifenólicas que se ha mencionado aquí es independiente del efecto que la reacción del medio (pH), lo garantiza

el que se trabajara dentro de un rango fisiológico favorable a la germinación indirecta de P. palmivora (ver la columna correspondiente en el Cuadro 6).

CUADRO 1. Reacción de frutos intactos, jóvenes, intermedios y maduros de cacao a la inoculación con una suspensión de zoosporas de Phytophthora palmivora.

	UF-613			UF-29			UF-221		
	Frutos 1/ jóvenes	Frutos 2/ intermedios	Frutos 3/ maduros	Frutos 1/ jóvenes	Frutos 2/ intermedios	Frutos 3/ maduros	Frutos 1/ jóvenes	Frutos 2/ intermedios	Frutos 3/ maduros
Frutos inoculados	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Frutos infectados	4	4	4	3	4	4	9	11	15
Promedio lesiones/fruto	0,53	0,80	0,93	0,33	0,46	2,80	1,86	2,53	11,06

1/ (+ 2 meses de edad)
 2/ (+ 4 meses de edad)
 3/ (+ 6 meses de edad)

CUADRO 2. Distribución de sustancias fenólicas totales y de orto-dihidroxifenoles en el epicarpio, mesocarpio y endocarpio de frutos intermedios de los cultivares UF-613, UF-29 y UF-221

Tejido	<u>UF-613</u>		<u>UF-29</u>		<u>UF-221</u>	
	Fenoles Totales	o-dihidroxi-fenoles	Fenoles Totales	o-dihidroxi-fenoles	Fenoles Totales	o-dihidroxi-fenoles
Epicarpio	8,6	6,4	5,6	4,0	6,2	5,4 *
Mesocarpio	5,4	3,8	4,2	2,2	4,4	2,6
Endocarpio	4,2	2,6	3,2	2,2	3,2	1,8

* Las cifras son promedios de 5 repeticiones y se expresan en mg/g de peso fesco.

CUADRO 3. Concentración de sustancias fenólicas totales y de orto-dihidroxifenoles en el epicarpio de frutos jóvenes, intermedios y maduros de cacao.

	UF-613			UF-29			UF-221		
	Frutos 1/ jóvenes	Frutos 2/ intermedios	Frutos 3/ maduros	Frutos 1/ jóvenes	Frutos 2/ intermedio	Frutos 3/ maduros	Frutos 1/ jóvenes	Frutos 2/ intermedio	Frutos 3/ maduros
Sustancias fenólicas Totales	18,2	8,6	6,4	11,6	5,6	4,8	16,8	6,2	4,8 [*]
Orto-dihidroxi-fenoles	13,6	6,4	5,6	7,6	4,0	4,0	11,2	5,4	4,4

1/ (+ 2 meses de edad)
 2/ (+ 4 meses de edad)
 3/ (+ 6 meses de edad)

* Las cifras son promedio de 5 repeticiones y se expresan en mg/g de peso fresco.

CUADRO 4. Caracterización de las sustancias fenólicas del extracto etanólico del epicarpio de cacao, según el valor Rf, la fluorescencia bajo luz ultra-violeta y el porcentaje de inhibición de la germinación de Phytophthora palmivora*.

Cultivar	Mancha	Rf**		Color	Inhibición %
		Solvente I	Solvente II		
FRUTOS JOVENES					
	Testigo	-	-	-	25,0
UF-613	1	0,40	0,74	Azul claro	26,0
	2	0,39	0,85	Azul claro	25,0
	3	0,44	0,86	Azul claro	25,0
	4	0,53	0,75	Azul claro	30,0
	5	0,11	0,48	Púrpura	92,0
	6	0,11	0,58	Púrpura	93,0
	7	0	0,93	Púrpura	95,0
UF-29	2	0,37	0,85	Azul claro	40,0
	3	0,45	0,85	Azul claro	40,0
	4	0,37-0,54	0,76	Azul claro	30,0
	7	0	0,93	Púrpura	98,0
	8	0,51	0,70	Azul claro	95,0
UF-221	3	0,44	0,83	Azul claro	38,0
FRUTOS MADUROS					
	Testigo	-	-	-	24,0
UF-613	9	0,85	0,72	Azul claro	48,0
	10	0,93	0,69	Azul claro	22,0
UF-29	11	0,95	0,73	Azul claro	32,0
UF-221	12	0,88	0,87	Azul claro	21,0

* Las cifras son promedios de 2 repeticiones

** I = Agua

II = Butanol: ácido acético: agua (4:1:2)

CUADRO 5. Efecto del pH y de la concentración iónica sobre la germinación indirecta de Phytophthora palmivora.

Sustancia	Concentración Molar	pH	Germinación* (%)
Acido fosfórico	9×10^{-4}	3,2	0,00
	9×10^{-5}	3,8	44,00
	9×10^{-6}	4,6	68,00
	9×10^{-7}	4,8	78,00
Acido acético	5×10^{-2}	3,2	0,00
	5×10^{-4}	3,8	43,00
	5×10^{-6}	4,6	62,00
	5×10^{-7}	5,0	71,00
Agua destilada	-	5,5	84,00
Hidróxido de sodio	2.5×10^{-2}	11,9	0,00
	2.5×10^{-3}	11,0	73,00
	2.5×10^{-4}	8,5	81,00
	2.5×10^{-5}	6,0	84,00
Hidróxido de calcio	2.5×10^{-2}	12,1	0,00
	2.5×10^{-3}	11,2	76,00
	2.5×10^{-4}	9,1	86,00
	2.5×10^{-5}	6,0	86,00
Hidróxido de potasio	2.5×10^{-2}	11,8	0,00
	2.5×10^{-3}	10,8	76,00
	2.5×10^{-4}	7,0	81,00
	2.5×10^{-5}	5,8	82,00

* Con base en la observación de 200 zoosporangios.

CUADRO 6. Efecto fungitóxico diferencial de distintos compuestos fenólicos en la germinación indirecta y el desarrollo del tubo germinativo de las zoosporas de Phytophthora palmivora

	C O N C E N T R A C I O N (mM)											
	0.5			1.0			2.0					
	pH	Germinación (%)	Longitud Tubo germinativo (micras)	pH	Germinación (%)	Longitud Tubo germinativo (micras)	pH	Germinación (%)	Longitud Tubo germinativo (micras)	pH	Germinación (%)	Longitud Tubo germinativo (micras)
Acido clorogénico	5,1	70,5*	75,0*	4,9	71,0	60,0	4,8	0,0	---			
Quercetina	7,5	57,0	45,0	8,2	46,5	40,5	9,2	22,5	0,0			
Cianidina	7,5	72,0	49,5	7,7	72,5	40,5	7,9	51,5	0,0			
D-Catequina	6,0	80,0	75,0	8,0	74,0	67,5	10,0	62,5	58,5			
Agua destilada	5,5	81,5	84,0	-	-	-	-	-	---			

* Las cifras se basan en la observación de 200 zoosporangios, o bien de 20 zoosporas

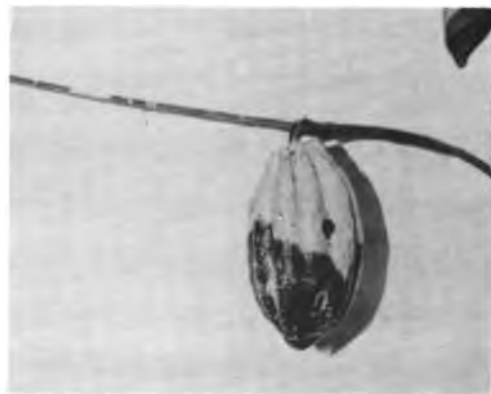
Fig. 1. Inoculación de frutos intactos de cacao con Phytophthora palmivora bajo condiciones de campo.



Fig. 2. Influencia de la edad del fruto (UF-29) sobre el grado de tolerancia a Phytophthora palmivora. Inoculación de frutos intactos: (a) joven; (b) maduro. Las fotografías fueron tomadas siete días después de hecha la inoculación.



(a)



(b)

FIG. 3 RELACION ENTRE LA CONCENTRACION DE SUSTANCIAS FENOLICAS (mg /g de peso fresco) DEL EPICARPIO Y SUSCEPTIBILIDAD A PHYTOPHTHORA PALMIVORA (PROMEDIO DE LESIONES/FRUTO) EN FUNCION DE LA EDAD DEL FRUTO DEL CACAO.-

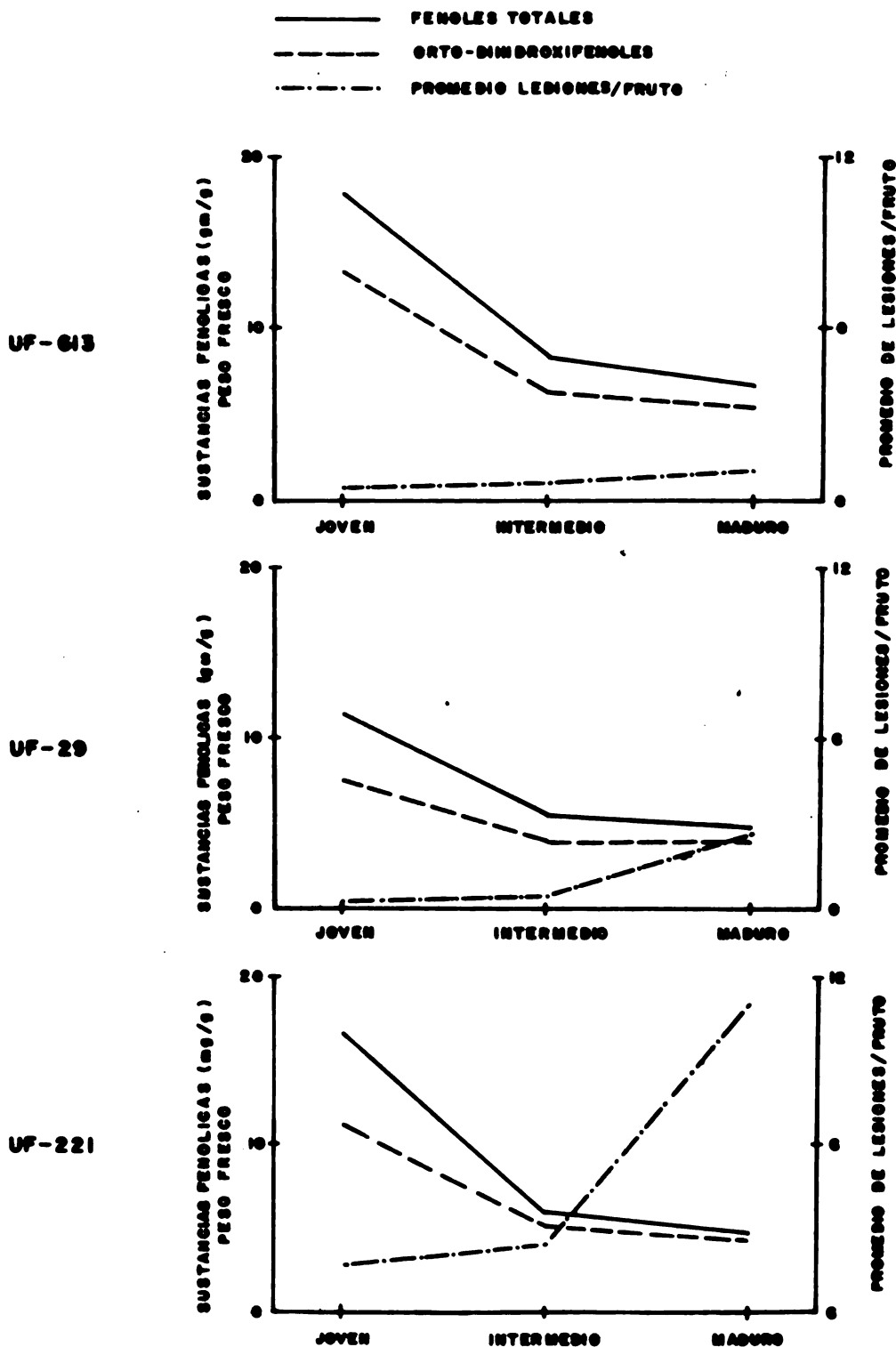


FIG. 4 SEPARACION CROMATOGRAFICA DE LAS SUSTANCIAS FENOLICAS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS ETANOLICOS DEL EPICARPIO DE FRUTOS JOVENES DE CACAO: (a) UF-613, (b) UF-29, (c) UF-221.-

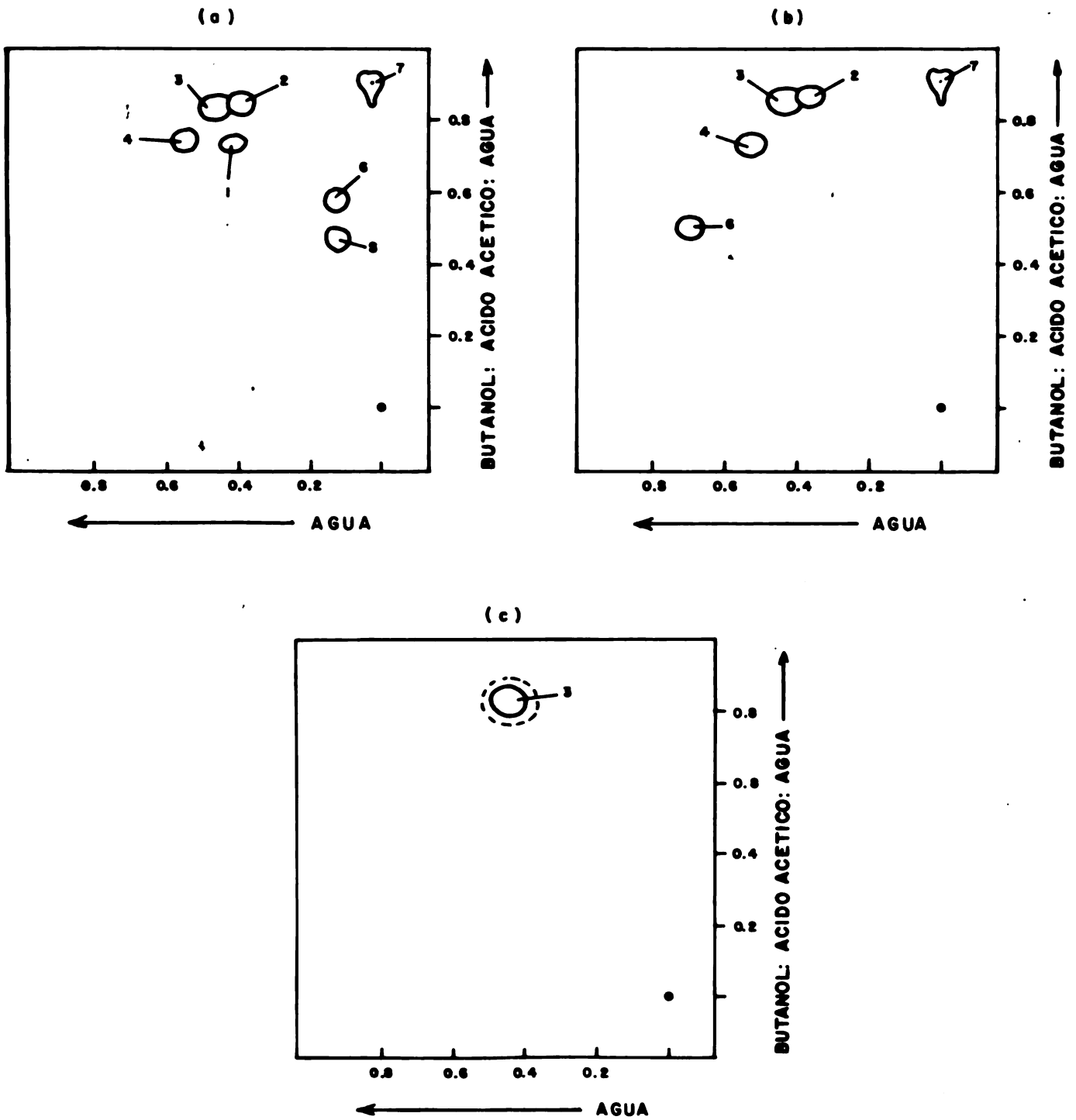
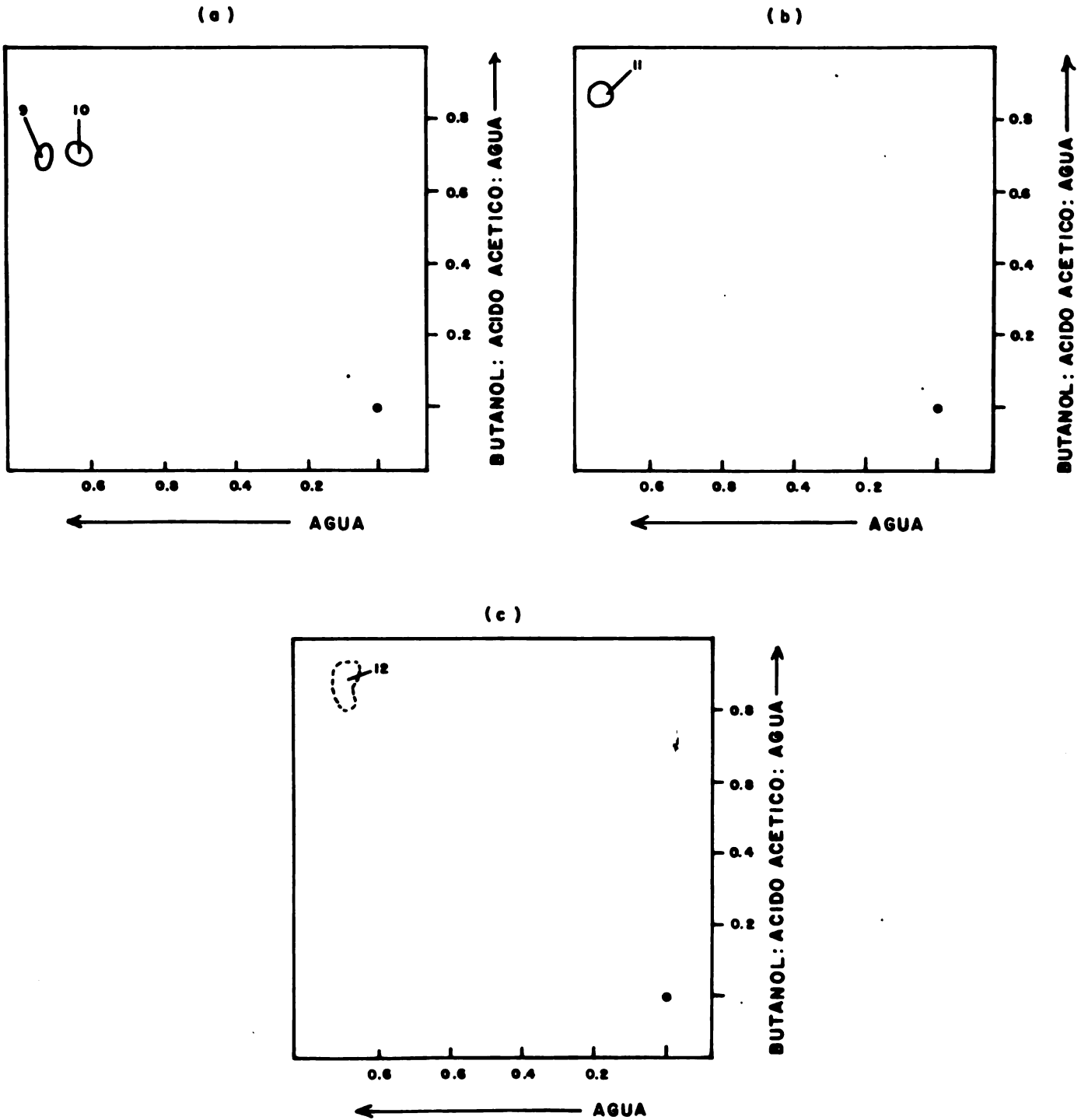


FIG. 5 SEPARACION CROMATOGRAFICA DE LAS SUSTANCIAS FENOLICAS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS ETANOLICOS DEL EPICARPIO DE FRUTOS MADUROS DE CACAO: (a) UF-613, (b) UF-29, (c) UF-221.-



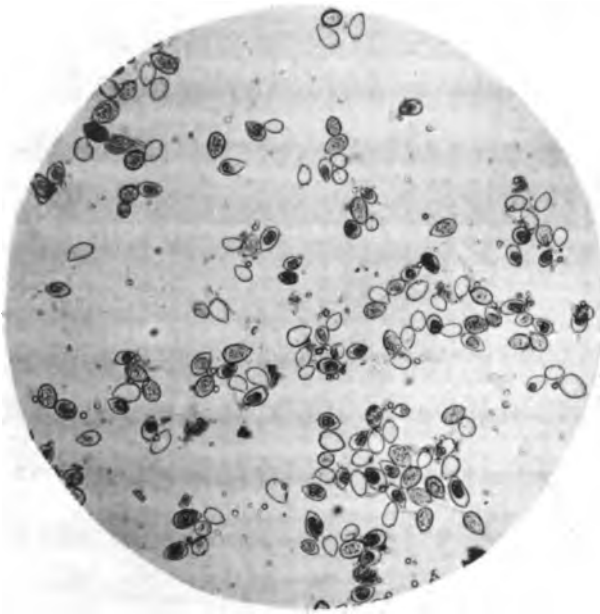


Fig. 6. Germinación de las zoosporas de P. palmivora en el extracto acuoso de una faja del cromatograma la cual no contenía manchas.

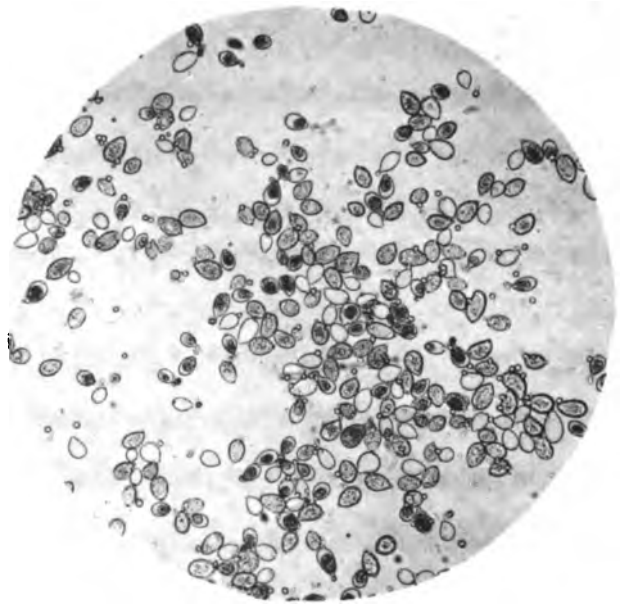


Fig. 7. Germinación de las zoosporas de P. palmivora en el extracto acuoso de la sustancia correspondiente a la mancha N^o 3 (Cultivar UF-221)

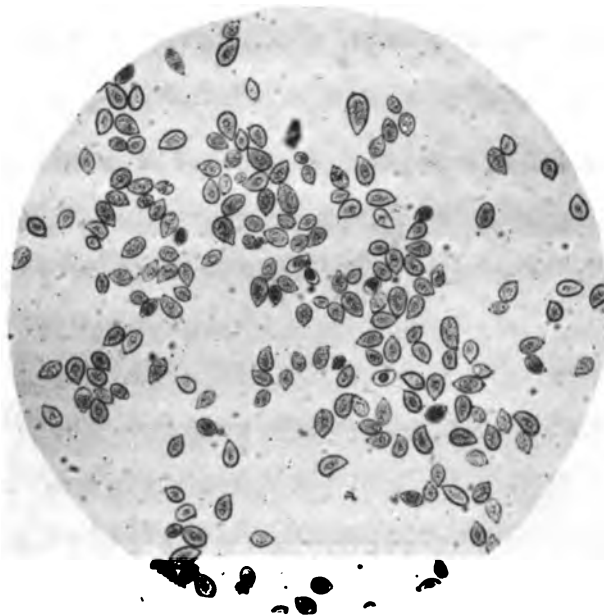


Fig. 8. Efecto inhibitor de la sustancia polifenólica correspondiente a la mancha N^o 6. (Cultivar UF-613) en la germinación de P. palmivora.

DISCUSION

Es bien sabido que el método preventivo constituye el medio más práctico y eficaz de combate de las enfermedades de las plantas, y que la piedra angular de dicho método estriba en la utilización de cultivares de alta resistencia y productividad.

Respecto de las poblaciones cacaoteras de América y Africa se sabe que están formadas por un material genético muy heterogéneo (5), y que tanto en un continente como en el otro se han encontrado árboles de cacao muy resistentes a ciertas razas de Phytophthora palmivora. Es pues razonable pensar que en ambas regiones aún existan individuos desconocidos que posean un alto grado de resistencia o tolerancia al citado patógeno, cuyo descubrimiento es responsabilidad del genetista. Sin embargo, es al patólogo y al fisiólogo a quienes corresponde la tarea de desarrollar y perfeccionar un método rápido y confiable a la vez que le permita al genetista reducir sustancialmente el largo proceso de mejoramiento del cacao.

Pero para llegar a elaborar tal método, antes es necesario contar con un conocimiento más preciso acerca de las interacciones más importantes entre la planta y el parásito en referencia. Es casualmente en este sentido que se cree que los resultados de la presente investigación pueden ser más útiles, por cuanto permiten dar una explicación más adecuada del mecanismo de la resistencia del cacao a la enfermedad llamada "mazorca negra".

Los resultados obtenidos a través de inoculaciones de frutos intactos de cacao concuerdan con los informes de SORIA y ESQUIVEL (36) y de HANSEN (15), en el sentido de que el cultivar UF-613 es altamente resistente a P. palmivora (ver los Cuadros 1 y 7), tanto bajo condiciones de campo como de laboratorio.

CUADRO 7. Diferencia en la respuesta de los cultivares UF-613 y UF-221 a la infección con Phytophthora palmivora bajo condiciones de campo.*

Cultivar	Año 59/60	Año 60/61	Año 61/62	Año 62/63	Año 63/64	Año 64/65	Promedio
UF-613	6,08**	4,19	9,73	7,87	5,31	9,88	7,17
UF-221	8,20	4,84	10,70	11,01	9,33	17,00	10,33

*

Según observaciones hechas por Soria y Esquivel (36)

**

Las cifras representan el porcentaje de frutos enfermos encontrados en cosechas quincenales sucesivas, de 30 árboles por cultivar.

Con relación a la distribución de las sustancias fenólicas en el fruto de cacao, se demostró que la concentración de las sustancias fenólicas en el fruto disminuye significativamente a medida que se profundiza en la cáscara (Cuadro 2). Estos resultados están de acuerdo con los encontrados por HILLIS y SWAIN (17) en ciruelo. A igual conclusión llegó TURNER (38) quien encontró que la actividad del sistema polifenol oxidosa era mayor en los tejidos externos del endocarpio. Según la clasificación empleada por este autor, el endocarpio externo es equivalente al tejido superficial (epicarpio) del fruto.

Otro aspecto importante de este trabajo es la confirmación de la observación hecha indirectamente por TURNER (38) en el sentido de que el contenido de las sustancias fenólicas disminuye significativamente con la maduración del fruto (Cuadro 3). Además, estos resultados concuerdan con los de HULME y EDNEY (19) en manzano, HILLIS Y SWAIN (17) en ciruelo y GOLDSTEIN y SWAIN (12) en banano, níspero, durazno y ciruelo. Cabe destacar aquí la relación inversa que existe entre la disminución del contenido de sustancias fenólicas que ocurre con el desarrollo del fruto de cacao y el incremento en la susceptibilidad a P. palmivora. Al respecto, HULME (18) encontró la misma tendencia cuando estudió la susceptibilidad de los frutos de manzano a Gloeosporium perennans.

Sin embargo, no debe pensarse que a mayor concentración de polifenoles debe corresponder una mayor resistencia, pues no siempre es tal el caso. En soporte de lo anterior puede aducirse el ejemplo del cultivar UF-221, el cual, no obstante ser más rico en fenoles totales y orto-fenoles que el UF-29, es significativamente más susceptible a P. palmivora que éste. En efecto, las pruebas biológicas realizadas con las sustancias fenólicas presentes en los cromatogramas demostraron que

muchas de ellas carecen de actividad fungitóxica (Cuadro 4, Fig. 7). Consecuentemente, lo correcto es relacionar sólo la concentración de fenóles biológicamente activos (manchas N^o 5, 6, 7 y 8) con el mecanismo de la resistencia.

La disminución de la resistencia de los frutos UF-613 y UF-29 que ocurrió con la maduración, aparentemente se debió a la desaparición de las sustancias fenólicas con alto poder fungitóxico y a la síntesis de nuevos compuestos menos activos. Al respecto, las pruebas realizadas con lavados de las manchas de los cromatogramas de frutos maduros (Cuadro 4) indicaron que solamente las números 9 y 11 poseen algún efecto inhibitor sobre la germinación indirecta, pero fueron inactivas sobre la formación del tubo germinativo de las zoosporas.

GOLDSTEIN y SWAIN (12) estudiaron las transformaciones que sufren los polifenoles durante el desarrollo de los frutos de varias especies, incluso Theobroma cacao, y concluyeron que el cambio se debe a la polimerización oxidativa de dichas sustancias que se lleva a cabo con el proceso de maduración.

Otro aspecto interesante es que el efecto inhibitor de las manchas N^o 5, 6, 7 y 8 no sólo se manifestó sobre la germinación indirecta sino también en la capacidad de las zoosporas para emitir tubos germinativos aún después de estar 2 horas y media en las correspondientes soluciones. Por otra parte, la germinación de las zoosporas en las demás soluciones (manchas N^o 1, 2, 3, 4, 9, 10, 11 y 12 en nada se distinguió de la que ocurrió en la solución testigo (lavado de una tira del cromatograma sin manchas).

Con base en los resultados expuestos puede concluirse que la resistencia de ciertos frutos de cacao a P. palmivora está directamente relacionada con la presencia en el epicarpio de determinadas sustancias fenólicas, y que el efecto fun

Los resultados obtenidos con las sustancias fenólicas conocidas demostraron (Cuadro 6) que tanto el ácido clorogénico como la quercetina y la cianidina tienen un alto poder inhibitor sobre la germinación indirecta de P. palmivora. Al respecto debe destacarse el hecho de que estas sustancias, al igual que las separadas cromatográficamente, actuaron de dos maneras distintas sobre las estructuras reproductivas del hongo: una fue sobre la germinación indirecta y la otra sobre la formación y desarrollo del tubo germinativo de las zoosporas. El ácido clorogénico, por ejemplo, inhibió completamente la germinación indirecta a la concentración 2,0 mM, y no mostró efecto alguno sobre la formación y crecimiento del tubo germinativo de la zoospora a concentraciones menores. En cambio, al nivel 2,0 mM la quercetina y la cianidina mostraron muy poca actividad sobre la germinación indirecta. Pero inhibieron completamente la germinación de las zoosporas. En lo que al ácido clorogénico se refiere, estos resultados concuerdan con los obtenidos por CHRISTIE (6) quien encontró que dicha sustancia carece de efecto tóxico en el crecimiento del micelio de Phytophthora cactorum y Phytophthora parasitica. Asimismo, JARVIS (20) halló que el ácido clorogénico y la D-catequina no inhiben el crecimiento del micelio de Phytophthora fragariae Hickman, a una concentración 1,0 mM.

Finalmente, HULME y EDNEY (19) reportaron que la cianidina impidió en casi ciento por ciento la germinación de las esporas de Gloeosporium perennas, pero no mencionan la concentración.

Es interesante mencionar que en el transcurso de este trabajo también se investigó el contenido de sustancias fenólicas en los tejidos leñosos de la cáscara del fruto de Theobroma mammosum. Los resultados (Cuadro 8) surgieron que en esta

gitóxico de éstas consiste en inhibir la germinación indirecta o impedir que las zoosporas formen tubos germinativos.

Este acerto encuentra respaldo en los resultados obtenidos por VALENTA y SISLER (39) quienes hallaron una sustancia en extractos del tallo de la variedad Piloy de frijol lima, la cual inhibe completamente la germinación de las zoosporas de la raza A de Phytophthora phaseoli Thaxter. Más aún, los citados autores demostraron que la sustancia fungitóxica aludida era un ácido fenólico, y llegaron a la conclusión de que dicha sustancia constituía el factor responsable de la resistencia. FIGARI (10) también arribó a una proposición semejante tras estudiar la base química de la resistencia del follaje de caucho, cultivar IAN-710, al hongo Dothidella ulei.

Ya se indicó que TURNER (38), SPENCE (37) y más recientemente PRENDERGAST y SPENCE (31), estudiaron separadamente el problema de la resistencia del cacao a P. palmivora en función de la actividad enzimática del sistema polifenol oxidasa. Es curioso que no obstante TURNER (38) demostró que la actividad del sistema enzimático en discusión no confiere resistencia al cacao, SPENCE (37), y PRENDERGAST y SPENCE (31) aún creen que la polifenol oxidasa juega un papel preponderante dentro del mecanismo de la resistencia. Sin embargo, debe añadirse que PRENDERGAST y SPENCE (31) también reconocieron la importancia que tienen las diferencias en composición fenólica de los distintos cultivares de cacao, por cierto ellos encontraron, por cromatografía, que ciertas sustancias presentes en los tejidos resistentes no aparecían en los susceptibles. Desafortunadamente para ellos, estos investigadores no efectuaron la prueba biológica de la capacidad fungitóxica de los compuestos aislados y en consecuencia no pudieron descubrir la verdadera función de las sustancias fenólicas como factor determinante del grado de resistencia en cacao.

especie las concentraciones de sustancias fenólicas totales y de orto-dihidroxi-fenoles son superiores a las encontradas en cualesquiera de las 3 clases de frutos de Theobroma cacao. No obstante ésto, y el hecho de que a esta especie se le considera inmune a P. palmivora, en la presente investigación no se pudo detectar los compuestos fenólicos fungitóxicos que aparecen en los frutos de cacao. Por lo tanto, antes de llegar a establecer el tipo de resistencia (física o química) en T. mammosum, debería efectuarse la prueba biológica para determinar la capacidad fungitóxica de los polifenoles respectivos.

CUADRO 8. Concentración de sustancias fenólicas totales y de orto-dihidroxi-fenoles en el epicarpio de frutos jóvenes, intermedios y maduros de Theobroma mammosum.

	Frutos jóvenes	Frutos intermedios	Frutos maduros
Fenoles Totales	26,0 ⁺	12,4	10,8
<u>Orto-dihidroxi</u> fenoles	18,0	8,4	7,0

⁺ Las cifras representan el promedio de 5 repeticiones y se expresan en mg/g de peso fresco.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en esta investigación se puede derivar las siguientes conclusiones:

1. Una explicación más adecuada del mecanismo de la resistencia del cacao a Phytophthora palmivora es que el factor determinante lo constituye la suma de las capacidades fungitóxicas de solamente algunas sustancias polifenólicas presentes en los tejidos, y no el total de éstas.
2. No debe generalizarse y decir que a una mayor concentración de sustancias fenólicas corresponde una mayor resistencia de los frutos de cacao a P. palmivora.
3. Existen grandes diferencias cualitativas y cuantitativas entre los cultivares de cacao con respecto a las sustancias fenólicas de la cáscara del fruto. Estas diferencias no sólo dependen del genotipo, sino también del tejido y la edad del fruto. Generalmente, el contenido total de polifenoles o de orto-dihidroxifenoles es más alto en el epicarpio de frutos jóvenes.
4. Algunas de las sustancias fenólicas del epicarpio de frutos jóvenes poseen un alto poder inhibidor sobre la germinación indirecta y la formación y desarrollo del tubo germinativo de las zoosporas de P. palmivora.
5. Las sustancias fungitóxicas sólo se encuentran en los frutos de los cultivares resistentes o tolerantes.
6. Algunas de las sustancias fenólicas conocidas que se utilizaron en esta investigación (pero que ocurren en frutos de cacao), también tienen efecto inhibidor sobre P. palmivora, y este efecto es independiente de la reacción (pH) del medio. En efecto, el ácido clorogénico y la quercetina inhiben fuertemente la germinación indirecta; además, la quercetina y la cianidina, inhiben poderosa-

mente la formación y crecimiento del tubo germinativo de las zoosporas; finalmente el ácido clorogénico es ineficaz al respecto y la D-catequina lo es en ambos sentidos.

7. La determinación de las sustancias fenólicas con actividad fungitóxica hacia P. palmivora puede servir de base para el desarrollo de un método eficaz para la selección de cultivares de cacao resistentes a la pudrición negra.
8. El efecto de la reacción del medio en la germinación indirecta de P. palmivora fue el siguiente: la germinación ocurre normalmente entre pH 4,8 y 11,2, siendo el rango óptimo de 5,5 a 9,1. Debajo de pH 3,2 y arriba de pH 11,8, la inhibición es total.

RESUMEN

Se investigó el mecanismo de la resistencia del cacao (Theobroma cacao L.) al hongo Phytophthora palmivora (Butl.) Butl., el cual causa la enfermedad llamada "mazorca negra del cacao". Se estudió el contenido y la actividad fungitóxica de las sustancias fenólicas presentes en los tejidos de los frutos de los cultivos UF-613, UF-29 y UF-221.

Además se investigó el efecto del pH y el poder inhibitor de algunas sustancias inorgánicas y fenólicas conocidas, tanto sobre la germinación indirecta como sobre la formación y crecimiento del tubo germinativo de las zoosporas de P. palmivora.

Se concluyó que el mecanismo de la resistencia de los frutos de Theobroma cacao es de naturaleza fisiológica, y que esta depende fundamentalmente de la presencia en el epicarpio de ciertas sustancias polifenólicas específicas, parcialmente identificadas, con capacidad para inhibir la germinación indirecta y la formación y desarrollo del tubo germinativo de las zoosporas de P. palmivora.

También se incluyó en este estudio la especie Theobroma mammosum, encontrándose que los frutos de ésta son más ricos en polifenoles totales y orto-dihidroxi fenoles que los de Theobroma cacao.

SUMMARY

The mechanism of the resistance of cacao (Theobroma cacao L.) to Phytophthora palmivora (Butl.) Butl., the causal agent of "black pod disease" was investigated. The content and the fungitoxic activity of the phenolic substances present in the tissues of the fruits from cultivars UF-613, UF-29 and UF-221, as well as the effect of pH and the inhibiting activity of some known inorganic and phenolic substances on the growth of P. palmivora were studied.

It was concluded that the mechanism of resistance of the pods of Theobroma cacao to P. palmivora is physiological in nature, and depends primarily on the presence of certain specific, partially identified, phenolic substances in the epicarp, which exhibit fungitoxic properties against both the indirect germination and growth of the germ tubes of P. palmivora zoospores.

The species Theobroma mammosum was also included in this work.

It was found that the fruits belonging to this species were richer in total polyphenols and orto-dihydroxyphenols than the fruits of Theobroma cacao.

LITERATURA CITADA

1. ANGEL, H. R., WALKER, J. C. y LINK, K. P. The relation of protocathechuic acid to disease resistance in the onion. *Phytopathology* 20(5):431-437. 1930.
2. ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Official methods of analysis. 8th ed. Washington, 1955. p. 144.
3. BROWNLEE, K. A. Statistical theory and methodology in science and engineering. New York, Wiley, 1960. 570 p.
4. BYRDE, R. J. W., FIELDING, A. H. y WILLIAMS, A. H. The role of oxidized poly phenols in the varietal resistance of apples to brown rot. In Pridham, J. B., ed. Phenolics in plant in health and disease. New York, Pergamon Press, 1960. pp.95-99.
5. CHEESMAN, E. E. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cacao populations. *Tropical Agriculture* 21(8):144-159. 1944.
6. CHRISTIE, T. The effect of some phenolic compounds upon the growth of two species of Phytophthora. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 8(3):630-635. 1965.
7. CUATRECASAS, J. Cacao and its allies. A taxonomic revision of the genus Theobroma. U.S. National Herbarium Contribution 35(6):379-607. 1964.
8. DIMOND, A. E. Natural models for plant chemotherapy. *Advances in Pest Control Research* 6:127-169. 1965.
9. ECHANDI, E. y FERNANDEZ, C. E. Relation between chlorogenic acid content and resistance to coffee canker incited by Ceratocystis fimbriata. *Phytopathology* 52(6):544-546. 1962.
10. FIGARI, A. Sustancias fenólicas tóxicas al hongo Dothidella ulei en hojas de clones de Hevea brasiliensis. *Turrialba* 15(2):103-110. 1965.
11. FLOOD, A. E. y KIKHAM, D. S. The effect of some phenolic compounds on the growth and sporulation of two Venturia species. In Pridham, J. B. ed. Phenolic in plant in health and disease. New York, Pergamon Press, 1960. pp. 81-85.
12. GOLDSTEIN, J. L. y SWAIN, T. Changes in tanins in ripening fruits. *Phytochemistry* 2(4):371-383. 1963.

13. GRIFFITHS, L. A. Phenolic acids and flavonoids of Theobroma cacao L. Separation and identification by paper chromatography. Biochemical Journal 70:120-125. 1958.
14. HALE, S. L. World production and consumption - 1951-1953. In Cocoa Chocolate and Confectionery Alliance, Ltd. Report of the Cocoa Conference, 1953. London, 1953. pp.3-11.
15. HANSEN, A. J. Resistance and susceptibility of cacao types to Ph. palmivora. Cacao (Costa Rica) 5(1):11-12. 1960.
16. HATHAWAY, D. E. Plant phenols and tanins. In Smith, I., ed. Chromatographic and electrophoretic techniques. 2a ed. London, Heinemann, 1960. pp. 308-354.
17. HILLIS, W. E. y SWAIN, T. The phenolic constituents of Prunus domestica. II. The analysis of tissues of the Victoria plum tree. Journal of the Science of Food and Agriculture 10(2):135-144. 1959.
18. HULME, A. C. Societé française de physiologie végétale. Réunion du 15 février, 1958. (Original no consultado; citado en Hulme, A. C. y Edney, K. L. Phenolic substances in the peel of cox's orange pippin apples with reference to infection by G. perennans. In Pridham, J. B. ed. Phenolic in plant in health and disease). New York, Pergamon Press, 1960. p. 88.
19. _____ y EDNEY, K. L. Phenolic substances in the peel of cox's orange pippin apples with reference to infection by G. perennans. In Pridham, J. B. ed. Phenolic in plant in health and disease. New York, Pergamon Press, 1960. pp.87-94.
20. JARVIS, W. R. Growth of isolates of Phytophthora fragariae Hickman in the presence of various polyphenols. Transactions British Mycological Society 44(3):357-364. 1961.
21. JOHNSON, G. y SCHAAL, L. A. Accumulation of phenolic substances and ascorbic acid in potato tuber tissue upon injury and their possible role in disease resistance. American Potato Journal 34(7):200-209. 1957.
22. _____ y SCHAAL, L. A. Relation of chlorogenic acid to scab resistance in potatoes. Science 115(2997):627-629. 1952.
23. KUC, J. et al. Chlorogenic and caffeic acids as fungistatic agents produced by potatoes in response to inoculation with Helminthosporium carbonum. Journal of American Chemical Society 78(13):3123-3125. 1956.
24. LE TORNEAU, D. et al. Effect of some phenols and quinones on growth in vitro of Verticillium albo-atrum. Phytopathology 47(10):602-606. 1957.

25. LEE, SHU-FUNG y LE TORNEAU, D. Chlorogenic acid content and Verticillium wilt resistance of potatoes. Phytopathology 48(5):268-274. 1958.
26. McLEAN, J. G. et al. Relation of histochemical tests for phenols to Verticillium wilt resistance of potatoes. Phytopathology 51(2):84-89. 1961.
27. MEDEIROS, A. G. A new method to assess resistance of cacao to Phytophthora palmivora (Abstract). In Conference Internationale sur les Recherches Agronomiques Cacaoyeres, Abidjan, 15-20 noviembre, 1965. s.n.t. 1 p. (mimeografiado).
28. MULLER, K. O. Studies on phytoalexins. I. The formation and the immunological significance of phytoalexin produced by Phaseolus vulgaris in response to infection with Sclerotinia fructicola and Phytophthora infestans. Australian Journal of Biological Science 11(3):275-300. 1958.
29. ORELLANA, R. G. Growth of Phytophthora palmivora of cacao in liquid media containing cacao shell from different clones as a basis for assesment of resistance. In Conferencia Interamericana de Cacao, 5a, Turrialba, Costa Rica, 1954. Trabajos presentados. Turrialba, Costa Rica, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, 1954. Vol. 1, sección "Fitopatología", Doc. 29. 3p. (mimeografiado).
30. PATIL, S. S. et al. Relation of chlorogenic acid and free phenols in potato roots to infection by Verticillium albo-atrum. Phytopathology 54(5):531-535. 1964.
31. PRENDERGAST, N. W. y SPENCE, J. A. A contribution to the study of the resistance of Theobroma cacao L. to Phytophthora palmivora (Butl.) Butl. In Conference Internationale sur les Recherches Agronomiques Cacaoyeres, Abidjan, 15-20, noviembre, 1965. s.n.t. 12 p. (mimeografiado).
32. ROCHA, H. M. Cacao varieties resistant to Phytophthora palmivora. A literature review. Cacao (Costa Rica) 10(1):1-9. 1965.
33. SCHAAL, L. A. y JOHNSON, G. The inhibitory effect of some phenolic compounds on the growth of Streptomyces scabies as related to mechanism of scab resistance. Phytopathology 45(11):626-628. 1955.
34. SNEDECOR, G. W. Statistical methods. Iowa State College Press, 1965 534 p.
35. SORIA, J. y ESQUIVEL, O. Comparación de plantas de estacas de injertos y de semillas de seis clones UF - (Turrialba). Cacao (Costa Rica) 6(3):16. 1961.

36. _____ y ESQUIVEL, O. Niveles de infección de Phytophthora palmivora sobre cultivares de cacao en condiciones de campo. Fitotecnia Latinoamericana (Costa Rica) 3(1). 1966. (En prensa).
37. SPENCE, J. A. Black-pod disease of cacao. II. A study of host-parasite relations. Annals of applied biology 49(4):723-734. 1961.
38. TURNER, P. D. Polyphenoloxidase activity in cacao selections showing variable resistance to Phytophthora pod rot. Plant Disease Report 49(4):319-321. 1965.
39. VALENTA, J. R. y SISLER, H. D. Evidence for a chemical basis of resistance of lima bean plants to downy mildew. Phytopathology 52(10):1030-1037. 1962.
40. VALLE, E. On anti-fungal factors in potato leaves. Acta Chemical Scandinavica 11(2):395-397. 1957.
41. WALKER, J. C. y LINK, K. P. Toxicity of phenolics compounds to certain onion bulb parasites. Botanical Gazette 96(3):468-484. 1935.
42. _____ et al. Further studies on toxicity of extracted onion juice. Journal of Agricultural Research 30(2):175-187. 1925.