

Thesis

F471

SUSTANCIAS FENOLICAS TOXICAS AL HONGO
Dothidella ulei COMO POSIBLES CAUSAS
DE LA RESISTENCIA, EN HOJAS DE CLONES
DE Hevea brasiliensis

por:

ALEJANDRO FIGARI RUBINA

B147

SUSTANCIAS FENOLICAS TOXICAS AL HONGO Dothidella ulei COMO POSIBLES
CAUSAS DE LA RESISTENCIA, EN HOJAS DE CLONES DE Hevea brasiliensis

por

↙
ALEJANDRO FIGARI RUBINA

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

Turrialba, Costa Rica

Junio de 1964

Thesis
F471

INSTITUTO INTERAMERICANO DE CIENCIAS AGRICOLAS
TURRIALBA, COSTA RICA



SUSTANCIAS FENOLICAS TOXICAS AL HONGO Dothidella ulei COMO POSIBLES
CAUSAS DE LA RESISTENCIA, EN HOJAS DE CLONES DE Hevea brasiliensis

Tesis

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

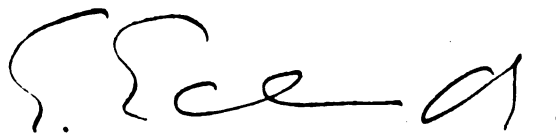
de

Magister Scientiae

en el

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

APROBADA:



Consejero

Eddie Echandi Ph.D.



Comité

Edilberto Camacho Mag. Agr.



Comité

Manuel Ibáñez Ph.D.



Comité

Pierre G. Sylvain Ph.D.

Junio de 1964

A mis Padres

AGRADECIMIENTOS

El autor desea expresar sus sinceros agradecimientos a las siguientes personas e instituciones:

Al Dr. Eddie Echandi, consejero principal, cuya valiosa ayuda y acertada dirección hicieron posible la realización de esta tesis.

Al Ing. Edilberto Camacho, y a los Doctores Manuel Ibáñez y Pierre G. Sylvain, miembros de su comité consejero.

Al Servicio de Investigación y Promoción Agraria del Perú (SIPA), y a la Agencia para el Desarrollo Internacional (AID), por la oportunidad que le dieron para llevar a cabo sus estudios postgraduados.



BIOGRAFIA

El autor nació en Lima, República del Perú, en el año 1933.

Realizó sus estudios universitarios en la Escuela Nacional de Agricultura "La Molina", Lima, Perú, en donde se graduó de Ingeniero Agrónomo.

De 1959 a 1962 trabajó en el Departamento de Jefe de la Estación Experimental Agrícola de Tingo María, y a su regreso al Perú estará a cargo de la Jefatura del Departamento de Arboricultura de la misma Estación.

Realizó sus estudios postgraduados en el Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A., en Turrialba, Costa Rica, de octubre de 1962 a junio de 1964, fecha en que recibió su grado de Magister Scientiae.



TABLA DE CONTENIDO

	Página
Lista de Cuadros	vii
Lista de Figuras	viii
INTRODUCCION	1
REVISION DE LITERATURA	2
I. La enfermedad sudamericana de la hoja	2
Sintomatología	2
Organismo causal	2
Hospedero	3
Naturaleza de la resistencia	5
II. Importancia de los fenoles en la resistencia a enfermedades	6
MATERIALES Y METODOS	10
RESULTADOS	15
Pruebas de germinación de las conidias en extractos acuosos de hojas de hule	15
Pruebas de germinación de las conidias en compuestos fenólicos	20
R _f de la sustancia tóxica	20
Cromatografía	21
DISCUSION	25
RESUMEN	28
SUMMARY	29
LITERATURA CITADA	30

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

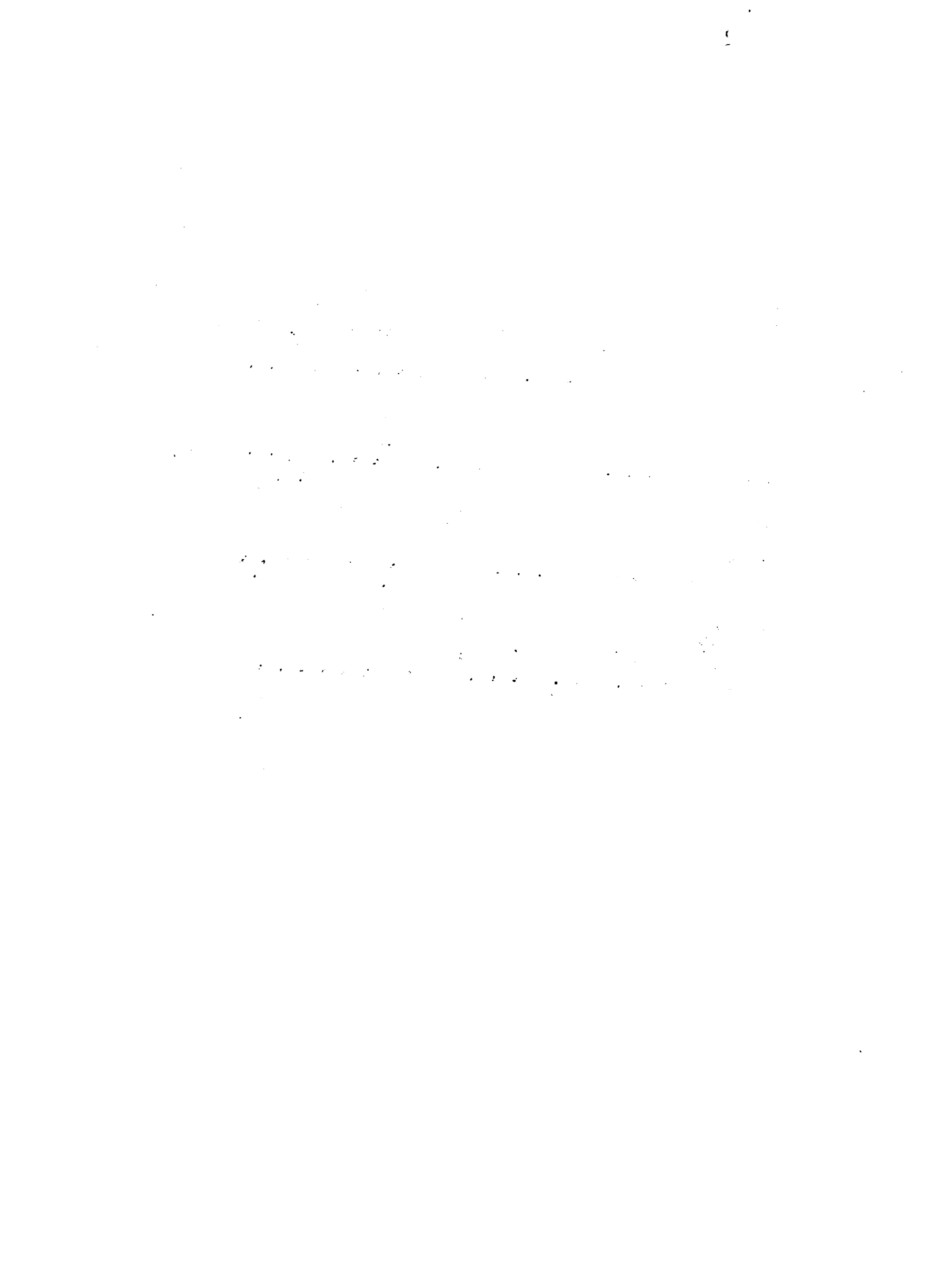
121

122

123

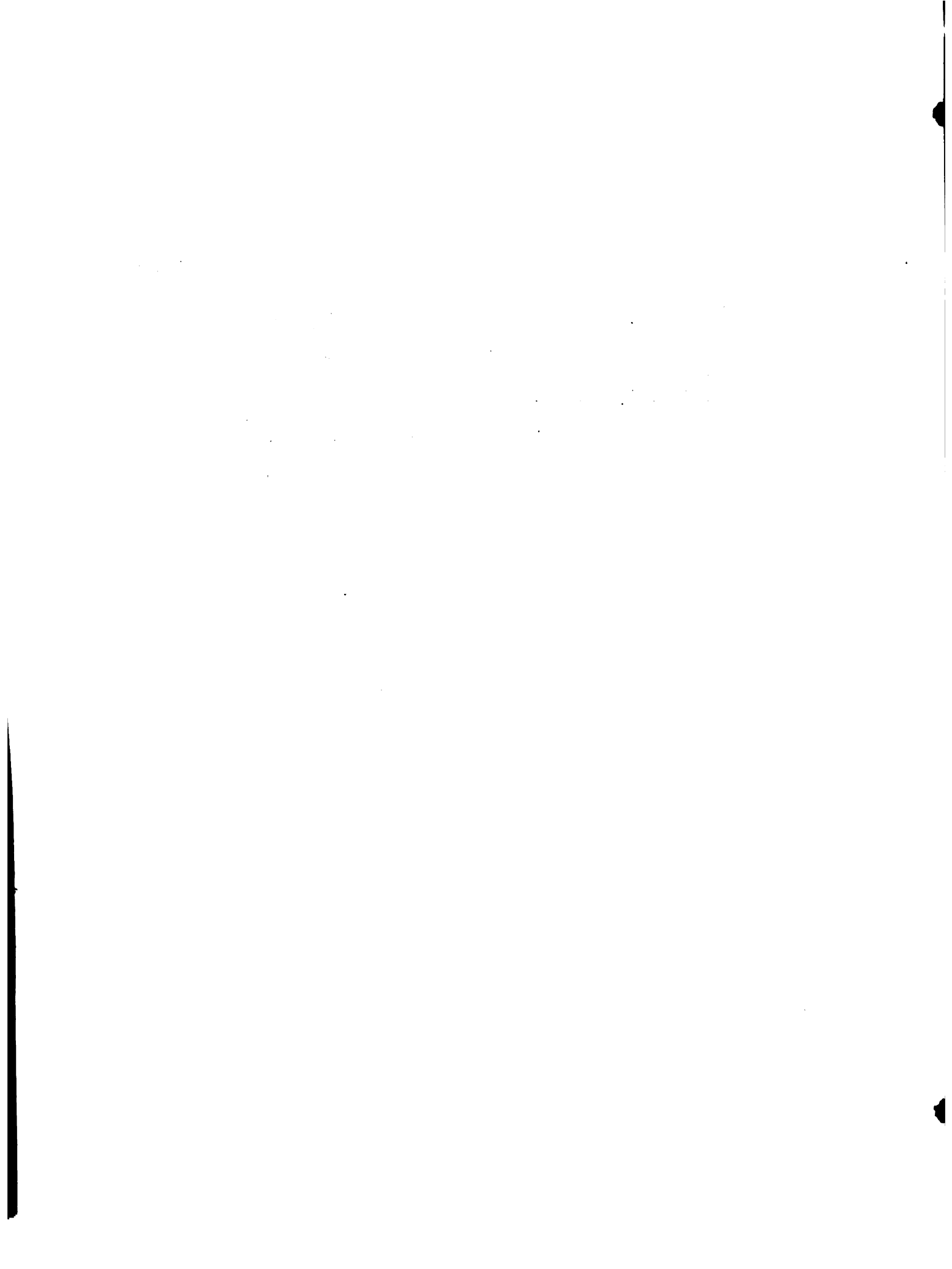
LISTA DE CUADROS

Cuadro N ^o		Página
1	Porcentajes de inhibición de la germinación de las conidias de <i>D. ulei</i> en extractos acuosos de hojas de los clones IAN-710 resistente y GA-1126 susceptible. Cada dato proviene del promedio de 4 repeticiones	16
2	Dosis medianas efectivas (ED_{50}) de los extractos de los clones IAN-710 resistente y GA-1126 susceptible	17
3	Valor de los R_f y de los porcentajes de inhibición de la germinación de las conidias, observados sobre cromatogramas. Estos datos representan el promedio de 2 observaciones	21
4	Reacciones de color de la mancha amarilla en cromatogramas tratados con diferentes reveladores y observados a la luz del día y con luz ultravioleta de onda larga	23



LISTA DE FIGURAS

Figura N ^o		Página
1	Efecto de los extractos de hojas de los grupos de clasificación II, III, V, de los clones desarrollados en el invernadero, sobre los porcentajes de inhibición de la germinación de las conidias	18
2	Efecto de los extractos de hojas de los grupos de clasificación III, V, de los clones desarrollados en los viveros, sobre los porcentajes de inhibición de la germinación de las conidias	19

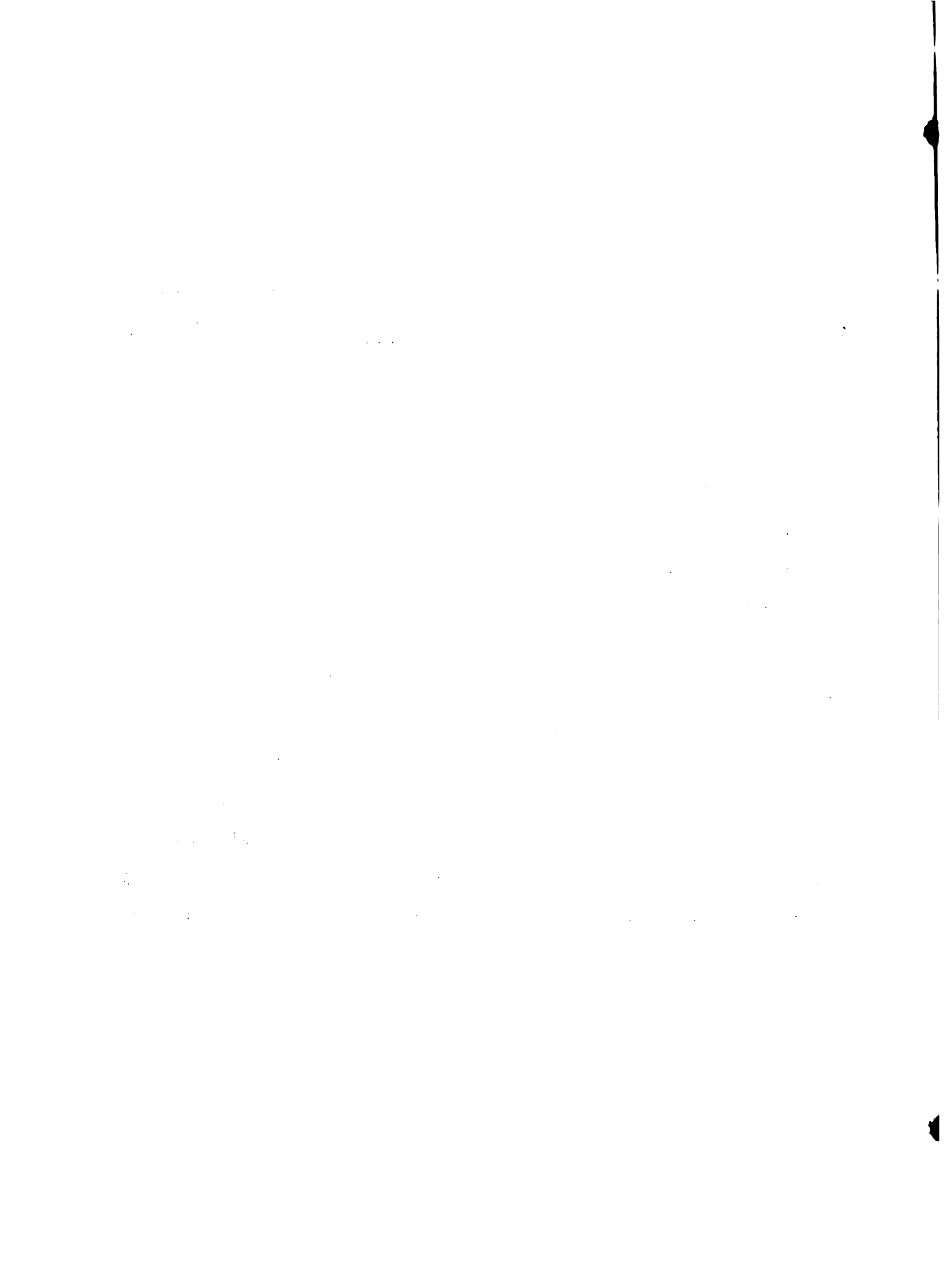


INTRODUCCION

La enfermedad sudamericana de la hoja, es una de las enfermedades más importantes del árbol del hule, Hevea brasiliensis (Muell.) Arg., en los trópicos americanos. Esta enfermedad provocada por el hongo Dothidella ulei P. Henn., ha causado la destrucción de miles de hectáreas de hule en las Guayanas, Trinidad, Brasil y el resto de países de la cuenca amazónica. Actualmente se considera un factor limitante en la producción de caucho en la América Tropical, y su propagación a otros centros productores de caucho del mundo, es motivo de constante preocupación.

El combate de la enfermedad se realiza en las plantaciones de Hevea utilizando clones resistentes, y la obtención de estos clones es uno de los objetivos principales de los programas de hule existentes en algunos países americanos. Ultimamente se han desarrollado razas del hongo capaces de atacar algunos clones considerados resistentes.

El presente trabajo tiene por objeto investigar la existencia y naturaleza de posibles sustancias tóxicas al hongo D. ulei en las hojas de algunos clones de hule resistentes a la enfermedad sudamericana de la hoja.



REVISION DE LITERATURA

I. La enfermedad sudamericana de la hoja

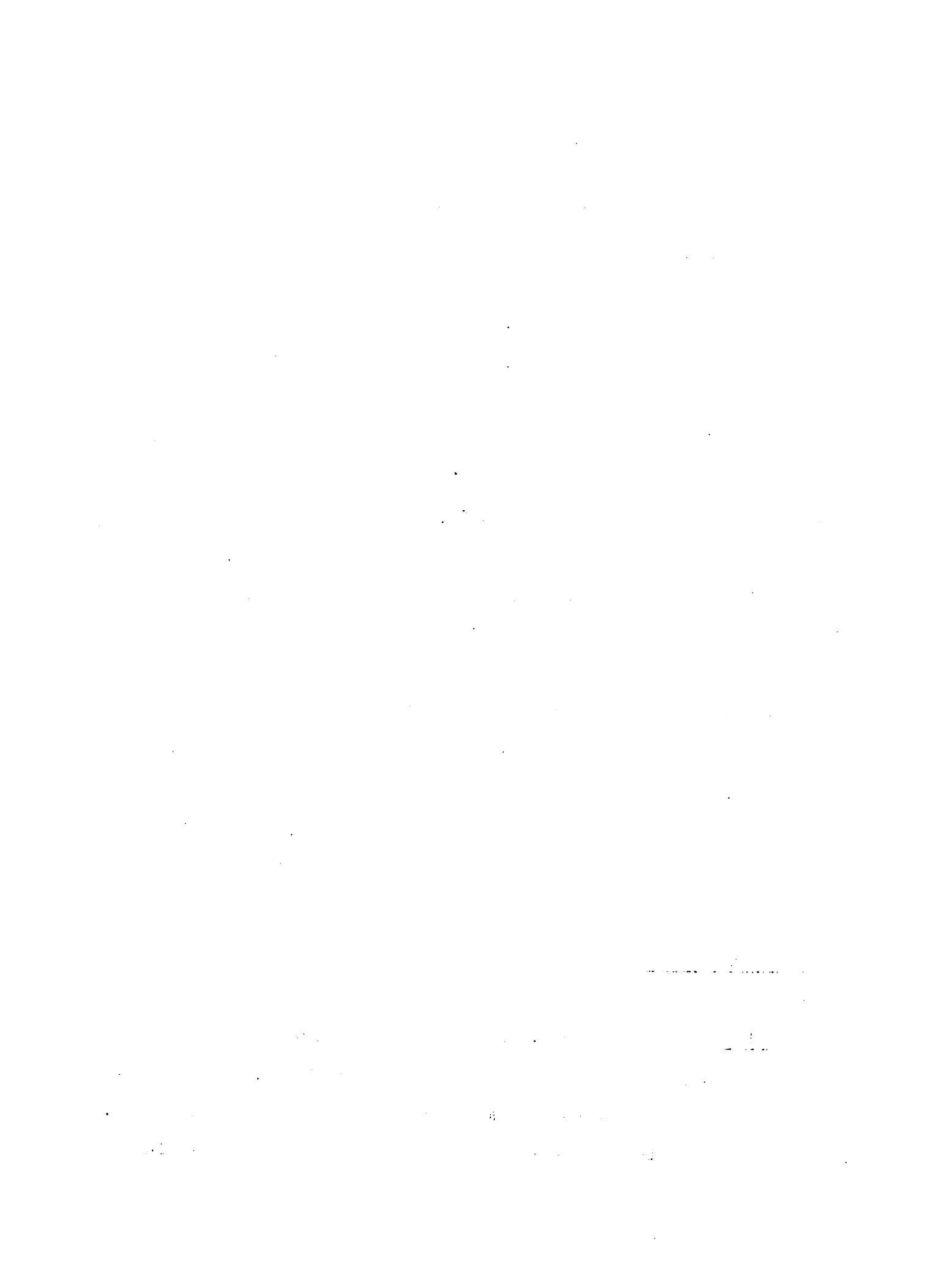
Sintomatología

Los síntomas foliares de la enfermedad varían con la edad de las hojas y la intensidad del ataque. La intensidad del ataque depende de la susceptibilidad del hospedero, de la cantidad de inóculo presente, y de las condiciones ambientales. Las hojas muy jóvenes de plantas susceptibles según LANGFORD (17), se cubren de masas de conidias de color verde oliva que aparecen 8 días después de la infección. Los ataques intensos causan una rápida defoliación, y los de mediana intensidad provocan una defoliación parcial y deformaciones en las hojas, que permanecen adheridas a la planta y cubiertas de masas de conidias. Los tallos jóvenes, las flores, y los frutos jóvenes son atacados por la enfermedad.

En las hojas jóvenes, entre 12 y 20 días de edad, el síntoma característico es la presencia de manchas opacas aterciopeladas de color verde grisáceo. Estas hojas más tarde presentan perforaciones en cuyo alrededor se forman anillos negros de consistencia dura, constituidos por los picnidios del hongo. Las hojas viejas con la cutícula endurecida son resistentes a la enfermedad.

Organismo causal

El organismo causal de la enfermedad sudamericana de la hoja es el hongo Dothidella ulei P. Henn. El hongo según STAHEL, citado por LANGFORD (17), presenta tres tipos de esporas: conidias, picnidiosporas, y ascosporas. LANGFORD y STAHEL, concuerdan en que las conidias, juegan el papel principal en la diseminación de la enfermedad; sin



embargo, se ha demostrado que las ascosporas acarreadas por el viento son también de importancia en la diseminación.

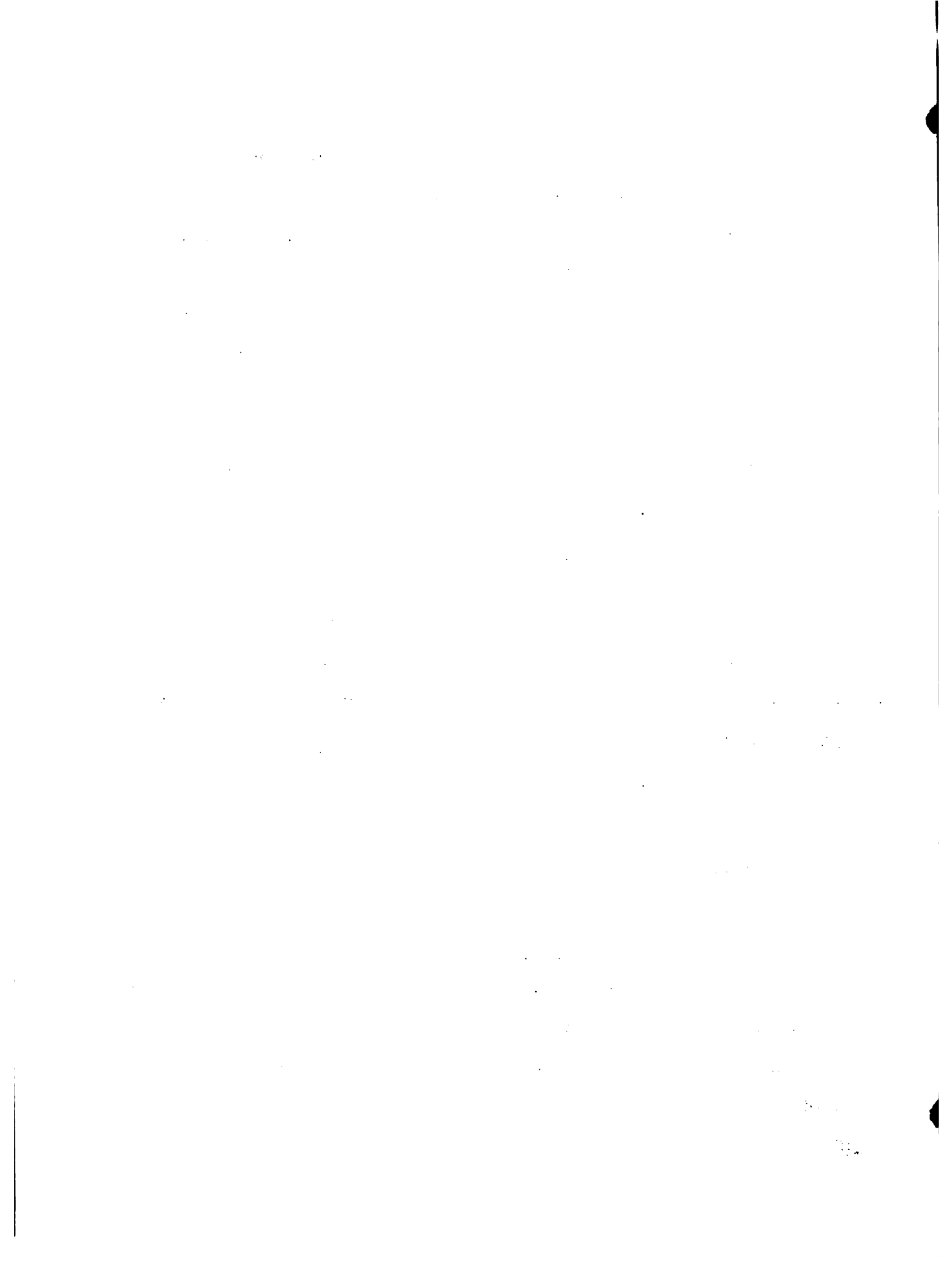
Las conidias varían apreciablemente en color, forma, y tamaño. En cuanto a color varían de hialino a oliváceo. Pueden ser mono o bicelulares, y miden 5 a 8 x 12 a 30 μ . Las ascosporas son más uniformes que las conidias; son hialinas, bicelulares, y miden 4 x 13 μ . Bajo las condiciones prevalentes en los trópicos húmedos americanos, las conidias y las ascosporas permanecen viables por varios días.

Algunos investigadores, han considerado este hongo un parásito obligado (17); sin embargo, LANGFORD (17), BLAZQUEZ y OWEN (4), y LANGDON (16), han obtenido colonias in vitro, utilizando medios artificiales.

En el año 1959 LANGFORD (18, 19) observó en Costa Rica, que la enfermedad atacaba a numerosas progenies del clon F-4542 que hasta entonces habían permanecido resistentes, y atribuyó este ataque a una raza nueva del hongo. Recientemente LANGDON (16), confirmó la observación de LANGFORD mediante inoculaciones con cepas de D. ulei procedentes de Costa Rica y Guatemala.

Hospedero

La enfermedad sudamericana de la hoja afecta solamente especies del género Hevea, y dentro de éste se observa gran variación en resistencia y susceptibilidad. Clones de Hevea brasiliensis, procedentes de ciertas zonas del valle del Amazonas, han mostrado según LANGFORD (17), una alta resistencia a la enfermedad, mientras que aquéllos obtenidos de otras localidades del valle tales como el área del río Tapajoz, de donde Henry Wickham obtuvo las semillas para establecer la industria de Hevea del oriente, se han mostrado altamente susceptibles (17).



Los trabajos de selección y mejoramiento para la obtención de clones resistentes y de alta producción se iniciaron en Brasil en el año 1937. Estos trabajos según BAPTISTE (2), fueron iniciados por la Compañía Ford, y continuados más tarde por la misma compañía y el Instituto Agronomico do Norte (Brasil) en colaboración con el gobierno de los Estados Unidos de América.

Las primeras plantas resistentes se obtuvieron de la plantación de Fordlandia, que en el año 1933 fue prácticamente destruída por la enfermedad. BAPTISTE (2) informa sobre la historia de esta plantación. Dicha plantación se sembró con material proveniente del área del río Tapajoz, de Belem, y de zonas del alto Amazonas. En la epifitía que destruyó la plantación de Fordlandia, las plantas provenientes de la zona del río Tapajoz se mostraron altamente susceptibles, mientras que algunas de las plantas procedentes de las otras zonas se mostraron resistentes. Las plantas resistentes sirvieron para salvar la plantación de Belterra, ya que en ésta se injertó con copas de estos clones resistentes. A estos primeros clones procedentes de la plantación de Fordlandia, se les denominó clones Ford y se les designó con la letra F; posteriormente aparecieron los clones FB (Ford Belem), FX (clones orientales x clones Ford), y los IAN (Instituto Agronomico do Norte) que proceden de los cruces hechos a partir de 1945.

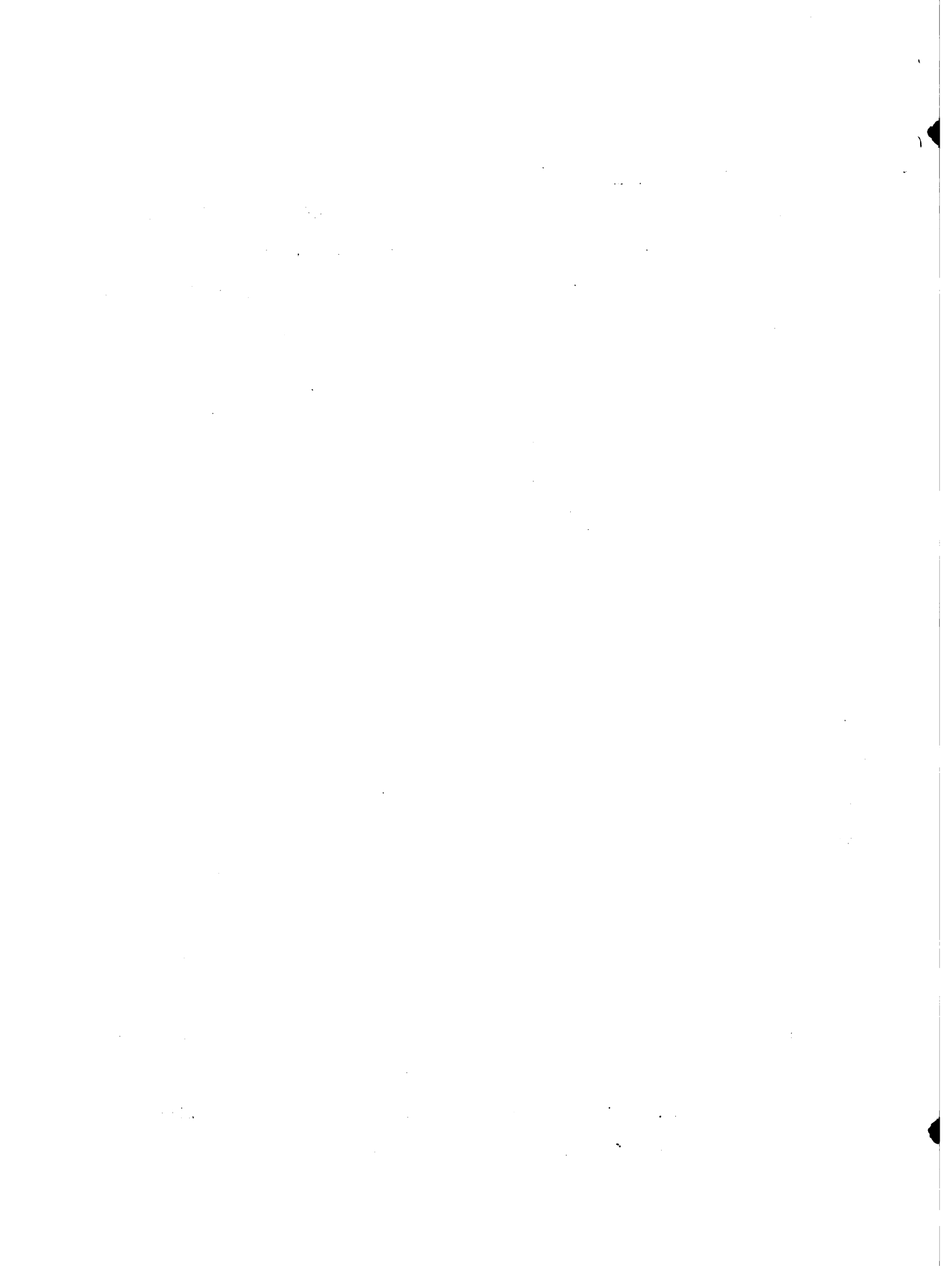
En el presente trabajo se ha utilizado el clon IAN-710 (resistente y buen productor) y el clon oriental GA-1126 (susceptible pero de alta producción).



Naturaleza de la resistencia

En un estudio histológico del agente causal, BLAZQUEZ y OWEN (5) determinaron que en condiciones de 100% de humedad relativa la expresión de los síntomas es rápida en los clones susceptibles y resistentes; posteriormente sin embargo, en las lesiones de los clones susceptibles se observa la esporulación del hongo, lo que no ocurre en los clones resistentes. Los mismos investigadores (5) observaron diferencias en los tubos germinativos de las conidias inoculadas en hojas de clones susceptibles y resistentes; en el último caso las conidias tienen tubos germinativos más cortos, y con frecuencia presentan apresorios.

LANGFORD (17) informa que la naturaleza de la resistencia en las hojas maduras de los clones susceptibles, es similar en muchos aspectos a la de las hojas jóvenes de los clones resistentes; tal resistencia fue atribuída por BLAZQUEZ y OWEN (4) a una alta concentración de quebrachitol (2 mono metil eter de i-inositol), que aparece en el látex de plantas de hule. Esta hipótesis tuvo como base la similitud existente entre el quebrachitol y el i-inositol que según observaciones de BARNETT y LILLY (3) es tóxico en altas concentraciones al hongo Sclerotinia camelliae. En trabajos posteriores BLAZQUEZ y OWEN (5) obtuvieron resultados que indican claramente que el quebrachitol no es la sustancia responsable de la resistencia, y observaron en esta oportunidad la presencia de un compuesto de color amarillo que ocurre intercelularmente en el borde de las lesiones foliares de los clones resistentes. Este compuesto que no fue observado en las hojas enfermas de los clones susceptibles, según estos autores, es un tanino o una toxina producida por la interacción del hongo y la planta.



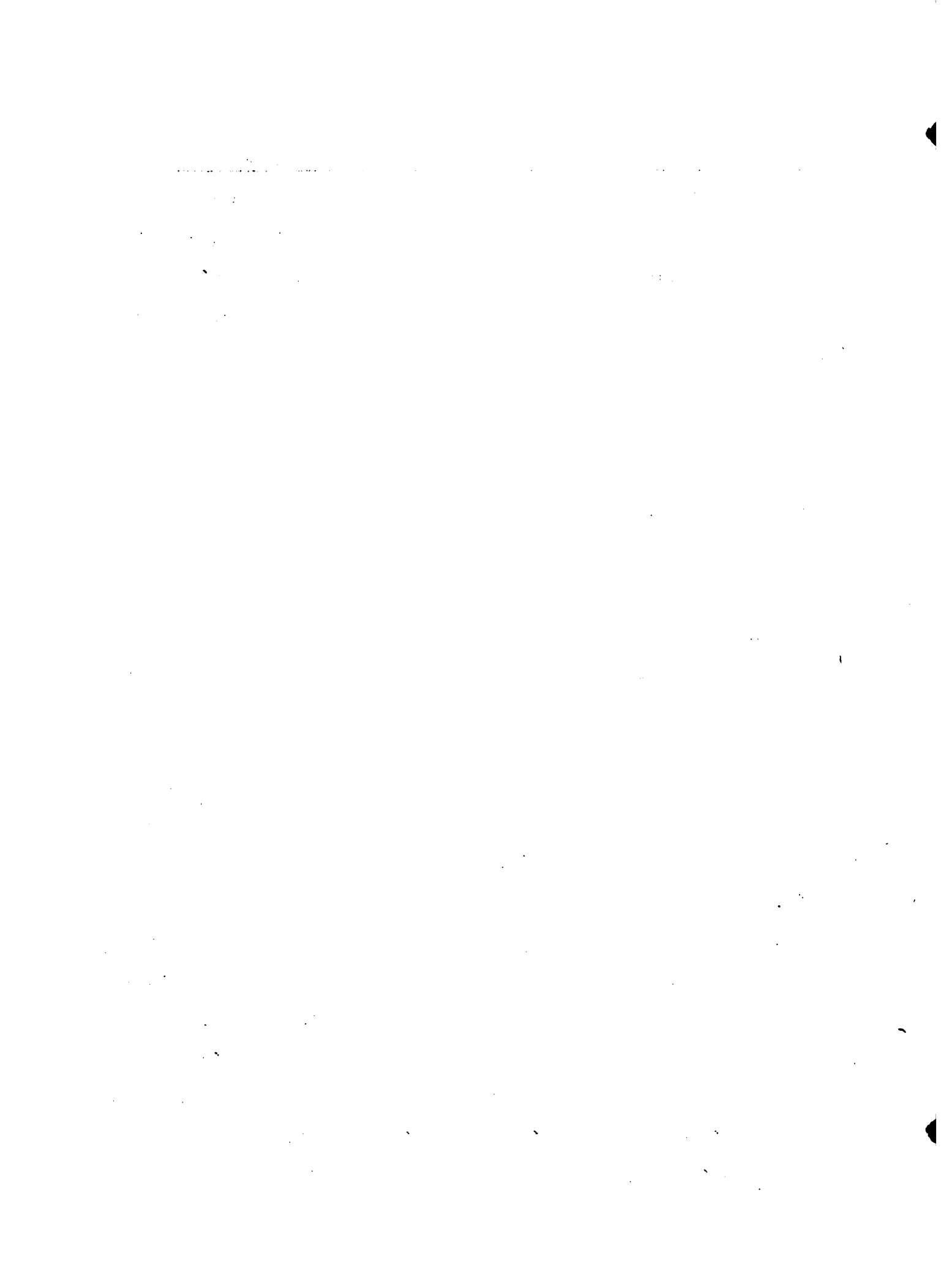
II. Importancia de los fenoles en la resistencia a enfermedades

En los tejidos vegetales existe una gran cantidad de compuestos simples y complejos que poseen grupos fenólicos hidroxilados, cuya importancia en el ciclo vegetativo de las plantas es cada vez más evidente. La importancia que estos compuestos tienen como sustancias fungotóxicas se ha puesto de manifiesto en los trabajos realizados sobre resistencia a enfermedades.

Los primeros en explicar satisfactoriamente la base química de la resistencia de las plantas a patógenos específicos fueron WALKER y colaboradores (26, 27, 28). Posteriormente ANGEL, WALKER, y LINK (1) identificaron los compuestos activos responsables de la resistencia, y determinaron que la antracnosis de la cebolla causada por el hongo Colletotrichum circinans, y la podredumbre de la cebolla provocada por varias especies de Botrytis no se desarrollaban en bulbos coloreados, debido a la presencia de ácido protocatéquico y catecol.

Ultimamente muchos otros investigadores han encontrado evidencia que permite relacionar la resistencia a enfermedades con la presencia de sustancias fenólicas en las plantas. Los diferentes grados de resistencia de la papa al tizón tardío, han constituido un problema de mucho interés. La sustancia existente en la parte aérea de la planta de papa, que es tóxica al hongo Phytophthora infestans, ha sido recientemente estudiada por VALLE, citado por HATHAWAY (13). El demostró que el ácido clorogénico es el compuesto predominante en las hojas de papa, pero tuvo dificultades al evaluar su importancia como agente fungotóxico, ya que en este caso la oxidación del ácido clorogénico da lugar a una quinona que es más activa que el ácido clorogénico en sí.

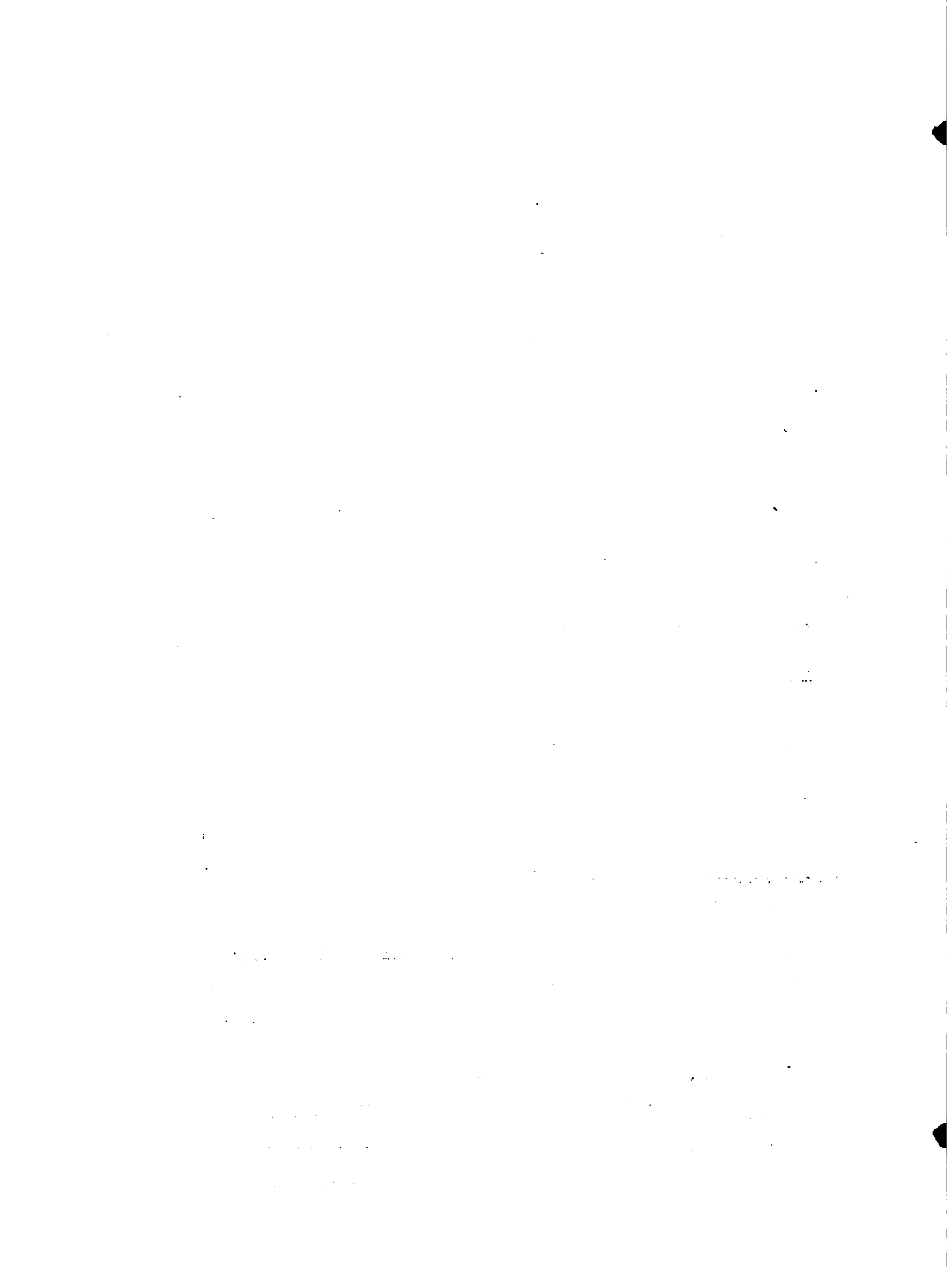
La relación entre el contenido de ácido clorogénico de las hojas



de papa y la resistencia al tizón tardío, ha sido también investigada por SOKOLOVA citado por HATHAWAY (13). Este investigador señala que la inoculación con Phytophthora infestans produce en las plantas susceptibles una movilización del ácido clorogénico, que no alcanza a protegerlas contra la infección; mientras que en las plantas resistentes inoculadas, se observa una disminución aparente en el nivel del ácido clorogénico y la formación de ácido cafeico y otras sustancias fenólicas. La hipótesis expuesta por SOKOLOVA, es que la inoculación con el patógeno estimula la movilización del ácido clorogénico, el cual sufre cambios químicos que dan lugar a compuestos que actúan como barreras al ataque de la enfermedad. Esta hipótesis está de acuerdo con lo que informan SHAAL y JOHNSON (24), que indican que los productos auto-oxidados del ácido clorogénico y el ácido cafeico son más tóxicos al Streptomyces scabies que los fenoles de los cuales derivan.

El contenido de ácido clorogénico y ácido cafeico tiene también influencia en la susceptibilidad de la papa a otras enfermedades. KUC et al (15) informan que la presencia de estos ácidos en las hojas está estrechamente vinculada a la inmunidad de la papa al ataque del Helminthosporium carbonum; y PATIL (22) ha encontrado relación entre el contenido de ácido clorogénico y fenoles libres en las raíces de papa, y la susceptibilidad al ataque del Verticillium albo-atrum.

En el manzano se han hecho numerosos estudios relacionados con la resistencia a enfermedades y la presencia de sustancias fenólicas en la planta. BYRDE, FIELDING, y WILLIAMS (6) encontraron una relación inversa entre la proporción de frutos infectados con Sclerotinia fructigena, y el grado de coloración marrón del tejido herido infectado. Ellos informan que los polifenoles del fruto que se oxidan al producirse las



heridas, inactivan a las enzimas pectolíticas del hongo, impidiendo de esta manera el progreso de la enfermedad.

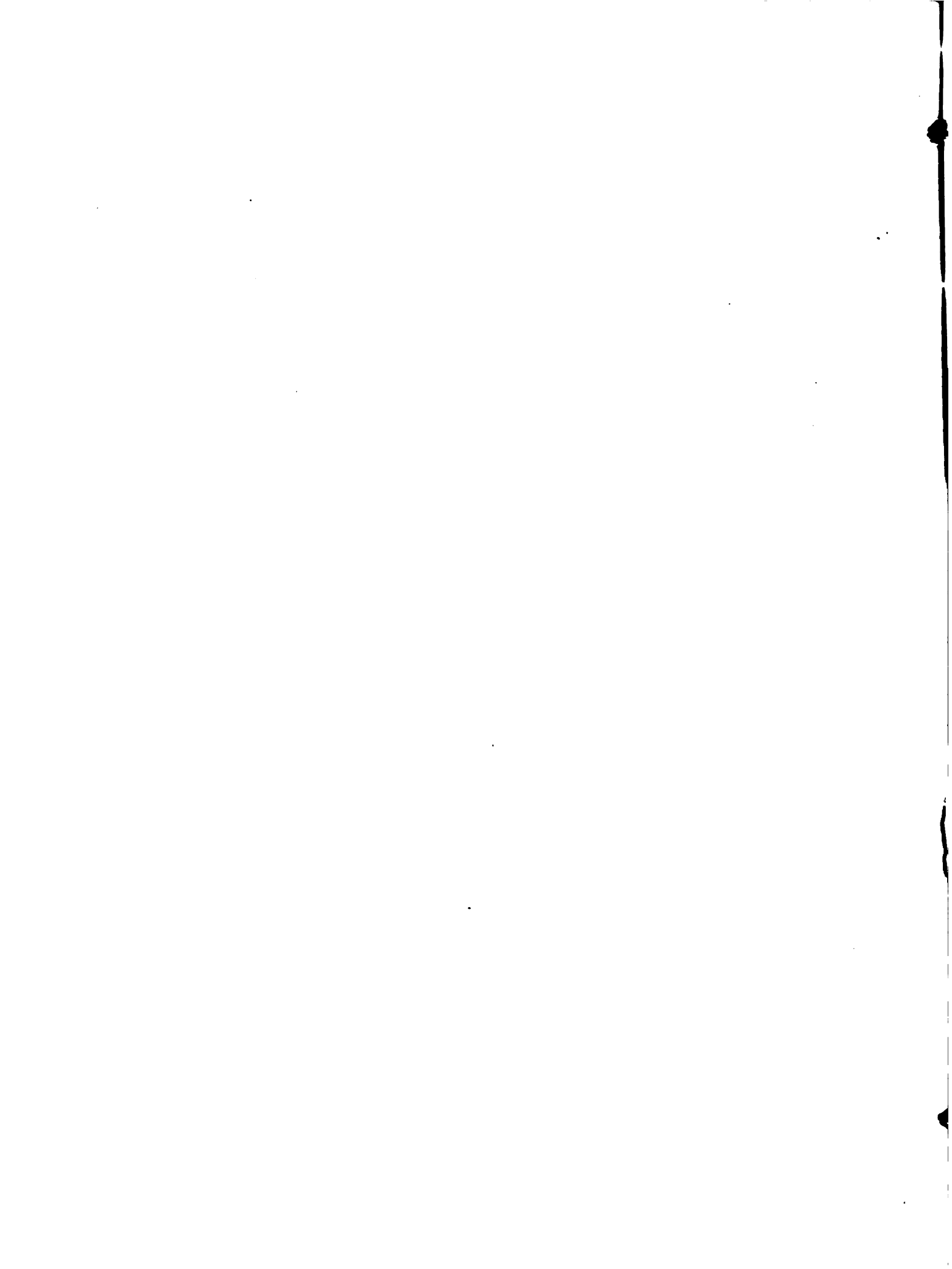
La cáscara de los frutos del manzano y la cera de sus hojas contienen compuestos fenólicos. MARTIN, BATT, y BURCHILL (21) señalan que la cera de las hojas de las plantas resistentes al oídio, contiene compuestos fenólicos que inhiben la germinación de esporas de Podosphaera leucotricha. HULME y EDNEY (14) encontraron paralelismo entre el aumento de la susceptibilidad de las manzanas al ataque del Gloeosporium perennans, y la disminución del ácido clorogénico en la cáscara del fruto.

El efecto de ciertos compuestos fenólicos del manzano en la esporulación del hongo Venturia inaequalis, ha sido investigado por FLOOD y KIRKHAM (9). Estos investigadores encontraron que extractos de dos variedades de manzano, una altamente resistente y la otra de menor resistencia al ataque del hongo, inhiben la esporulación de razas de diferente patogenicidad del hongo, aunque no en el mismo grado; y que cuando se usaron concentraciones altas de los extractos de ambas variedades, desaparecían las diferencias en la inhibición de la esporulación de las razas de Venturia inaequalis. Los análisis cromatográficos de los dos extractos demostraron que solamente existían diferencias cuantitativas entre ellos, conteniendo los dos ácido clorogénico.

En un trabajo efectuado en el Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas en Turrialba, ECHANDI y FERNANDEZ (7) encontraron que las plantas resistentes a la llaga macana o cáncer del cafeto, causado por el hongo Ceratocystis fimbriata, contienen más ácido clorogénico que las plantas susceptibles, y que el ácido clorogénico en la concentración que aparece en las plantas resistentes, es altamente tóxico al hongo.



Un grupo de compuestos relacionados con los fenoles, son los flavonoles que se encuentran en las plantas formando parte de los antocianinos y otros pigmentos. La desintegración de los flavonoles produce compuestos fenólicos. NAGHSKI, COPLEY, y COUCH citados por ECHANDI (8) afirman que los flavonoles tienen efecto antagonístico a gran número de patógenos de las plantas, siendo la quercitina el flavonol más activo de cuantos ellos investigaron.



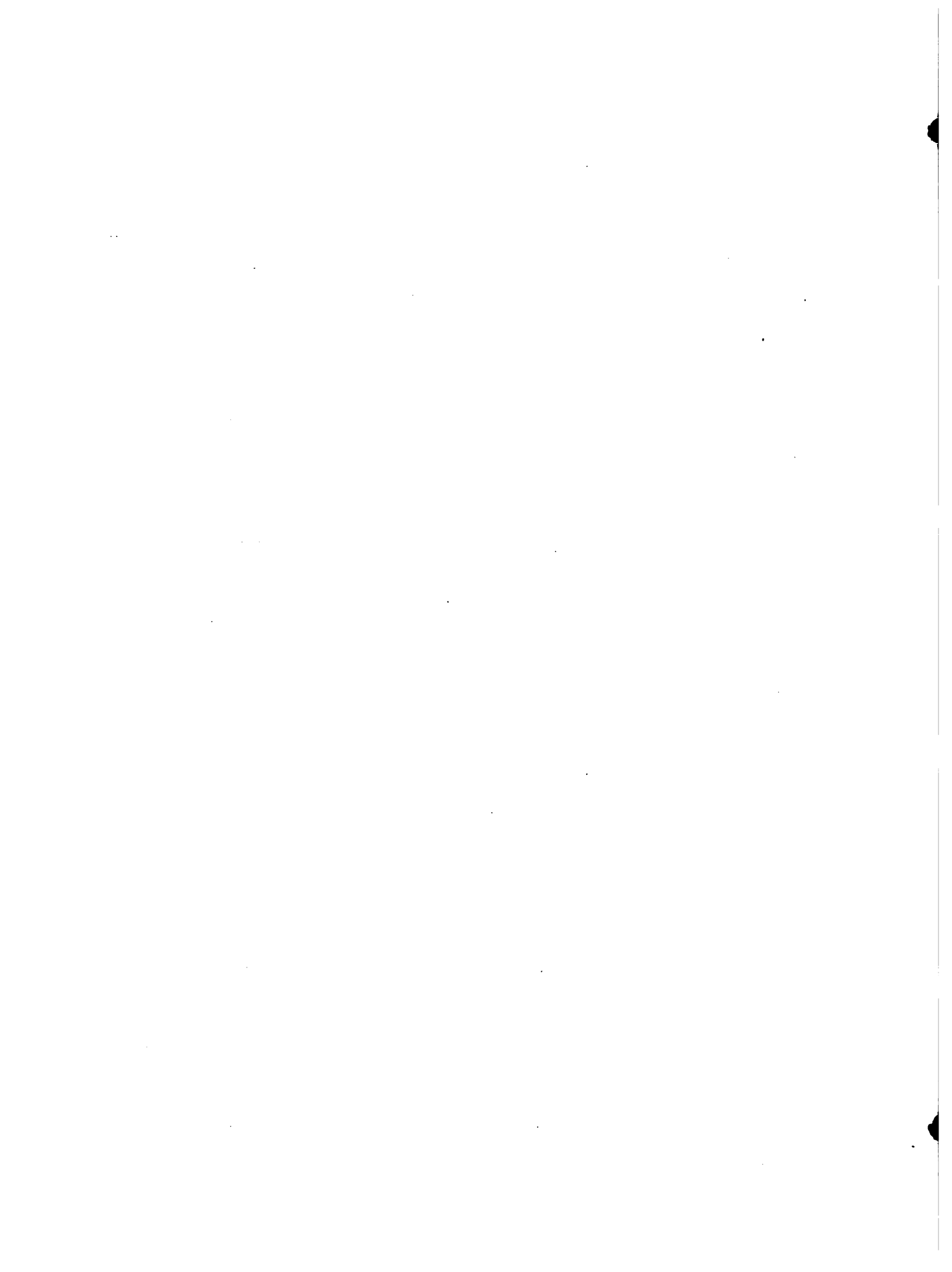
MATERIALES Y METODOS

En las pruebas de germinación de las conidias se utilizaron extractos acuosos de hojas de los clones IAN-710 resistente y GA-1126 susceptible, desarrollados en el invernadero y viveros de hule del Centro de Turrialba.

Como el grado de susceptibilidad de las hojas varía con la edad, se consideró conveniente utilizar tres extractos por clon, cada uno preparado con hojas en diferentes estados de desarrollo. Los tres estados de las hojas utilizados en la preparación de los extractos, corresponden a los siguientes grupos de clasificación de BLAZQUEZ y OWEN (5):

- II. Foliolos doblados dorsalmente, verticales, rojizos, y de aproximadamente 1 cm de largo.
- III. Foliolos parcialmente abiertos, verticales, rojizos, y de 2 a 4 cm de largo.
- V. Foliolos verdes, peciolo separado en ángulo de 70° del punto de crecimiento.

Después de numerosas pruebas tendientes a determinar la cantidad de hojas y agua a usarse en la preparación de los extractos, se optó por prepararlos utilizando 3 g de hojas y 2,5 ml de agua destilada. Tres gramos de hojas recién cosechadas, se cortaron en porciones de aproximadamente 1 cm² y se introdujeron en un tubo de ensayo que contenía 2,5 ml de agua destilada, luego se insertó un tubo de ensayo de menor diámetro dentro del anterior. Los tubos se colocaron inmediatamente en baño maría por 30 minutos, se inclinaron y se aplicó presión sobre el tubo interno para obtener el extracto.



En las pruebas se utilizaron tres concentraciones de los extractos. Las concentraciones utilizadas fueron: extracto puro, $2/3$ y $1/3$ del extracto; las dos últimas concentraciones se obtuvieron diluyendo el extracto puro con agua destilada.

Las conidias utilizadas en las pruebas de germinación, se obtuvieron de hojas enfermas de plantas del vivero del Centro de Turrialba; sin embargo, para algunas pruebas se utilizaron también, conidias procedentes de cultivos de D. ulei en PDA peptona (16).

Las pruebas de germinación se efectuaron en portaobjetos de microcultivo. Los extractos de hojas se colocaron en los portaobjetos por medio de una micropipeta, haciendo las diluciones necesarias al colocar los, y procurando que el volumen final fuera de 60 microlitros. En los testigos se usaron 60 microlitros de agua destilada. A los portaobjetos con los extractos se les agregó las conidias por medio de una aguja esterilizada, se agitó la preparación para uniformarla, y se colocó luego en cámaras húmedas por espacio de 12 horas; al cabo de las cuales se procedió a hacer las observaciones.

En las pruebas de germinación de las conidias en compuestos fenólicos se utilizó ácido clorogénico, ácido cafeico, y catecol, que fueron los fenoles empleados por BYRDE, FIELDING, y WILLIAMS (6) en sus trabajos con Sclerotinia fructigena. Los fenoles anteriormente mencionados se utilizaron en concentraciones de 0,003, 0,006, y 0,01 molar. Estas concentraciones se emplearon por ser comunes en muchas plantas (6). Los métodos seguidos en la ejecución de estas pruebas fueron similares a los anteriores.

En todas las pruebas de germinación se efectuaron 4 repeticiones por tratamiento.



Las observaciones se efectuaron utilizando un aumento de 125 X, y contando al azar en cada observación 25 conidias sumergidas en el líquido. Se consideraron conidias germinadas, aquéllas que tuvieran tubos germinativos más largos que el ancho de la espora.

El análisis estadístico de las pruebas de germinación se hizo por el método de LITCHFIELD y WILCOXON (20) denominado "curvas de dosis-mortalidad". Los límites de confianza para los parámetros se establecieron al 5% de probabilidad estadística.

La dosis mediana efectiva (ED_{50}) es en este caso, la concentración de extracto necesario para producir el 50% de inhibición en la germinación de las conidias.

Para determinar la localización de la sustancia tóxica en los cromatogramas, se hicieron pruebas de germinación sobre cromatogramas efectuados en tiras de papel Whatman Nº 1 de 2,5 x 40 cm, cubiertos por una capa delgada de agar.

Los cromatogramas se prepararon con 20 microlitros de extracto puro de hojas del grupo de clasificación V del clon IAN-710 desarrollado en los viveros del Centro de Turrialba. Utilizando como solvente n-butanol: ácido acético acuoso al 27% (1:1 v/v). Después de secar los cromatogramas al aire, se sumergieron por unos segundos en agar agua al 2%, colocándolos luego sobre un vidrio plano.

Los cromatogramas cubiertos con la capa de agar se dejaron sobre el vidrio, y se les aplicó conidias en toda la superficie utilizando un pincel de pelo de camello; la mitad de los cromatogramas se desprendieron del vidrio y se colocaron sobre el resto que permanecía adherido al vidrio, de tal manera que las superficies con las conidias quedaran en contacto y los puntos de partida y frentes de los cromatogramas

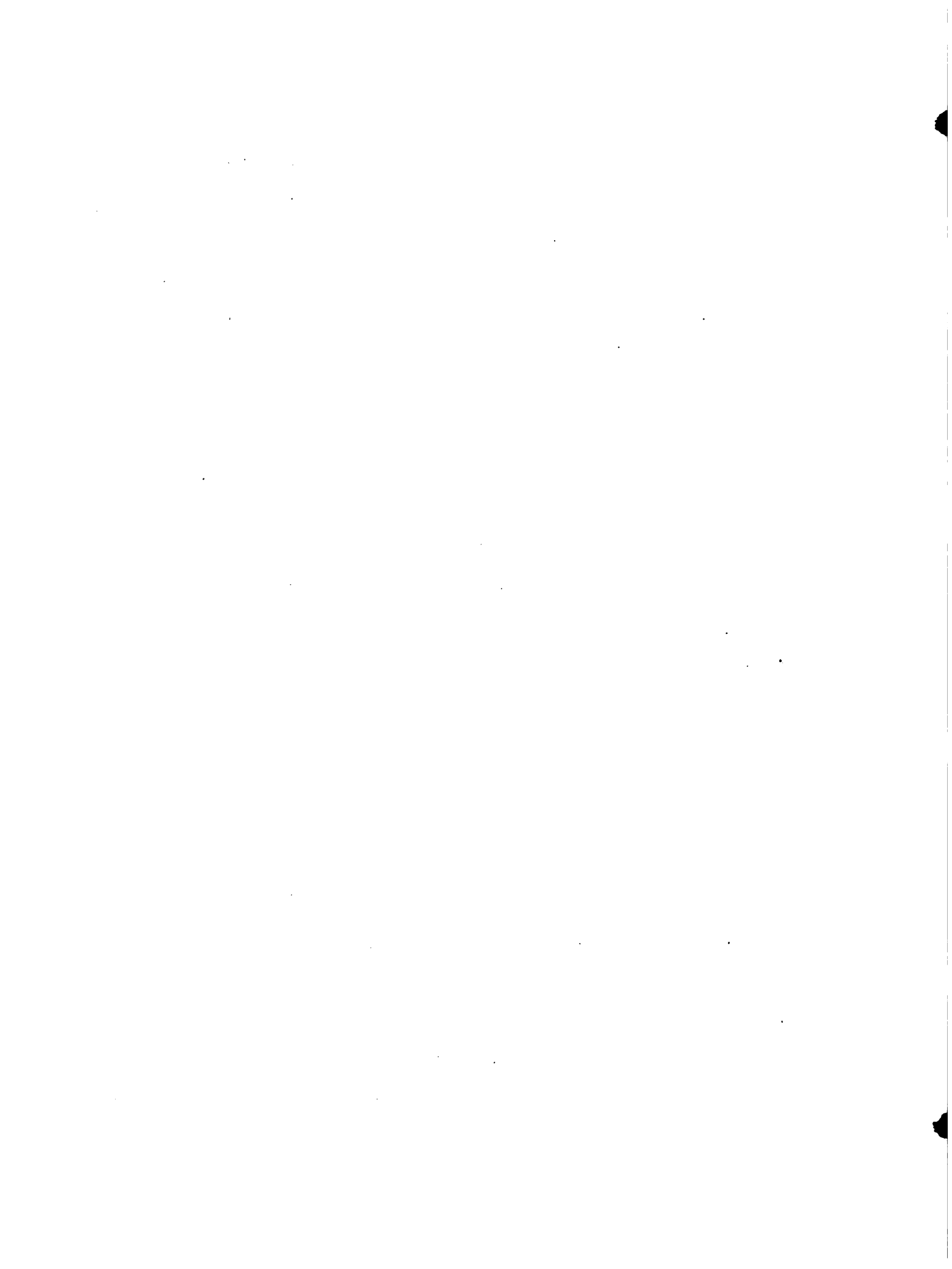


superpuestos. Inmediatamente después, los cromatogramas con los vidrios se colocaron en cámaras húmedas por espacio de 12 horas, procediendo luego a hacer las observaciones.

Las observaciones se realizaron en el cromatograma que quedaba adherido al vidrio, después de levantar cuidadosamente el que lo cubría. Luego de una observación cuidadosa a lo largo de la superficie del cromatograma, se hicieron recuentos de 100 conidias tomadas al azar en 6 puntos a lo largo del cromatograma.

Los extractos utilizados en los análisis cromatográficos, fueron los extractos puros utilizados en las pruebas de germinación de las conidias. Para el análisis cromatográfico, se utilizó la técnica de cromatografía de papel, empleando una combinación de los métodos de GEISSMAN (11), y GAGE, DOUGLASS, y WENDER (10) para la identificación de compuestos fenólicos.

Los cromatogramas se hicieron en tiras de papel Whatman Nº 1 de 10 x 40 cm. Los extractos se aplicaron a 10 cm de uno de los bordes de las tiras de papel por medio de una micropipeta, a razón de 20 microlitros por aplicación. Estos se corrieron luego en forma descendente en cámaras "Chromatocab" (Reco Research Equipment Corporation, Oakland, California) con los siguientes solventes: n-butanol: ácido acético acuoso al 27% (1:1 v/v), fenol: agua (73:27 p/p), y agua destilada. El tiempo que se corrieron varió con la clase de solvente (6 a 14 horas); sin embargo, en todos los casos se dejó que el solvente recorriera aproximadamente 25 cm del punto de partida, luego se les extrajo de la cámara y se les dejó secar al aire. Estos cromatogramas se examinaron primero a la luz del día y luego con luz ultravioleta de onda larga, en ausencia y presencia de vapores de amonio. Después se les examinó a la luz del



día y con luz ultravioleta de onda larga, una vez asperjados con los siguientes reveladores: cloruro de aluminio alcohólico al 1%, carbonato de sodio acuoso al 1%, acetato de plomo básico acuoso al 1%, y acetato de plomo normal acuoso al 1%. También se les examinó a la luz del día después de asperjarlos con cloruro férrico acuoso al 1% y con nitrato de plata amoniacal.

En cada caso se anotaron los R_f de las manchas observadas y el color que presentaba cada una de ellas.

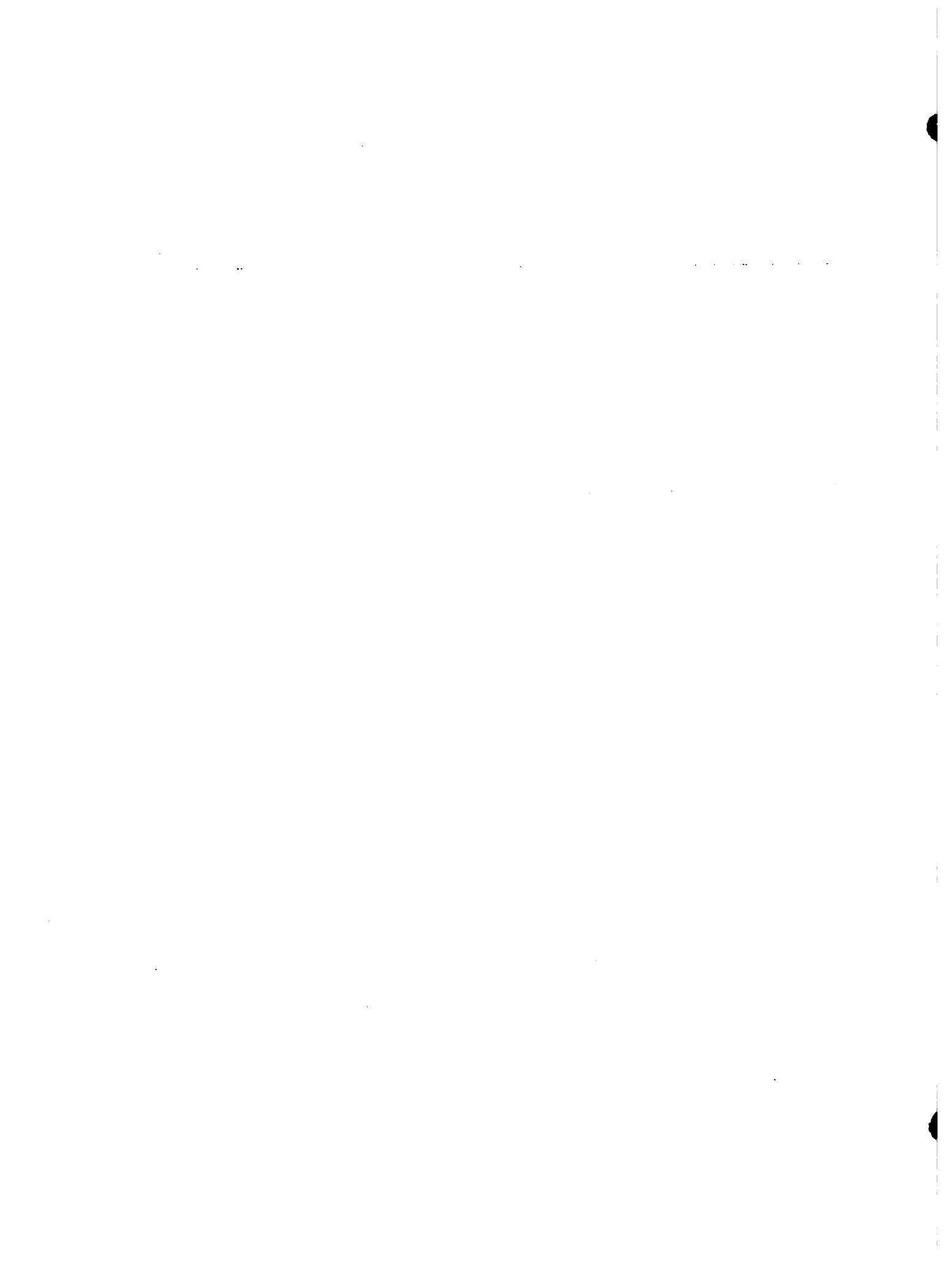


RESULTADOS

Pruebas de germinación de las conidias en extractos acuosos de hojas de hule

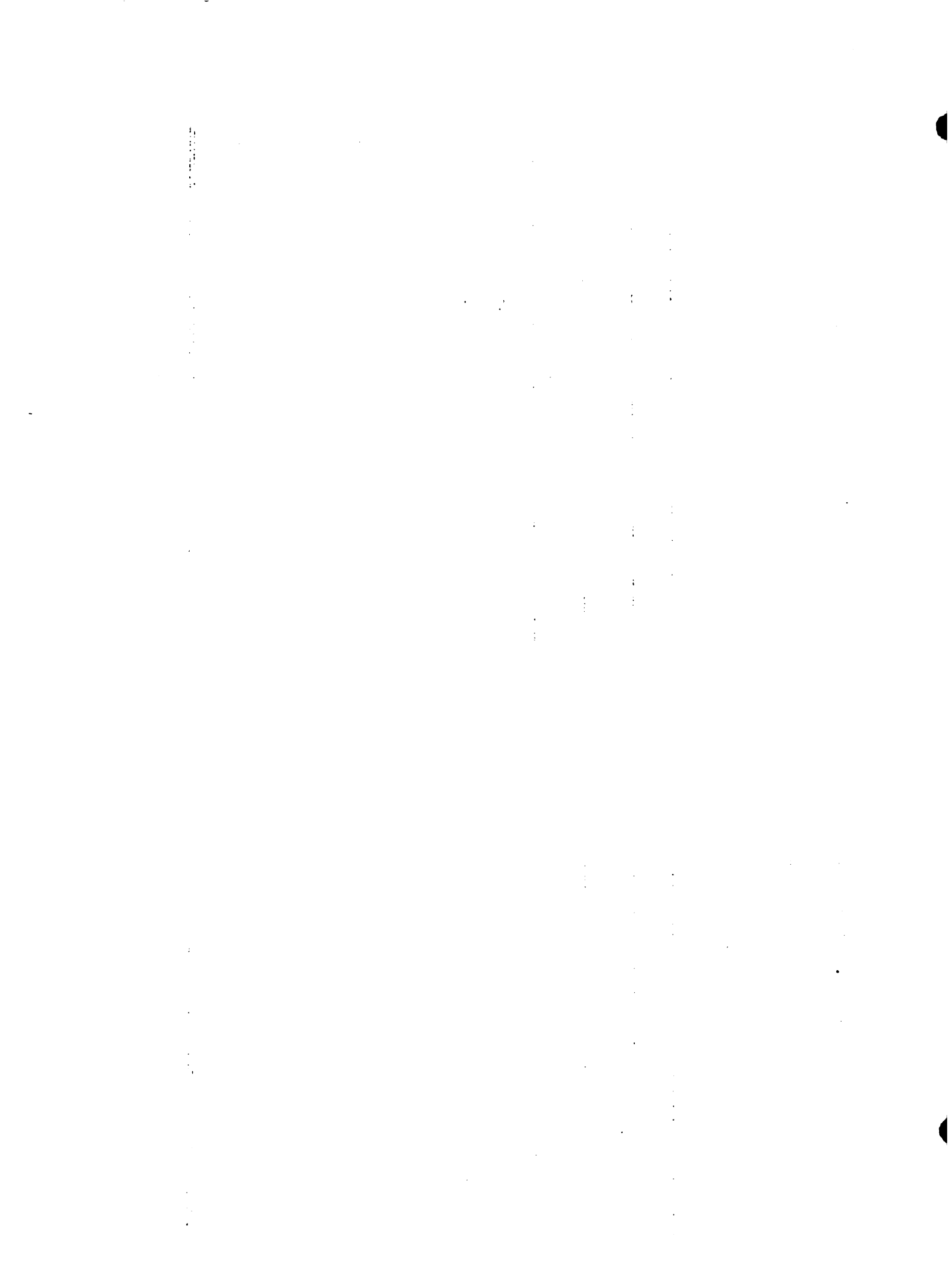
En las pruebas realizadas con extractos acuosos de hojas de los clones IAN-710 resistente y GA-1126 susceptible, desarrollados en el invernadero y viveros de hule del Centro de Turrialba, se observaron diferencias apreciables en los porcentajes de germinación de las conidias, notándose una mayor inhibición en los extractos de las plantas resistentes (Cuadro 1). Los resultados obtenidos en las pruebas realizadas con extractos de hojas de plantas desarrolladas en el invernadero fueron más consistentes que los obtenidos en las pruebas realizadas con extractos de hojas de plantas desarrolladas en los viveros. Algunas veces no se observaron diferencias entre los porcentajes de germinación en los extractos de los clones resistente y susceptible desarrollados en los viveros; en estas ocasiones la inhibición de la germinación fue alta y de valores semejantes en los extractos de ambos clones.

Los tubos germinativos de las conidias en los extractos de hojas del clon susceptible fueron largos y delgados, mientras que en los extractos de hojas del clon resistente fueron cortos y gruesos. La relación en longitud de los tubos germinativos fue de aproximadamente 3 a 1. La longitud de los tubos, por otra parte, disminuyó con el aumento de la concentración de los extractos, tanto del clon resistente como del susceptible.



CUADRO 1. Porcentajes de inhibición de la germinación de las conidias de D. ulei en extractos acuosos de hojas de los clones IAN-710 resistente y GA-1126 susceptible. Cada dato proviene del promedio de 4 repeticiones.

Concentración del extracto	Grupos de clasificación de las hojas																					
	II		III				V															
	Invernadero	Vivero	Invernadero	Vivero	Invernadero	Vivero	Invernadero	Vivero	Invernadero	Vivero												
1	IAN-710	GA-1126	IAN-710	GA-1126	IAN-710	GA-1126	IAN-710	GA-1126	IAN-710	GA-1126	99	70	100	100	98	78	100	97	95	60	83	64
2/3	96	58	100	100	92	67	96	84	87	37	34											
1/3	82	36	100	100	79	41	85	59	61	22	19											
H ₂ O	12	16	20	15	18	19	16	14	21	19	15	12										



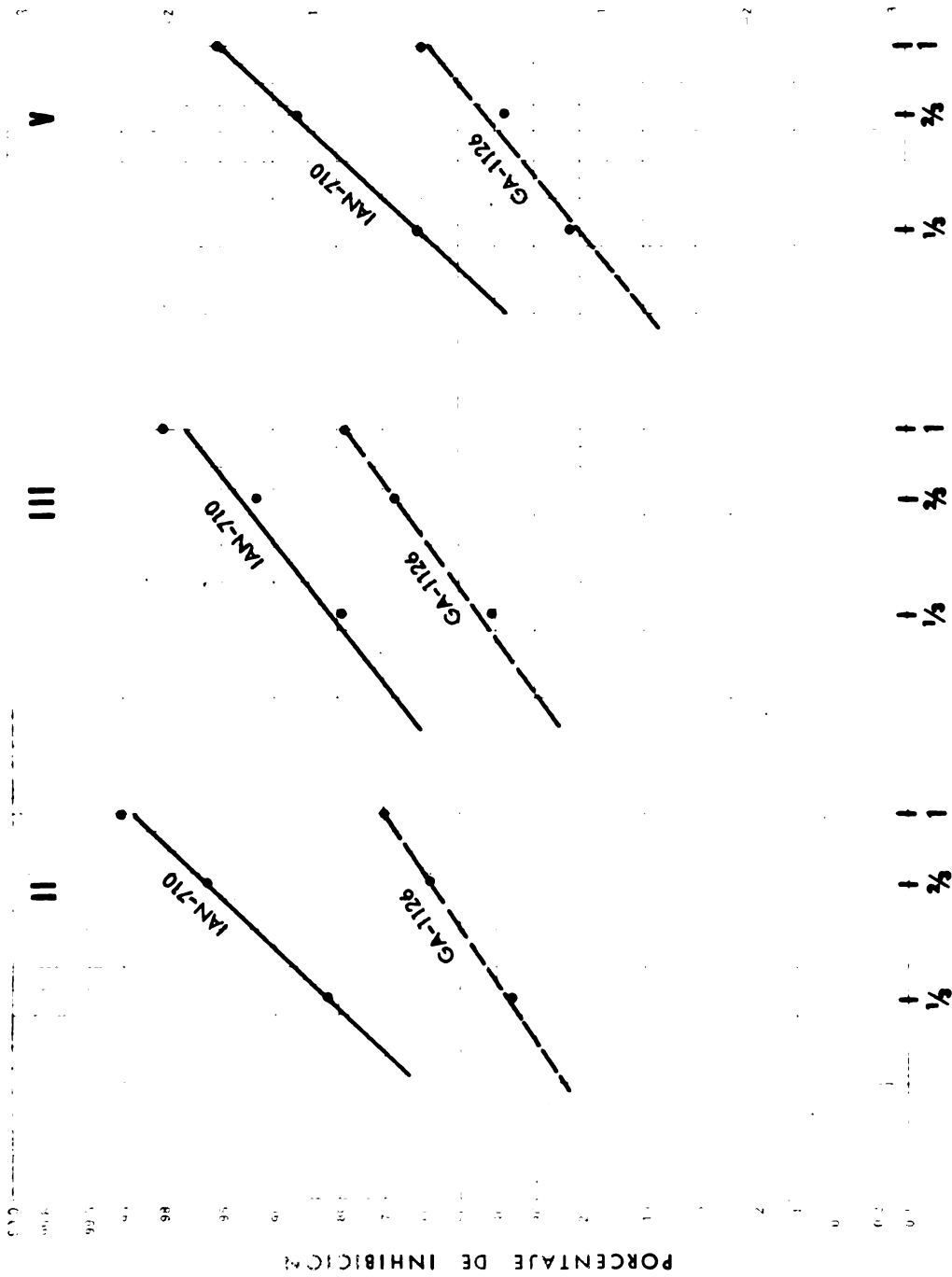
En el Cuadro 2 aparecen las aproximaciones de las dosis medianas efectivas (ED_{50}) de los extractos de hojas de los clones resistente y susceptible, utilizados en la prueba cuyos resultados se presentan en el Cuadro 1.

Las pendientes de las líneas que relacionan las dosis de extractos aplicadas (X), y los porcentajes de inhibición de la germinación (Y), observados en la prueba de germinación cuyos resultados presenta el Cuadro 1, pueden apreciarse en las Figuras 1 y 2.

CUADRO 2. Dosis medianas efectivas (ED_{50}) de los extractos de los clones IAN-710 resistente y GA-1126 susceptible.

Extracto del clon	Grupos de clasificación de las hojas					
	II		III		V	
	Invernadero	Viveros	Invernadero	Viveros	Invernadero	Viveros
Resistente	0,15	--	0,12	0,12	0,23	0,29
Susceptible	0,50	--	0,40	0,29	0,84	0,81

Todas las comparaciones entre las dosis medianas efectivas (ED_{50}) de los extractos de hojas del clon resistente y del susceptible, preparados con hojas de un mismo grupo de clasificación y origen (invernadero o vivero), fueron significativas al 5% de probabilidad estadística.



CONCENTRACION DE LOS EXTRACTOS

FIGURA 1. Efecto de los extractos de hojas de los grupos de clasificación II, III, V, de los clones desarrollados en el invernadero, sobre los porcentajes de germinación de la germinación de las conidias.



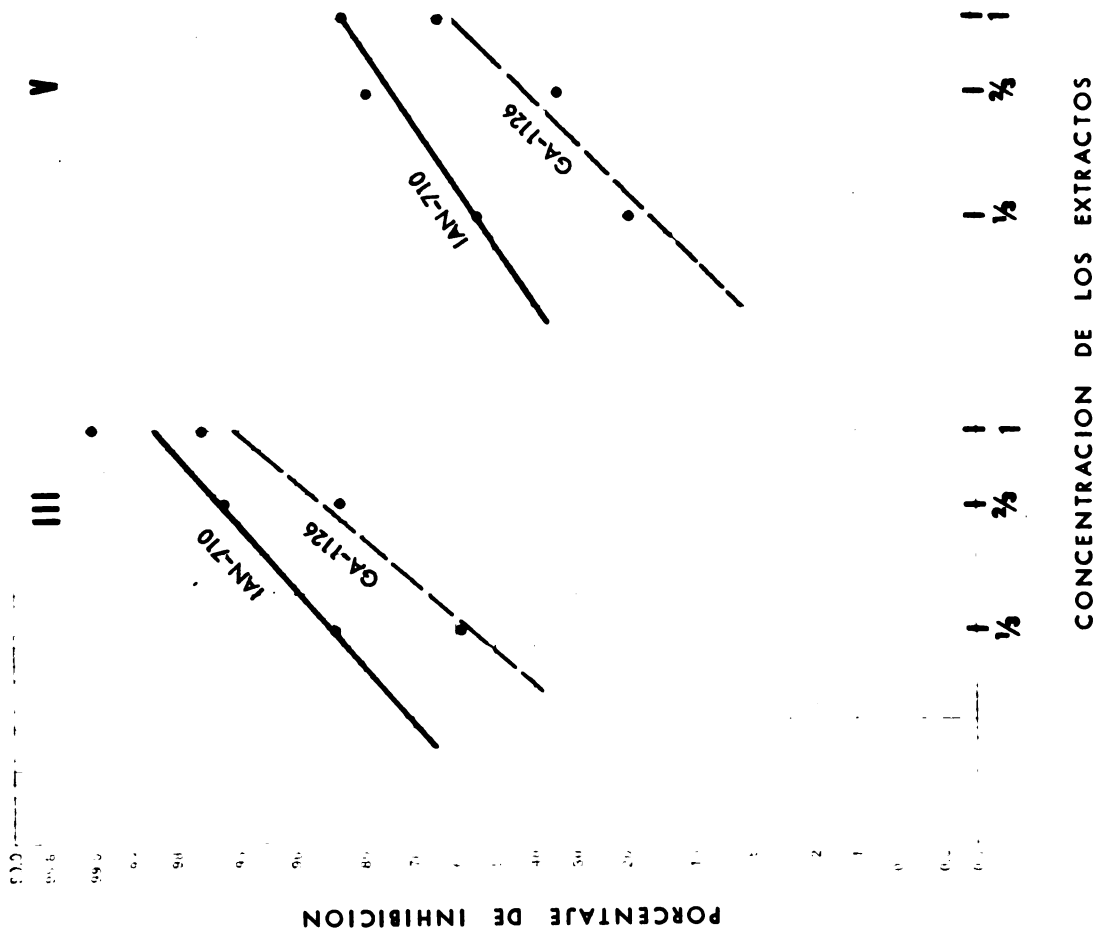


FIGURA 2. Efecto de los extractos de hojas de los grupos de clasificación III, V, de los clones desarrollados en los viveros, sobre los porcentajes de inhibición de la germinación de las conidias.

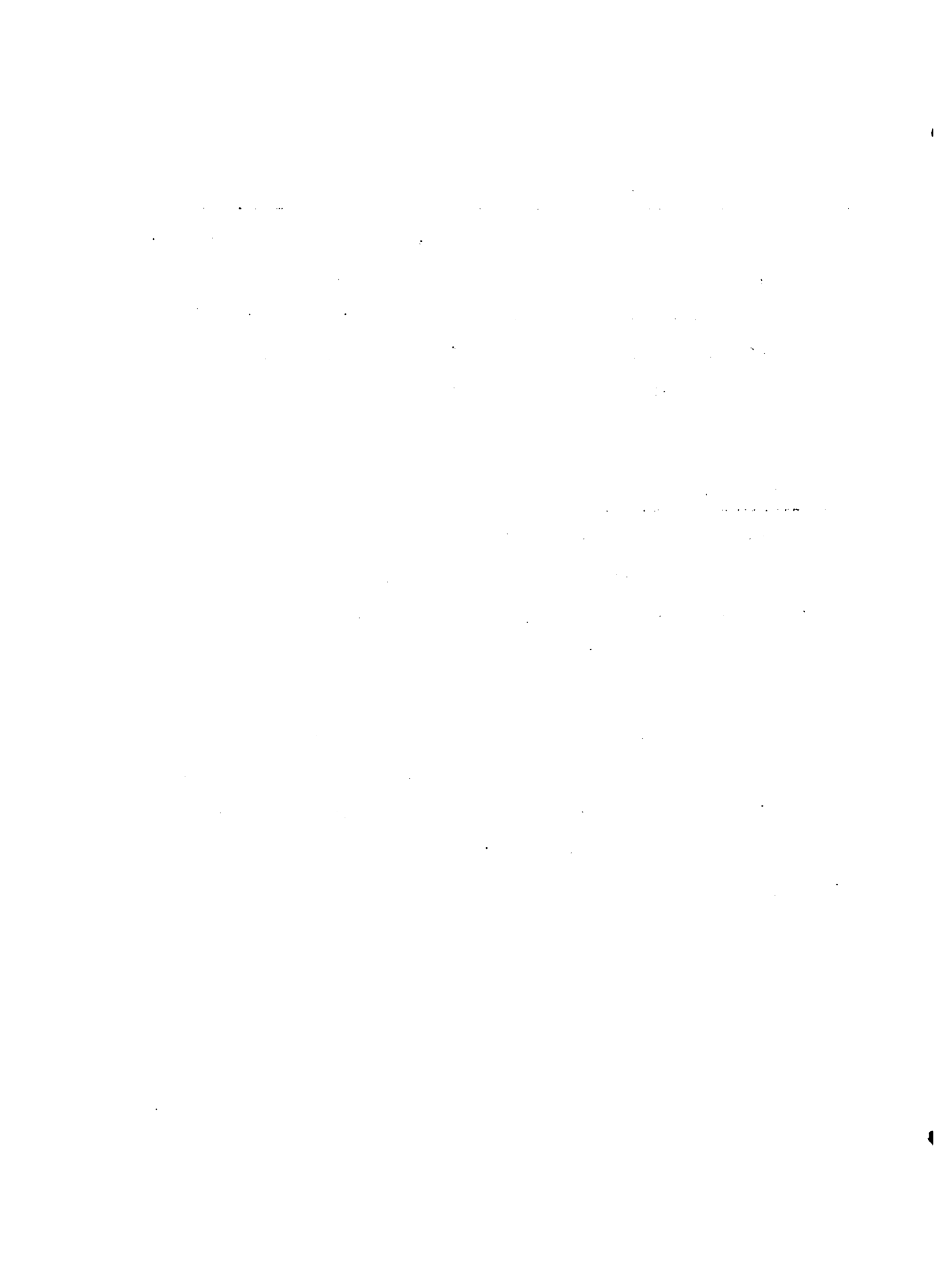


Pruebas de germinación de las conidias en compuestos fenólicos

El ácido clorogénico, ácido cafeico, y catecol con concentraciones de 0,003, 0,006, y 0,01 molar, inhibieron completamente la germinación de las conidias. Las soluciones de ácido clorogénico y ácido cafeico tenían pH 4; el pH de la solución de catecol fue mayor. El porcentaje de inhibición de la germinación de las conidias en los testigos en agua destilada fue de 17%.

R_f de la sustancia tóxica

En las pruebas de germinación realizadas sobre cromatogramas, se observó una marcada inhibición de la germinación en la zona en que apareció una mancha amarilla R_f 0,80. En el centro de esta mancha se observó un 79% de inhibición, cifra que asciende a aproximadamente el doble de cualquiera de los otros porcentajes de inhibición observados en los otros 5 puntos del cromatograma. El Cuadro 3 presenta los R_f de los puntos en donde se efectuaron observaciones, y los porcentajes de inhibición que se obtuvieron. Las conidias localizadas sobre la mancha amarilla presentaban un color marrón intenso, y las que germinaron tenían tubos germinativos más cortos que las localizadas en otras zonas del cromatograma.



CUADRO 3. Valor de los R_f y de los porcentajes de inhibición de la germinación de las conidias, observados sobre cromatogramas. Estos datos representan el promedio de 2 observaciones.

R_f	Porcentaje de inhibición de la germinación de las conidias
0,15	36
0,31	31
0,40	25
0,62	37
0,80*	79
0,93	45

* Mancha amarilla.

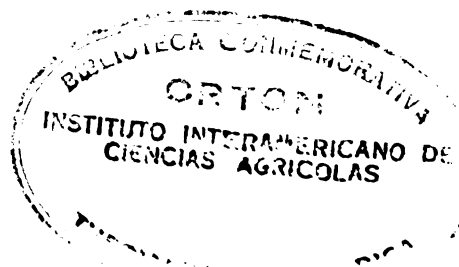
Cromatografía

En los cromatogramas preparados con extractos de hojas de los clones IAN-710 y GA-1126 se observó una mancha amarilla visible a simple vista. Esta mancha fue mayor y de color más intenso en los cromatogramas preparados con extractos de hojas del clon resistente, salvo en algunos casos en que no se observó diferencias en los porcentajes de inhibición de la germinación entre los extractos de los clones resistente y susceptible. En los cromatogramas preparados con estos extractos, tampoco se apreciaron diferencias en el tamaño de las manchas amarillas.



La mancha amarilla presentó los siguientes R_f : 0,80 (n-butanol: ácido acético acuoso al 27% 1:1 v/v), 0,50 (fenol: agua 73:27 p/p), y 0,33 (agua destilada). Con el primer solvente la mancha amarilla se mostró definida y de un color amarillo intenso, mientras que con los otros solventes apareció poco definida, y el color amarillo fue mucho menos intenso que con el primer solvente. Las reacciones de color de esta mancha aparecen en el Cuadro 4.

En los cromatogramas preparados con extractos de hojas de los grupos de clasificación II y III de los clones resistente y susceptible desarrollados en los viveros, se observó además de la mancha amarilla una mancha gris azulada visible a simple vista; ésta presentaba un R_f de 0,56 con n-butanol: ácido acético acuoso al 27%. Esta mancha fue de mayor tamaño en los cromatogramas preparados con los extractos del grupo de clasificación II, pero siempre de igual tamaño en los cromatogramas preparados con extractos de hojas de los clones resistente y susceptible. La mancha gris azulada no se observó en los cromatogramas hechos con extractos de hojas de los clones desarrollados en el invernadero.



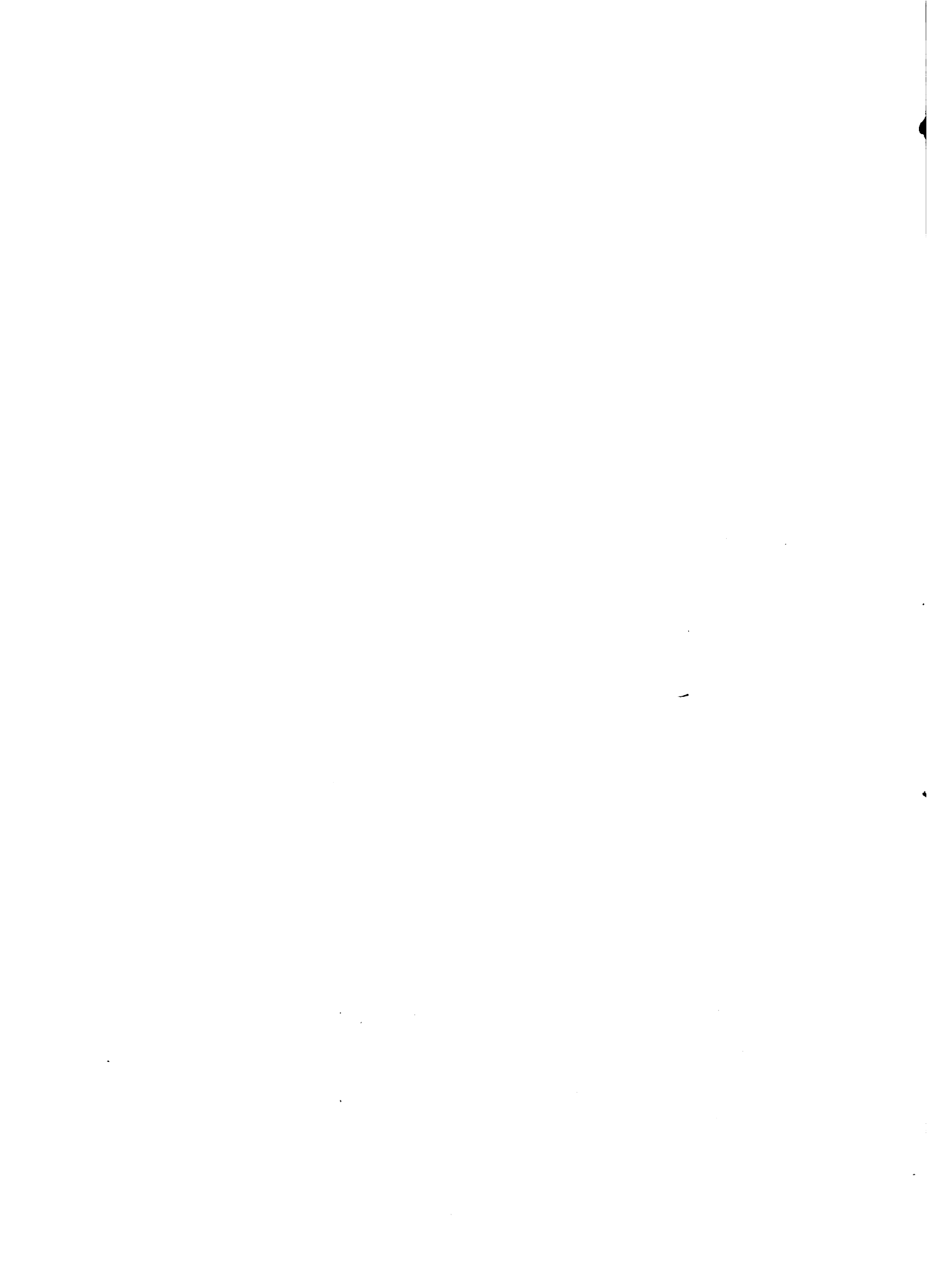


CUADRO 4. Reacciones de color de la mancha amarilla en cromatogramas tratados con diferentes reveladores y observados a la luz del día y con luz ultravioleta de onda larga.

Revelador	Luz del día	Luz ultravioleta
---	Amarillo	Marrón
Vapores de amonio	Amarillo	Amarillo anaranjado
Cloruro de aluminio	Amarillo	Amarillo anaranjado
Carbonato de sodio	Amarillo	Amarillo anaranjado
Acetato de plomo básico	Amarillo	Marrón
Acetato de plomo normal	Amarillo	Marrón
Cloruro férrico	Verde olivo	---
Nitrato de plata amoniacal	Marrón rojizo	---



Cromatograma corrido con n-butanol: ácido
acético acuoso al 27%, y revelado
con nitrato de plata amoniacal.



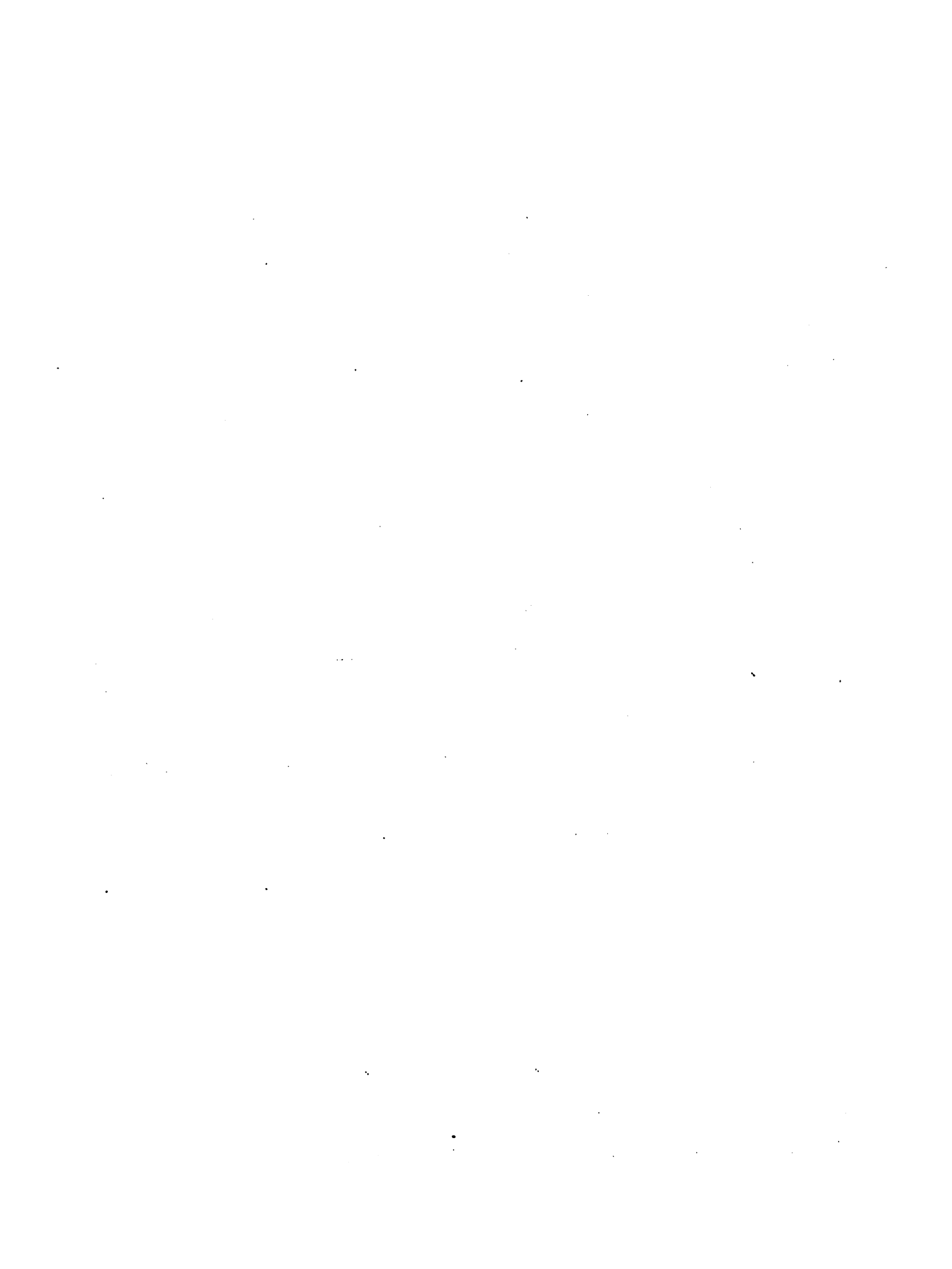
DISCUSION

Los altos porcentajes de inhibición de la germinación observados en los extractos de hojas del clon resistente IAN-710, y el aumento en los porcentajes de inhibición que se obtuvo al aumentar las concentraciones de los extractos de este clon y los del clon susceptible GA-1126, indican la presencia de alguna sustancia(s) tóxica al hongo en los extractos de ambos clones, que se presenta en mayor cantidad en los extractos del clon resistente. En ensayos preliminares, se observó que concentraciones altas de los extractos de los clones resistente y susceptible inhiben completamente la germinación de las conidias. FLOOD y KIRKHAM (9) obtuvieron resultados similares; ellos informan que extractos de dos variedades de manzano, una altamente resistente y la otra de mucho menor resistencia al ataque de Venturia inaequalis, inhiben la es-
porulación de razas de diferente grado de patogenicidad del hongo y observaron mayor inhibición en los extractos de la variedad altamente resistente. Esta diferencia desapareció al aumentar la concentración de los extractos.

La completa inhibición de la germinación que se observó en las tres concentraciones de las soluciones de ácido clorogénico, ácido cafeico, y catecol, indica que estos compuestos fenólicos son altamente tóxicos a las conidias del hongo.

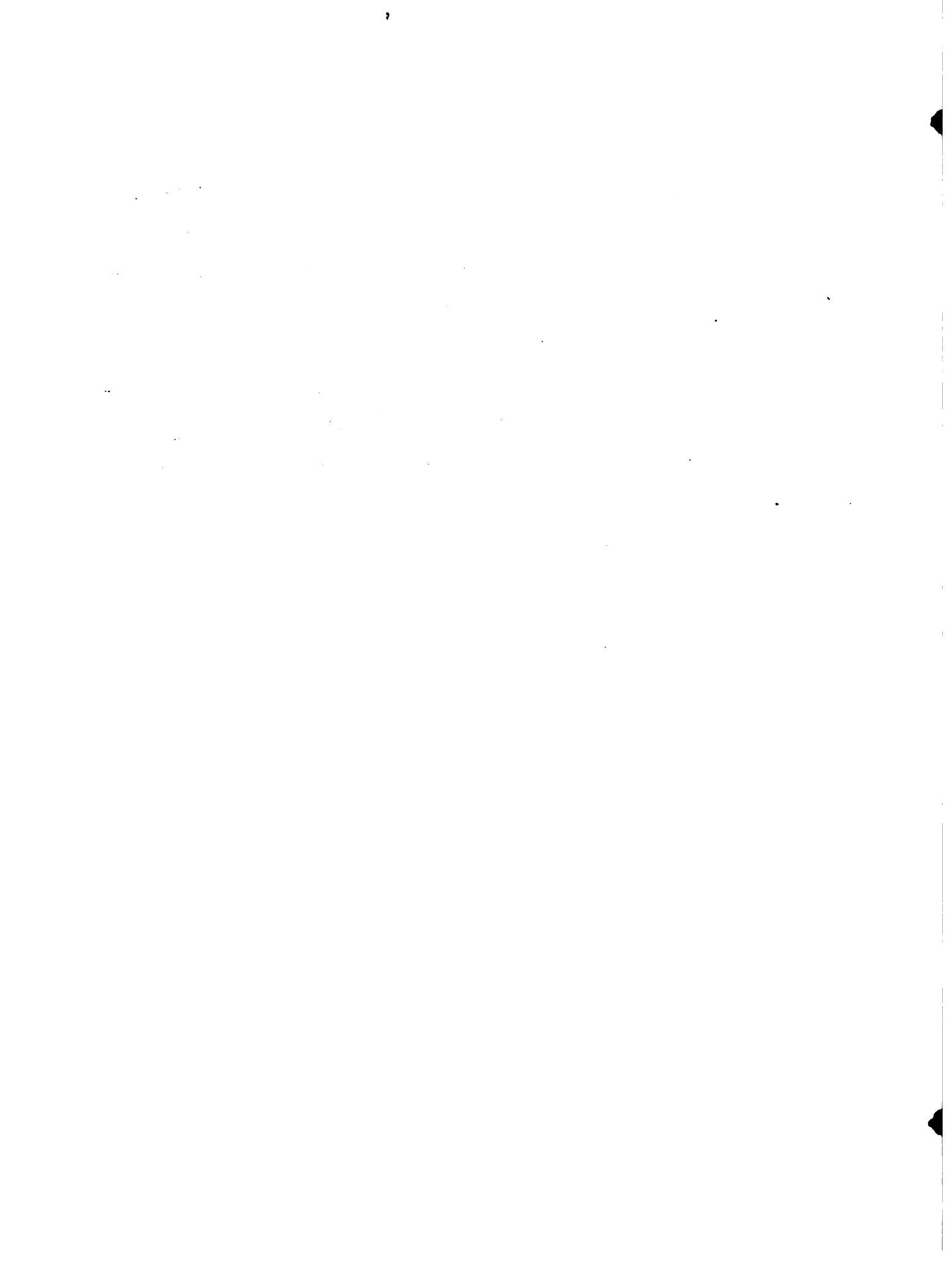
El alto porcentaje de inhibición observado sobre las manchas amarillas, indica claramente la localización del compuesto tóxico.

Los resultados de los análisis cromatográficos demuestran que las diferencias entre los extractos acuosos de las hojas de los clones resistente y susceptible, son cuantitativas. FLOOD y KIRKHAM (9)



importancia de la luz en la formación de estos compuestos fenólicos.

El efecto sobre las conidias de la sustancia(s) que produce las manchas amarillas observadas en los cromatogramas, y la estrecha relación entre el tamaño de las manchas y la toxicidad de los extractos acuosos de hojas del clon resistente, permiten suponer que la presencia de esta sustancia(s) en las hojas de hule, en concentraciones suficientes como para inhibir la germinación de las conidias de Dothidella ulei, puede estar asociada con la resistencia a la enfermedad sudamericana de la hoja.

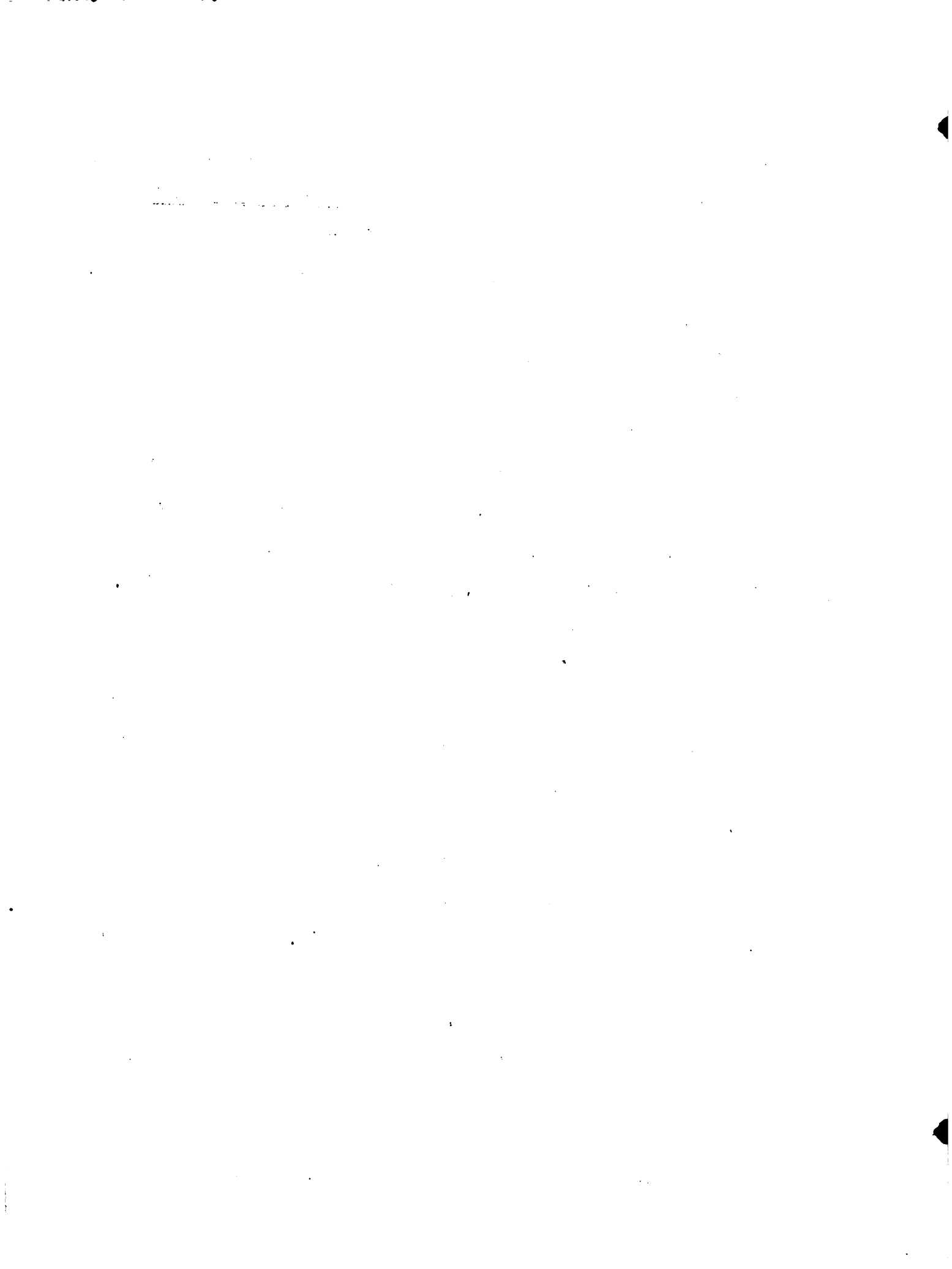


obtuvieron resultados similares al estudiar la resistencia de dos variedades de manzano al ataque de algunas razas de Venturia inaequalis.

La mancha amarilla es de naturaleza fenólica y posiblemente un flavonol, por la similitud que tienen sus reacciones con las de la rutina, isoquercitrina, quercimeritrina, y otros compuestos pertenecientes a este grupo. Otra evidencia de la presencia de compuestos fenólicos en los extractos, es la coloración roja que presentan al tratarlos con magnesio y ácido clorhídrico concentrado (23).

Los numerosos informes sobre la toxicidad de compuestos fenólicos a hongos patógenos de las plantas, algunos de los cuales están citados en la revisión de literatura, incluyen también al grupo de los flavonoles según expresan NAGHSKI, COPLEY, y COUCH citados por ECHANDI (8). Estos investigadores afirman que los flavonoles tienen efecto antagónico a gran número de patógenos de las plantas.

Los pocos casos en que no se observaron diferencias en los porcentajes de inhibición de las conidias con extractos de hojas de los clones IAN-710 y GA-1126, desarrollados en los viveros de hule del Centro de Turrialba, se deben posiblemente a la desigualdad de condiciones en que se encontraban ambos clones en los viveros. El clon susceptible GA-1126 estaba sembrado a mayor distanciamiento que el resistente IAN-710, recibiendo por ello una mayor iluminación. SWAIN (25) informa que la intensidad lumínica es sumamente importante en la formación de sustancias fenólicas en las plantas, ya que la fotosíntesis es la que determina la cantidad de productos primarios precursores de ellas. GEISSMAN y SWAIN, citados por SWAIN (25), al comparar la síntesis del ácido clorogénico y de la rutina en hojas de tabaco que ejercieron su actividad metabólica en la luz y en la oscuridad, apreciaron también la



RESUMEN

Se investigó la presencia de sustancias fenólicas tóxicas al hongo Dothidella ulei P. Henn. en hojas de dos clones de Hevea brasiliensis IAN-710 y GA-1126 resistente y susceptible respectivamente, y se estudió el efecto de compuestos fenólicos sobre el organismo causal.

En las pruebas de germinación de las conidias realizadas en extractos acuosos de los clones, se observaron diferencias en los porcentajes de germinación, notándose una mayor inhibición en los extractos del clon resistente.

Con el objeto de determinar la localización de la sustancia(s) tóxica, se efectuaron pruebas de germinación sobre cromatogramas preparados con extractos de hojas del clon IAN-710; observándose una mayor inhibición de la germinación en la zona en que apareció una mancha de color amarillo.

Por medio de análisis cromatográficos se determinó que la sustancia(s) tóxica es de naturaleza fenólica, posiblemente un flavonol.

El ácido clorogénico, ácido cafeico, y catecol fueron altamente tóxicos a las conidias del hongo.



SUMMARY

The presence of toxic substance(s) to the fungus Dothidella ulei in leaves of Hevea brasiliensis, and the effects of phenolic compounds, were investigated. Two clones, IAN-710, resistant, and GA-1126, susceptible, were used.

Tests of conidia germination in aqueous leaf extracts showed differences in percentages of germination. Higher inhibition was evident in the extracts of resistant clone.

In order to determine the location of the toxic substance(s), germination tests were done on chromatograms prepared with leaf extracts of clone IAN-710. Higher inhibition was noted on a yellow spot that had appeared in the chromatograms.

Chromatographic analysis suggested that the toxic substance was a phenolic compound, probably a flavonol.

Chlorogenic acid, caffeic acid, and catechol were highly toxic to the fungus.



LITERATURA CITADA

1. ANGELL, H. R., WALKER, J. C. y LINK, K. P. The relation of protocatechuic acid to disease resistance in the onion. *Phytopathology* 20(5):431-437. 1930.
2. BAPTISTE, E. D. C. Breeding for high yield and disease resistance in Hevea. Rubber Research Institute of Ceylon. *Quarterly Journal* 36(3,4):38-51. 1960.
3. BARNETT, H. L. y LILLY, V. G. The interrelated effects of vitamins, temperature and pH upon vegetative growth of Sclerotinia camelliae. *American Journal of Botany* 35(5):297-302. 1948.
4. BLAZQUEZ, C. H. y OWEN, J. H. Physiological studies of Dothidella ulei. *Phytopathology* 47(12):727-732. 1957.
5. _____ y OWEN, J. H. Histological studies of Dothidella ulei on susceptible and resistant Hevea clones. *Phytopathology* 53(1):58-65. 1963.
6. BYRDE, R. J. W., FIELDING, A. H. y WILLIAMS, A. H. The role of oxidized polyphenols in the varietal resistance of apples to brown rot. In Pridham, J. B., ed. *Phenolics in plants in health and disease*. New York, Pergamon Press, 1960. pp. 95-99.
7. ECHANDI, E. y FERNANDEZ, C. E. Relación entre el contenido de ácido clorogénico y la resistencia a la llaga macana o cáncer de los cafetos causado por Ceratocystis fimbriata. *Turrialba (Costa Rica)* 12(2):87-90. 1962.
8. ECHANDI, R. J. A study of the biochemical nature of resistance of Phaseolus vulgaris and Phaseolus coccineus to Fusarium solani f. phaseoli. Thesis M. S. New York, Cornell University, 1962. 44 p. (mimeografiado)
9. FLOOD, A. E. y KIRKHAM, D. C. The effect of some phenolic compounds on the growth and sporulation of two Venturia species. In Pridham, J. B., ed. *Phenolics in plants in health and disease*. New York, Pergamon Press, 1960. pp. 81-85.
10. GAGE, T. B., DOUGLASS, C. D. y WENDER, S. H. Identification of flavonoid compounds by filter paper chromatography. *Analytical Chemistry* 23(11):1582-1585. 1951.
11. GEISSMAN, T. A. Anthocyanins, chalcones, aurones, flavones and related water-soluble plant pigments. In Peach, K. y Tracey, M. V., ed. *Modern methods of plant analysis*. Berlin, Springer-Verlag, 1955. v. 3, pp. 450-498.

12. HATFIELD, W. C., WALKER, J. C. y OWEN, J. H. Antibiotic substances in onion in relation to disease resistance. *Journal of Agricultural Research* 77(4):115-135. 1948.
13. HATHAWAY, D. E. Plant phenols and tannins. In Smith, I., ed. *Chromatographic and electrophoretic techniques*. London, William Heinemann Medical Books, 1960. v. 1 pp. 308-353.
14. 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. *Phenolics in plants in health and disease*. New York, Pergamon Press, 1960. pp. 87-94.
15. KUC, J. et al. Chlorogenic and caffeic acids as fungistatic agents produced by potatoes in response to inoculation with *Helminthosporium carbonum*. *Journal of the American Chemical Society* 78(13):3123-3125. 1956.
16. LANGDON, K. R. Culture and pathogenicity of *Dothidella ulei*. Thesis Ph.D. Florida, University of Florida, 1963. 36 p. (xerografía).
17. LANGFORD, M. H. South American leaf blight of *Hevea* rubber trees. U. S. Department of Agriculture, Technical Bulletin no. 882. 1945. 30 p.
18. _____. A new strain of leaf blight on rubber trees in Costa Rica. Informe sin publicar. 1960. 2 p. (mimeografiado)
19. _____. A new strain of leaf blight on rubber trees in Costa Rica. Informe sin publicar. 1961. 2 p. (mimeografiado)
20. LITCHFIELD, J. T. y WILCOXON, F. Dosage-mortality curves. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy* 96:99. 1949.
21. MARTIN, J. T., BATT, R. F. y BURCHILL, R. T. Defense mechanism against fungi. *Nature* 180(4590):796-797. 1957.
22. PATIL, S. S. The relation of chlorogenic acid and total free phenols in potato plants to resistance to infection by *Verticillium albo-atrum*. Thesis Ph.D. Oregon, Oregon State University, 1962. (Original no consultado; compendiado en *Dissertation Abstracts* 23(6):1862-1863. 1962).
23. ROBINSON, T. The organic constituents of higher plants. Minnesota, Burgess Publishing Company, 1963. 306 p.
24. SHAAL, L. A. y JOHNSON, G. The inhibition effect of phenolic compounds on the growth of *Streptomyces scabies* as related to the mechanism of scab resistance. *Phytopathology* 45(11): 626-628. 1955.

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

- 25. SWAIN, T. Some interrelationships between leuco-anthocyanins and lignin in plants. In Pridham, J. B., ed. Phenolics in plants in health and disease. New York, Pergamon Press, 1960. pp. 45-55.
- 26. WALKER, J. C. Resistance to club rot in Brassica. *Phytopathology* 26(2):112. 1936.
- .27. _____ y LINDEGREN, C. C. Onion scale pigmentation. *Journal of Agricultural Research* 29(10):507-514. 1924.
- .28. _____, LINDEGREN, C. C. y BACHMAN, F. M. Further studies on toxicity of extracted onion juice. *Journal of Agricultural Research* 30(2):175-187. 1925.

