

Variación en la composición química foliar de *Coffea* sp. (Rubiales: Rubiaceae) y su relación con la resistencia a *Hemileia vastatrix* (Uredinales: Pucciniaceae)

Elmer G. García¹, Eduardo Jiménez¹, Oscar Castro², y Bernardo Mora³

¹ Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

² Escuela de Química y Centro de Investigaciones en Productos Naturales, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

³ Laboratorio de Fitopatología, Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica, San José, Costa Rica.

(Rec. 5-V-1992. Acep. 3-XII-1992)

Abstract: Coffee plants of the cultivars "Catuai Rojo" and "Catimor T-5298" were inoculated with uredospores of *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. After this inoculation, foliar extracts were obtained with 95% ethanol at 1, 3, 5 and 7 hr for thin layer chromatography analysis, with organic solvents. After the inoculation the plants accumulated an aliphatic ester and a carotenoid that inhibited the germination of the uredospores; these compounds are phytoalexin-like. This accumulation was greater and more rapid in the plants of "Catimor". In both cultivars a carotenoid that disappears after inoculation was detected, but the disappearance was more rapid in "Catimor". These compounds could be related to coffee leaf rust resistance.

Key words: Rust, phytoalexin, ester, carotenoid, coffee, resistance.

Según Rijo y Rodrigues (1978) y Martins *et al.* (1985), la resistencia del cafeto (*Coffea* sp.) a la roya (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.), se desarrolla después del contacto entre el hongo y el hospedero. Los mecanismos de resistencia no están todavía claros; sin embargo, se ha encontrado que las plantas resistentes acumulan calosa y lignina en las paredes celulares, con mayor rapidez que las susceptibles (Rijo *et al.* 1982, Martins *et al.* 1985). También se ha relacionado la resistencia con la producción de fitoalexinas (Rodrigues *et al.* 1975, Medeiros y Rodrigues 1978, Guedes 1983, Martins *et al.* 1986), cuyas estructuras químicas no han sido dilucidadas. García (1990), sugirió que algunas sustancias solubles en acetato de etilo y con características de fitoalexinas, pueden acumularse posteriormente a la infección, tanto en plantas resistentes como en susceptibles y que la inducción de la resistencia, puede ser provocada por factores distintos a la enfermedad.

En el presente estudio se investigó cromatográficamente la variación del contenido de sustancias foliares, solubles en solventes orgánicos, durante las primeras siete horas de infección con *H. vastatrix*, en cafetos resistentes y susceptibles a esa enfermedad.

MATERIAL Y METODOS

Inoculación y diseño del experimento: La investigación se realizó en los invernaderos y laboratorios de la Escuela de Biología y del Centro de Investigaciones en Productos Naturales de la Universidad de Costa Rica, Montes de Oca, Costa Rica. Se evaluaron plantas de 15 meses de edad, de los cultivares "Catuai Rojo" y "Catimor T-5298", susceptibles y resistentes, respectivamente, a la mayoría de las razas de *H. vastatrix*. Estas plantas procedieron del Centro de Investigaciones en Café del Instituto del Café de Costa Rica.

Con un pincel se recolectaron uredósporas de la raza II del patógeno, a partir de hojas infectadas de plantas de "Caturra". Se preparó una suspensión de aproximadamente 20 000 uredósporas por ml de agua destilada, la que se asperjó sobre las plantas, al inicio de la noche (encima y debajo) con un atomizador de Vilbis, conectado a un compresor con presión constante.

Se usó un diseño experimental de bloques al azar con arreglo factorial 2 X 5, con cinco repeticiones. El primer factor correspondió a los cultivares y el segundo al período de infección. A 1, 3, 5 y 7 hr después de la inoculación, se recolectaron 8 g de hojas de los pares 3 ó 4, contactados desde el ápice, las que se maceraron y extrajeron con etanol de 95%. El testigo correspondió a plantas que no recibieron uredósporas, sino únicamente dispersión de agua destilada.

Análisis cromatográfico: Los extractos etanólicos se fraccionaron primero con hexano y después con acetato de etilo. Las fracciones de acetato de etilo concentradas, se analizaron por cromatografía de capa fina en gel de sílice, usando los siguientes solventes y mezclas de polaridad creciente: hexano (100%); hexano: benceno (5:5); hexano:acetato de etilo (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:7); benceno:acetato de etilo (8:2, 7:3, 5:5); acetato de etilo (100%); cloroformo (100%); cloroformo:metanol (9.5:0.5, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7). Para esto se colocaron aproximadamente 20 microlitros de la muestra por evaluar a 1 cm del borde de la placa; posteriormente, se eluyeron con los solventes.

Los cromatogramas previamente secos se observaron bajo luz ultravioleta de 254 y 366 nm y posteriormente se expusieron a los siguientes reactivos de revelado: vapores de yodo, vainillina al 5% en ácido fosfórico y vapores de amoníaco.

Para estimar la concentración de las sustancias, se determinó el área de las manchas del cromatograma, con un planímetro. Las sustancias de interés en relación con la resistencia a la roya, se purificaron por cromatografía preparativa en gel de sílice y se eluyeron con una mezcla de cloroformo y metanol (7:3). Posteriormente, se analizaron por espectroscopía de luz ultravioleta e infrarroja.

Fungitoxicidad de las sustancias aisladas: A las sustancias que incrementaron su concentración de acuerdo con el período de infección con *H. vastatrix*, se les determinó el efecto sobre la germinación de las uredósporas de ese patógeno. Para esto se preparó una solución de agar con una concentración de 15 g por 1000 ml de agua destilada, esterilizada a 120°C por 15 min. Posteriormente, se colocaron 20 ml de esta solución en una placa de Petri, junto con 1 ml de la muestra a evaluar.

La muestra empleada para hacer la evaluación fungitóxicas se aisló del cromatograma de extractos de "Catimor" con 7 hr de inoculado, por medio de raspado de la porción del gel de sílice con la mancha correspondiente y extracción con etanol. Este extracto se evaporó hasta sequedad y se disolvió en 10 ml de una mezcla de agua destilada y etanol (99:1). A lo obtenido se le denominó factor de dilución 1. Luego se tomó una muestra y se diluyó hasta el doble o el triple del volumen, lo que correspondió a los factores de dilución 2 y 3, respectivamente.

Antes de la solidificación del agar, para delimitar las áreas donde se colocarían las uredósporas, se colocaron en cada placa de Petri 5 anillos de vidrio de 1.5 cm de altura por 1.8 cm de diámetro. En el agar solidificado, se colocó 0.03 ml de una suspensión de aproximadamente 4000 uredósporas por ml de agua destilada y se cubrieron las placas con un plástico negro, para evitar la interferencia de la luz en la germinación de las uredósporas. Después de 18 hr, se determinó la germinación de las esporas, con base en la presencia del tubo germinativo. Por cada área demarcada se obtuvo el cociente de germinación (número de esporas germinadas entre número total). Con estos datos, se calculó el porcentaje de inhibición respecto al testigo, con la siguiente fórmula:

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

CT: cociente de germinación del testigo

CI: cociente de germinación del tratamiento

Todos los datos se sometieron al análisis de varianza para experimentos factoriales. Los porcentajes de inhibición se transformaron a arcoseno. Como prueba de comparación posterior se usó la de Tuckey.

RESULTADOS

Al analizar los 50 extractos se detectaron tres sustancias solubles en acetato de etilo que mostraron variación según el tratamiento (Cuadro 1). El análisis de las curvas de absorción en el ultravioleta, evidenció la probable naturaleza carotenoide de dos de éstas, denominadas carotenoide 1 y carotenoide 2, respectivamente. Las bandas máximas de absorción en luz infrarroja, se indican en el Cuadro 2; éstas sugieren que ambos carotenoides son muy similares. El tercer compuesto detectado presentó bandas de absorción máximas en el infrarrojo a 1380, 1460, 2860, 2940 y 2975 cm^{-1} , características de un éster alifático.

CUADRO 1

Area en mm^2 de las manchas de los carotenoides 1 y 2 y del éster alifático, en los cromatogramas de extractos de acetato de etilo

Período de infección (hr)	"Catuaí Rojo"			"Catimor T-5298"		
	I	II	III	I	II	III
Testigo	09.25aB	00.00aA	00.00aA	10.25aC	00.00aA	00.00aA
1	07.00bB	00.00aA	00.00aA	04.00aB	03.00aA	06.75bA
3	02.50aA	03.00aA	03.75aAB	00.00aA	07.25aB	42.50bB
5	00.00aA	09.50aB	11.50aBC	00.00aA	11.25aBC	58.75bC
7	00.00aA	15.75aC	16.00aC	00.00aA	13.25aC	69.50bC

Medias con letras minúsculas iguales para cada fila y mayúsculas para cada columna, no difieren significativamente ($P < 0.05$) según la prueba de Tuckey. I-carotenoide 1, II-carotenoide 2, III-éster alifático.

CUADRO 2

Bandas de absorción máximas (cm^{-1}) de los carotenoides 1 y 2 en los espectros de luz infrarroja

Carotenoide 1	Carotenoide 2
1075	1075
1120	1120
1280	1270
1380	1380
1735	1735
2835	2830
2850	2850

El carotenoide 1 se detectó en los extractos de las plantas testigo de ambos cultivares, y en los períodos de infección de 1 hr en "Catimor" y 3 hr en "Catuaí Rojo". Esto indica que esta sustancia desapareció a las pocas horas después de la inoculación, en ambos cultivares, pero con mayor rapidez en "Catimor" (Fig. 1).

El carotenoide 2 sólo se encontró después de la inoculación con *H. vastatrix*. En ambos cultivares, su concentración aumentó con el período de infección (Fig. 2), pero no se detectaron diferencias significativas entre cultivares en cada uno de los períodos ($p < 0.05$) en los extractos tomados de las hojas de "Catimor" que en los correspondientes a las de "Catuaí Rojo".

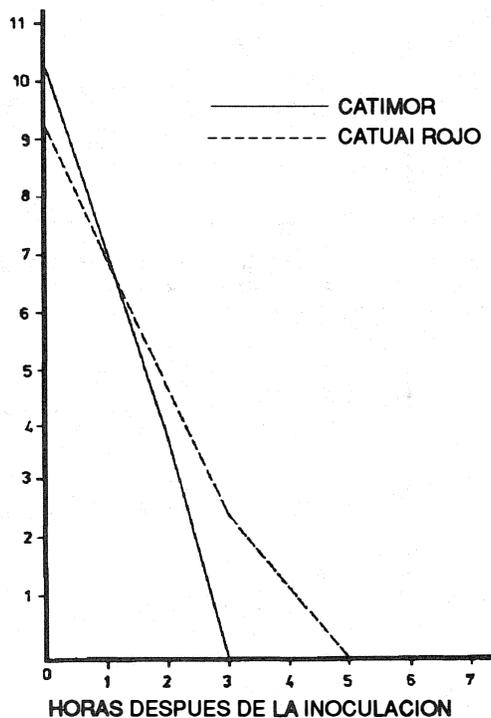


Fig. 1. Variación del área de la mancha del carotenoide 1 en los cromatogramas de extractos de acetato de etilo, obtenidos de hojas de los cultivares "Catuaí Rojo" y "Catimor T-5298"

El éster alifático no se encontró en el testigo, por lo tanto debe haberse formado también como respuesta a la inoculación, pero se detectó primero en "Catimor" (Fig. 3). Además en todos los períodos de infección, el área de su mancha en el cromatograma, fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en los extractos tomados de las hojas de "Catimor", que en los correspondientes a las de "Catuaí Rojo".

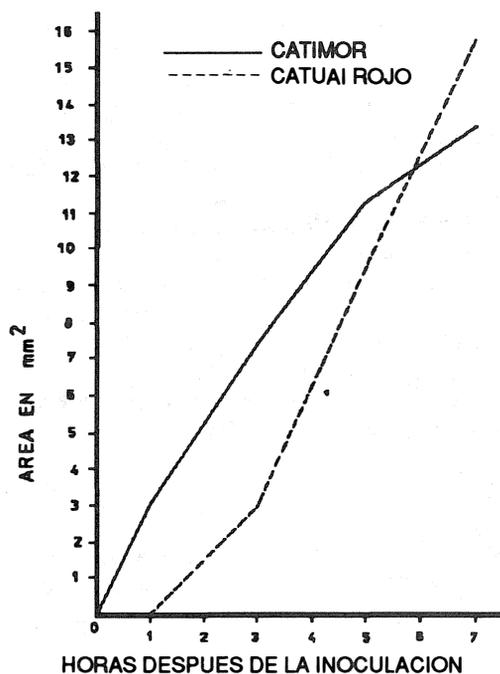


Fig. 2. Variación del área de la mancha del carotenoide 2 en los cromatogramas de extractos de acetato de etilo, obtenidos de hojas de los cultivares "Catuai Rojo" y "Catimor T-5298".

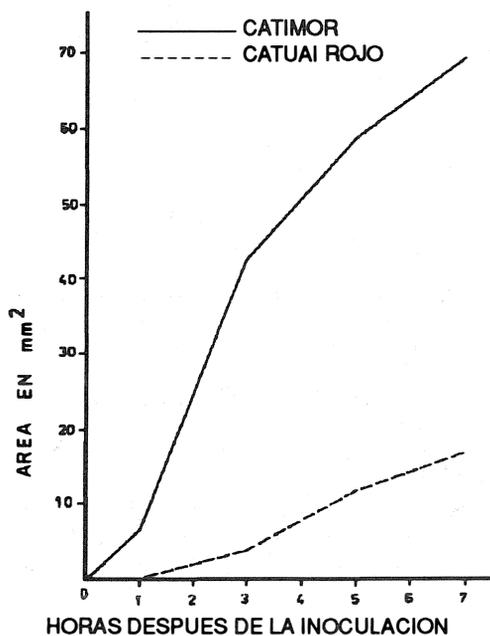


Fig. 3. Variación del área de la mancha del éster alifático en los cromatogramas de extractos de acetato de etilo, obtenidos de hojas de los cultivares "Catuai Rojo" y "Catimor T-5298".

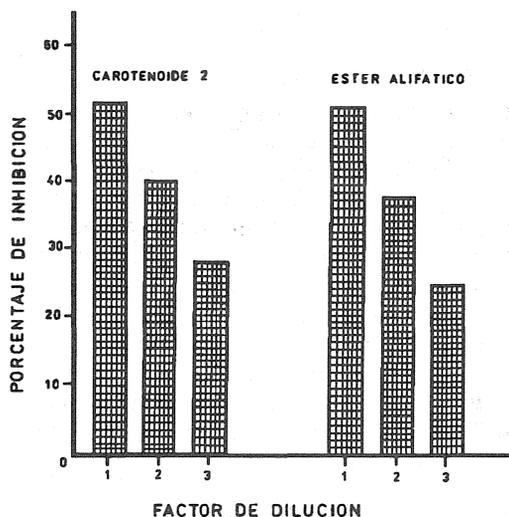


Fig. 4. Efecto de la concentración del carotenoide 2 y del éster alifático en la germinación de las uredósporas de *H. vastatrix*.

Tanto el carotenoide 2 como el éster alifático, inhibieron la germinación de las uredósporas ($p < 0.05$), de acuerdo con la concentración (Fig. 4).

DISCUSION

Los resultados demostraron que las plantas de ambos cultivares produjeron dos sustancias que incrementaron la concentración durante las tres primeras horas de infección con *H. vastatrix*; éstas además inhibieron la germinación de las uredósporas, por lo que posiblemente se trata de fitoalexinas, producidas por síntesis *de novo*. Guedes (1983) y Martins *et al.* (1986), encontraron que las plantas de café acumulan compuestos fungitóxicos, con características de fitoalexinas, pero al no haberlas caracterizado ellos químicamente, es difícil determinar si corresponden a las detectadas en esta investigación. Las fitoalexinas pueden inhibir el crecimiento de los patógenos, por afectar, entre otros aspectos, la acción de enzimas fundamentales para su metabolismo, por ejemplo las respiratorias, como ha sido sugerido para otras interacciones entre hospederos y patógenos (Stoessel 1985).

La capacidad de las plantas de café para liberar más de una fitoalexina, puede ser un aspecto importante en la expresión de la resistencia. Al producir diferentes sustancias fungitóxicas, podría ocurrir un efecto sinérgico en su acción, lo cual puede aumentar la defensa con-

tra el patógeno. También, de otras investigaciones (VanEtten *et al.* 1989) se sabe que los patógenos pueden desarrollar mecanismos de desintoxicación de fitoalexinas; por lo tanto, si se producen varias clases de éstas, es probable que existan diferentes vías metabólicas involucradas en su síntesis, por lo que será más difícil que el patógeno desarrolle mecanismos que quebranten la resistencia.

La mayor acumulación del carotenoide 1 en las plantas de "Catimor", sugiere una posible relación directa con la resistencia a la roya. Se ha mencionado en la literatura que los carotenoides protegen la clorofila contra la fotooxidación durante la fotosíntesis (Krinsky 1971, Thommen 1979). Así, una mayor concentración de carotenoides en las plantas de "Catimor", podría volverlas fotosintéticamente más eficientes, lo cual puede repercutir en un aumento de la defensa contra el patógeno. Además, los carotenoides pueden servir como "esqueletos carbonados" para la síntesis de otras sustancias de importancia en el metabolismo de las plantas, entre éstas el ácido abscísico (Krinsky 1971, Kienzle *et al.* 1978, Thommen 1979, Kuc and Preisig 1984). En algunas especies se ha encontrado un incremento en la concentración de dicho ácido, después de someter las plantas a factores adversos; por tal razón, es probable que regule diversos aspectos relacionados con la resistencia a las enfermedades (Kienzle *et al.* 1978, Guedes *et al.* 1981).

El éster alifático, según los resultados, puede tener una alta relación con la resistencia a la enfermedad, ya que la diferencia en la acumulación entre ambos cultivares fue muy marcada. En algunas otras especies de plantas atacadas por patógenos, se ha demostrado la liberación de fitoalexinas con estructura alifática (Stoessl 1985). Sin embargo, al no conocer su verdadera naturaleza química, es difícil comprender su posible mecanismo de acción.

Los resultados de esta investigación demuestran que las plantas de los dos cultivares son capaces de producir fitoalexinas, pero existe variación en el tiempo de producción y en la concentración. Probablemente, si en las plantas de "Catimor" la síntesis de fitoalexinas es rápida y la concentración alta, los mecanismos del patógeno son insuficientes para bloquear su efecto, por lo tanto, el micelio no puede desarrollarse adecuadamente dentro del tejido foliar.

En el caso de las plantas de "Catuaí Rojo" una síntesis y acumulación tardía de fitoalexinas, puede ser favorable para que el patógeno las ataque con mayor facilidad.

La desaparición del carotenoide 1, es un aspecto que probablemente tiene alguna relación con la resistencia a la enfermedad. Este puede servir como "esqueleto carbonado" para la síntesis de alguna otra sustancia involucrada directamente con la resistencia, o sufrir alguna pequeña modificación para transformarse en el carotenoide 2. La similitud química entre ambos carotenoides, es una evidencia para apoyar lo anterior.

A pesar de haber encontrado sustancias que incrementan la concentración en respuesta a la inoculación y otras que desaparecen, es bastante difícil explicar los mecanismos de resistencia del café a la roya. El estudio de la variación de la concentración de sustancias, es sólo una parte de este complejo sistema de interacción entre hospedero y patógeno, el cual es necesario estudiar más ampliamente en sus aspectos bioquímicos, histológicos y moleculares.

RESUMEN

Se inocularon plantas de café, cultivares "Catuaí Rojo" y "Catimor T-5298", con uredósporas de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. Después de 1, 3, 5 y 7 hr de inoculadas, se extrajo material foliar con etanol de 95%, con el propósito de efectuar análisis por cromatografía de capa fina, usando mezclas de diferentes solventes orgánicos. Se detectó que las hojas de las plantas de "Catimor", acumularon en mayor concentración que las de "Catuaí Rojo" un éster alifático y un carotenoide, capaces de inhibir la germinación de las uredósporas, por lo que se consideran fitoalexinas. También, se encontró un carotenoide que desapareció después de la inoculación, pero más rápidamente en las plantas de "Catimor". Los dos carotenoides y el éster alifático mencionados, pueden relacionarse con la resistencia del café a la roya.

REFERENCIAS

- García, E.G. 1990. Estudio de sustancias foliares del café asociadas al mecanismo de resistencia a *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. Tesis de Maestría, Universidad de Costa Rica, San José.

- Guedes, M.E. 1983. Formação de fitoalexinas em interações incompatíveis *Coffea arabica*-*Hemileia vastatrix*. Simposio sobre Ferrugens do Cafeeiro. Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, Oeiras, Portugal, p. 21-31.
- Guedes, M.E., R. Bostock, R. Hammeschmidt & J. Kuc. 1981. The accumulation of six sesquiterpenoids phytoalexin in tobacco infected with *Pseudomonas lacrymans*. *Phytochem.* 45:121-130.
- Kienzle, F., H. Mayer, R.E. Minder & H. Thommen. The carotenoids. *Helv. Chim. Acta* 61:2616-2627.
- Krinsky, N.I. 1971. Function of carotenoids, p. 669-716. In O. Isler (ed.). *Carotenoids*. Birkhauser, Basilea.
- Kuc, J. & C.L. Preisig. 1984. Regulation of sesquiterpenoid eliciting activity of fatty acids in potato by carbohydrate isolated from *Phytophthora infestans*. *Phytopathol.* 73:831-838.
- Martins, E.M., A. De María, G. Grunewaltdt & W.B.C. Moraes. 1985. Histological studies of compatible interaction of coffee leaves and *Hemileia vastatrix*. *Fitopatol. Bras.* 10:627-636.
- Martins, E., D.J. Roveratti & W.B.C. Moraes. 1986. Elicitation of stress metabolites in coffee leaves by non pathogens. *Fitopatol. Bras.* 11:683-693.
- Medeiros, E. & C.J. Rodrigues. 1978. Produção de substâncias do tipo fitoalexinas em folhas de *Coffea arabica* L. inoculadas con ferrugens não patogénicas para o cafeeiro. *García de Orta, Sér. Est. Agron.* 5:15-18.
- Rijo, L. & C.J. Rodrigues. 1978. Processo de infecção da *Hemileia vastatrix* em cultivares susceptíveis e resistentes de *Coffea arabica* L. *García de Orta, Sér. Est. Agron.* 5:23-24.
- Rijo, L., E. Medeiros & C.J. Rodrigues. 1982. Immunity of coffee orange rust association: Histopathological aspects. *García de Orta, Sér. Est. Agron.* 9:101-103.
- Rodrigues, C.J., E. Medeiros & B. Lewis. 1975. Relationship between a phytoalexin-like response in coffee leaves and compatibility with *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. *Physiol. Plant. Pathol.* 6:35-41.
- Stoessl, A. 1985. Secondary plant metabolites in plant disease resistance: Preformed resistance factors. *Fitopatol. Bras.* 10:391-416.
- Thommen, H. 1979. The role of carotenoids in plant physiology, p. 867-879. In T.H. Goodwin (ed.). *Carotenoids* 5. Pergamon, Londres.
- VanEtten, H.D., D.E. Matheus & P.S. Matheus. 1989. Phytoalexin detoxification: Importance for pathogenicity and practical implications. *Ann. Rev. Phytopathol.* 27:143-164.