

ÍNDICE ESTOMÁTICO EN MATERIALES GENÉTICOS DE CAFÉ RESISTENTES O SUSCEPTIBLES A LA ROYA

Ramón Silva Acuña^{*}, Annie Silva Acuña^{*} y Laércio Zambolim^{**}

RESUMEN

El hábito de penetración y esporulación a través de los estomas del hongo *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., agente causal de la roya del café, permitió especular que los niveles de resistencia a esa enfermedad podrían estar asociados al número de estas estructuras foliares. Con el objetivo de evaluar la posible relación entre estructuras anatómicas y niveles de resistencia, se determinó el índice estomático en dos materiales genéticos de café resistentes (Híbrido de Timor y Clon 644/18) y uno susceptible (variedad Catuaí Rojo 2144). Para ello se aplicó una capa de esmalte transparente de uñas diluido en acetona 1:1 (v/v) en la porción media y abaxial de las hojas, y luego de removidas las películas de esmalte se tiñeron con azul de Aman. Las determinaciones del número de células epidérmicas y de estomas se realizaron al microscopio óptico en aumento 400x. Con los valores obtenidos de esas variables se calculó el índice estomático. Los resultados indican que no hubo diferencias significativas entre los materiales genéticos evaluados en relación al número de estomas e índice estomático; sin embargo, para la variable células epidérmicas, el Híbrido de Timor superó estadísticamente al Clon 644/18 y a la variedad Catuaí Rojo 2144; no se observaron diferencias entre estos dos últimos materiales genéticos. Para las variedades estudiadas, la resistencia a la roya del café no podría ser atribuida a la naturaleza anatómica de las hojas de la planta.

Palabras claves adicionales: *Hemileia vastatrix*, *Coffea arabica*, número de estomas

ABSTRACT

Stomatic index in genetic materials of coffee tree resistant or susceptible to rust

The penetration habit through leaf stomata of the fungus *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., causal agent of coffee rust, has suggested that the resistance levels to the disease could be associated to the leaf stomata number. In order to evaluate some relationship between those anatomical structures and the resistance levels, the stomatic index of two rust resistant coffee materials (Timor Hybrid and Clone 644/18) and one susceptible (Red Catuaí 2144 variety) was determined. A layer of finger nail enamel, diluted in acetone 1:1(v/v), was applied on the middle abaxial portion of the leaves, and after removal, the enamels were coloured with blue of Aman. The determination of the number of epidermic cells and stomata was performed using an optic microscope with 400x magnification. The stomatic index was calculated using the values obtained from those variables. The results showed that there were not significant differences among the evaluated genetic materials in relation to the stomata number and stomatic index; however, for the variable epidermic cells, the Timor Hybrid was statistically superior to the Clone 644/18 and the Red Catuaí 2144 variety. There were not differences between these two genetic materials. Taking in account the studied variables, the resistance to coffee rust could not be attributed to anatomical nature of the plant leaves.

Additional key words: *Hemileia vastatrix*, *Coffea arabica*, stomata number

INTRODUCCIÓN

La resistencia de una planta puede ser definida como la capacidad de restringir o evitar la entrada o la subsecuente actividad de patógenos en sus tejidos. Esa resistencia es conferida por mecanismos clasificados en dos categorías: pre-formados o constitutivos y los

post-formados o inducidos (Pascholati et al., 1995).

Se han realizado diversos trabajos histopatológicos para estudiar el patosistema de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. y *Coffea arabica* L. Razafindramanba (1958) realizó cortes histológicos transversales en tejidos foliares de cafetos infectados por *H. vastatrix* y

Recibido: Junio 15, 1998.

^{*} Investigadores del Centro de Investigaciones Agropecuarias Monagas, FONAIAP. Apdo. 184. Maturín, estado Monagas, Venezuela.

^{**} Profesor. Dpto. de Fitopatología, UFV, 367571-000, Vicosa. MG. Brasil.

constató la presencia de micelio intercelular e intracelular con haustorios. El micelio intercelular estaba formado por hifas septadas, bien desarrolladas, y muchas circunvoluciones con diámetro uniforme de 5 a 6 micras, y el micelio intracelular por haustorios. Asimismo, Roger (1951) encontró que el avance de ese micelio por el interior de los tejidos foliares, está relacionado con el grado de susceptibilidad de la planta. En especies resistentes del grupo Robusta, se observó que el desarrollo del micelio se restringe a algunas capas del parénquima esponjoso del limbo foliar; sin embargo, en cafetos susceptibles que son muy atacados por *H. vastatrix*, el micelio invade el tejido de empalizada y en ciertos casos hasta las células de la epidermis superior.

Rajendren (1968), indicó que el patógeno tiene especial afinidad por las células del parénquima en empalizada, las cuales serían las primeras en ser colonizadas. Después de su penetración en la cámara sub-estomática a través del ostiolo, las hifas de infección alcanzan las paredes de las células del parénquima en empalizada y se fijan a ellas formando estructuras discoides denominadas células madres del haustorio, separadas de la hifa por un septo. Estas estructuras forman una protuberancia puntiaguda denominada ginóforo de infección, que perfora la pared celular y la membrana citoplasmática. La presencia del ginóforo en el interior de la célula provoca coagulación y reticulación del citoplasma, transformando el contenido celular en una densa masa granular. La extremidad del ginóforo de infección adquiere mayor volumen y da origen al haustorio.

Gopalkrishan (1951) indica que los uredosoros que son formados por grupos de hifas intercelulares, forman un aglomerado o fascículo dentro del espacio sub-estomatal. De las extremidades de esas hifas se originan pequeños esterigmas sobre los cuales se forman las uredosporas y/o teliosporas.

Tanto la penetración del micelio del hongo al interior del mesófilo foliar, como la esporulación ocurren por los estomas (Rodrigues, 1990); así, se especula que la mayor o menor susceptibilidad observada entre cafetos del mismo o de diferentes grupos fisiológicos podría estar asociada a la cantidad

de estomas en la hoja. En razón de ello, se realizó el presente trabajo con el objetivo de determinar la posible relación entre el nivel de susceptibilidad y el índice estomático de tres materiales genéticos de café: Híbrido de Timor 832/1, Clon 644/18 y la variedad Catuaí Rojo 2144; los dos primeros resistentes y el tercero susceptible a *H. vastatrix*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron tres materiales genéticos de café (Híbrido de Timor 832/1, Clon 644/18 y la variedad Catuaí Rojo 2144) del Banco de germoplasma de la Universidad Federal de Vicosa, Minas Gerais, Brasil, mantenidos en condiciones de invernadero. Del tercio medio de las plantas fueron colectadas ocho hojas tomadas del segundo par, contadas a partir del extremo distal del ramo plagiotrópico, seleccionado de forma aleatoria alrededor de la planta.

Las hojas fueron colocadas inmediatamente en cámara húmeda, constituida de una bandeja de 38 x 32 x 6 cm con papel absorbente humedecido con agua destilada en el fondo y cubierta con una tapa de vidrio. Para mantener por mayor tiempo túrgidas las hojas de café, se colocó en los extremos de los pecíolos, algodón humedecido con agua destilada.

Para cuantificar el número de estomas y las células epidérmicas se utilizó la técnica de Caldwell y Stone (1932), que consiste en aplicar una película de esmalte de uñas incoloro, diluido 1:1 en acetona (v/v) sobre la superficie abaxial de las hojas de cada material genético evaluado. Una vez secas, las películas de esmalte fueron colocadas invertidas en una gota de glicerina acidificada y azul de Aman. La parte de la hoja donde se aplicó el esmalte correspondió a la región central. Las lecturas de número de estomas y células de la epidermis fueron hechas con microscopio óptico en aumento de 400x en cinco campos seleccionados aleatoriamente. Se consideró el número estomas/campo, cuando las dos células guardas del estoma estaban presentes y al número de células epidérmicas aquellas que tenían toda su área o al menos un 60 % dentro del campo muestreado. Además de esas dos características fue calculado el índice

estomático (IE), sugerido por Azevedo et al. (1990), de acuerdo con la siguiente relación:

$$IE = \frac{N^{\circ} \text{ est.}}{N^{\circ} \text{ est.} + N^{\circ} \text{ cel. epid.}} \times 100$$

N° est. = número de estomas

N° cel. epid. = número de células epidérmicas

El diseño experimental fue el completamente aleatorizado, con tres tratamientos, representados por los materiales genéticos, y ocho repeticiones. La parcela experimental estuvo constituida por la hoja muestreada, siendo el valor de cada una de las variables el promedio en cinco campos. El

análisis estadístico fue realizado con el Sistema de Análisis Estadístico y Genético (SAEG) de la Universidad Federal de Vicosa (Euclides, 1983).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se pudo constatar que para la variable número de células epidérmicas el Híbrido de Timor 832/1 presentó el mayor promedio el cual fue estadísticamente diferente al del Clon 644/18 y la variedad Catuaí Rojo 2144, según la prueba de Tukey (Cuadros 1 y 2). No hubo diferencias estadísticas entre el Clon 644/18 y la variedad Catuaí Rojo 2144.

Cuadro 1. Valores promedio de las variables número de células epidérmicas, número de estomas e índice estomático en dos materiales genéticos de café resistentes y uno susceptible a *Hemileia vastatrix*

Materiales genéticos	Variables cuantificadas		
	Número de células epidérmicas	Número de estomas	Índice estomático
Híbrido de Timor 832/1	6,82 a	1,73 ns	20,39 ns
Clon 644/18	5,95 b	1,50	21,32
Catuaí Rojo 2144	5,82 b	1,75	23,59
Promedio	6,19	1,66	21,77

Promedios seguidos de la misma letra no difieren estadísticamente según la prueba de Tukey al 5% de probabilidad
ns No significativo

Para los tres materiales genéticos, tanto para la variable número de estomas como el índice estomático no hubo diferencias estadísticas ($p \leq 0,05$) entre ellos (Cuadro 2), a pesar que el Catuaí Rojo 2144 presentó valores ligeramente superiores (Cuadro 1).

El análisis en conjunto de las variables estudiadas, permiten señalar que aunque el Híbrido de Timor fue estadísticamente diferente de los otros dos materiales genéticos con relación al número de células epidérmicas, la resistencia no podría ser atribuida a esa característica, visto que el Clon 644/18 también es resistente a la roya del cafeto y a su vez éste presentó un comportamiento estadístico similar a la variedad Catuaí Rojo 2144, que es altamente susceptible a *H. vastatrix*. Las variables número de estomas e índice estomático tampoco explican la susceptibilidad del Catuaí Rojo 2144 ni la resistencia del Híbrido de Timor y del Clon 644/18. En el caso de la variedad Catuaí Rojo, aún presentando una ligera tendencia de aumento en el índice estomático, no justificaría

la susceptibilidad que presenta el grupo fisiológico SH₅ (Rodrigues et al., 1965), en razón de la similitud estadística con los materiales resistentes a la enfermedad.

Según la escala de D'Oliveira (1958), hay un amplio rango de reacciones a la roya del cafeto, las cuales varían desde la hipersensibilidad hasta la producción abundante de uredosporas en lesiones de diferentes tamaños. El hecho de que *H. vastatrix* penetre al mesófilo foliar vía estomas para establecer su parasitismo no parece ser la condición para que se observen todos esos tipos de reacciones, tal cual podría ser una resistencia de naturaleza post-infecciosa. Chaulfon y Carvalho (1987), en estudios realizados sobre la composición química de la hoja del cafeto en relación al ataque de la roya, constataron que los tenores foliares de compuestos fenólicos en su fracción monodimérica se incrementaron en el grupo de plantas de café sin producción, las cuales son menos atacadas en la época de mayor incidencia y severidad de la roya. Este aumento

en el tenor de compuestos fenólicos se correlaciona negativamente con los bajos índices de roya, atribuible a que en la fracción monodimérica se encuentran compuestos de reconocida función fungitóxica como los ácidos clorogénico, cinámico, cafeico y otros. En posteriores

estudios Carvalho (1991) y García (1993) coincidieron con los resultados obtenidos por Chaulfon y Carvalho (1987); además, Carvalho (1991) señaló que en cafetos con altos índices de roya ocurre aumento en la actividad enzimática de polifenoloxidasas y peroxidasa.

Cuadro 2. Resumen del análisis de varianza de las variables, número de células epidérmicas, número de estomas e índice estomático en dos materiales de café resistentes y uno susceptible a *Hemileia vastatrix*

FV	Cuadrados medios		
	Número de células epidérmicas	Número de estomas	Índice estomático
Tratamiento	2,37 **	0,15 ns	21,60 ns
Error	0,38	0,12	23,93
CV (%)	9,98	21,68	22,46

** Significativo según la prueba de F al 1 % de probabilidad

ns No significativo

Abreu (1988), al evaluar niveles de resistencia horizontal, inoculó discos de hojas de progenies de cafeto Catimor y Cavimor en generaciones F₃ y F₅ y, de progenies F₁ y F₂, además del cruzamiento Cavimor y Catuaí con diferentes razas de roya, no encontrando correlación entre índices estomáticos y resistencia horizontal. En este trabajo, donde se incluyeron materiales genéticos de conocida resistencia a la roya y que son fuertes de resistencia en los programas de mejoramiento, no fue posible demostrar la existencia de diferencias estadísticas entre estos materiales genéticos en relación al material susceptible para las variables número de estomas e índice estomático. Para el caso de la variable número de células epidérmicas, el Clon 644/18 que es resistente a *H. vastatrix*, fue estadísticamente similar a la variedad Catuaí Rojo 2144, que es susceptible al hongo.

CONCLUSIONES

Las características anatómicas de la hoja del cafeto, como son el número de estomas y células epidérmicas, no estuvieron asociadas a sus cualidades de resistencia o susceptibilidad al ataque de la roya.

AGRADECIMIENTO

A los investigadores Miguel Oliveros, Auberdo Millán y Ursulino Manrique por la

revisión y sugerencias presentadas al manuscrito.

LITERATURA CITADA

1. Abreu, M. S. 1988. Resistencia horizontal a *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. em cafeeiros descendentes do Híbrido de Timor. Tesis. Universidade Federal de Vicosa, Minas Gerais. 68 p.
2. Azevedo, A. A., C. J. Gomide, E. A. Monteiro, H. Silva y J. María. 1990. Anatomía das espermatófitas (Ejercicios prácticos). Universidade Federal de Vicosa. Boletín N° 226. 120 p.
3. Caldwell, R. M. y G. M. Stone. 1932. Apressorium formation and penetrations by leaf rust of wheat *Puccinia triticina* in relation to stomatal aperture. *Phytopathology* 22: 39-51.
4. Carvalho, V. L. 1991. Influencia dos niveis de producao sobre la evolucao da ferrugem e composicao química das folhas do cafeeiro. Tesis. Universidade Federal de Lavras. Lavras, Minas Gerais 85p.
5. Chaulfon, S. M. y V. L. Carvalho. 1987. Efecto da producao e da composicao química de folhas de cafeeiros sobre a

- intensidade de ataque de ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.). Resúmenes del XIV Congreso Brasileiro de Pesquisas Cafeeira. Sao Paulo. pp. 121-122.
6. D'Oliveira, B. 1958. As ferrugens do cafeeiro. Revista do café Português 3:39-51.
 7. Euclides, R. F. 1983. Sistema para análisis estadísticas e genéticas (SAEG). Central de procesamiento de dados. Universidade Federal de Vicosa, Minas Gerais. 68 p.
 8. García, E. G. 1993. Resistencia del café a *Hemileia vastatrix* I. Acumulación de fitoalexinas. Agronomía Costarricense 17:89-93.
 9. Gopalkrishnan, K. S. 1951. Notes in the morphology of the genus *Hemileia*. Micology 43:271-28.
 10. Pascholati, S. F. y B. Leite. 1995. Hospedeiro: mecanismos de resistencia. In: F. Bergamin, H. Kimati y L. Amorin (eds). Manual de Fitopatología, Vol. 1. Editora Ceres, Sao Paulo. pp. 417-453.
 11. Rajendren, R. B. 1968. Pathologic-histology and morphology of haustoria in *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. Mycopathologia et Mycologie Applicata. 36:107-112.
 12. Razafindramanba, R. 1958. Biologie de la rouille du cafeier. Revue de Mycologie 23:171-200.
 13. Rodrigues, Jr. C. J. 1990. Coffee rusts: History, taxonomy, morphology, distribution and host resistance. Fitopatología Brasileira 15: 5-9.
 14. Rodrigues, Jr. C. J., A. J. Bettencourt y J. Lopes. 1965. Study of the physiologic specialization on the coffee rust *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. and selection of coffee clones for the establishment of a standard range of differential host for this rust. Coffee Rust Research Center. Progress Report. Lisboa. pp. 21-27.
 15. Roger, L. 1951. Phytopathologie des pays chauds. Paul le Chevalier. Vol. I. Paris. pp.838-855.