

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

RESISTENCIA DE CULTIVOS DE HULE  
HEVEA BRASILIENSIS AL ATAQUE DE MICROCYCLUS ULEI



INFORME DE TESIS

Presentado Por:

SANDRA ELIZABETH MORALES CONTRERAS  
PARA OPTAR EL TITULO DE  
QUIMICO BIOLOGO

Guatemala, marzo de 1,996

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS  
DE GUATEMALA



FACULTAD DE CC. QQ. Y FARMACIA

Edificio "T-12"  
Ciudad Universitaria, zona 12  
Guatemala, Centroamérica

JUNTA DIRECTIVA DE LA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

DECANO

LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR

SECRETARIA

LICDA. ANA LUCRECIA FORTUNY DE ARMAS

VOCAL I

LIC. MIGUEL ANGEL HERRERA GALVEZ

VOCAL II

LIC. GERARDO LEONOEL ARROYO CATALAN

VOCAL III

LIC. RODRIGO HERRERA SAN JOSE

VOCAL IV

BR. ANA MARIA RODAS CARDONA

VOCAL V

BR. HAYRO OSWALDO GARCIA GARCIA

/bid

## AGRADECIMIENTOS

Especial agradecimiento a la Gremial de Hueleros de Guatemala, Laboratorio de Diagnóstico Fitopatológico de la Facultad de Agronomía de la UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA, al Ingeniero Agrónomo Gustavo Alvarez, Licenciado Químico Biólogo Emilio Garcia y en especial al Perito Agrónomo Vilialdo Arreága por su valiosa colaboración brindada para la realización de éste trabajo de Investigación.-

**DEDICO ESTE ACTO**

**A DIOS**

**Por permitirme culminar mi meta**

**A MI MADRE**

**OLGA CLEMENCIA CONTRERAS CAMPOS**

**A MIS HIJOS**

**ADRIANA DEL CARMEN Y DIEGO JOSE**

**A MI ESPOSO**

**Dr. GUSTAVO H. GUZMAN**

**A MI HERMANA**

**MARIA DEL CARMEN ADELSON**

**A MI SOBRINO**

**MICHAEL STEPHEN**

**A MI PRIMO**

**OSCAR DE LEON C.**

**A MIS COMPANEROS Y AMIGOS**

**DEDICO ESTA TESIS**

**A MI PATRIA**

**A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

**A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

**A LA GREMIAL DE HULEROS DE GUATEMALA**

**A MI ASESOR, LICENCIADO EMILIO GARCIA**

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

## INDICE

	Página
1.- RESUMEN	3
2.- INTRODUCCION	4-5
3.- ANTECEDENTES	6
3.1 El cultivo de hule	6
3.2 La Mancha Sudamericana de la hoja	6-7
3.3 El hongo	7-9
3.4 Control de la enfermedad	9
3.4.1 Control Químico	9
3.4.2 Control Biológico	9-10
3.4.3 Resistencia Varietal	10-11
3.4.4 Ejemplo de Resistencia	11-14
4.- JUSTIFICACIONES	15
5.- HIPOTESIS	16
6.- OBJETIVOS	17
7.- MATERIALES Y METODOS	18-21
8.- RESULTADOS	22-23
9.- DISCUSION DE RESULTADOS	24-25
10.-CONCLUSIONES	26
11.-RECOMENDACIONES	27
12.-REFERENCIAS	28-30
13.-ANEXOS	31-34

## 1. RESUMEN

A través del presente estudio se pretendía aislar la sustancia productora de la resistencia, en plantas de H. brasiliensis que manifestaron resistencia a nivel de invernadero, contra el hongo Microcyclus ulei, causante de la enfermedad sudamericana de la hoja, con el fin de identificar el principio activo de dicha resistencia.

Con ello se pretendía favorecer el uso de este principio activo en el control biológico de la enfermedad.

Se muestrearon hojas de H. brasiliensis del clon PR257 cuya resistencia ha sido comprobada en la estación experimental de la Gremial de Hueleros de Guatemala ubicada en la Finca LOS BRILLANTES de Retalhuleu. Se tomaron 3 tipos de hojas, tierna, inmadura y madura, a las cuales se les realizó un extracto clorofórmico, cada extracto se enfrentó con el hongo M. ulei por el método de difusión en placa para determinar la inhibición del crecimiento del hongo por el extracto.

Ninguno de los extractos inhibió el crecimiento del hongo por lo que se concluye que los extractos cloroformicos de H. brasiliensis no contienen el principio activo de resistencia de la planta a M. ulei.

## 2. INTRODUCCION

En las últimas décadas Guatemala ha incrementado considerablemente la extensión de superficie cultivada con Hevea sp, para la producción de caucho natural, llegando a convertirse en un cultivo económicamente importante para el país.

Guatemala tiene cultivada en la actualidad 27,000 hectáreas de las que 8,000 están en producción y el resto en desarrollo, generando ingresos del orden de Q 60,000,000.00 anuales, estimados al cambio actual, la actividad derivada de este cultivo da empleo directo a cerca de 10,000 trabajadores permanentes.

Para el cultivo de hule se utilizan principalmente plantas de la variedad Hevea brasiliensis por sus características de producción del caucho, sin embargo, el factor limitante más importante para el desarrollo del cultivo en regiones lluviosas, es la Mancha Sudamericana en la hoja producida por el hongo Microcyclus ulei (p. Henn Arx).

A pesar de ello, se han encontrado variedades de la planta resistentes al hongo aunque no presentan un comportamiento homogéneo, por lo que hay interés en conocer el principio activo por el cual se lleva a cabo esta resistencia.



Como en estudios previos de resistencia se ha encontrado efecto antifúngico en extractos clorofórmicos, se estudió un extracto clorofórmico de hojas de plantas de Hevea brasiliensis del clon PR257 que ha presentado resistencia al hongo en los semilleros de la Gremial de Huleros, localizados en el Centro Experimental "Los Brillantes" Retalhuleu, para determinar, a través de pruebas de difusión en agar, si estos extractos contienen sustancias inhibitorias del crecimiento del hongo M. Ulei, como principio activo de la resistencia de las plantas de dicho clon a la enfermedad.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. El cultivo de hule.

El árbol de hule (Hevea sp), es una planta tropical perenne que se cultiva para aprovechar en su estado adulto el látex proveniente del tallo, materia prima utilizada en la industria para la elaboración de hule o caucho, que a su vez se emplea para la fabricación de llantas, neumáticos, calzado, accesorios de vehículos, productos quirúrgicos, pinturas y otros.

El árbol de hule es originario del valle del Amazonas, Brasil y su cultivo comercial en Guatemala requiere de las zonas tropical húmeda y subtropical muy húmeda de las costas del pacífico y norte del país. Estos requerimientos son: una altitud de 0 a 2,000 pies sobre el nivel del mar, temperatura comprendida entre los 22 grados a 32 grados centígrados, precipitación pluvial mínima de 2,000 milímetros anuales, los suelos que mejor se adaptan son los profundos no menores de 1,5 metros y preferiblemente con una capa de materia orgánica gruesa (1).

#### 3.2.- La Mancha Sudamericana de la hoja

Es causada por el hongo Microcyclus ulei se manifiesta por manchas de color café verduzco oscuro en las hojas tiernas y pequeños tallos. Conforme avanza el grado de infección, estas manchas se unen entre si, cubriendo la casi totalidad de la hoja, se observa una apariencia de terciopelo café parduzco y una marchitez general, los bordes de las hojas se deforman y las hojas se tornan color negro, llegando a caer casi todo el follaje (3)

En el haz de las hojas aparecen picnidios color negro, su incremento en número y tamaño dan lugar a estructuras más grandes de grupos de ellos, con forma de anillo de varios milímetros de diámetro. Las esporas también aparecen en los peciolos, troncos, inflorescencias y frutas jóvenes. Los síntomas iniciales dependen de la forma de la conidia, la infección ocurre en la parte activa del crecimiento del tejido, distorsionándolo. En la mayoría de las veces se hipertrofian las inflorescencias o se rompen, y así la infección penetra hasta las flores, también pueden ser infectados los frutos pequeños de un centímetro de diámetro, los que son destruidos (4)

Algunos de los factores más importantes para que se implante el hongo son la variedad de la planta, la temperatura, la deseminación de la espora y el tamaño y la densidad de la plantación. Además, el viento o las corrientes de agua de lluvia diseminando las conidias, las que son depositadas en plantas sanas que se exponen a contraer la enfermedad, la conidia germina en cuestión de 8 a 10 horas bajo condiciones favorables de humedad ambiental que pueden ser provocadas por lluvias continuas e incluso el rocío de una noche fría (5)

### 3.3. El Hongo

Reino = Fungi

División = Micota

Sub-división = Eumicotina

Clase = Ascomicete

Sub-clase = Loculoscomicetadae

Orden = Dothideales

Familia = Dothideaceae

Genero = Dothidela

Especie = ulei

Sus características infectantes son conidias y ascosporas las que se producen según las condiciones ambientales predominantes. Las conidias varían en color desde hialino a violáceo y pueden presentarse como una o dos células que miden de 6 x 20 um. Por su parte, las ascosporas son más uniformes que las conidias, son hialinas, bicelulares y miden aproximadamente 4 a 13 um.

Los estudios realizados prueban que el período en que la conidia necesita infectar a la planta es de 8 horas en presencia del tejido del hospedero susceptible, la severidad de la enfermedad en la hoja es determinada por las condiciones ambientales. Las conidias tienen un período diurno que es menos marcado en los días secos, las grandes lloviznas incrementan el transporte y diseminación de la conidia, especialmente por la noche y por la mañana. El estado conidial se completa en 3-4 horas a saturación de humedad y a una temperatura óptima de 24 grados centígrados, aparentemente, los períodos cortos de temperatura bajas (13-16 grados centígrados), son necesarios para obtener ascosporas. La invasión del hongo es por vía de la cutícula, por medio de la conidia, la que es viable por dos a cuatro días a humedades muy bajas.

A la temperatura óptima de 24 grados centígrados las a/scosporas germinan después de 2 1/2 horas en la oscuridad y 6 horas en la luz. ~~Estas mueren en humedades mayores del 80%, y en~~

4 minutos expuestas a la luz ultravioleta, pero sobreviven semanas a temperatura ártica bajo condiciones secas, su virulencia es mayor a 24 grados centígrados, y disminuye marcadamente a 28 grados centígrados (4). La germinación es mayor a un ph entre 7-8 (4)

### 3.4 Control de la enfermedad

#### 3.4.1. Control Químico

Al inicio el uso de fungicidas para el control de M. ulei, fue muy limitado y se aplicaba casi exclusivamente en plantillas, estos tratamientos se iniciaron con derivados cúpricos, los que fueron reemplazados más tarde por compuestos de ditiocarbomato, necesitándose para ello aspersiones semanales. En 1970 se iniciaron los tratamientos a árboles maduros, lo cual vino a incrementar la producción, aumentando la factibilidad de la producción comercial de hule. En estas prácticas los fungicidas más ampliamente usados fueron entre los protectores clorotalonil, ditiocarbomato de magnesio y también triforine.

Estos tratamientos pueden bloquear dos estadios en el ciclo de vida del patógeno; primero en hojas jóvenes se puede prevenir la infección por ambos tipos de esporas y segundo en hojas maduras donde se inhibe la formación de ascosporas (3)

#### 3.4.2. Control Biológico

Se han hecho varios estudios sobre control biológico en diversas enfermedades de plantas, como en roya de trigo, de avena, enfermedades del cacao y otras, estos estudios se basan en la siguiente definición planteada por Deacon en referencia a Garret

"El control biológico es la práctica o proceso por los cuales los efectos indeseables de un organismo son reducidos por la acción de cualquier organismo que no sea la planta huésped, la peste, el patógeno o el hombre'" (7).

En un estudio hecho en Guatemala se estudiaron posibles efectos antagónicos "in vitro" sobre la roya de café, de hongos y bacterias de la microbiota normal de la hoja, obteniéndose algunos antagonistas efectivos (8).

No se conocen estudios en este sentido sobre M. ulei.

#### 3.4.3 Resistencia varietal

La resistencia puede ser descrita como la habilidad inherente de una planta para prevenir o restringir el establecimiento y actividades subsecuentemente de un patógeno. potencial (9), en éste fenómeno las células hospederas reaccionan a la presencia del invasor, excluyéndolo, previniendo su crecimiento o matándolo pudiendo morir también la célula, como consecuencia de una reacción de hipersensibilidad (10).

Las células y los tejidos responden a los daños, ya sea causados por los patógenos o por agentes mecánicos o químicos; con frecuencia esa reacción está relacionada con la producción de sustancias fungitóxicas en torno a la zona dañada algunos de los agentes químicos producidos en esa forma se hallan en concentraciones lo bastante altas como para inhibir el desarrollo de la mayoría de los hongos fitopatógenos (11).

Entre estos agentes están los compuestos fenólicos como los ácidos cloroénico y caféico y otros derivados del fenol,

algunos fenoles relacionados con la resistencia a las enfermedades parecen manifestar aumento en su síntesis o en su concentración después de haberse producido la infección. Algunos compuestos fenólicos que presentan efecto tóxico para los patógenos, al momento de presentarse una infección, aumentan su producción y se acumulan a un ritmo mucho mayor en una variedad resistente que en una susceptible. Algunos de esos compuestos fenólicos comunes pueden llegar a alcanzar concentraciones que pudieran ser letales para el patógeno (11).

La respuesta mecánica al daño depende de la estructura y potencialidad bioquímica de ambos, así como de la vía por la cual el patógeno entra e invade a la planta hospedera; algunas barreras aparecen en la planta sana aun no atacada y conocen como "barreras preformadas", tales como cutícula y pared celular epidérmica, los estomas, órganos florales y otras; cuando se forman al producirse el ataque y se conocen como "barreras inducidas por la infección" entre ellas la presencia de sustancias aislantes como suberina, lignina, gomas, taninos y flobafenos hasta la formación de un cambium de corcho (11).

#### 3.4.4 Ejemplo de resistencia

Estudios hechos por Langdon sobre la resistencia o susceptibilidad de varios clones de *Hevea* contra dos cepas de M. ulei, mostraron que las plantas eran susceptibles a ambas cepas, encontrándose solo una variedad altamente resistente, para ello se inocularon los árboles con conidias de cada cepa y se observó la severidad de la enfermedad durante la segunda y tercera semana

después de la inoculación (12).

En otro estudio, se observó un alto porcentaje de inhibición de la germinación en las pruebas con los extractos de las hojas de los clones resistentes; esto se produjo al aumentar las concentraciones de estos extractos, por lo que se concluyó que los compuestos fenólicos son altamente tóxicos para las conidias del hongo. Las pruebas de este estudio se efectuaron en extractos obtenidos por reflujo de hojas contenidas en agua destilada, así mismo se verificó germinación, usándo microcultivos del hongo en porta objetos (13)

Por otra parte, se estudió la susceptibilidad de clones de Hevea contra M. ulei, usando semillas de la planta que venían de Liberia, siendo en esta país resistentes al hongo pero al ser sembradas en Guatemala y Brasil, resultaron susceptibles al ataque del hongo. Uno de estos clones fue usado para la preparación de semilleros especiales para obtener, por medio de cruces y mutaciones, clones de hevea que mostraron resistencia; de esa manera se desarrollo un programa de cultivo de semillas resistentes en las plantaciones de hule (15)

En estudios para evaluar la resistencia del cacao a Ceratocystis fimbriata, se determinó la presencia de una sustancia fungitóxica, por lo que se estudiaron extractos de la corteza de la planta. Por medio de un cromatograma se determinó la presencia de polifenóles y la actividad fungitóxica fue probada a través de un bioensayo. También se concluyó que no era el ácido clorogénico el responsable de la actividad fungitóxica, debido a que éste no se encuentra presente en esta planta y sin embargo, las esporas no



germinaron en el extracto acuoso de las plantas estudiadas (16).

Una forma diferente de resistencia fue la encontrada en cacao a Phitophtora palmivora, determinándose que la concentración de sustancias fenólicas era mayor en frutos jóvenes que en los maduros. El efecto inhibitor no dependía únicamente de los fenoles, sino también de otras sustancias obtenidas del fruto, así mismo se concluyó que la resistencia es de naturaleza fisiológica, pero aun así, otros autores dicen que la actividad antifúngica es debida a la presencia de fenoles (17).

Sahl en una revisión bibliográfica sobre péptidos catiónicos, indicó que dichos péptidos también se encontraban involucrados en el mecanismo de defensa del hospedero (18).

Por otro lado, se descubrió que plantas de café sometidas a tratamiento con una suspensión de uredosporas de roya inactivadas por calor, presentaron protección contra una subsecuente inoculación con el mismo patógeno, por medio de un mecanismo hasta ahora desconocido (19).

En una evaluación hecha sobre la resistencia de cultivares de soya a Sclerotinia sclerotiorum en invernaderos, se encontró más resistencia en algunos cultivares que en el cultivar patrón de Evans (20). A su vez, otros investigadores provocaron reacciones de hipersensibilidad en tejidos de tubérculos de papa, obteniéndose la producción de fitoalexinas, tipo sesquiterpenoide, como rishitin y lubinin, a través de su activación con sustancias de alto peso molecular extraídas del tejido del hongo patógeno Phytophtora infestans (21).

En algunos intentos por determinar la correlación entre

niveles de polifenolixidasa en plantas de café y la resistencia de estas a la roya, no se encontró ninguna evidencia significativa de ello (22)

En otro estudio se obtuvo tres fitoalexinas, dos de tipo sesquiterpenoide y una tipo capsidal, éstas provenían de plantas con interacciones incompatibles Coffea arabica-Hemilea vastatrix la que podría jugar un papel importante en el desarrollo de la resistencia al patógeno (23)

Existen algunos indicios de la presencia de compuestos fungistáticos y fungitóxicos en la savia excretada en heridas y lesiones provocadas por hongos en los árboles; determinándose que en muchos casos, pueden servir para impedir el desarrollo de futuros patógenos (24).

Estudios recientes han demostrado dos reacciones fisiológicas de resistencia; una de ellas es la producción fitoalexina Scopoletina, provocando un efecto Cumarínico a las 12 horas después de la inoculación. El otro efecto es el fungitóxico de la Scopoletina sobre Microcyclus ulei que fue provocado in vitro (29)

Otro estudio se dirigió a identificar los componentes de resistencia en el campo bajo condiciones controladas. Estos análisis mostrarán que ninguno de los clones estudiados convinaban todas las características perjudiciales del hongo hacia la hoja (30)

#### 4. JUSTIFICACIONES

Nuestro país reúne características climáticas favorables para el crecimiento del árbol de Hevea, productor del caucho natural, por lo que se ha convertido en uno de los principales exportadores de este producto; generando empleo y divisas para el país.

Sin embargo, uno de los mayores problemas fitosanitarios a que se enfrentan el hule en el campo lo constituye la Mancha Sudamericana de la hoja, causada por el hongo Microcyclus ulei, esta enfermedad diezma las plantaciones, limitando el fenómeno del cultivo y causando pérdidas a los productores. Se han encontrado variedades de la planta que presentan resistencia al hongo patógeno, sin embargo no se han hecho estudios que permitan conocer los mecanismos que producen esta resistencia, por lo que el presente trabajo tiene por objeto determinar si en los extractos clorofórmicos de la hoja de plantas de Hevea brasiliensis cultivadas en nuestro país, y si seleccionadas por pruebas de resistencia, existen sustancias con actividad antagónica del hongo M. ulei, verificando en esos extractos el efecto que manifiesten sobre el crecimiento del patógeno.

Debido a que en la práctica agronómica las sustancias para el control de las enfermedades son aplicadas generalmente por aspersión, principalmente en enfermedades que atacan el follaje, se hace necesario verificar el efecto de los extractos estudiados en un medio líquido.

## 5. HIPOTESIS

- 5.1 El extracto clorofórmico, suspendido en agua, obtenido de hojas de Hevea brasiliensis provenientes de plantas cultivadas en nuestro país que presentan resistencia al hongo Microcyclus ulei, poseen propiedades inhibitorias para el crecimiento del hongo, en prueba in vitro de difusión en placa.

## 6. OBJETIVOS

- 6.1. Obtener extractos clorofórmicos de hojas de *Hevea brasiliensis*, obtenidas de plantas resistentes al hongo *Microcyclus ulei*, cultivadas en nuestro país.
- 6.2. Estudiar el efecto de estos extractos sobre el crecimiento en medio sólido del hongo *Microcyclus ulei*.
- 6.3. Estudiar el efecto de estos extractos sobre la producción de biomasa en medio líquido del hongo *Microcyclus ulei*.

## 7. MATERIALES Y METODOS

### 7.1 Universo de trabajo

Se utilizarón hojas de Hevea brasiliensis, provenientes de plantas del clon PR257 resistentes al hongo Microcyclus ulei, obtenidas y verificada su resitencia en el semillero de la Gremial de Huleros de Guatemala localizado en la estación experimental de la finca Los Brillantes, Retalhuleu, según el método de dispersión con pincel en ambiente controlado, descrito por Langdon (12)

### 7.2 Medios y Materiales

- Medios:

Agar de dextrosa y papa (PDA)

Caldo dextrosa, papa (CDP)

- Reactivos:

Alcohol al 95%

Cloroformo

Agua tridestilada

- Recursos humanos:

El trabajo fué realizado por la Br. Sandra Elizabeth Morales Contreras, con asesoría del Licenciado Emilio Garcia, y la colaboración de profesionales de la Gremial de Huleros de Guatemala y del laboratorio de Diagnostico Fitopatológico de la Facultad de Agronomía de la USAC.

- Materiales:

Discos de papel Whatman #1

Tubos de ensayo 100 x 10 mm con tapón de rosca

Erlenmeyes de 250 y 500 ml

Cajas de petri descartables

Papel limpiantes

Láminas cubre y porta objetos

Microscópio binocular modelo HKS-12

Incubadora Equatherm C.M.S. modelo c-1485

Mechero Bunsen

Dispensora de vidrio manual microbiológica

Estereóscopo

Pinzas y

Horno de ambiente controlado Biotranette Lab. Linea modelo 846.

### 7.3 Procedimiento

- En el semillero de la finca Brillantes se recolectaron hojas de plantas resistentes, obtenidas de un almácigo con tocones brotados en bolsas aproximadamente de 6 a 7 meses de haber sido sembrados, verificados por profesionales de la rama agronómica que labora en dicho centro. Se tomarón 3 tipos de hojas de acuerdo con criterios establecidos por la Gremial de Hueleros para la selección de dichas hojas: Hojas tiernas con coloración oscura (hojas tipo b) y hojas maduras completamente desarrolladas (hojas tipo c), se recolectarón al azar entre el semillero 200 hojas de cada tipo, y se llevarón a sequedad en horno a 60 grados centigrados.
- A las hojas secas de cada tipo se le hizo una maceración. Y del macerado se tomarón 2 gramos y se le agregaron 30 ml de cloroformo, se agitaron por media hora aproximadamente, se filtró el extracto 3 veces y se llevó a evaporación.

- Se reconstituyó con agua destilada estéril el extracto obtenido y se prepararon 3 diluciones de los extractos en la siguiente forma: 1:2, 1:5, 1:10.

Con estos extractos se aplicó una modificación de la metodología de Bauer Kirby de susceptibilidad antimicrobiana, de la siguiente manera:

- De cada dilución, para cada tipo de hoja, se impregnaron 10 discos estériles de papel Whatman # 1. De 0.1 mm de diametro y 0.1 mm de grosor.
- En 10 cajas de petri con PDA, se incluyó un ml de un licuado estéril de crecimiento de M. ulei en medio líquido, con una concentración igual a la dilución 1:1 y extendido con una dispersora de vidrio.
- En cada caja se colocó un disco de cada extracto, se inocularon cinco cajas de PDA con el hongo como control.
- Se hicieron 10 repeticiones por cada dilución.

#### Preparación del inóculo

- En un erlenmeyer con 50 ml de CPD se inoculó el hongo, usándose micelio mas esporas.
- Incubar a 30 grados por 8 días
- Llevar con agua destilada estéril
- Licuar el crecimiento en condiciones estériles
- Llevar a concentración igual a la dilución 1:1 usando agua destilada estéril.

Además se corrieron pruebas usando otros solventes para la obtención del extracto, estos fueron extractos acuoso, extracto



bencenico, extracto en alcohol etílico al 90% y éter.

Estos extractos fueron analizados de la misma forma que el extracto cloroformico, se leyeron las pruebas y se elaboraron los resultados.

## 8. RESULTADOS

De las pruebas realizadas se analizarón los datos obtenidos y se determinó que el extracto clorofórmico de las hojas tiernas, hojas inmaduras y hojas maduras de H. Brasiliensis no contenía el principio activo de resistencia a M. Ulei, lo cual se reflejó en el crecimiento masivo del hongo en los ensayos realizados.

Tampoco se pudo verificar el efecto de la dosis aplicada debido a que el crecimiento del hongo fue similar en todas las diluciones efectuadas.

Estos resultados se describen en la siguiente tabla No. 1.

De los otros extractos muestreados se encontro que tampoco inhibian el crecimiento de Microcyclus ulei como se ve en la tabla No. 2

DETERMINACION DE PROPIEDADES INHIBITORIAS DE DILUCIONES CLOROFORMICAS DE LA DIFERENTES ETAPAS DE MADURACION DE LAS HOJAS DE PLANTA H. BRASILIENSIS CON RESPECTO AL HONGO M. ULEI EN PRUEBAS IN VITRO DE DIFUSION EN PLACA.

No. rep/Dil./	/ HOJA TIERNA			/ HOJA INMADURA			/ HOJA MADURA		
	1:	2-1:5-	1:10/	1:2-1:5-	1:10		/1:2-1:5-	1:10	
1	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
2	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
3	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
4	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
5	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
6	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
7	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
8	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
9	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
10	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI

NI= No se observó inhibición

PRUEBAS IN VITRO DE DIFUSION EN PLACA DE MICROCYCLUS ULEI  
 UTILIZANDO OTROS SOLVENTES COMO PRUEBA DE EXTRACCION PARA LA  
 DETERMINACION DE LA INHIBICION.

Repetición	Al	C	Ag	C	Ep	C	B	C
Hoja tierna 1	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni
Hoja tierna 2	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni
Hoja inmadura 1	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni
Hoja inmadura 2	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni
Hoja madura 1	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni
Hoja madura 2	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni

Al = Alcohol

Ag = Agua

Et = Eter

Be = Benceno

C = Control

Ni = No se observo inhibición

## 9. DISCUSION DE RESULTADOS

En las tres etapas se utilizó el mismo procedimiento de extracción y las mismas diluciones, dando iguales resultados no pudiendo determinarse el efecto de las etapas de maduración de las hojas sobre la producción de sustancias inhibitorias del crecimiento de M. ulei, que pudieran formar parte del principio activo de resistencia a dicho hongo, al no existir el principio activo en los extractos clorofórmicos estudiados, tampoco se pudo establecer algún efecto de la concentración del principio activo sobre el crecimiento del hongo. Esto a pesar de que en estudios anteriores se han citado casos de inhibición en clones de H. brasiliensis y H. benthamiana a dos razas de M. ulei en clones de H. brasiliensis (13). Los factores que afectaron los resultados de la inhibición pudieron haber sido el método de extracción que no extrajo adecuadamente el principio activo de la hoja, otro pudo ser la época del año que no era la más apropiada, quizás haciendo el muestreo en época seca se tendría más éxito, y la edad de las plantas, pudo haber afectado principalmente al proceso de obtención de dicho principio.

Por lo que se determinó in vitro que no hay inhibición significativa del crecimiento de M. Ulei, en el extracto cloroformico en hojas de plantas del clon Pr257 de la plantación experimental de la Gremial de Huleros de Guatemala ubicada en la Finca LOS BRILLANTES de Retalhuleu.

La ausencia de inhibición del crecimiento de Microcyclus ulei en las pruebas realizadas en extractos con agua, etanol a 90% Benceno y Eter demuestran que el principio activo de resistencia no se encuentra en dichos extractos debiendo considerarse otras extracciones u otra clase de propiedades de la planta como causa de la resistencia.

## 10. CONCLUSIONES

- El extracto clorofórmico de la hoja H. brasiliensis no permitió obtener el principio activo de la resistencia al hongo M. ulei.
- La época del año en que se muestreó pudo haber afectado las propiedades inhibitorias de la hoja de H. brasiliensis.
- El hongo M. ulei tuvo alta producción de conidias y crecimiento miceliar en el medio de cultivo utilizado y aun sobre los discos impregnados con extractos, demostrando un efecto nulo de dicho extracto sobre su crecimiento.
- Otros extractos de la hoja Hevea brasiliensis (Benceno, Agua, Eter y alcohol al 90%) demostraron la ausencia del principio activo según la metodología usada.

## 11. RECOMENDACIONES

- Determinar la metodología adecuada de extracción del principio activo de resistencia de H. brasiliensis sobre el hongo M.ulei. usando otros extractos
- Determinar la concentración adecuada del principio activo para inhibir el crecimiento del hongo IN VITRO.
- Verificar la concentración adecuada del hongo para la realización de los ensayos.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Salam AA. Establecimiento de plantaciones de Hule. Guatemala:Departamento de Divulgación Agrícola. Guatemala: DIGESA, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, Doc. Tec. 1982. 24p.
2. Ovalle VCA. Manual del cultivo de hule Hevea en Guatemala. Guatemala: DIGESA, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, Doc. Tec. 1983, 112p (p. 67)
3. Chee AH, Holliday P. South American Leaf Blight of Hevea Rubber. Malaysian: Rubber Research and Development Board 1976. 50p.
4. Peries OS, Liyanage A. de S. Hevea Diseases of Economic Importance and Integrated Methods of Control. Kuala Lumpur: International Rubber Conference, 1985, 14p. (p.2-4)
5. Langford MH. South American Leaf Blight of Hevea Rubber Trees. Washinton, D.C.: Department of Agriculture, 1944. 30p. (1-12).
6. Holliday, P. South American Leaf Blight of Hevea Brasiliensis (Microcyclus ulei). Phytopathology 1970. 225p. (p.125-127).
7. Deacon JW. Microbial Control of Plant Pest an Diseases. Washinton, Am Soc Micro 1983; 87p.
8. Garcia FEE, Control Biológico de la Roya del Café. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 1989. 53p.
9. Daly M. Some Aspects of Host Pathogen Interaction. 29- 50p. (in: Heigris R. and Williams Pit. eds. Physiological Plant Pathology. Berlin: Springer-Ver lag. 1976: XX, 890p.
10. Moraes WBC Host Parasite interaction in the Coffea arabica Hemileia vastatrix. Sistem. 59-74p (In: Fulton RH. ed Coffea Rust in the America) St. Paul MN. USA. Phitopath Soc. 1984. 120p.
11. Agrios GN. Fitopatologia. Mexico: Limusa, 1986. 743 p. (p101-107)
12. Langdon KR. Resistencia o Susceptibilidad Relativa de varios clones de Hevea brasiliensis y Hevea benthamiana a dos razas de D. ulei. Gainesville, Fla. Departamento de patología vegetal. 1966. 49: 1-4.

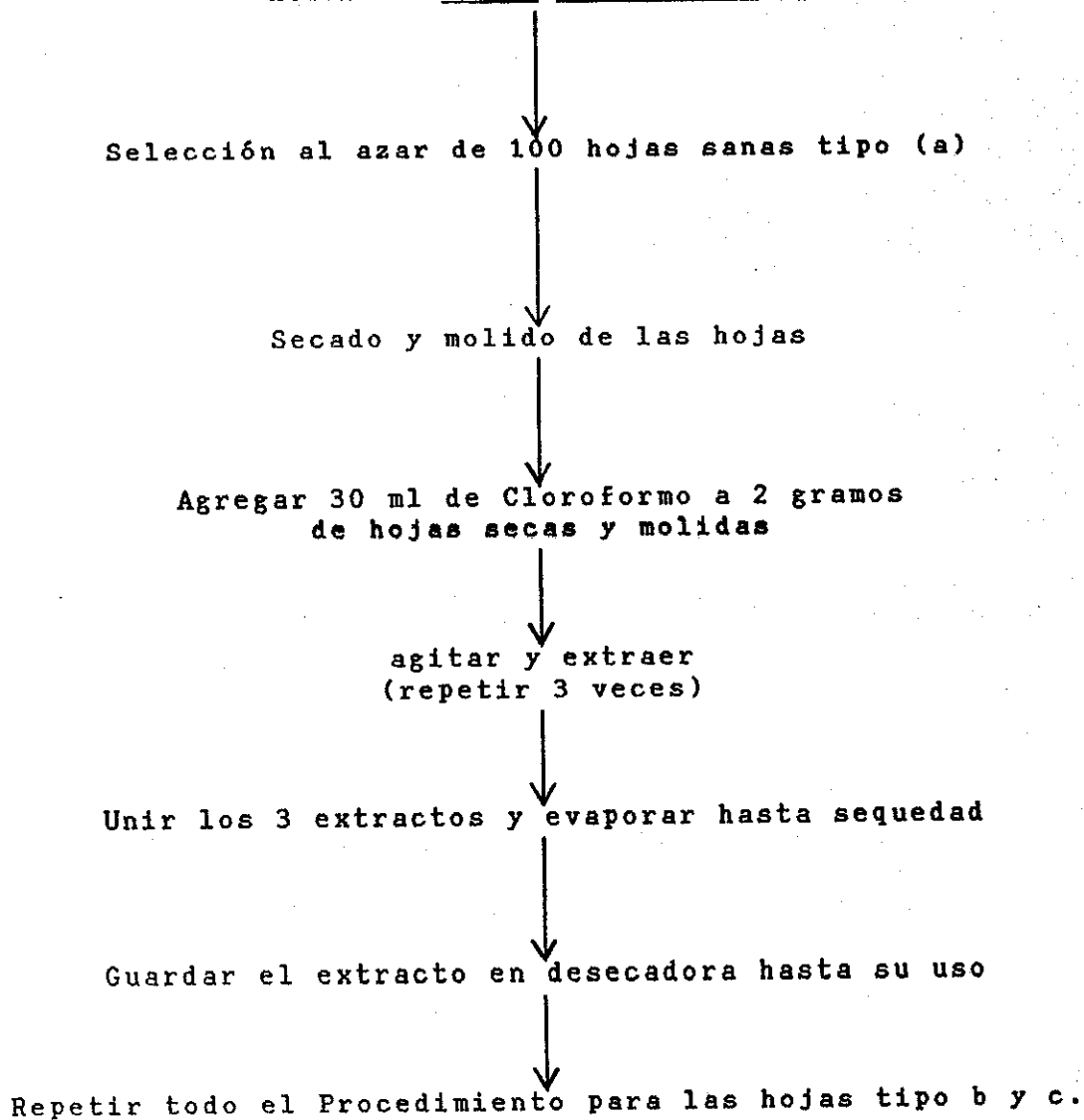


13. Figari A. Sustancias Fenólicas Tóxicas al Hongo D. ulei en hojas de clones de Hevea brasiliensis. Turrialba, Costa Rica: Rev. ICCA; 1965; 15: 103-109
14. Langdon Kr. Culture and Pathogenicity of D. ulei Miami: Universidad de Florida, (A Dissertation Presented to Degraduate Council of the University of Florida). 1963. Monografía. V + 35p.
15. Bos H. McIndoe AG. Breeding of Hevea for Resistance Against D. ulei. p. Henn. Kuala Lumpur: JIRI of Malaya 1965; 19:92-107.
16. Ruiz ZM. Mecanismos y Métodos de Evaluación de la Resistencia del Cacao a ceratocystis fimbriata. Turrialba, Costa Rica: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA, (Centro de Enseñanzas e Investigación)
17. Maia RH. La importancia de las Sustancias Polifenólicas en el Mecanismo Fisiológico de la Resistencia de Cacao (Theobroma cacao L.) a Phytophthora palmivora. Turrialba, Costa Rica: Instituto Interamericano de las Ciencias Agrícolas de la OEA, (Centro de Enseñanza e Investigación) 1966. XX+452pp.
18. Sahl MG. Bactericidal Cationic Peptides Involved in Bacterial Antagonism and Host Defense. Microbial Sci 1985; 2(7) 7212.
19. Moraes WBC, Matius EMF, Musumeci MR, Beretta MJG, Induced Protection to Hemileia vastatrix in Coffee Plants. Summa phytopath. 1976; 2:39-43.
20. Boland GJ. and Hall R. Growthroom Evaluation of Soybean Cultivars for Resistenci to Sclerotinia sclerotiorum. Can J. Plant Sci. 1986; 66: 559-64.
21. Keanen L, Bryan IB, Friend J. The elicitation of the Hypersensitive Response of Potato Tuber Tissue by a Component of the Culture Filtrate of Phytophthora infestans. Physiol Plant Pathol 1985; 26(3) 343.
22. Guedes MEM. Polyphenoloxidase Isozymes in Coffee Plants Differing a Single Gene for Resitence to Hemileia vastatrix. Lisboa, Bioteria Genetica . 1981; 11 (LXXVII): 51-56 P.
23. Guedes MEM. Farmacao the Fitalexinas em Interaccoes Incompativeis Coffea arabica hemileia vastatrix. Simposio sobre Ferrugens do cafeeiro, Oeiras, Portugal; 1983. 207-215 P.

24. Hattori T, Ohta Y. Induction of Phenylalanine Ammonialyase Activation and Isoflavone Glucoside Accumulation in Suspension Cultured Cells of Red Bean, Vigna angularis, by phytoalexin Elicitors, Vanadate, and Elevation of Medium pH. *Plant Cell Physiol* 1985; 26(6): 1101.
25. Kemp MS, Burden Rs. Phytoalexins and Stress Metabolites in the Sapwood of Trees. Review Article Number 17. *Phytochemistry*. 1986; 25(6): 1261-69.
26. Arriola MC. Garcia E. Extracción de compuestos foliares de *Hevea brasiliensis* modificación de Figari A. (referencia #13)
27. Garcia E. Pruebas Microbiologicas para Determinación de actividad Inhibitoria in Vitro sobre M. ulei, de extractos cloróformicos de material foliar de Hevea Brasiliensis. Comunicación Personal
28. Método Microbiológico de placa. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 5a. ed. Mexico, Grupo Papelero Continental 1988, 1576 p (p. 31-42)
29. Garcia Dominique. CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA RESISTANCE TOTALE ET PARTIELLE DANS L'INTERACTION HOTE-PARASITE *Hevea* spp.- *Microcyclus ulei*. ASPECTS HISTOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DES REACTIONS IMPLIQUEES DANS CES RESISTANCES. Francia: Universite Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc,- (These De Doctorat). 1995.- 208p.
30. Rivano Franck, LA MALADIE SUD-AMERICAINE DES FEUILLES DE L'HEVEA. ESTUDE EN CONDITIONS NATURALLES ET CONTROLEES, DES COMPOSANTS DE LA RESISTANCE PARTIELLE A MICROCYCLUS ULEI (P. HENN.) V. ARX. Francia: UNIVERSITE DE PARIS-SUD CENTRE D'ORSAY, (These de Doctorat, de L'Universite de PARIS-SUD). 1992. - 231p.

## 13. A N E X O S

ANEXO 1.  
DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA  
OBTENCION DEL EXTRACTO CLOROFORMICO DE LAS  
HOJAS DE Hevea brasiliensis.



## ANEXO 2.

EFEECTO INHIBITORIO DEL EXTRACTO CLOROFORMICO DE TEJIDO  
FOLIAR DE Hevea brasiliensis SOBRE EL CRECIMIENTO  
EN MEDIO SOLIDO DE Microcyclus ulei.

Suspender el residuo del extracto de hoja  
tipo (a) en 40 ml de agua destilada.

Preparar diluciones 1:2, 1:5 y 1:10

Impregnar 10 discos de papel filtro No. 1 de  
5 mm de diametro para cada dilusi3n.

Colocar los discos en 10 cajas de petri con medio Agar Papa  
Dextrosa (PDA) Inoculadas previamente con  
el hongo, distribuyendo en cada caja un disco  
de dilusi3n 1:2, uno de 1:5, uno de 1:10 y un disco  
control solo con agua destilada est3ril.

Incubar a temperatura ambiente por 20 d3as.

Medir los halos de inhibici3n de cada dilusi3n y  
determinar si hubo efecto inhibitorio comparando  
con los resultados de los discos control.

Repetir el Procedimiento para las hojas de tipo b y c.

ANEXO No. 3  
PREPARACION DEL INOCULO DEL HONGO  
Microcyclus ulei.

En un erlenmeyer con 50 ml de caldo Papa Dextrosa (CPD) inocular una cepa del hongo aislada en las plantaciones de la Finca Brillantes e identificada en la Facultad de Agronomía, USAC.

↓  
Incubar a 30 grados centigrados por 8 días

↓  
Lavar con agua destilada estéril

↓  
Licuar el crecimiento en condiciones estériles

↓  
Llevar a concentración igual al estandar de Macfarland No. 4, usando agua destilada estéril

↓  
Guardar en refrigeración en recipientes estériles.

## ANEXO No. 4

Extracción con otros solventes de hojas de Microcyclus ulei para la obtención de la inhibición del crecimiento de Microcyclus ulei por el método de difusión en Agar

↓  
Seleccionar al azar hojas sanas de Hevea brasiliensis del tipo (a)

↓  
Secado y molido de las hojas

↓  
Agregar 30 ml. de Eter, Benceno, Alcohol al 90% y Agua a 2 gr. de hoja secas y molidas.

↓  
Agitar y extraer (repetir 3 veces)

↓  
Unir los tres extractos para cada solvente y evaporar a sequedad

↓  
Suspender el residuo del extracto de la hoja tipo (a) en 40 ml. de agua destilada

↓  
Inocular un ml. de la suspensión con una concentración igual a la dilución 1: 1 de el hongo Microcyclus ulei en cajas de petri con agar PDA

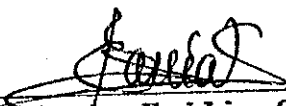
↓  
Solidificar

↓  
Leer cada día durante 8 o mas días



---

**Br. Sandra Elizabeth Morales Contreras**  
**Autor**



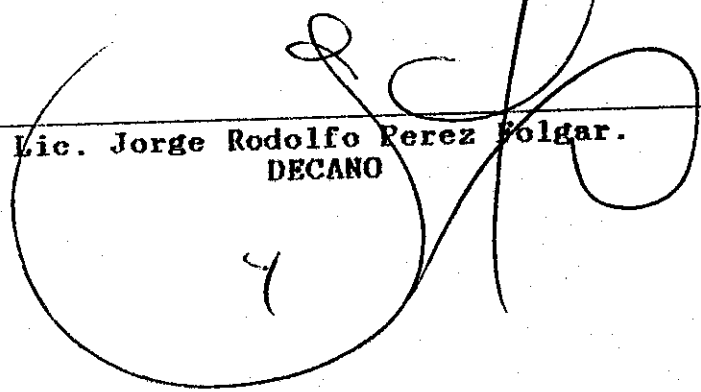
---

**Lic. Erwin Emilio García Fuentes.**  
**Asesor**



---

**Lic. Gerardo Arroyo**  
**Director**



---

**Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar.**  
**DECANO**