

DEFOLIACIÓN DE CAFETOS CAUSADA POR *Hemileia vastatrix* EN MÉXICODEFOLIATION OF COFFEE PLANTS BY *Hemileia vastatrix* IN MEXICO

por Gloria Carrión*
Fernando Ruiz-Belín* y
Ricardo Alarcón-Mora*

SUMMARY

Defoliation caused by *Hemileia vastatrix* in coffee plants in Mahuixtlan, State of Veracruz was 93% per year.

RESUMEN

La defoliación de cafetos parasitados por *Hemileia vastatrix*, en Mahuixtlan, Ver., fue de 93% por año.

La enfermedad causada por *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. en el café es una de las más importantes, ya que provoca una gran defoliación, lo que ocasiona el debilitamiento de las plantas y la baja producción de frutos. El porcentaje normal de defoliación de cafetos sanos en la India, cuando las hojas tienen entre 3 y 6 meses de edad, es en promedio de 25% (Indian Coffee Board Research Department, 1973) y en Brasil es de 16.3% a los 9 meses, según Cadena-Gómez y Buriticá-Céspedes (1980). El incremento en la defoliación causado por la roya del café en este último país, es de 71.8% para la variedad Mundo Novo (idem, 1983). En México no se había cuantificado esta defoliación.

En el presente trabajo se cuantificó dicha defoliación causada por la roya del café en la localidad de Mahuixtlan, Ver. Se marcaron con etiquetas colgantes 100 hojas parasitadas por *Hemileia vastatrix* de 10 cafetos (5 de la variedad Typica y 5 de la variedad Mundo Novo) al inicio de cada una de las estaciones del año entre el invierno de 1987 y el otoño de 1988. Se calculó la edad de las hojas marcadas tomando en cuenta los 25 días en que las hojas se desarrollan completamente y el período de 40 días de incubación antes de la esporulación de las pústulas del hongo, siguiendo los trabajos de Yamaguchi y Friend (1979) y Cadena-Gómez y Buriticá-Céspedes (1981). La edad de las hojas marcadas fue en promedio de 2 meses. En el período diciembre-marzo se cayeron 93 hojas; en el segundo período, marzo-julio, el número de hojas caídas fue de 92; en el tercero, junio-septiembre, fue de 95 y en el cuarto período, septiembre-diciembre, fue de 93 (Tabla 1), cayéndose la mayoría en el segundo mes de cada período. No se presentaron diferencias importantes en el número de hojas caídas en los cuatro períodos en las variedades de café estudiadas.

Se observa que los porcentajes de defoliación de los cafetos enfermos estudiados causados por la roya del café, permanecen relativamente constantes durante el año en que se realizó este estudio.

Los autores agradecen a los Dres. G. Guzmán del Instituto de Ecología y H. C. Evans del CAB International Institute of Biological Control por sus sugerencias y revisión del trabajo.

*Instituto de Ecología, Proyecto Hongos, Apdo. Postal 63 Xalapa, Veracruz 91000

TABLA 1. Defoliación de cafetos parasitados por *Hemileia vastatrix* en Mahuixtlán, Ver. en las estaciones del año.

Estación	Mes	Hojas sobrevivientes	Hojas caídas	Defoliación mensual* (%)	Defoliación acumulada (%)
Invierno	diciembre	100	--	--	--
	enero	47	53	53	53
	febrero	17	30	63	83
	marzo	7	10	58	93
Primavera	marzo	100	--	--	--
	abril	49	51	51	51
	mayo	21	28	57	79
	junio	8	13	61	92
Verano	junio	100	--	--	--
	julio	37	63	63	63
	agosto	19	18	8	81
	septiembre	5	14	73	95
Otoño	septiembre	100	--	--	--
	octubre	50	50	50	50
	noviembre	23	27	54	77
	diciembre	7	16	69	93

 $\bar{X} = 93$

* No. de hojas caídas por mes/No. de hojas sobrevivientes del mes anterior x 100.

LITERATURA CITADA

- Cadena-Gómez, G. y P. Buriticá-Céspedes, 1980. Expresión de resistencia horizontal a la roya (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.) en *Coffea canephora* variedad Conilón. *CENICAFE* 31: 3-27.
- Cadena-Gómez, G. y P. Buriticá-Céspedes, 1981. Determinación cuantitativa de resistencia a *Hemileia vastatrix* en plantas de *Coffea canephora* variedad Conilón. *CENICAFE* 32: 15-34.
- Indian Coffee Board Research Department, 1973. 26th Annual Report 1972/73.
- Yamaguchi, T. y D.J.C. Friend, 1979. Effect of leaf-age and irradiance on photosynthesis of *Coffea arabica*. *Photosynthetica* 13: 271-278.

RELACIONES INMUNOLÓGICAS ENTRE Phialophora verrucosa,
Fonsecaea pedrosoi, F. compacta, Cladosporium carrionii Y
Wangiella dermatitidis A TRAVÉS DE SUS EXOANTÍGENOS

por Teresa Mier*,
Hortensia Navarro** y
Conchita Toriello**

IMMUNOLOGICAL RELATIONSHIP AMONG Phialophora verrucosa,
Fonsecaea pedrosoi, F. compacta, Cladosporium carrionii AND
Wangiella dermatitidis BY THEIR EXOANTIGENS

SUMMARY

Exoantigens of Phialophora verrucosa, Fonsecaea pedrosoi, F. compacta, Cladosporium carrionii and Wangiella dermatitidis were obtained from culture filtrates to observe their immunological relationship by the immunodiffusion technique using hyperimmune rabbit sera. This procedure permitted the immunological separation of W. dermatitidis from the chromoblastomycosis agents. Cross-reactions were observed among P. verrucosa, F. pedrosoi, F. compacta and C. carrionii exoantigens. The potential value of exoantigens to differentiate presumptive fungal species was established.

RESUMEN

Se obtuvieron exoantígenos de Phialophora verrucosa, Fonsecaea pedrosoi, F. compacta, Cladosporium carrionii y Wangiella dermatitidis a partir de filtrados de

*Departamento El Hombre y su Ambiente, División Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. México, D.F. 04960, México.

**Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 04510, México.

cultivos, para observar sus relaciones inmunológicas por la técnica de inmunodifusión, en presencia de sueros hiperinmunes de conejo. Este procedimiento permitió la separación inmunológica de Wangiella dermatitidis de los agentes de la cromoblastomycosis. Se encontraron reacciones cruzadas entre los antisueros de P. verrucosa, F. pedrosoi, F. compacta y C. carrionii y los exoantígenos obtenidos de los mismos. A pesar de las reacciones cruzadas observadas los resultados establecen el valor potencial de la prueba de los exoantígenos para realizar la diferenciación presuntiva de las especies estudiadas.

La cromoblastomycosis es una infección micótica de evolución crónica, limitada generalmente a la piel o al tejido subcutáneo y causada por cinco especies de hongos dematiáceos (Cladosporium carrionii, Fonsecaea compacta, F. pedrosoi, Phialophora verrucosa y Rhinocladiella aquaspersa). Estos hongos en el estado parasitario presentan células muriformes de pared gruesa denominadas esclerotes de Medlar. En contraste, los diversos agentes causales de la feohifomicosis, Wangiella dermatitidis, entre ellos, producen in vivo una morfología totalmente diferente a los de la cromoblastomycosis. La forma básica parasitaria presenta un micelio dematiáceo septado. Clínicamente los casos de la feohifomicosis pueden ser superficiales, cutáneos, subcutáneos o sistémicos. Estas dos micosis deben ser consideradas como dos entidades clínicas diferentes (Ajello, 1986). La identificación de los agentes causales de estas enfermedades se ha basado tradicionalmente en el estudio morfológico de sus formas de esporulación y en especial en lo concerniente al ordenamiento y disposición de los conidios. Sin embargo, la extensa variedad de estas estructuras, el marcado pleomorfismo de especies como en F. pedrosoi (Ibrahim-Granet y de Bièvre, 1984; McGinnis, 1980), las similitudes en la morfología de muchas especies pertenecientes a un mismo género, la dificultad en demostrar en algunos casos los conidios e incluso, la existencia de cepas no esporuladas, han motivado que la taxonomía de este grupo de hongos dematiáceos resulte generalmente confusa.

Standard y Kaufman (1976) y Kaufman y Standard (1978) han demostrado que usando la prueba de los exoantígenos es posible identificar a Blastomyces dermatitidis, Coccidioides immitis y Paracoccidioides brasiliensis, así como a miembros del género Histoplasma de otros hongos. Nicolaisen y Swatek (1980), obtuvieron antígenos específicos a partir de filtrados de cultivo de W. dermatitidis y F. pedrosoi que revelaban reacciones de precipitación solamente a los

antisueros correspondientes. Sin embargo, no lograron establecer bandas ni para *F. compacta* ni para *P. verrucosa*. Asimismo, Honbo *et al.* (1984), hallaron identidad inmunológica entre *Cladosporium ajelloi* y *C. carrionii* y observaron que *C. trichoides* y *Xylohypha bantiana*, anteriormente conocida como *C. bantianum* (Ajello, 1986) comparten entre sí componentes antigénicos.

Por otra parte, Espinel-Ingroff *et al.* (1986) diferenciaron *X. bantiana*, *F. pedrosoi* y *P. verrucosa* de otros hongos dematiáceos, saprofitos y patógenos utilizando también esta metodología. En el presente trabajo se ponen en evidencia las relaciones inmunológicas entre *P. verrucosa*, *F. pedrosoi*, *F. compacta*, *C. carrionii* y se logra diferenciar inmunológicamente a *W. dermatitidis* de los agentes de la cromoblastomycosis.

Las cepas de *P. verrucosa*, *F. pedrosoi*, *F. compacta*, *C. carrionii* y *W. dermatitidis* fueron gentilmente donadas por A.A. Padhye y L. Ajello de la División de Enfermedades Micóticas del Centro de Enfermedades Infecciosas de Atlanta, Georgia, E.E.U.U. Se mantuvieron en medio de agar de Sabouraud (Bioxón, México) incubándose a 28°C.

El medio de cultivo para la producción de exoantígenos contenía 10 g/l de extracto de levadura (Bioxón, México) y 10 g/l de peptona de caseína (Bioxón, México) dializados con 35 g/l de dextrosa (EPD). Los antígenos se obtuvieron según la metodología descrita por Standard y Kaufman (1976). Se inocularon matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 75 ml de medio EPD con porciones homogéneas de micelio de cada cepa. Se incubaron durante 22 días a 28°C en agitación. Los cultivos se trataron con timerosal a una concentración final de 0.02% durante 48 horas. El micelio fue eliminado con papel filtro Whatman No. 1 y el filtrado se esterilizó utilizando membranas Millipore de 0.45 µm, y se concentró 25 veces por medio de ultrafiltración con equipo Amicon y membrana PM 10 (Amicon Co., MA), conservándose a -70 °C hasta su utilización. Los exoantígenos obtenidos a partir de *P. verrucosa*, *F. pedrosoi*, *F. compacta*, *C. carrionii* y *W. dermatitidis* fueron usados para inmunizar conejos Nueva Zelanda, utilizando dos animales por cepa. Cada animal recibió una dosis intramuscular con 0.5 ml del exoantígeno y 0.5 ml de adyuvante incompleto de Freund (Difco) los días 1 y 9; durante los días 4, 7, 10, 14, 16, 18 y 24, los animales fueron inoculados intravenosamente con 0.5 ml de exoantígeno diluido (1:2). Los animales fueron sangrados el día 28 y la positividad de los sueros fue verificada por la prueba de inmunodifusión de Ouchterlony (1962) contra el antígeno homólogo inmunizante.

Adicionalmente, el medio líquido (EPD) dializado y concentrado 25 veces fue probado contra todos los antisueros

usados en este estudio, para descartar reacciones inespecíficas hacia posibles componentes antigénicos del medio de cultivo (Nicolaisen y Swatek, 1980).

Para la prueba de inmunodifusión de Ouchterlony (1962), se utilizó una solución de agarosa al 1% en solución de glicina (7.5% de glicina, 0.9% de cloruro de sodio y 0.1% de azida de sodio). Las laminillas fueron lavadas con citrato trisódico al 5% durante 3 días, agua destilada por 24 h, secadas y teñidas con negro amido.

En la figura 1a se observa una banda bien definida entre el antisuero de *P. verrucosa* (APv) y su exoantígeno homólogo (Pv) y una banda muy tenue de reacción cruzada con *F. compacta* (Fc). También puede distinguirse la formación de una línea de precipitación común con el exoantígeno de *C. carrionii* (Cc). En la figura 1b se destaca la reacción entre el antisuero (AFp) y el antígeno de *F. pedrosoi* (Fp) por la presencia de una línea definida y bien delimitada de precipitinas. También puede distinguirse una banda de identidad con los antígenos de *C. carrionii* (Cc), *F. compacta* (Fc) y *P. verrucosa* (Pv). La figura 1c muestra una reacción de precipitación delgada y bien definida entre los componentes antigénicos obtenidos a partir de *C. carrionii* (Cc) con su antisuero correspondiente (ACc). Puede observarse una reacción cruzada con el antígeno de *F. compacta* (Fc) y *P. verrucosa* (Pv). En la figura 1d se distingue solamente una banda ancha y difusa de precipitinas entre el antisuero de *F. compacta* (AFc) y el exoantígeno respectivo (Fc). Por último, en la figura 1e podemos observar solamente la reacción de precipitación desarrollada entre el antisuero de *W. dermatitidis* (AWd) y su exoantígeno homólogo (Wd). Este fue el único de los hongos probados que no presentó reacciones cruzadas ya sea entre su exoantígeno y los antisueros heterólogos ni entre su propio antisuero y los productos antigénicos obtenidos del resto de las especies estudiadas.

Los resultados muestran las relaciones inmunológicas entre *P. verrucosa*, *F. pedrosoi*, *F. compacta*, *C. carrionii* y *W. dermatitidis*, poniendo de manifiesto diferencias inmunológicas entre los agentes de la cromoblastomycosis y *W. dermatitidis*, agente causal de la feohifomicosis.

Las reacciones cruzadas observadas entre los antígenos de *F. pedrosoi* con *P. verrucosa*, *F. compacta* y *C. carrionii* no coinciden con los resultados de Nicolaisen y Swatek (1980) quienes indican que el antisuero de *F. pedrosoi* es específico hacia el antígeno homólogo y no presenta reacciones cruzadas con ninguna de las otras cepas probadas. Además, estos mismos autores mencionan la presencia de tres bandas de precipitinas, dos bien definidas y una delgada, para *F. pedrosoi*, mientras que en este trabajo solamente se

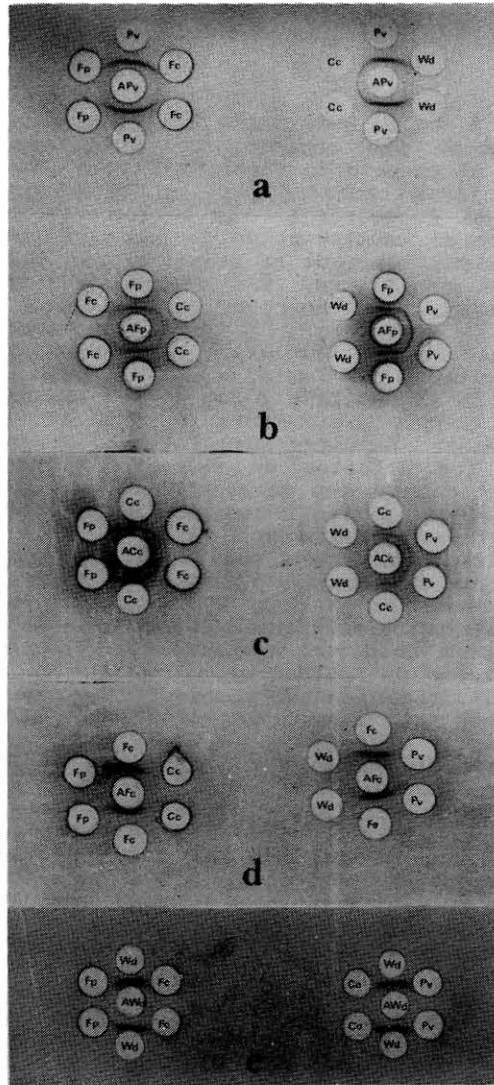


Fig. 1. Inmunodifusión de sueros hiperinmunes de conejos con los exoantígenos de *P. verrucosa* (Pv), *F. pedrosoi* (Fp), *F. compacta* (Fc), *C. carrionii* (Cc) y *W. dermatitidis* (Wd): a) anti-*P. verrucosa* (APv); b) anti-*F. pedrosoi* (AFp); c) anti-*C. carrionii* (ACc); d) anti-*F. compacta* (AFc); y e) anti-*W. dermatitidis* (AWd).

distingue una línea delgada entre los componentes homólogos de esta especie. Sin embargo, los resultados obtenidos coinciden con el trabajo de Conant y Martin (1980) quienes reportan reacciones cruzadas para P. verrucosa con suero hiperinmune anti F. pedrosoi. La heterogeneidad serológica manifestada por el antisuero de F. pedrosoi podría deberse al marcado pleomorfismo que ha caracterizado a esta especie (Ibrahim-Granet y de Bièvre, 1984; McGinnis, 1980).

La ausencia de líneas de precipitación entre los antígenos de P. verrucosa y F. compacta y sus antisueros respectivos descrita por Nicolaisen y Swatek (1980) contrasta con los resultados de este trabajo, pues como puede observarse en la figura 1a y d las bandas obtenidas de cada uno de estos hongos son nítidas y bien definidas. Esta variación pudiera depender de factores tales como la respuesta de los animales en relación a las diferentes características antigénicas de cada hongo o a la metodología empleada, la que sería necesario normar, para lograr resultados uniformes y reproducibles.

Los resultados obtenidos con W. dermatitidis concuerdan con los trabajos de Nicolaisen y Swatek (1980), quienes al probar el antisuero de W. dermatitidis contra varios hongos dematiáceos observaron solamente una relación de precipitinas contra la especie homóloga. Asimismo, podría ser congruente con los resultados de Kaufman et al. (1980) quienes tampoco encuentran relaciones inmunológicas entre W. dermatitidis y Exophiala jeanselmei, importantes agentes etiológicos de la feohifomicosis.

Los trabajos de Standard y Kaufman (1976) y de Kaufman y Standard (1978) apoyan la validez del método de producción de exoantígenos para identificar inmunológicamente los hongos causantes de micosis profundas. La utilidad potencial del método para hongos dematiáceos ha sido demostrada en los trabajos de Espinel-Ingroff et al. (1986) al encontrar bandas específicas de precipitación para P. verrucosa, F. pedrosoi y Xylohypha bantiana antes considerada como Cladosporium bantianum y recientemente clasificada por McGinnis et al. (1986).

Los resultados presentados confirman la separación inmunológica de la especie W. dermatitidis, y demuestran que los exoantígenos de los hongos dematiáceos estudiados, destacando a F. pedrosoi, comparten componentes antigénicos. Honbo et al. (1986) han demostrado lo importante que resulta adsorber los antisueros con antígenos heterólogos ya que a pesar de las reacciones cruzadas que encontraron entre varias especies del género Cladosporium (C. carrionii, C. herbarum, C. cladosporoides) y X. bantiana, estas pudieron ser identificadas y diferenciadas específicamente a través de

cuatro factores séricos monoespecíficos obtenidos por el procedimiento de inmunoadsorción.

Por último, se considera que la prueba de los exoantígenos representa una herramienta útil que permite realizar una diferenciación preliminar de los agentes causales de la cromoblastomycosis, de *W. dermatitidis*, agente de la feohifomicosis, y que aunada a inmunoadsorciones podría ser de gran utilidad en su identificación inmunológica.

LITERATURA CITADA

- Ajello, L., 1986. Hyalohyphomycosis and phaeohyphomycosis: Two global disease entities of Public Health Importance. Eur. J. Epidemiol. 2: 243-251.
- Conant, N.F. y D.S. Martin, 1980. The morphological and serological relationships of the various fungi causing dermatitis verrucosa (Chromoblastomycosis). Amer. J. Trop. Med. 17: 553-578.
- Espinel-Ingroff, A., S. Shadomy, D. Dixon y P. Boldson, 1986. Exoantigen test for *Cladosporium bantianum*, *Fonsecaea pedrosoi* and *Phialophora verrucosa*. J. Clin. Microbiol. 23:305-310.
- Honbo, S., A.A. Padhye y L. Ajello, 1984. The relationship of *Cladosporium carrionii* to *Cladophialophora ajelloi*. Sabouraudia: J. Med. Vet. Mycol. 22: 209-218.
- Honbo, S., P.G. Standard, A.A. Padhye, L. Ajello y L. Kaufman, 1986. Antigenic relationship among *Cladosporium* species of medical importance. Sabouraudia: J. Med. Vet. Mycol. 22: 301-310.
- Ibrahim-Granet, O. y C. de Bièvre, 1984. Study of the conidial development and cleistothecium-like structure of some strains of *F. pedrosoi*. Comparison with other close dematiaceae. Mycopathologia 84: 181-186.
- Kaufman, L. y P.G. Standard, 1978. Immuno-identification of cultures of fungi pathogenic to man. Curr. Microbiol. 1: 135-140.
- Kaufman, L., P.G. Standard y A.A. Padhye, 1980. Serological relationships among isolates of *Exophiala jeanselmei* (*Phialophora jeanselmei*, *P. gougerotii*) and *W.*

dermatitidis. In: Superficial, Cutaneous and Subcutaneous Infections. Pan American Health Organization. Scientific Publication No. 396. pp.252-258, Washington, D.C.

McGinnis, M.R., 1980. Recent taxonomic developments and changes in medical mycology. Ann. Rev. Microbiol. 34: 109-135.

McGinnis, M.R., D. Borelli y A.A. Padhye, 1986. Reclassification of Cladosporium bantianum in the genus Xylohypha. J. Clin. Microbiol. 23: 1148-1151.

Nicolaisen, L. y F.E. Swatek, 1980. Some studies of exoantigens for the identification of the causative agents of chromoblastomycosis. Pan American Health Organization. Scientific Publication No. 396, pp. 259-264. Washington, D.C.

Ouchterlony, O., 1962. Diffusion in gel methods for immunological analysis. Progr. Allergy 6: 30-154.

Standard, P.G. y L. Kaufman, 1976. Specific immunological tests for the rapid identification of members of the genus Histoplasma. J. Clin. Microbiol. 3:191-199.