

Efecto de la interacción de *Ascochyta phaseolorum* y *Pseudomonas* sp. sobre la morfología de los frutos de *Sechium edule* (Cucurbitaceae)*

Nelly Vásquez, Eugenia M. Flores and E. Vargas.

Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica. Escuela de Fitotecnia, Universidad de Costa Rica.

(Recibido: 25 de abril de 1986)

Abstract: *Ascochyta phaseolorum* and *Pseudomonas* sp. were isolated from infected *Sechium edule* fruits collected in the Valley of Ujarrás, Costa Rica. Young and mature healthy fruits were inoculated with suspensions of fungus spores or bacteria and placed in humid chambers in the laboratory or in the greenhouse. Only the young fruits from the laboratory developed lesions. The lesions produced by the fungus are characterized by rupture and lysis of the epidermal cell walls, with posterior invasion of the mesocarp parenchyma and the vascular tissues. In general, tissue destruction is correlated to the size of the lesion; the infection may even cause rotting of the fruit. Bacterial lesions showed thickening of the walls of the surrounding cells, as well as cytoplasm granulation and inclusions of crystalline formations. Bacteria were not observed inside the wound. There was no difference between natural lesions in the fruits collected in the field and those induced in the laboratory.

El chayote es una planta comestible casi en su totalidad, ya que de ella se aprovechan las raíces, semillas, frutos, flores y retoños tiernos. Algunos análisis permitieron comprobar que los tallos tiernos de chayote (cogollos) son más ricos en nutrientes que muchas hortalizas y la mayor parte de los cereales (Medina, 1969). Por la importancia que recién adquiere como producto de exportación no tradicional, y gracias a la amplia aceptación que tiene en mercados internacionales, promete convertirse en una valiosa fuente generadora de divisas.

Hasta el momento, las plagas y enfermedades que atacan el cultivo han sido, entre otros, factores limitantes de una productividad rentable. La mayor parte de dichas enfermedades ha sido poco estudiada. Entre las más frecuentes y severas, se halla la peca blanca que ataca el cultivo en el Valle de Ujarrás, Costa Rica (Sáenz, 1985). Dicha enfermedad es causada por el hongo *Ascochyta phaseolorum* (Deuteromycete, orden Sphaeropsidales; González, 1976). En el campo se distinguen dos tipos de lesión; una seca, considerada típica y otra rodeada de un halo con apariencia acuosa. En la actualidad ha cobrado mayor importancia, debido a su posible asociación

con una bacteria del género *Pseudomonas* sp. Se ha propuesto que la asociación de estos patógenos causa un severo daño e induce la pudrición del fruto, lo que produce un fuerte rechazo, no tanto en el mercado local, como en el internacional. El objetivo de esta investigación, es aclarar algunos aspectos sobre el desarrollo de esta enfermedad en el fruto y determinar la posible interacción de esos patógenos.

MATERIAL Y METODOS

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Anatomía Vegetal de la Escuela de Biología y en el Laboratorio de Fitopatología de la Escuela de Fitotecnia de la Universidad de Costa Rica, de Agosto de 1984 a Junio de 1985. Se colectaron frutos sanos y frutos con el síntoma típico de la enfermedad en la zona productora del Valle de Ujarrás, Provincia de Cartago, donde se encuentran las plantaciones comerciales. De los frutos enfermos se aisló el hongo *Ascochyta phaseolorum* y la bacteria *Pseudomonas* sp. Estos organismos fueron cultivados en medio nutritivo de dextrosa, agar y papa, en

* Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) y la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.

platos de petri. Antes de inocular, se lavó previamente los frutos con agua y jabón y se desinfectó con alcohol de 70°. Las pruebas se efectuaron de la siguiente forma: un grupo de frutos sólo con el hongo, otro grupo sólo con la bacteria, y un grupo utilizado como testigo en cada uno de los tratamientos. Se hicieron dos repeticiones de cada tratamiento.

Se realizaron las inoculaciones del hongo con una asa en forma localizada sin producir heridas. La suspensión de conidios en agua destilada se colocó sobre la superficie de los frutos maduros; éstos fueron luego almacenados en una cámara húmeda dentro del invernadero. Se repitió la experiencia utilizando frutos jóvenes; una parte de éstos se colocó en las cámaras húmedas del laboratorio a una temperatura de 21-22 °C, la otra en el invernadero a temperatura ambiente.

Las inoculaciones de la bacteria se hicieron con un gotero en forma localizada, provocando heridas. Se limpió el mucílago que salió del fruto al provocarse la herida y se colocó colonias bacterianas suspendidas en agua destilada, sobre la superficie de frutos maduros. Estos fueron colocados en una cámara húmeda en el laboratorio.

Durante los dos primeros días después de realizada la inoculación, se colectó muestras de las áreas infectadas a las 9 a.m. y las 5 p.m.; después se tomó una muestra cada dos días hasta que aparecieron los síntomas típicos de la enfermedad. Las lesiones producidas en el campo fueron comparadas con las producidas en el laboratorio con el fin de establecer semejanzas y diferencias. Las muestras procedentes del material colectado en el campo, así como las producidas en el laboratorio, fueron fijadas en F.A.A. (Johansen, 1940). Parte del material fijado fue usado para observación al microscopio de luz y parte para microscopía electrónica de barrido.

Los especímenes utilizados en microscopía de luz se deshidrataron mediante una serie de alcoholes y se infiltraron en Paraplast-Plus. Se hicieron secciones transversales de 20 µm de grosor y se las tiñó siguiendo la técnica de Sharman (1943), o la técnica de Safranina-Fast Green. Se montaron las secciones en Preservalide y se observaron al microscopio Leitz Dialuz 20. Para el examen de microscopía electrónica de barrido, las muestras se deshidrataron mediante una serie ascendente de alcohol etílico, y se llevaron hasta el punto de secado crítico con CO₂ líquido. Los especímenes se montaron

en soportes de aluminio empleando pintura conductora de plata. Se colocó el material en un cobertor iónico y se cubrió con película de oro. Se observó las secciones en un microscopio de rastreo bajo un voltaje de aceleración de 10 y 15 KV.

Parte de las secciones de fruto fueron fijadas en F.A.A., deshidratadas con la técnica de Johansen (1940) y embebidas en parafina. Se hicieron cortes transversales de 8 µm de grosor y se colocaron sobre un cubreobjetos redondo. Se fijó con el adhesivo de Haupt y se secó a 37 °C durante cuatro horas. Las secciones fueron desparafinadas en xileno, transferidas a una mezcla 1:1 de xileno-etanol y luego a alcohol de 100; posteriormente, fueron secadas al aire. Los cubreobjetos fueron fijados a bases de aluminio con pintura conductora de plata, cubiertos con oro y observados en un microscopio electrónico de barrido (Gaudet y Kokko, 1984). También se hicieron réplicas con colodión de la superficie inoculada de un grupo determinado de muestras; éstas se observaron al microscopio de luz.

RESULTADOS

A. Descripción morfológica del fruto de *Sechium edule* Swartz c.v. Quelite

Los frutos son carnosos, con pericarpio blanco o verde, y superficie lisa. La epidermis es unicelular; con células de paredes externas convexas y cuticularizadas en sección transversal; las células poseen un núcleo bastante grande. Los estomas son de tipo actinocítico, elípticos, hundidos y de densidad moderada. Los tricomas son multicelulares uniseriados y multicelulares capitados. El mesocarpio es parenquimático, de color verdoso o blancuzco. Las células son ricas en gránulos de almidón, grasa y agua. Tanto en la epidermis como en el mesocarpio, las células contienen numerosos cristales de oxalato de calcio (rafidios) y mucílago. En los frutos, este jugo sale a la superficie en forma de grandes gotas al efectuarse un corte; al secarse, forma una cubierta gomosa y vidriosa sobre la herida.

En los frutos maduros es frecuente encontrar numerosas fibras localizadas bajo la epidermis; en los jóvenes, esas fibras aún conservan parte de su protoplasto y sus paredes no muestran el grosor característico de una fibra madura. Por lo común, el endocarpio tiene numerosas fibras. Tanto en frutos jóvenes como maduros, se observa un tejido vascular bien desarrollado.

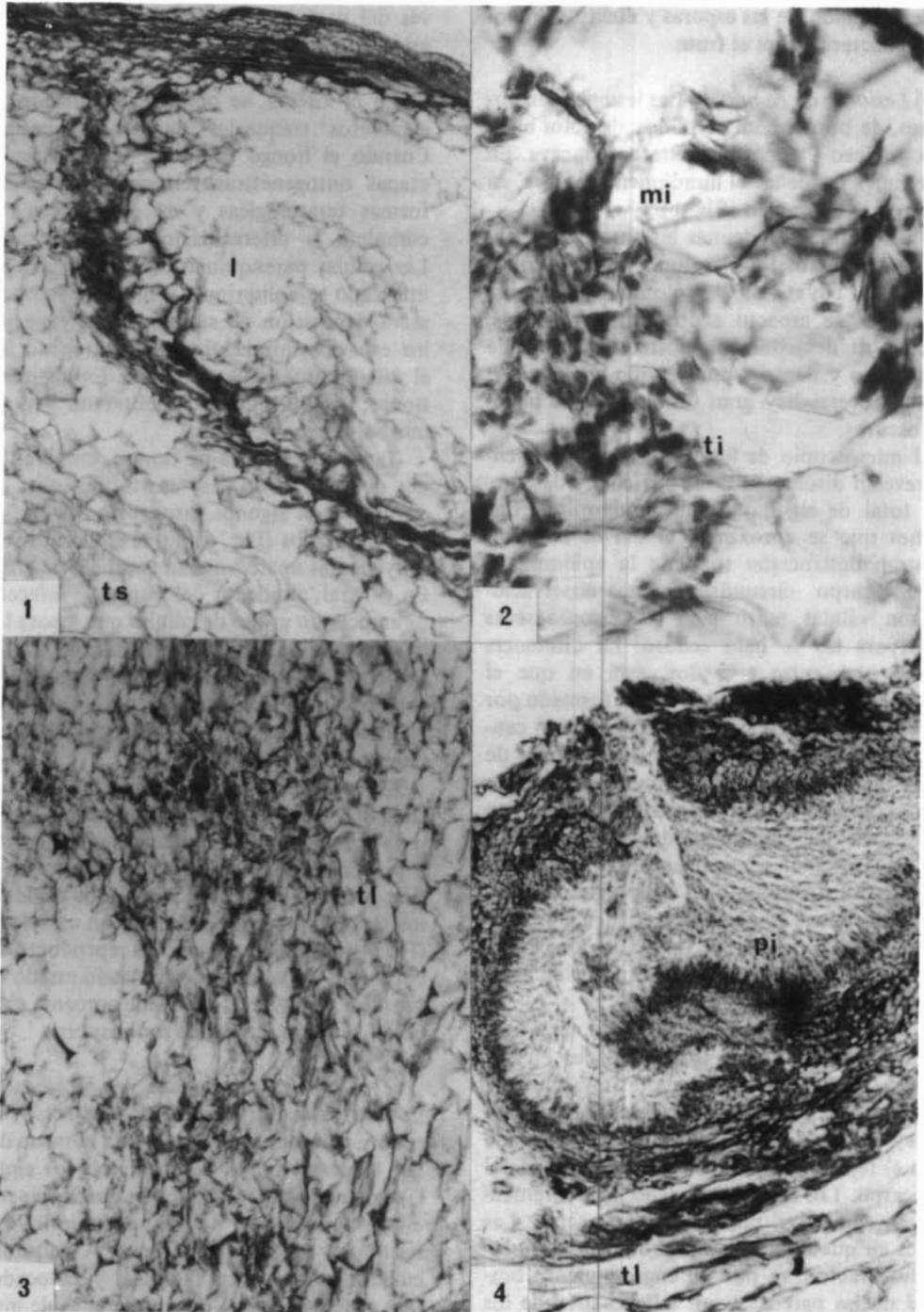


Fig. 1: Sección transversal de fruto mostrando una lesión colectada en el campo. (160 \times) l: lesión, ts: tejido sano.
 Fig. 2: Sección transversal de fruto mostrando tejido interno invadido por micelio. (320 \times) ti: tejido infectado, mi: micelio.
 Fig. 3: Sección transversal de fruto mostrando tejido enfermo. (320 \times) tl: tejido lesionado.
 Fig. 4: Sección transversal de fruto mostrando el desarrollo de picnidios con conidios en su interior. (320 \times) tl: tejido lesionado, pi: picnidio.

B. Germinación de las esporas y efecto del hongo y la bacteria sobre el fruto

1) *Lesiones de campo*: Las lesiones son circulares, de bordes bien definidos, de color blanco o grisáceo y superficie externa cóncava. En las lesiones pequeñas el hundimiento es leve, en las mayores conspicuo (Fig. 1).

Ocasionalmente, algunas lesiones no presentan hundimiento. En el campo, pueden colectarse frutos cuyas lesiones sólo muestran un halo circular de aspecto acuoso. Estas lesiones, aceleran su desarrollo en postcosecha; son de color pardo y llegan a pudrir todo el fruto. En lesiones severas hay gran producción de picnidios oscuros.

Al microscopio de luz, las lesiones incipientes, revelan disolución de la cutícula y destrucción total de algunas células epidérmicas. Las lesiones que se aproximan al cm de longitud muestran destrucción total de la epidermis y del mesocarpo circundante. Estas observaciones son válidas tanto para las lesiones secas como para las de halo acuoso. La diferencia fundamental entre esas dos, está en que el halo que rodea a las segundas, está formado por una capa de células obliteradas, con gran cantidad de micelio en su interior. Las lesiones de mayor tamaño muestran una invasión posterior del micelio a los tejidos internos de la planta; en especial, del parénquima y del tejido vascular (Fig. 2). Las células invadidas sufren un rápido colapso y su protoplasto se desintegra (Fig. 3). Las células sanas en apariencia, tienen gran cantidad de sustancias (sobre todo almidón) en su interior; las células invadidas, carecen de estas circunstancias.

El micelio es septado, ramificado, de grosor variable y con muchas irregularidades en sus paredes (Fig. 5). Es casi siempre intracelular y se extiende a través de las paredes. Abunda en la mayoría de los tejidos destruidos e invade tanto el tejido vascular como el parénquima del mesocarpo. Los restos de micelio, aparentemente viejo, muestran una coloración oscura. Las células en que el contenido de micelio es notorio, se caracterizan por un engrosamiento ocasional de las paredes y un relleno total de los espacios intercelulares; en algunos casos, dichas paredes presentan un color dorado. En las áreas infectadas se observa, además, que los protoplastos son granulares; después de un tiempo el contenido celular se vuelve pardo y las células mueren. La invasión del micelio es rápida a tra-

vés del parénquima y lenta vía esclerénquima; este último tejido restringe la extensión del micelio.

En el xilema, se observa destrucción de los elementos traqueales durante su ontogenia. Cuando el hongo invade el tejido vascular en etapas ontogenéticas tempranas, se producen formas teratológicas y en otros casos, no se completa la diferenciación de los elementos. Las células parenquimáticas que rodean el haz infectado se comprimen y distorsionan y se observa deposición de sustancias, en especial, en los espacios intercelulares. El patógeno invade el xilema antes que el floema. En algunas ocasiones, éste último está obliterado y presenta una coloración negruzca.

Tanto en lesiones de campo, como en lesiones de laboratorio, hay malformaciones de los estomas y en algunos casos, estomas con ostiolos obliterados (Fig. 6). En la epidermis y capas subyacentes aparecen gran cantidad de cristales. En general, alrededor del punto de infección se diferencia un grupo de células que separa la parte infectada de la aparentemente sana. Esta zona es la que forma el halo circular externo de la lesión y tiene apariencia acuosa. Dentro de las células de dicha zona se observó gran cantidad de micelio en desarrollo.

En secciones transversales de la lesión, es posible observar numerosos picnidios en desarrollo o ya formados. Estos poseen una forma globosa o piriforme, con un ostiolo en el extremo superior, a través del cual se liberan los conidios; éstos son bicelulares, hialinos y con un solo septo (Fig. 4 y 7). Estas estructuras reproductoras son corrientes en lesiones de avanzado estado de desarrollo. En general, conforme aumenta el tamaño de la lesión, los daños son mayores.

2) *Lesiones producidas en el laboratorio*: Los frutos maduros inoculados provocando heridas y colocados en una cámara húmeda dentro del laboratorio, no desarrollaron los síntomas típicos de la enfermedad. En apariencia, el mucílago proveniente de las heridas influyó en el resultado. Los frutos jóvenes y maduros inoculados sin provocar heridas, y colocados en una cámara húmeda en condiciones de invernadero tampoco desarrollaron lesión. Sin embargo, es importante hacer notar que sobre la superficie de éstos, se encontró tubos germinativos y micelio en desarrollo. De esta manera, en todos los muestreos realizados a partir de las 48 horas de la inoculación, se observó gran can-

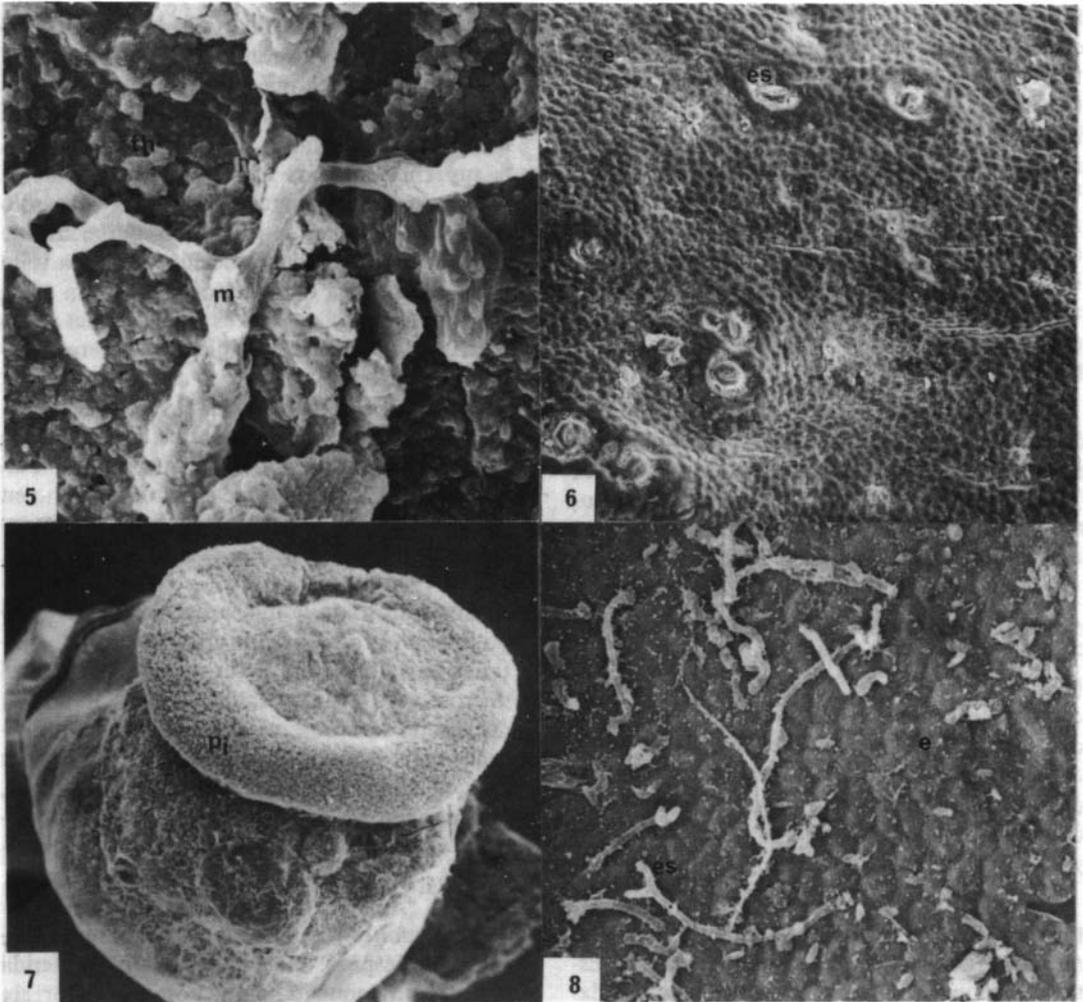


Fig. 5: Micelio de *Ascochyta* creciendo dentro de los tejidos del hospedero (198 x) th: tejido del hospedero, m: micelio.

Fig. 6: Superficie epidérmica de fruto infectado mostrando malformación de estomas. (4666 x) e: epidermis, es: estoma.

Fig. 7: Picnidio de *Ascochyta phaseolorum* desarrollado en medio de cultivo de Agar, Dextrosa y Papa. (40 x) pi: picnidio.

Fig. 8: Esporas creciendo sobre la superficie de frutos inoculados en el laboratorio. (533 x) e: epidermis, es: esporas.

tividad de esporas germinadas (Fig. 8). En estos frutos, a partir del quinto día de realizada la inoculación, se detuvo el desarrollo del micelio.

En la mayoría de los casos, para estas pruebas no se hicieron estudios microscópicos sino réplicas con colodión de la superficie inoculada. No se encontró penetración de hifas en las células epidérmicas, ni formación de apresorios.

Los frutos jóvenes inoculados en el laboratorio sin producir heridas y colocados en una cámara húmeda en el laboratorio, desarrollaron gran cantidad de lesiones. A las 15 horas de

realizada la inoculación, se observó al microscopio de luz las primeras lesiones, que se manifiestan como hundimientos típicos de la epidermis, y a veces, la aparición de micelio dentro de las células epidérmicas. Análisis realizados al microscopio electrónico de barrido revelan que entre las 15 y 38 horas de realizada la inoculación, algunos de los conidios desarrollan un tubo germinativo largo; no obstante, no es sino hasta las 46 horas en que se nota un mayor número de esporas germinadas sobre la superficie del fruto (Fig. 8). Aquí, la espора produce un

tubo germinativo (pueden ser dos) de grosor considerable y en apariencia, de consistencia fuerte, que penetra directo a la cutícula (Fig. 9). Durante la penetración a través de la pared celular del hospedero se forma una constricción en el tubo germinativo (hifa infectiva, fig. 10). Las hifas que resultan de la formación del tubo germinativo, crecen a través de la superficie del fruto hasta el punto de penetración (Fig. 11). En algunos casos, se observa lisis de las paredes de las células epidérmicas. Estas rupturas se originan durante el proceso de penetración del hongo.

Es usual que el hongo penetre sin la ayuda de apresorios definidos; sin embargo, en algunas ocasiones estas estructuras se hicieron presentes (Fig. 12). En el punto de formación del apresorio, se observó también lisis de las paredes celulares epidérmicas (Fig. 13).

Con frecuencia, los tubos germinativos y el micelio resultante de éstos, pasan sobre los estomas y penetran a través de las células vecinas (Fig. 14). En alguna oportunidad se observó conidios germinando cerca de un ostiolo, lo que sugiere una eventual penetración a través del estoma. En lesiones muy avanzadas traídas del campo, se encontró estomas completamente desintegrados por efecto de la rápida extensión y penetración del hongo (Fig. 15).

En el laboratorio, se obtuvo los primeros síntomas visibles de la lesión causada por *Ascochyta* a los seis días de realizada la inoculación. Esta es pequeña, circular y se extiende rápidamente. No obstante, con ayuda del microscopio de luz se encuentra que el inicio de la lesión es más temprano (tres a cuatro días después de la inoculación) y que éste comienza a producirse después del desarrollo del micelio sobre la superficie. Al sétimo día se ven ya lesiones bien definidas, con ruptura de las células epidérmicas y exposición del tejido interno. Este último empieza a desintegrarse bajo la acción del hongo (Fig. 16). Muestreros posteriores realizados a los 9, 11, 14 y 17 días después de la inoculación, muestran poca variación. Sobre la superficie de los frutos, se observa gran cantidad de conidios germinados. Conforme el número de días aumenta, el número de esporas germinadas se hace mayor. Además, es posible observar el desarrollo de gran cantidad de micelio penetrando las células epidérmicas. La penetración de los tubos germinativos dentro de las células del hospedero se inició a los siete días, indu-

ciendo la desintegración total de las células epidérmicas y del mesocarpo.

Treinta días después de la inoculación, se obtuvo frutos cubiertos por la lesión, con gran cantidad de picnidios distribuidos por toda la superficie. Dichos frutos se encontraban ya en estado de descomposición; no obstante, sólo en algunos de ellos se produjo hundimiento de la epidermis y tejidos asociados. El desarrollo de la lesión varía de uno a otro fruto. En unos, la expansión de la lesión es total después de un mes, en otros apenas incipiente. Un tercer grupo no desarrolla lesión.

Los frutos inoculados en el laboratorio con sólo una suspensión de conidios, presenta gran cantidad de bacterias del tipo bacilo distribuidas por toda la superficie del fruto, así como en las cavidades subestomáticas y en los tejidos internos, en donde la lesión es más notable (Figs. 17, 18 19).

Los frutos con lesión, provenientes del campo, revelan la presencia de gran cantidad de bacterias en su interior, al ser examinadas con el microscopio. En apariencia, estas bacterias son del mismo tipo observado en las lesiones provocadas en el laboratorio (Fig. 20). En las láminas fijadas se observa la presencia de otros hongos, que invaden los tejidos después de la inoculación; es posible que éstos sean del tipo saprófito.

3) *Lesiones por bacteria*: Durante los primeros días después de la inoculación, la herida muestra un pequeño halo acuoso alrededor; sin embargo, el examen microscópico no muestra desarrollo interno de la lesión. Las pocas lesiones que se desarrollaron nunca fueron de gran consideración. En ninguna de las lesiones causadas por bacteria, fue posible observar el desarrollo de dicho agente infeccioso. Dieciseis días después de la inoculación se encontró lesiones con un pequeño halo alrededor de la herida provocada. Al microscopio de luz se observó que dicha lesión se caracteriza por el engrosamiento en las paredes que circundan la herida y por una granulación del citoplasma en algunas de ellas. Además, se observó una deposición de material que rellena los espacios intercelulares. En las células destruidas por efecto de la lesión provocada, se observa una invasión posterior de hongos aparentemente saprófitos; y alrededor de la misma, gran cantidad de inclusiones de apariencia cristalina, de composición no determinada.

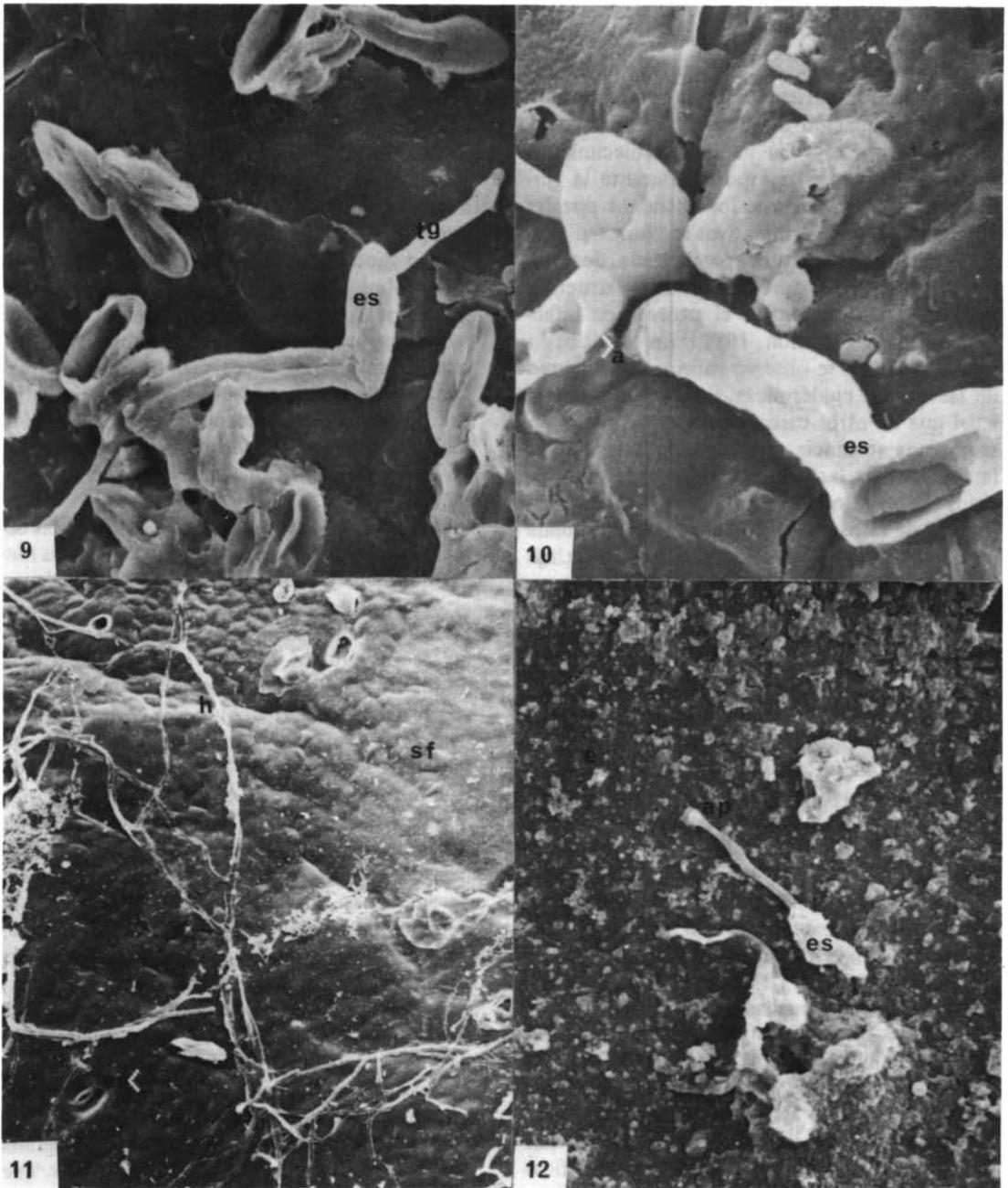


Fig. 9: Espora germinada mostrando el desarrollo de 2 tubos germinativos (2933 x) es: espora, tg: tubo germinativo.

Fig. 10: Tubo germinativo penetrando la superficie del hospedero. (5333 x) tg: tubo germinativo, a: adelgazamiento del tubo germinativo (hifa infécciosa).

Fig. 11: Hifas creciendo sobre la superficie de frutos infectados (400 x) sf: superficie del fruto, h: hifa, es: estoma.

Fig. 12: Desarrollo de apresorios sobre la superficie de frutos inoculados. (1733 x) e: epidermis, es: espora, ap: apresorio.

DISCUSION

La forma irregular de la superficie epidérmica, así como la cutícula delgada, permiten una mayor acumulación de gotas de agua, creando un microclima especial para el establecimiento y germinación de las esporas. Durante la germinación de las mismas, los extremos distales de algunos tubos germinativos se "hinchon" para formar una estructura especializada, denominada apresorio. El apresorio es una estructura funcional únicamente en el proceso de infección del hongo (Kunoh, 1982). En los sitios en que se localizó, se observó rupturas en la pared de las células epidérmicas. Esto sugiere, que al igual que en otros casos, el apresorio puede secretar una sustancia que altera la cutícula y a las paredes de las células del hospedero en los sitios de penetración (Kunoh, 1982). La formación de estos apresorios, al parecer, responde más a estímulos físicos que a estímulos químicos, nutricionales, de humedad, luz o temperatura (Wynn, 1976).

No todos los tubos germinativos producen apresorios. En ocasiones, dicho tubo penetra directamente en las células epidermales y forma un micelio intracelular que pasa de pared a pared. En otros casos, a partir del tubo germinativo se desarrolla un micelio septado y ramificado que posteriormente penetra las células epidérmicas. Durante el proceso de penetración, se observó una disolución de la cutícula y destrucción de las paredes de las células epidérmicas.

Son muchos los hongos que pueden penetrar la cutícula directamente y en ese mecanismo de penetración, están involucrados procesos de digestión enzimática (Baker y Bateman, 1978). Las observaciones realizadas coinciden con las de otros autores (Reshtnikova y Uspenskaya, 1979a, 1979b; Shrivastava, 1982; Steekelenburg, 1978, 1982; Uspenskaya y Reshtnikova, 1981), quienes atribuyen propiedades enzimáticas a diferentes especies de *Ascochyta*. Las enzimas descritas son celulolíticas, proteolíticas y pectolíticas. El micelio, igual que los apresorios, ejerce acción enzimática, facilitando su ingreso al interior del órgano (Subirós, 1984). Una vez dentro del hospedero, y en contacto con el citoplasma de las células, el patógeno puede establecer su economía extrayendo alimentos elaborados de la planta (Sarasola y Rocca, 1975).

Se ha dicho que el grosor y composición química de la cutícula, juegan un papel importante

en la inhibición de la actividad fungosa, reduciendo la germinación de esporas o deteniendo la penetración de las hifas (Agrios, 1978). Sin embargo, Jaroz *et al.* (1982) observaron que el grosor de la cutícula puede variar dependiendo de las condiciones ambientales, por lo que la cutícula cobra importancia únicamente en lo que a su composición química se refiere (Martin y Juniper, 1970).

Las inoculaciones realizadas provocando heridas sobre frutos jóvenes y maduros, hicieron que éstos excretaran gran cantidad de mucílago como respuesta al daño físico recibido. Esa formación de gomas parece proporcionar una barrera física activa y efectiva contra la invasión del hongo, o por lo menos retarda su acción, inhibiendo durante algún tiempo la germinación de las esporas (M. González, 1985; com. personal).

Las altas temperaturas que alcanzaron las cámaras húmedas del invernadero durante los meses de enero y febrero (época seca) detuvieron el desarrollo del micelio y aparentemente inhibieron la penetración del hongo; por lo tanto, no se produjeron lesiones sobre la superficie de los frutos. Esto coincide con las investigaciones realizadas en *Ascochyta pisi*, en las cuales se demostró que temperaturas de 21 - 25 °C, inhibían el desarrollo de los síntomas típicos de la enfermedad (Brewer, 1960).

Los frutos en que sí se logró producir lesión por hongo, se caracterizaron por ser muy jóvenes, de aproximadamente 7 cm de largo por 5 de ancho; en ellos las fibras localizadas debajo de la epidermis aún están en el proceso de diferenciación. La actividad fungal se inicia en la epidermis, siendo éste el primer tejido afectado. Luego el hongo invade tejidos subyacentes a ésta, causando un colapso total de los mismos y la desintegración de sus protoplastos. También se observó un engrosamiento de las paredes de las células parenquimáticas invadidas. Los tejidos con paredes secundarias, impregnadas de lignina o suberina son más resistentes al ataque que aquellos con paredes celulares delgadas.

Se ha propuesto que la formación de lignina es un mecanismo de resistencia de las plantas a las enfermedades. La lignina es resistente a la degradación por la mayoría de los microorganismos, y puede formarse como una respuesta a la penetración microbial y al daño mecánico (Serwood y Vance, 1982). De acuerdo con numerosos autores (Kuc, 1982; Ride, 1980; Serwood y Vance, 1982; Vance y Kirk, 1980), la lignifi-

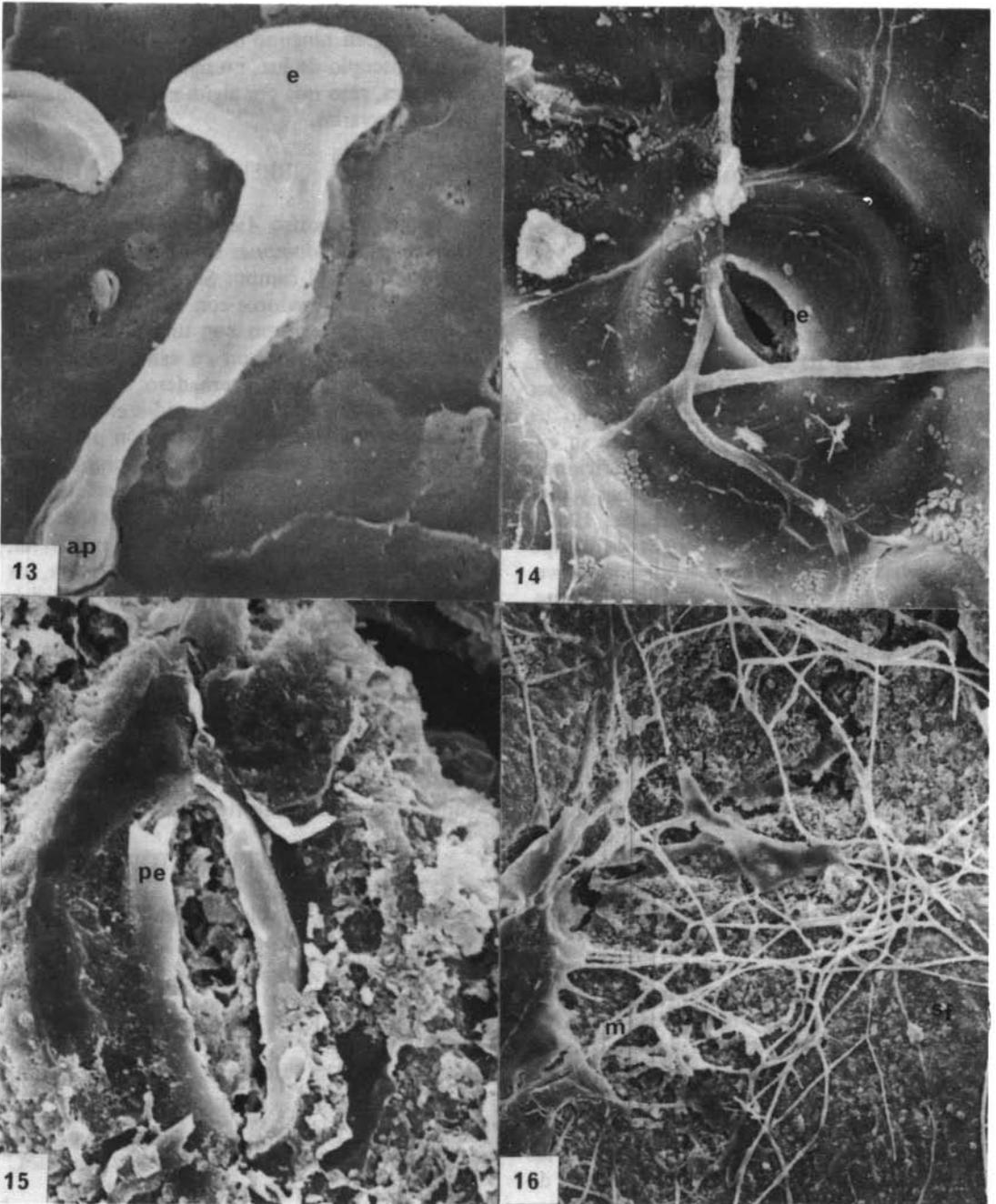


Fig. 13: Apresorio mostrando lisis de las paredes celulares de las células epidérmicas. (6533 x) e: espora, ap: apresorio, l: lisis.

Fig. 14: Micelio creciendo sobre las aberturas estomáticas. (2000 x) pe: poro estomático, m: micelio, b: bacterias.

Fig. 15: Estoma completamente desintegrado por la acción del hongo. (3333 x) pe: poro estomático.

Fig. 16: Lesión sobre la superficie del fruto a los 7 días de la inoculación. (293 x) sf: superficie del fruto, m: micelio, l: lesión.

cación puede inhibir el crecimiento fungal ya que proporciona una barrera mecánica al ingreso de la hifa. También limita la difusión de enzimas y toxinas del hongo al hospedero y de agua y nutrientes del hospedero al hongo. Produce además un "impacto" en las paredes de las hifas, reduciendo así su capacidad para alargarse (hay lignificación de hifas) y finalmente, protege las paredes del hospedero de la degradación enzimática.

En la mayoría de las lesiones estudiadas, una vez que el hongo invade el tejido interno, se produce una demarcación histológica, que parece limitar la rápida extensión de la infección. De esta forma, el hospedero parece interponer una barrera a los productos del metabolismo del patógeno, localizándolo y restringiendo su extensión, no obstante, bajo ciertas condiciones, éste puede atravesar esas demarcaciones y proseguir su acción infectiva (Fernández, 1952).

La comparación de las lesiones de campo con aquellas producidas en el laboratorio, revelan un tipo de lesión muy similar; no obstante, en las de campo, la demarcación histológica al igual que la formación de picnidios, es más clara.

La lesión producida por bacterias, no es de gran consideración; se limita a la desintegración del protoplasto de las células invadidas y a la producción de gran cantidad de cristales de composición no determinada. Las células infectadas depositan paredes gruesas; se ignora si esto es inducido por la bacteria o si representa una respuesta de la planta a la infección. Como se encontró numerosas colonias bacterianas (tipo bacilo) creciendo sobre la superficie de los frutos inoculados sólo con esporas de hongo, cabe suponer que estas bacterias realizan, al menos, parte de su ciclo de vida sobre la superficie de dichos órganos sin provocar daños. Trabajos anteriores han demostrado la presencia de numerosas bacterias, entre las que se encuentran algunas pertenecientes al género *Pseudomonas*, en la superficie de diferentes órganos de las plantas sin causar daño. Estas son capaces de realizar una fase de su crecimiento en forma residente o epífita sobre hospederos saludables (Hayward, 1974; Hirano, 1983; Leben, 1981).

Es posible que las heridas provocadas al órgano en que se desarrollan dichas bacterias (fruto en este caso), permiten el ingreso de este microorganismo a los tejidos internos, en donde se multiplican rápidamente, contribuyendo de esta forma, al desarrollo y expansión de la le-

sión. El hecho de que dichas bacterias no se encontraron en ninguno de los cortes observados al microscopio de luz, no significa que no estén presentes, sino que por algún motivo no fue posible observarlas.

RESUMEN

Se aisló el hongo *Ascochyta phaseolorum* y la bacteria *Pseudomonas* sp. de frutos enfermos colectados en el campo. Se inoculó frutos sanos, jóvenes y maduros con una suspensión de esporas, y otro grupo con una suspensión de bacterias, y se colocaron en cámaras húmedas en el laboratorio y el invernadero. Sólo los frutos jóvenes inoculados y colocados en el laboratorio desarrollaron lesión. La lesión producida por el hongo se caracteriza por el rompimiento y lisis de las paredes celulares de las células epidérmicas e invasión posterior de las células del mesocarpo y del tejido vascular. En general, conforme aumenta el tamaño de la lesión, los daños son mayores, llegando incluso a pudrir el fruto. Las lesiones por bacteria se caracterizan por engrosamientos en las paredes de las células que circundaban la herida, granulación del citoplasma y aparición de inclusiones de apariencia cristalina. En esas lesiones no se observaron bacterias al microscopio de luz. No se observó gran diferencia entre las lesiones de campo y las de laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración de Edgar Valverde.

REFERENCIAS

- Agrios, G.N. 1978. Plant Pathology. Academic Press, New York.
- Aung, L. & G. Flik. 1976. Gibberellin induced seedles fruit of chayote *Sechium edule* Swartz. Hort. Sci., 11: 460-462.
- Baker, L.J. & D. Bateman. 1978. Cutin degradation by plant pathogenic fungi. Phytopath., 68: 1577-1584.
- Brewer, D. 1960. Studies in *Ascochyta pisi* Lib. Can. J. Bot., 38: 705-717.
- Fernández, M. 1952. Introducción a la fitopatología. 2da. ed. Talleres Gráficos Gadola, Buenos Aires, Argentina. 872 p.

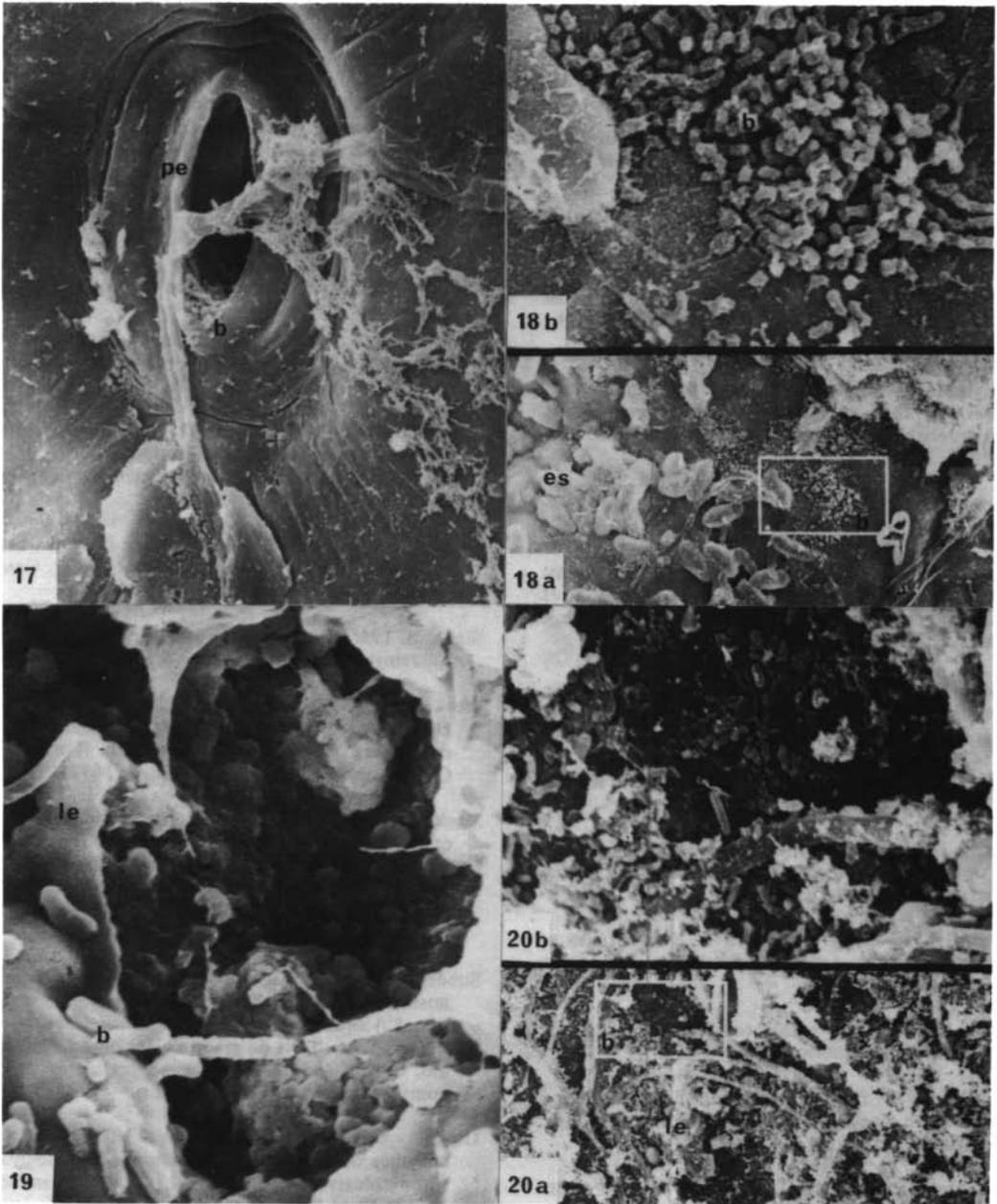


Fig. 17: Estoma mostrando el desarrollo de gran cantidad de bacterias dentro de su cavidad. (2666 x) pe: poro estomático, b: bacterias.

Fig. 18a: Bacterias creciendo sobre la superficie de frutos inoculados con *Ascochyta phaseolorum*. (1066 x) es: esporas, b: bacterias.

18b: Ampliación del recuadro que aparece en la fig. 18a (5330 x) b: bacterias.

Fig. 19: Bacterias creciendo dentro de hospederos inoculados en laboratorio con *Ascochyta*. (8000 x) le: lesión, b: bacterias.

Fig. 20a: Bacterias creciendo dentro de las células del mesocarpo en frutos con lesión, colectados en el campo. (33 x) le: lesión, b: bacterias.

20b: Ampliación del recuadro que aparece en la fig. 20a. (1665 x) b: bacterias.

- Gaudet, D.A. & E.G. Kokko. 1984. Application of Scanning Microscopy to paraffin - embedded plant tissues to study invasive processes of plant pathogenic fungi. *Phytopath.*, 74: 1078-1080.
- González, L.C. 1976. Introducción a la fitopatología. San José, Costa Rica, Ed. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. 148 p.
- Hayward, A.C. 1974. Latent infections by bacteria. *Ann. Rev. Phytopath.*, 12: 87-97.
- Hirano, S. 1983. Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant pathology. *Ann. Rev. Phytopath.*, 21: 243-269.
- Jaroz, A.M., M. Sheets & M. Levy. 1982. Cuticle tickness in *Phlox* and resistance to powdery mildew: an unreliable line of defense. *Amer. J. Bot.*, 6: 824-828.
- Johansen, D.A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Co., New York. 523 p.
- Kuc, J. 1982. The immunization of cucurbits against fungal, bacterial and viral diseases. *In: Asada, Y. et al.* Plant Infection. Japan Scientific Societies Press. Tokyo. p. 137-153.
- Kunoh, H. 1982. Primary Germ Tubes of *Erisiphe graminis* conidia. *In: Asada, Y. et al.* Plant Infection. Japan Scientific Societies Press, Tokyo. p. 45-59.
- Leben, C. 1981. How plant-pathogenic bacteria survive. *Plant Disease*, 65: 633-637.
- León, J. 1968. Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales. Ed. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, Lima, Perú. 487 p.
- Martin, J.T. & B.E. Juniper. 1970. The cuticles of plants. Edward Arnold (Publishers) Ltd., New York. 347 p.
- Medina, J. 1969. Una planta totalmente comestible? El Surco Latinoamericano, Nov-Dic. p. 17.
- Núñez, E. 1978. Plantas medicinales de Costa Rica y su folclorc. Segunda edición. Ed. Univ. Costa Rica, San José, Costa Rica. 318 p.
- Reshtnikova, I.A. & G.D. Upenskaya. 1979a. Pectolytic enzymes of *Ascochyta* species. *Biologisches kic Nauki (U.R.S.S.)* N6, 97-100. 1978. Compendiado en *Rev. Plant Path.*, 58: 1060.
- Reshtnikova, I.A. & G.D. Upenskaya. 1979b. Enzyme activity of *Ascochyta cucumerines*. *Biologiya (U.R.S.S.)*. N2: 47-50. 1978. Compendiado en *Rev. Plant Path.*, 58: 1441.
- Ride, J.P. 1980. The effect of induced lignification of the resistance of wheat cell walls to fungal degradation. *Physiol. Plant Path.*, 16: 187-196.
- Sáenz, M.V. 1985. Identificación y estacionalidad de los factores de rechazo de frutos de exportación del chayote (*Sechium edule* SW) costarricense. Tesis de grado de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Costa Rica. Facultad de Agronomía, Escuela de Fitotecnia. 104 p.
- Sarasola, A. & M.A. Rocca. 1975. Fitopatología. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina. 364 p.
- Sharman, B.C. 1943. Tannic acid and iron alum with safranin and orange G in studies of the shoot apex. *Stain Tech.*, 18: 105-111.
- Sherwood, R. & C.P. Vance. 1982. Initial events in the epidermal layer during penetration. *In: Asada, Y. et al.* eds. Plant infection. Japan Scientific Societies Press, Tokyo. p. 27-44.
- Shrivastava, R.C. 1982. Fungi causing plant diseases at Jampur. *Indian Phytopath.*, 33: 221-224. Compendiado en *Rev. Plant Path.*, 61: 4774.
- Singh, B. 1965. Ovule and seed of *Sechium edule* Sw. A reinvestigation. *Current Sci.* 34: 696-697.
- Steekelenburg, N.A. van. 1978. Chemical control of *Didymiella bryoniae* (*Ascochyta cucumerines*) in cucumbers. *Netherland J. Plant Path.* 84: 27-34. Compendiado en *Rev. Plant Path.*, 5: 3691.
- Steekelenburg, N.A. van. 1982. Factors influencing external fruit rot of cucumber caused by *Didymiella bryoniae*. *Netherlands J. Plant Path.* 88(2): 47-56. 1981. Compendiado en *Microbiological Abstracts (U.S.A.) Serie A: Industrial and Applied Microbiology*, 17: 5249-A.
- Suborós, J.F. 1984. Estudio morfológico de la antracnosis en tallos y hojas de guanábana (*Annona muricata* L.) causados por *Colletotrichum gloeosporioides* Tenz. Tesis de grado de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Costa Rica, Facultad de Agronomía, Escuela de Fitotecnia. 52 p.
- Uspenskaya, G. & I.A. Reshtnikova. 1981. Cellulolytic enzymes of *Ascochyta* and *Phoma*. *Mikologiya i Fitopatologiya (U.R.S.S.)*. 15: 27-32. Compendiado en *Rev. Plant Path.*, 61: 5714.
- Vance, C.P. & T.K. Kirk. 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Ann. Rev. Phytopath.*, 18: 259-288.
- Wynn, W. 1976. Appressorium formation over stomates by the bean rust fungus: Response to a surface contact stimulus. *Phytopath.*, 66: 136-146.