UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA

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

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias, Escuela de Biología para optar al grado de Licenciada en Biología

Nelly Vásquez Morera

CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO

1985

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

Facultad de Ciencias
Escuela de Biología

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

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias, Escuela de Biología para optar al grado de Licenciada en Biología

Nelly Vásquez Morera

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
1985

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología

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

APROBADA

Eugenia Ma. Flores V., Ph.D.	Directora de Tesis
María Isabel Morales Z., M.Sc.	Miembro del Tribunal
Edgar Vargas. Ing. Agr.	Miembro del Tribunal
Edgar Valverde, Ing. Agr.	Miembro del Tribunal
Carlos R. Villalobos S., M.Sc.	Director de la Escuela
Nelly Vásquez Morera	Sustentante

DEDICATORIA

A toda mi familia, y muy especialmente a mis padres, quienes con su cariño, trabajo y esfuerzo, hicieron posible mi educación.

INDICE

	Página
Tribunal Examinador	i
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Contenido	iv
Indice de Figuras	v
Resumen	viii
Introducción	1
Revisión de Literatura	4
Descripción de la especie	4
Descripción de los patógenos:	5
A. phaseolorum	5
Pseudomonas sp.	7
Materiales y Métodos	8
Resultados	11
Descripción morfológica del fruto	11
Lesiones de campo	14
Lesiones de laboratorio	25
Discusión	51
Literatura Citada	57

INDICE DE FIGURAS

Figura N°		Página
1	Vista panorámica de la superficie epidérmica del fruto en estado sano.....	13
2	Sección transversal de mesocarpo mostrando células sanas con grandes gránulos de almidón.....	13
3	Sección transversal de fruto mostrando una lesión colectada en el campo.....	16
4	Sección transversal de fruto mostrando tejido interno invadido por micelio.....	16
5	Sección transversal de fruto mostrando tejido enfermo.....	19
6	Sección transversal de fruto mostrando el contenido citoplasmático en células sanas.....	19
7	Micelio de *Ascochyta* creciendo dentro de los tejidos del hospedero.....	21
8	Superficie epidérmica de fruto infectado mostrando malformación de estomas.....	21
9	Zona de demarcación histológica que separa la zona dañada de la aparentemente sana.....	24
10	Sección transversal de fruto mostrando el desarrollo de picnidios con conidios en su interior.....	24
11	Picnidio de *Ascochyta phaseolorum* desarrollado en medio de cultivo de Agar, Dextrosa y papa.....	27
12	Esporas creciendo sobre la superficie de frutos inoculados en el laboratorio.....	27
13	Esporas creciendo sobre la superficie de frutos a las 4 horas de inoculados.....	30

14 Espora germinada mostrando el desarrollo de 2 tubos germinativos..... 30

15 Tubo germinativo penetrando la superficie del hospedero..... 32

16 Hifas creciendo sobre la superficie de frutos infectados..... 32

17 Desarrollo de apresorios sobre la superficie de frutos inoculados..... 35

18 Apresorios mostrando lisis de las paredes celulares de las células epidérmicas..... 35

19 Micelio creciendo sobre las aberturas estomáticas..... 36

20 Espora germinando cerca de una abertura estomática..... 36

21 Estoma completamente desintegrado por la acción del hongo..... 40

22 Lesión sobre la superficie del fruto a los 7 días de la inoculación..... 40

23 Estoma mostrando el desarrollo de gran cantidad de bacterias dentro de su cavidad..... 43

24a. Bacterias creciendo sobre la superficie de frutos inoculados con A. phaseolorum..... 43

24b. Ampliación del recuadro que aparece en la Figura 24a..... 43

25 Bacterias creciendo dentro de hospederos inoculados en laboratorio con Ascochyta..... 45

26a. Bacterias creciendo dentro de las células del mesocarpo en frutos con lesión colectados en el campo..... 45

26b. Ampliación del recuadro que aparece en la figura 26a 46

27 Lesión causada por bacterias dentro del laboratorio..... 47

28 Inoculación realizada en el laboratorio mostrando desarrollo posterior de hongos saprófitos..... 47

29 Inoculación realizada en el laboratorio con bacterias donde se muestran inclusiones de apariencia cristalina..... 49

AGRADECIMIENTOS

En forma muy especial quiero dar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Eugenia Ma. Flores V., Directora de esta Tesis, por sus valiosos y oportunos consejos, no sólo durante la realización de este trabajo sino durante la mayor parte de mi formación académica.

Al Ingeniero Agrónomo Edgar Vargas, por haberme dado la oportunidad de trabajar a su lado durante este tiempo y brindarme su ayuda cada vez que la necesité.

Al Ingeniero Agrónomo Edgar Valverde, por permitirme realizar este trabajo como parte del proyecto de investigación que lleva a cabo con el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas CONICIT; financiando con ello parte de la investigación y a la vez colaborando con el desarrollo de la misma.

Al M.Sc. Carlos R. Villalobos S., y a la M.Sc. María Isabel Morales Z. por la revisión del borrador y sugerencias al mismo.

A todo el personal del Laboratorio de Fitopatología de la Escuela de Fitotecnia y en especial a la Ingeniera Gerardina Umaña, por toda su ayuda y amistad.

Al personal de la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad de Costa Rica y muy especialmente al Dr. Francisco Hernández, al Ingeniero Alfredo Azofeifa, al Dr. Omar Méndez, al Sr. Guillermo Vargas y a las Biólogas Ethel Sánchez y Daysi Corrales, por el trato tan especial que siempre

han sabido brindarme, además de sus consejos y ayuda.

A todos mis amigos y compañeros del Laboratorio, a la M.Sc. Dora Ingrid Rivera y a los Biólogos Elizabeth Arnáez S., Braulio Vílchez A., y Pablo Acuña, por su ayuda y amistad demostradas.

A mis padres y hermanos, y a todas las demás personas que con su cariño y apoyo hicieron posible la realización de la misma.

Para todos, muchas gracias.

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 tanto dentro del laboratorio como dentro del invernadero.

Los frutos jóvenes y maduros, inoculados y colocados en el invernadero no desarrollaron lesión. Los frutos jóvenes inoculados y colocados en el laboratorio sí desarrollaron lesión.

La lesión por 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 bacterias se caracterizaron por engrosamiento de las paredes celulares 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.

INTRODUCCION

Sechium edule (Jacq) Swartz (chayote) es un cultivo bastante antiguo en diversas zonas del continente americano. Singh (1965) asegura que es originario de América Tropical, mientras que otros autores (León, 1968; Aung, 1976) aseguran que es específicamente nativo de América Central. Núñez (1973) señala a Puerto Rico como su centro de origen. Trabajos más recientes llevados a cabo por la investigadora norteamericana Linda Newstrom señalan a México como su centro de origen (L. Newstrom, com. pers.).

Esta planta recibe diferentes nombres comunes en los varios países en que se cultiva: por ejemplo, en Colombia se conoce como huisquila y cidapapa y en Centro América como chayote, alchonchas y quisayote. En Brasil se conoce como Xuxú o chuchú; en Estados Unidos como chouchou, vegetable pear y pear squash. Por último, los italianos la denominan ayote romano (Pineda, 1973).

El chayote es una planta comestible casi en su totalidad (80%), ya que de ella se aprovechan las raíces, semillas, frutos, flores y retoños tiernos. Algunos análisis realizados han permitido 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.

Por ejemplo para el período 82-83 generó divisas por 3.6 millones de dólares, y para el primer semestre de 1985 generó divisas por 1.0 34.796 millo

mes de dólares.

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 han sido poco estudiadas. Entre la más frecuente y severa que atacan el fruto en el Valle de Ujarrás, se halla la peca blanca (Sáenz, 1985). Dicha enfermedad está causada por el hongo Ascochyta phaseolorum (Deuteromycete del orden Sphaeropsidales), y en la actualidad ha cobrado mayor importancia, debido a su posible asociación con una bacteria del género Pseudomonas sp. (E. Vargas, com. pers.) la cual se ha aislado frecuentemente de lesiones que presentan un halo acuoso. La asociación de estos patógenos causa un severo daño e induce la pudrición del fruto en poscosecha, lo que está produciendo un fuerte rechazo, no tanto en el mercado local, como en el de exportación.

La aparición de esos dos tipos de lesión en el campo (con halo acuoso y sin él) motivó la presente investigación, que se espera permita aclarar muchos aspectos sobre el desarrollo de la enfermedad en el fruto.

Los objetivos del presente trabajo son:

1) Identificar las causas de la enfermedad que causa en el fruto una mancha blanca con borde acuoso.

2) Determinar la vía de penetración del hongo y de la bacteria en los frutos.

3) Estudiar el desarrollo de la lesión producida por el hongo Ascochyta phaseolorum y determinar si el patógeno muestra especificidad por algún tejido.

4) Estudiar el desarrollo de la lesión producida por la bacteria *Pseudomonas* sp. y determinar si el patógeno muestra especificidad por algún tejido.

5) Determinar las alteraciones morfológicas que producen los dos posibles patógenos al invadir los diferentes órganos.

6) Comparar el daño producido por los patógenos en frutos colectados en el campo y en aquellos inoculados en el laboratorio.

REVISION DE LITERATURA

Descripción de la especie.

El chayote (*Sechium edule*) pertenece a la familia Cucurbitaceae. Junto con el tacaco (*Polakowskia tacaco*) han sido colocadas por Messian (1979) en una tribu aparte llamada Sicyoideae que se caracteriza por la presencia de frutos con una sola semilla.

Es una planta trepadora, herbácea, perenne, con un tallo suculento y ramificado, pubescente o glabro, provisto de gran cantidad de zarcillos, que se eleva a mucha altura y alcanza hasta 10 m de largo o más (Pineda, 1973; Núñez, 1978; León, 1968; Lionti, 1959; Sundaratajan, 1979).

Las hojas son simples, alternas, pecioladas, con borde aserrado, de nervadura clara y superficie áspera. Su limbo es anguloso o lobado, generalmente acorazonado y mide de 6 a 20 cm de largo (Pineda, 1973; Núñez, 1978).

Es una planta monoica, con flores unisexuales colocadas en racimos. Las inflorescencias son axilares y pueden encontrarse inflorescencias estaminadas y pistiladas en el mismo nudo o flores de ambos sexos sobre un mismo eje (E. Flores, com. pers.).

Las flores estaminadas, están suspendidas en un largo pecíolo; las pistiladas generalmente en pares, colocadas en la base del tallo que sostiene las primeras. De acuerdo a León (1968), las flores estaminadas son pequeñas, con 5 sépalos verdosos, agudos y pequeños, que alternan con 5 pétalos amarillentos de 8 a 10 mm de largo. Los estambres son 5, unidos en la base. Hay 10 nectarios bien desarrollados. Además hay inflorescencias con sólo

flores pistiladas que constan por lo común de una sola flor; en algunos casos de 2 a 3. Esta inflorescencia tiene un eje de 4 a 8 cm de largo. El gineceo tiene el ovario cónico, carnoso y blancuzco, que se angosta en el ápice con un eje fino sobre el que están colocados el cáliz y la corola, similares a los de la flor estaminada; el estilo termina en un estigma discoide.

El fruto es piriforme, cerdoso, espinoso o liso, verde o blanquecino, indehiscente y cada uno con una semilla larga, ovada y comprimida que muestra pocos rasgos comunes dentro de la familia Cucurbitaceae, por ejemplo: testa coriácea, germinación hipógea y viviparidad (Singn, 1965).

Sin embargo, es importante hacer notar que esta planta presenta una diversidad fenotípica notable y que al igual que otras cucurbitáceas, a menudo presenta variaciones estacionales dentro de la misma planta (Maffioli, 1981).

Descripción de los patógenos.

Ascochyta phaseolorum.

Este hongo pertenece a la clase Deuteromicetes u Hongos Imperfectos; orden Sphaeropsidales. Dentro de esta clase se agrupan todos los hongos cuya fase sexual no se conoce (González, 1976). Estudios realizados por Crossan (1958) demostraron que Ascochyta abelmoschi, A. gossypii, A. althaeina, A. nicotiana, A. capsici y A. lycopersici son sinónimos de Ascochyta phaseolorum. El hongo Ascochyta incluye muchas especies patógenas, caracterizadas por causar lesiones sobre los tejidos de plantas superiores (Oku y Nakanishi, 1963).

Este hongo se caracteriza por poseer los picnidios inmersos, de forma esférica a subglobosa, con una pared compuesta por tres capas de células de grosor, pseudoparenquimáticas. Los conidios son bicelulares, hialinos, ocasionalmente sigmoideos, de ápice redondeado o aplastado, con una base redonda o truncada (Sutton y Waterston, 1966).

El hongo causa manchas blanquecinas en hojas tallos y frutos, especialmente en muchas especies de leguminosas como Cannavalia ensiformes, Glycine max, y la mayoría de las especies de Phaseolus y Vigna. Además, por inoculación actúa sobre géneros de otras familias, tales como Althaea rosea, Cannabis sativa, Capsicum anuum, Lycopersicon esculentum y otros (Sutton y Waterston, 1966).

Las manchas de las hojas son circulares, pardas y con una gran cantidad de cuerpos fructíferos negros. Cuando el manchado es abundante, la hoja muere. Sobre los frutos, tallos y pecíolos, las lesiones son alargadas y tienen menos cuerpos fructíferos (Chupp y Sherf, 1960).

Aislamientos de A. phaseolorum demostraron que existe un efecto de temperatura sobre la germinación de las esporas, ya que el crecimiento óptimo se obtuvo cuando se encontraba entre los 20 y los 24°C; y no hubo crecimiento a los 28°C (Crosan, 1958).

En caupí, en condiciones de campo, la aparición de los síntomas se ve condicionada al comienzo de las lluvias. Después de un período de precipitaciones abundantes, se observó un considerable incremento no sólo en el número de plantas enfermas, sino en la cantidad de lesiones por planta (Moreno, 1975).

Una vez que se ha realizado la liberación de las esporas, el impacto de las gotas de lluvia sobre las masas de esporas liberadas, favorece la diseminación posterior del inóculo. El hongo penetra y forma lesiones típicas en el hospedante únicamente después de destruir la epidermis de éste (Moreno, 1975).

Pseudomonas sp.

Este género contiene alrededor de 90 especies fitopatógenas. Estas poseen gran importancia, debido a que atacan la mayoría de las plantas cultivadas. Al igual que otros géneros, requiere de buenas condiciones ambientales, especialmente humedad, para que su permanencia en el hospedero se vea favorecida.

Los miembros de este género son bacilos gramm-negativos con 1 o varios flagelos polares o sin flagelos (González, 1976).

La asociación Ascochyta phaseolorum- Pseudomonas como patógenos del fruto del chayote ha sido observada recientemente, por lo que no se dispone de material que permita conocer detalles de esta enfermedad.

MATERIALES 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 platos de Petri. Una vez que se obtuvo los cultivos puros, se inocularon frutos jóvenes y maduros. Tanto para el trabajo con el hongo como con la bacteria, se hicieron pruebas experimentales para definir si se debía o no provocar heridas.

En el caso del hongo, se realizaron inoculaciones con una asa en forma localizada sin producir heridas. Para ello, conidios suspendidos en agua destilada fueron puestos sobre la superficie de frutos maduros y colocados en una cámara húmeda dentro del invernadero. Se repitió la experiencia utilizando frutos jóvenes, colocando las cámaras húmedas en el laboratorio (en condiciones normales de temperatura) y otra en el invernadero.

Para el trabajo con la bacteria, se realizaron inoculaciones con un gotero en forma localizada, provocando heridas. Se limpió el mucílago que salió del fruto al provocarse la herida y posteriormente, se colocó colonias bacteriales suspendidas en agua destilada estéril sobre la superficie de fru

tos maduros. Estos fueron colocados en una cámara húmeda en el laboratorio.

En todas las inoculaciones, los frutos fueron previamente lavados con agua y jabón y desinfectados con alcohol de 70°. Las pruebas se efectuaron de la siguiente forma: un grupo de frutos sólo con el hongo, otro grupo solo con la bacteria, y un grupo utilizado como testigo en cada uno de los tratamientos. Se hicieron 2 repeticiones de cada tratamiento.

Los dos primeros días después de realizada la inoculación, se colectó muestra de las áreas infectadas a las 9:00 a.m. y las 5:00 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 de 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 otra parte para microscopía electrónica de barrido.

Los especímenes utilizados en microscopía de luz de deshidrataron mediante una serie ascendente de alcoholes y se infiltraron en Paraplast-Plus. Se hicieron secciones transversales de 20 um de grosor y se las tiñó siguiendo la técnica de Sharman (1943) y la técnica Safranina-Fast Green. Se montaron las secciones en Preservaslide y se observaron en un microscopio Leitz Dialux 20.

Para el examen con 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 CO_2 líquido. Los especímenes se montaron en soportes de aluminio empleando pintura conductora de plata. Se colocó el material en un cobertor iónico EIKO IB-3 y se cubrió con película de oro. Se observó las secciones en un microscopio de rastreo Hitachi HHS-2R y en otro Hitachi S- 570, bajo un voltaje de aceleración de 10 y 15 KV. Las fotografías se tomaron con película Verichrome Pan Kodak VP 120.

Parte de las secciones de fruto fueron fijadas en F.A.A., y deshidratadas con la Técnica de Johansen (1940) y embebidas en parafina. Se hicieron cortes transversales de 8 um de grosor, los cuales fueron colocados sobre un cubreobjetos redondo y fijados con el adhesivo Haupt y secadas a 37°C durante 4 horas. Las secciones fueron desparafinadas con xileno, seguidamente en una mezcla 1:1 de xileno - etanol y posteriormente en alcohol de 100 y finalmente 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 Hitachi HHs-2R (Gaudet y Kokko, 1984).

Se hicieron réplicas con colodión de la superficie inoculada de un grupo determinado de muestras, éstas fueron observadas posteriormente al microscopio de luz.

También se hicieron cortes transversales de material fresco y se tiñeron con toluidina azul y con fluoroglucinol. Se tomaron fotografías del material procesado y observado.

RESULTADOS

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

Los frutos con carnosos con pericarpo blanco o verde, y superficie lisa.

La epidermis es unicelular; las paredes externas se muestran ligeramente convexas y cuticularizadas en un corte transversal; poseen un núcleo bastante grande. Se observan estomas de contorno elíptico, hundido, en número moderado; las células oclusivas se encuentran rodeadas de 5 ó 6 células subsidiarias (Figura 1). Los tricomas, bastante pequeños a la madurez del fruto, se caracterizan por ser multicelulares uniseriados y multicelulares capitados.

El mesocarpo es verdoso o blancuzco, formado en su mayoría por parénquima muy rico en grandes gránulos de almidón, grasa y agua (Figura 2). Muchas células, tanto de la epidermis como del mesocarpo, contienen gran cantidad de cristales de oxalato de calcio (rafidios). Debe mencionarse también la presencia de mucílago en todas las paredes de la planta. En los frutos, este jugo sale a la superficie en forma de grandes gotas, al efectuarse un corte; al secarse, forma una cubierta gomosa o vidriosa sobre la herida.

En los frutos maduros es corriente encontrar grandes cantidades de fibras localizadas inmediatamente por debajo de la epidermis. En los frutos jóvenes, esas fibras aún conservan parte de su protoplasto y sus paredes no muestran los engrosamientos característicos de una fibra bien formada. El endocarpo usualmente tiene numerosas fibras.

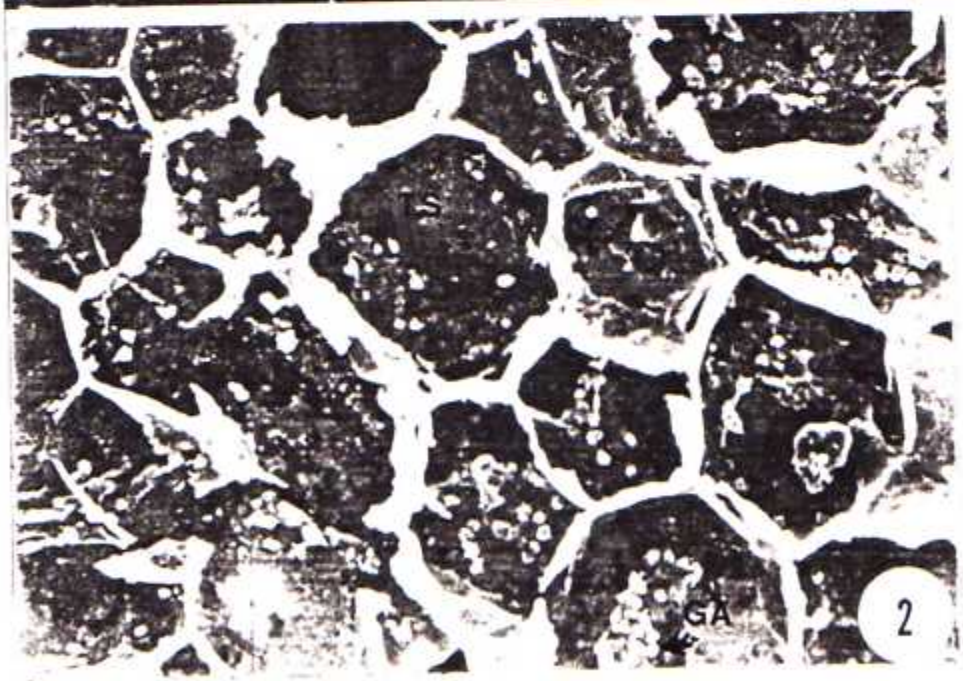
Figura 1: Vista panorámica de la superficie epidérnica del fruto en estado sano. (1700 x)

EP: Epidermis, es: estoma.

Figura 2: Sección transversal de mesocarpo mostrando células sanas con grandes gránulos de almidón. (340 x).

TS: Tejido sano, GA: gránulos de almidón

es
EP
1


GA
2

Tanto en frutos jóvenes como maduros, se observa un tejido vascular bien desarrollado.

Germinación de las esporas y efecto del hongo y la bacteria sobre los frutos

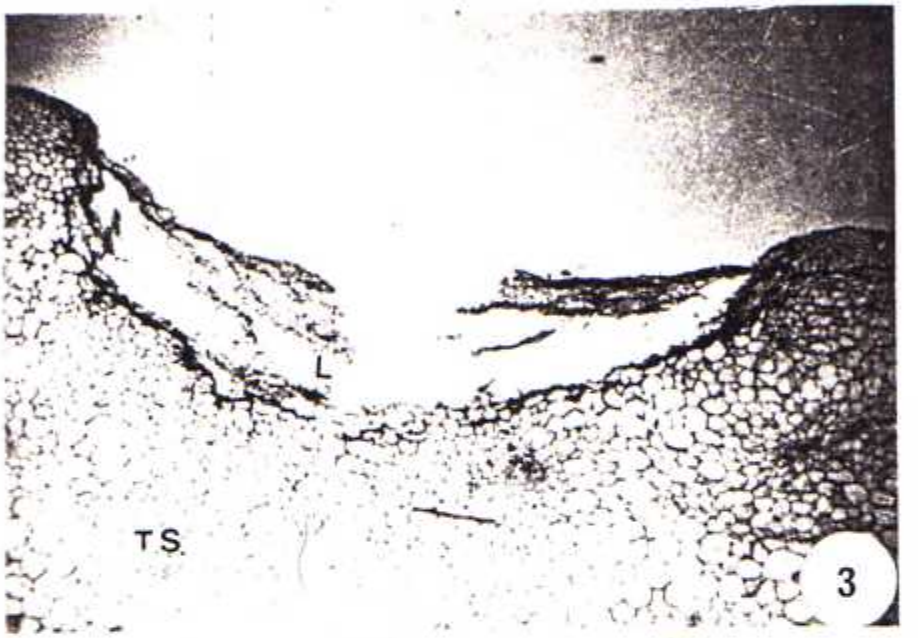
Las lesiones se caracterizan por circulares, de bordes bien definidos, de color blanco o grisáceo, con un hundimiento sobre la superficie del fruto, que depende del grado de desarrollo de la lesión. De esta forma, lesiones pequeñas muestran un ligero hundimiento, mientras que en lesiones mayores, esa característica es más notoria (Figura 3). Sin embargo, no todas las lesiones presentan dicho hundimiento. En el campo pueder colectarse frutos que también presentan algunas lesiones que muestran únicamente un halo circular de aspecto acuoso. Estas lesiones desarrollan rápidamente en postcosecha, son de color pardo y llegan a pudrir todo el fruto, con producción de gran cantidad de picnidios oscuros.

Las observaciones realizadas al microscopio de luz en lesiones que apenas han iniciado su desarrollo, revelaron una disolución de la cutícula y destrucción total de algunas células de la epidermis. Lesiones de aproximadamente 1 cm de largo mostraron destrucción total de las células epidérmicas y del parénquima que forma el mesocarpo circundante.

Estas observaciones son válidas tanto para las lesiones consideradas como típicas, como para las que presentaron un halo acuoso. La diferencia fundamental entre esas dos, estaba en que el halo que rodeaba a las segundas, estaba formado por una capa celular bastante obliterada, que poseía gran cantidad de micelio en su interior.

Figura 3: Sección transversal de fruto mostrando una lesión colectada en el campo. (160 x).
L: lesión, TS: tejido sano.

Figura 4: Sección transversal de fruto mostrando tejido interno invadido por micelio. (640 x).
TI: tejido infectado, mi: micelio.


L
TS
3

TI
MI
4

Lesiones de tamaño considerable, mostraron una invasión posterior del micelio en los tejidos internos de la planta; sobre todo del parénquima y del tejido vascular (Figura 4).

Cuando el micelio invadió dichos tejidos, las células invadidas sufrieron un rápido colapso y su protoplasto se desintegró (Figura 5). Las células aparentemente sanas muestran gran cantidad de sustancias (sobre todo almidón) en su interior a diferencia de las células invadidas. en donde la mayoría de estas sustancias ya no se encuentran presentes (Figura 6).

El micelio se caracteriza por ser septado, ramificado, de grosor variable y con muchas irregularidades en sus paredes (Figura 7). Es predominantemente intracelular y se dirige directamente a través de paredes. Es muy prominente en la mayoría de los tejidos colapsados, e invade tanto el tejido vascular como el parénquima del mesocarpo. Restos de micelio aparentemente viejo, muestran coloraciones oscuras dentro de las células que lo contiene.

Las células en que el contenido de micelio fue notorio, se caracterizaron por una reacción peculiar de sus paredes. En la mayoría de éstas, hubo un engrosamiento ocasional y un relleno total de los espacios intercelulares, además de que en algunos casos, dichas paredes tiñeron de color dorado.

Las áreas infectadas se caracterizaron además porque el protoplasma se vuelve granular y después de un tiempo los contenidos de las células del hospedero se vuelven pardas y las células mueren

Figura 5: Sección transversal de fruto mostrando tejido enfermo. (320 X).

TL: tejido lesionado.

Figura 6: Sección transversal de fruto mostrando el contenido citoplasmático en células sanas. (640 X).

TS: Tejido sano.

TI
5

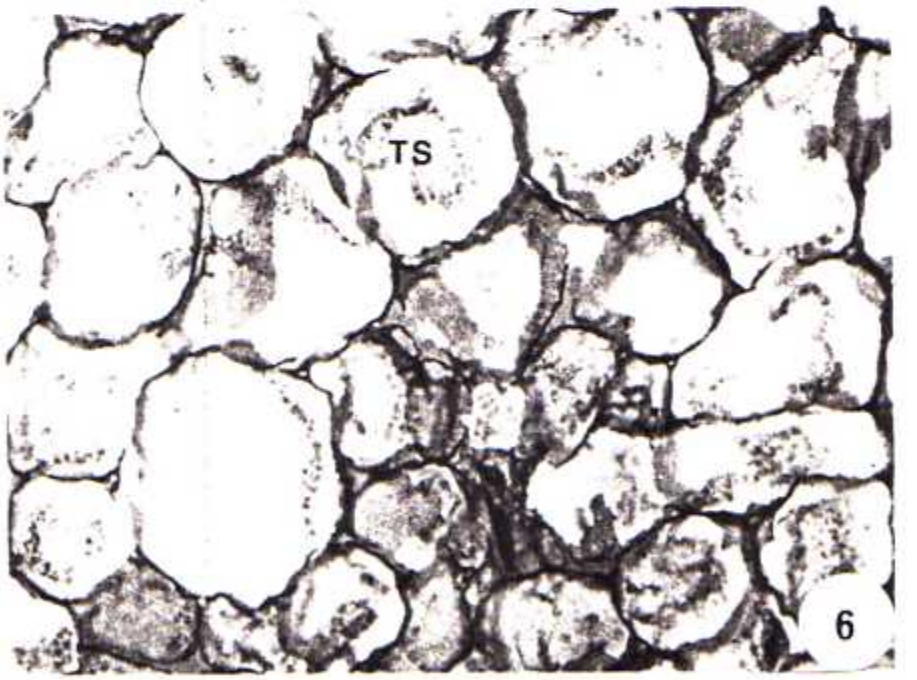

TS
6

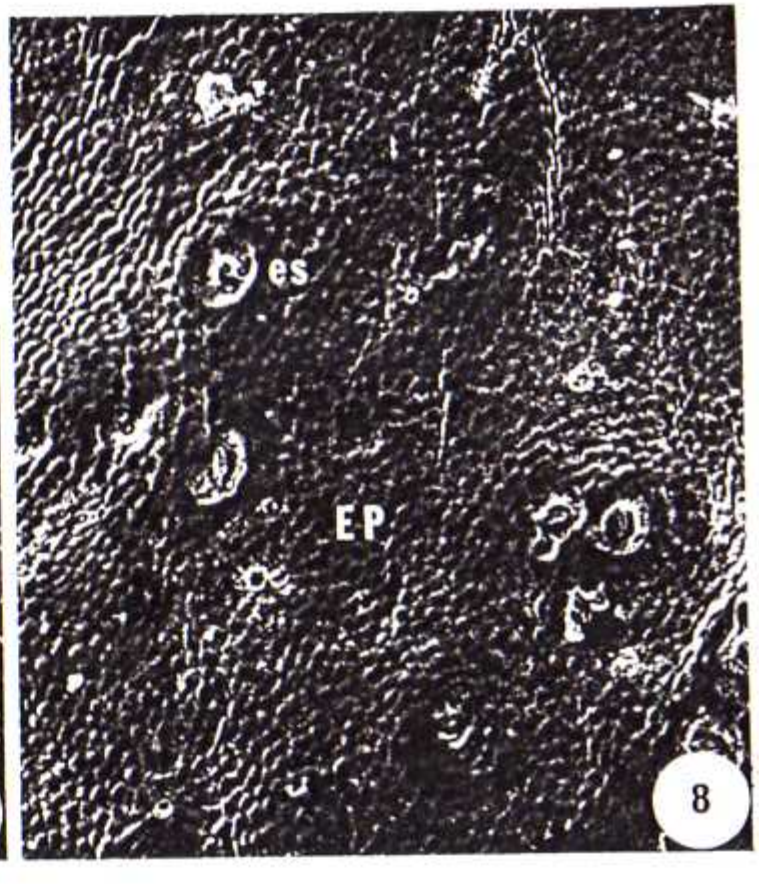
Figura 7: Micelio de Ascochyta creciendo dentro de los tejidos del hospedero. (198X).

TH: tejido del hospedero, M: micelio.

Figura 8: Superficie epidérmica de fruto infectado mostrando malformación de estomas. (4666 X).

EP: epidermis, es: estoma.

M
7


es
EP
8

La invasión por el micelio puede suceder rápidamente a través de tejido de paredes delgadas como el parénquima. El esclerénquima por su parte, restringe la rápida extensión del micelio.

Con respecto al elemento traqueal, se oberva una destrucción del mismo durante su ontogenia. Al alcanzar el hongo el tejido vascular en etapas ontogenéticas tempranas, en algunos casos hay malformación de células del xilema y en otros casos no llega a diferenciarse completamente. El haz vascular no se diferencia cuando hay infección en tejidos muy jóvenes, sino que aparece una estructura mal formada, y las células parenquimáticas que rodean el área infectada se colapsan y hay deposición de sustancias, principalmente en los espacios intercelulares. El xilema es invadido antes que el floema. En algunas ocasiones éste último se observa completamente obliterado y con una coloración negruzca.

Tanto en lesiones de campo, como en lesiones de laboratorio, podemos encontrar malformación de estomas y en algunos casos, estomas con poros obliterados (Figura 8).

Gran cantidad de cristales aparecen en la epidermis y capas adyacentes a éstas. Generalmente, alrededor del punto de infección se diferencia un grupo de células que separa la parte dañada de la aparentemente sana (Figura 9). Esta zona es la que forma externamente en la lesión un halo circular y de apariencia húmeda. Dentro de las células que se encuentran delimitando dicha zona se observó gran cantidad de micelio en desarrollo.

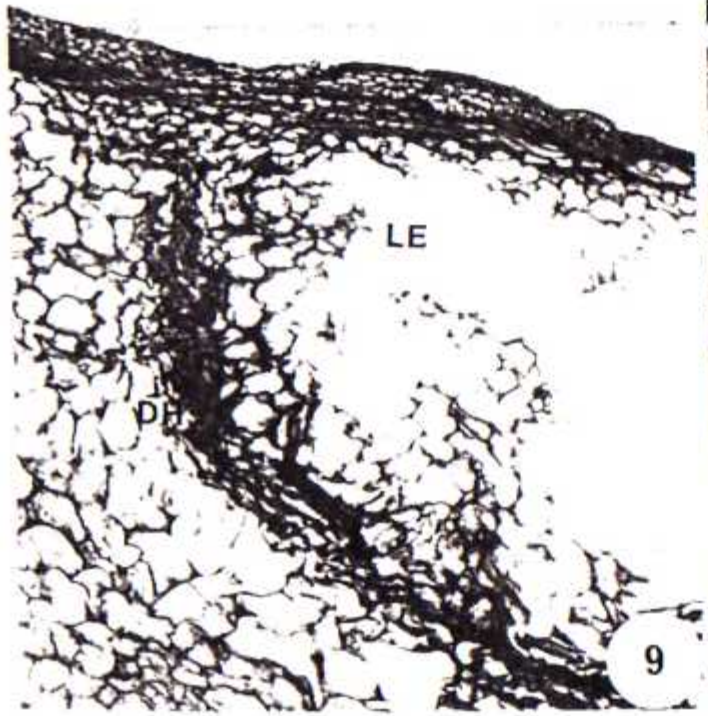
En secciones transversales, es posible observar en la lesión gran cantidad de picnidios desarrollándose o ya bien formados. Estos poseen gene-

Figura 9: Zona de demarcación histológica que separa la zona dañada de la aparentemente sana. (320 X).

LE: lesión, DH: demarcación histológica.

Figura 10. Sección transversal de fruto mostrando el desarrollo de picnidios con conidios en su interior. (320 X).

TL: tejido lesionado; Pi: picnidios.



9

10

ralmente una forma globosa o piriforme, con un ostíolo en la parte superior, por el cual van a ser liberados los conidios; éstos a su vez se caracterizan por ser bicelulares con un sólo septo y hialinos (Figuras 10 y 11). 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.

b. Lesiones producidas en el laboratorio.

Se encontró que frutos maduros inoculados en el laboratorio provocando heridas, y colocados posteriormente en una cámara húmeda dentro del laboratorio, no desarrollaron los síntomas típicos de la enfermedad. Aparentemente el mucílago proveniente de las heridas influyó en el resultado.

Frutos jóvenes y maduros inoculados en el laboratorio sin provocar heridas, y colocados en una cámara húmeda en condiciones de invernadero durante los meses de enero-febrero de 1985, tampoco desarrollaron lesión. Sin embargo es importante hacer notar que sobre la superficie de éstos, se encontró desarrollo de tubos germinativos y micelio. De esta manera, en todos los muestreos realizados a partir de las 48 horas de la inoculación, se observó gran cantidad de esporas germinadas (Figura 12).

En estos frutos, a partir del quinto día de realizada la inoculación, se observó que el desarrollo del micelio por algún motivo se detuvo; y en frutos que tenían aproximadamente 15 días de inoculados, el desarrollo del micelio continuó siendo igual que al principio.

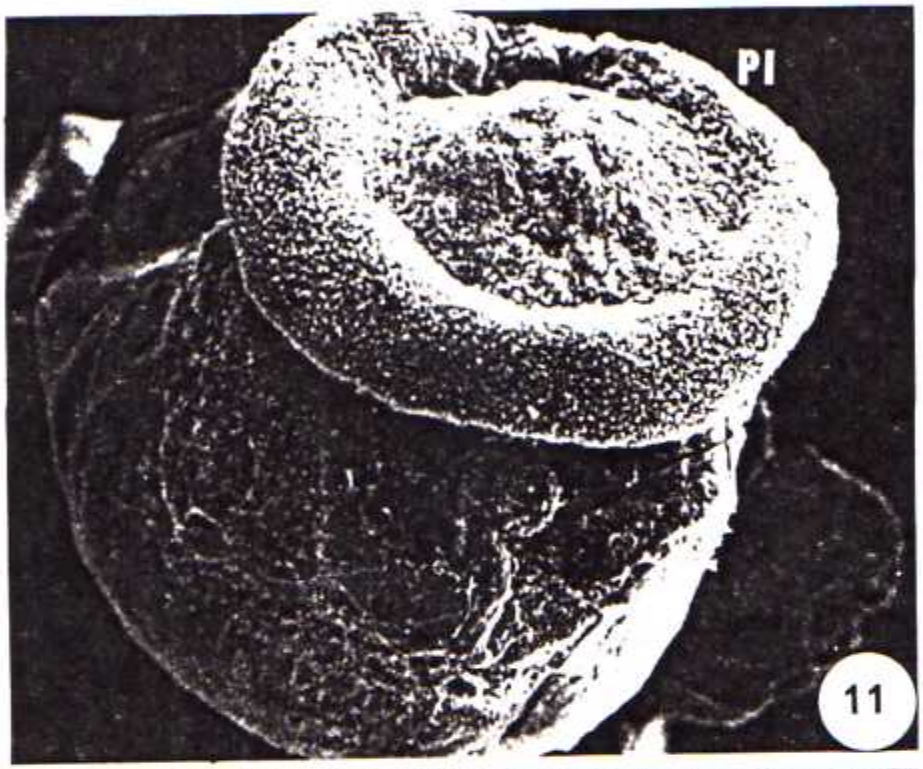
En vista de que para estas pruebas en la mayoría de los casos no se hicieron estudios al microscopio electrónico, sino únicamente réplicas con

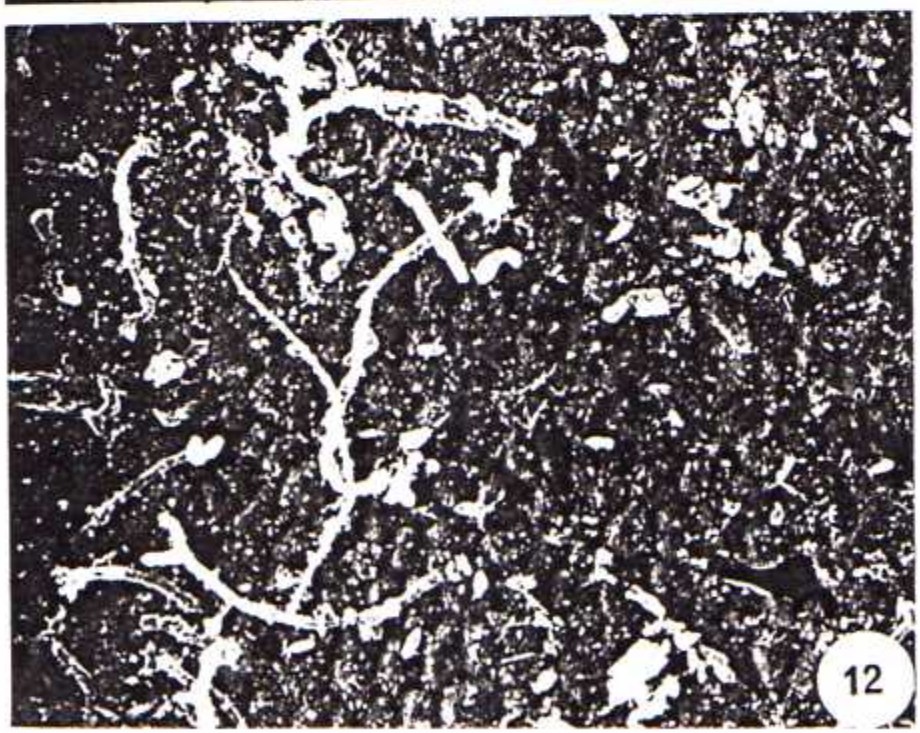
Figura 11: Picnidio de Ascochyta phaseolorum desarrollado en medio de cultivo de Agar, Dextrosa y Papa. (40 X).

Pi: picnidio.

Figura 12: Esporas creciendo sobre la superficie de frutos inoculados en el laboratorio. (533 X).

EP: epidermis; es: esporas.


PI
11


12

colodión de la superficie inoculada; no se encontró penetración de hifas en células epidérmicas, ni formación de apresorios.

Frutos jóvenes inoculados en el laboratorio sin producir heridas y colocados en una cámara húmeda en el laboratorio, a una temperatura ambiente de 21-22°C, desarrollaron gran cantidad de lesiones. De esta forma, a las 15 horas de realizada la inoculación, al microscopio de luz se observaron las primeras lesiones que se manifiestan como hundimientos típicos en la epidermis, y en algunos casos, la aparición de micelio dentro de las células epidérmicas.

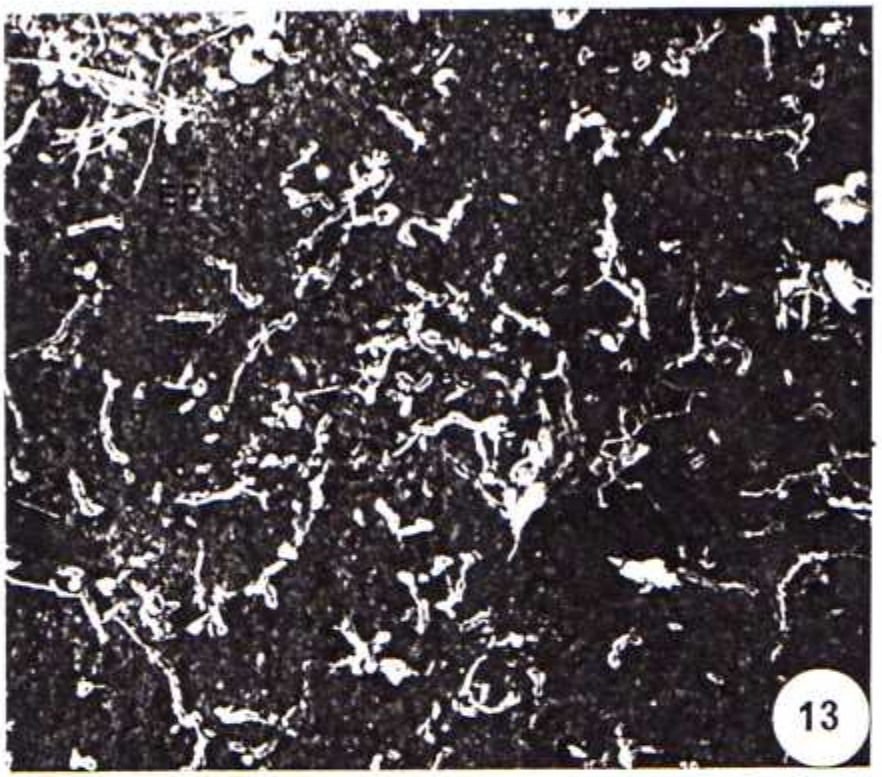
Análisis realizados al microscopio electrónico revelan que aproximadamente entre las 15 y 38 horas de realizada la inoculación, algunos de los conidios ya habían emitido un tubo germinativo largo; sin embargo, no fue sino hasta las 46 horas aproximadamente en que se notó un mayor número de esporas germinadas sobre la superficie del fruto (Figura 13). Aquí, la espora emite un tubo germinativo (pueden ser 2) de grosor considerable y consistentencia aparentemente fuerte que va a penetrar la cutícula directamente (Figura 14). Hay una constricción del tubo germinativo durante la penetración a través de la pared celular del hospedero (Figura 15). Las hifas que resultan de la formación del tubo germinativo, crecen a través de la superficie del fruto hasta un punto donde pueda producirse la penetración (Figura 16). En algunos casos se observa lisis de las paredes de las células epidérmicas debidas posiblemente a la acción de enzimas secretadas por el hongo sobre los componentes de la pared celular. Estos rompimientos de las paredes celulares, se realizan durante el proceso de penetración del hongo.

Figura 13: Esporas creciendo sobre la superficie de frutos a las 4 horas de inoculados. (333 X).

EP: epidermis, es: espora, tg: tubo germinativo.

Figura 14: Espora germinada mostrando el desarrollo de 2 tubos germinativos. (2933 X).

es: espora, tg: tubo germinativo.


13

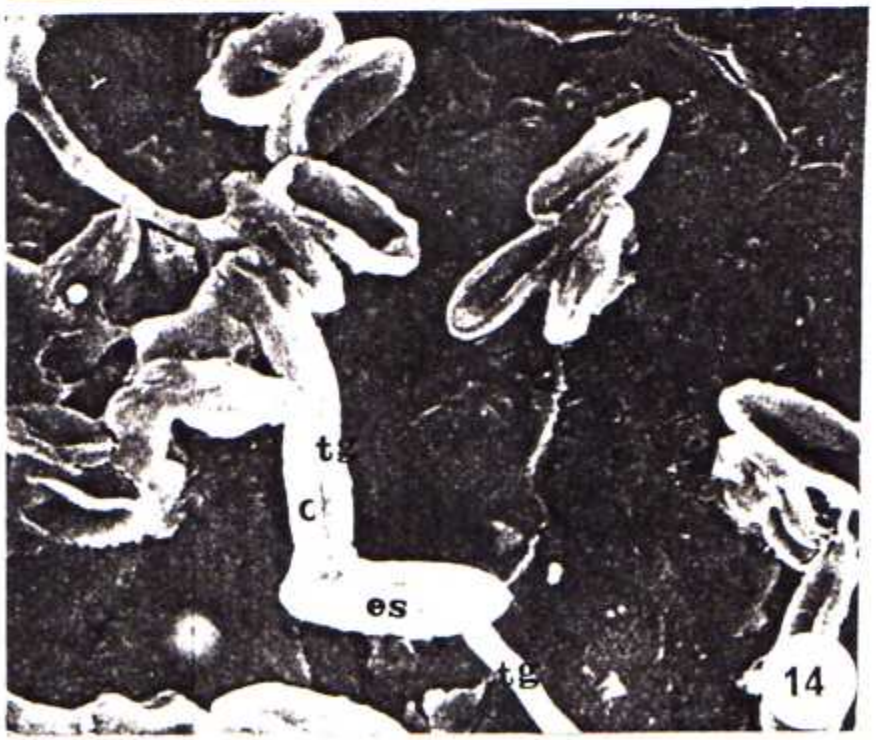
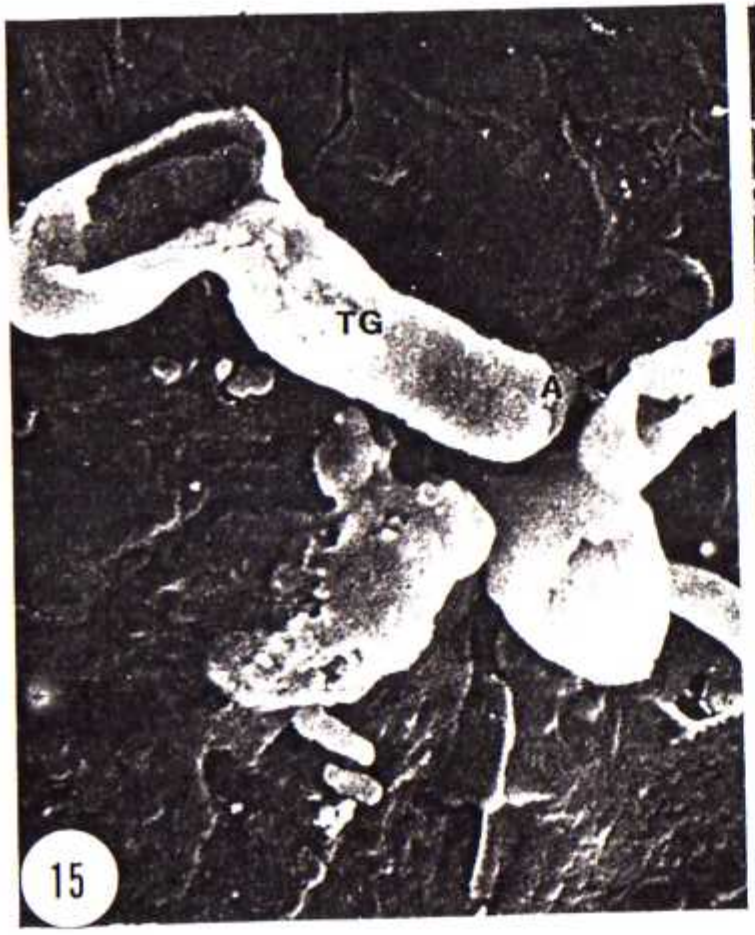

es
14

Figura 15: Tubo germinativo penentrando la superficie del hospedero. (5333 X).

TG: tubo germinativo, A: adelgazamiento del tubo germinativo (hifa infecciosa).

Figura 16: Hifa creciendo sobre la superficie de frutos infectados. (400 X).

SF: superficie del fruto, H: hifas; ES: estoma.


TG
A
15

16

En la mayoría de los casos, pareciera que el hongo penetra sin la ayuda de apresorios definidos; no obstante, en algunas ocasiones estas estructuras se hicieron presentes (Figura 17). En el punto de formación del apresorio, se observó también lisis de las paredes celulares epidérmicas (Figura 18).

En algunas ocasiones, los tubos germinativos y el micelio resultante de éstos, pasaron por alto los estomas, creciendo a veces directamente sobre sus aberturas y penetrando por las células vecinas (Figura 19). Otras veces fue posible observar conidios germinando cerca de una abertura estomática, dando la apariencia de una posible y ocasional penetración a través de estomas (Figura 20).

En lesiones muy avanzadas traídas del campo, se encontraron estomas completamente desintegrados por efecto de la rápida extensión y penetración del hongo (Figura 21).

En el laboratorio, aproximadamente a los 6 días de realizada la inoculación, se obtuvieron los primeros síntomas visibles (sin ayuda del microscopio) de la lesión causada por Ascochyta. Esta se caracterizó por formar una pequeña lesión circular, que se fue extendiendo rápidamente a manera que pasaron los 4 días. No obstante, con ayuda del microscopio de luz se encontró que los síntomas empiezan a producirse cuando hay mayor cantidad de micelio desarrollado sobre la superficie, que empieza a penetrar las células de la epidermis. Este fenómeno se lleva a cabo aproximadamente entre el tercero y cuarto día después de realizada la inoculación.

Al sétimo día encontramos ya lesiones bien definidas, con rompimiento de células epidermales y exposición de tejido interno. Este último empieza a

Figura 17: Desarrollo de apresorios sobre la superficie de frutos inoculados. (1733 X).
EP: epidermis, E: espora, AP: apresorio.

Figura 18: Apresorio mostrando lisis de las paredes celulares de las células epidérmicas. (6533 X).
E: espora, AP: apresorio, L: lisis.

17

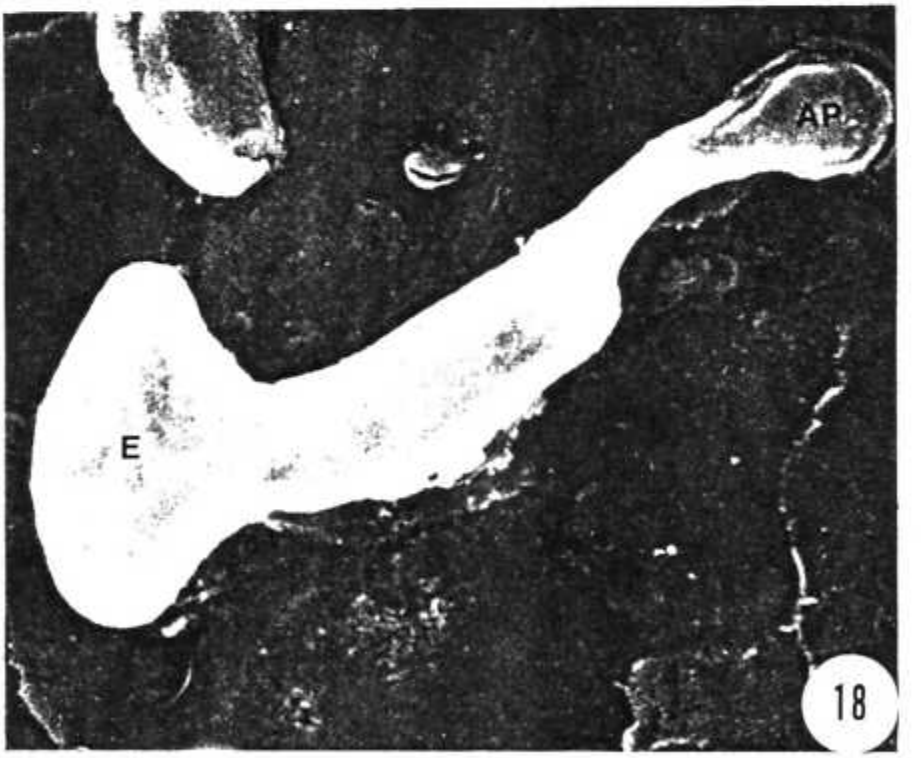
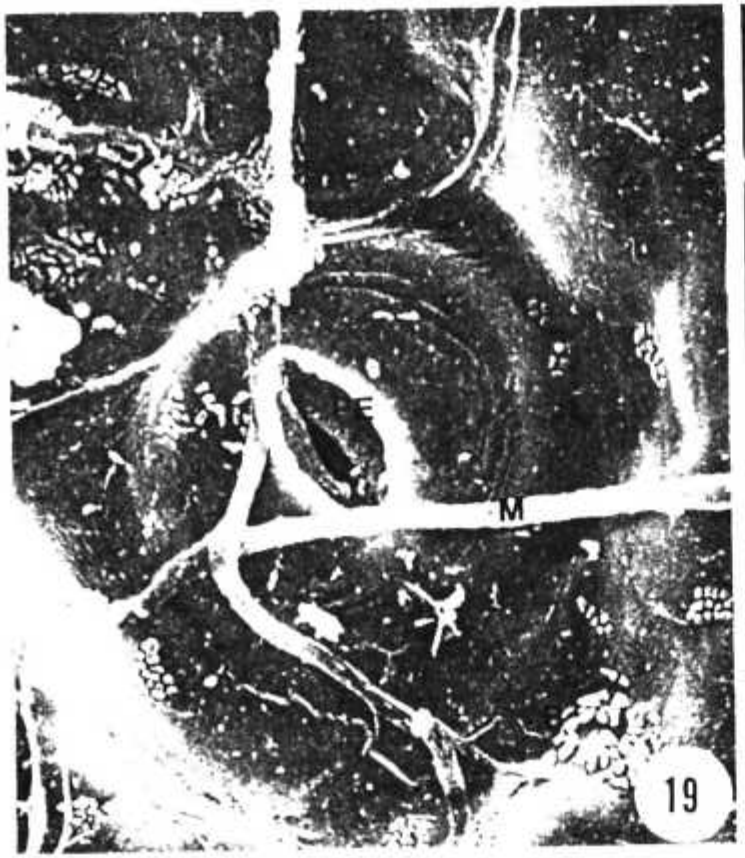

AP
E
18

Figura 19: Micelio creciendo sobre las aberturas estomáticas (2000 X).

PE: poro estomático, M: micelio, B: bacterias.

Figura 20: Espora germinando cerca de una abertura estomática. (3333 X).

PE: poro estomático, E: espora.


M
19

PE
20

observarse desintegrado por la acción del hongo (Figura 22).

Muestras posteriores realizadas a los 9, 11, 14 y 17 días después de realizada la inoculación, muestran poca variación. Sobre la superficie de los frutos, se observan 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 epidermales. Ya a partir del sétimo día, se observó penetración de tubos germinativos dentro de las células del hospedero, desintegración total de células epidérmicas y células del mesocarpo, con hundimiento típico de la enfermedad. Conforme pasan los días, los síntomas se hacen más evidentes.

Aproximadamente a los 30 días de realizada la inoculación, fue posible obtener frutos completamente cubiertos por la lesión, mostrando además gran cantidad de picnidios distribuidos por toda su superficie. Dichos frutos se encontraban ya en un estado de aparente descomposición, pero cabe hacer notar que no en todos los casos se produjeron hundimientos de la epidermis y tejidos asociados.

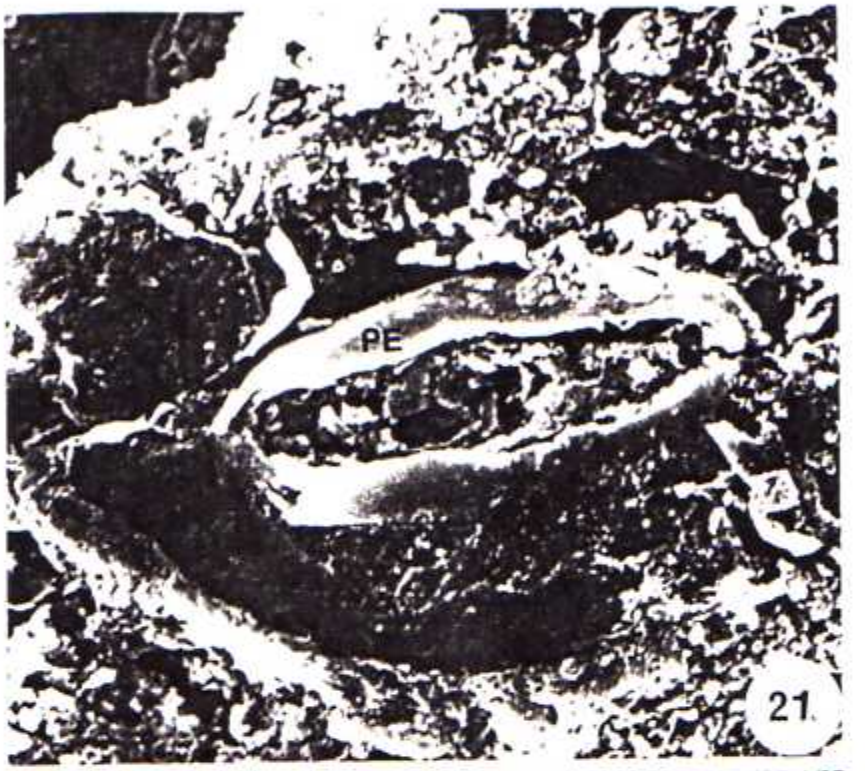
No todos los frutos inoculados desarrollaron lesión al mismo tiempo, sino que en el transcurso del desarrollo de la presente investigación, unos frutos se vieron más afectados que otros. Así, mientras que en unos al mes posterior a la inoculación la lesión había sido completamente expansiva, en otros apenas comenzaba a desarrollarse y otros, no llegaron a desarrollarla en ningún momento.

Figura 21: Estoma completamente desintegrado por la acción del hongo. (3333 X).

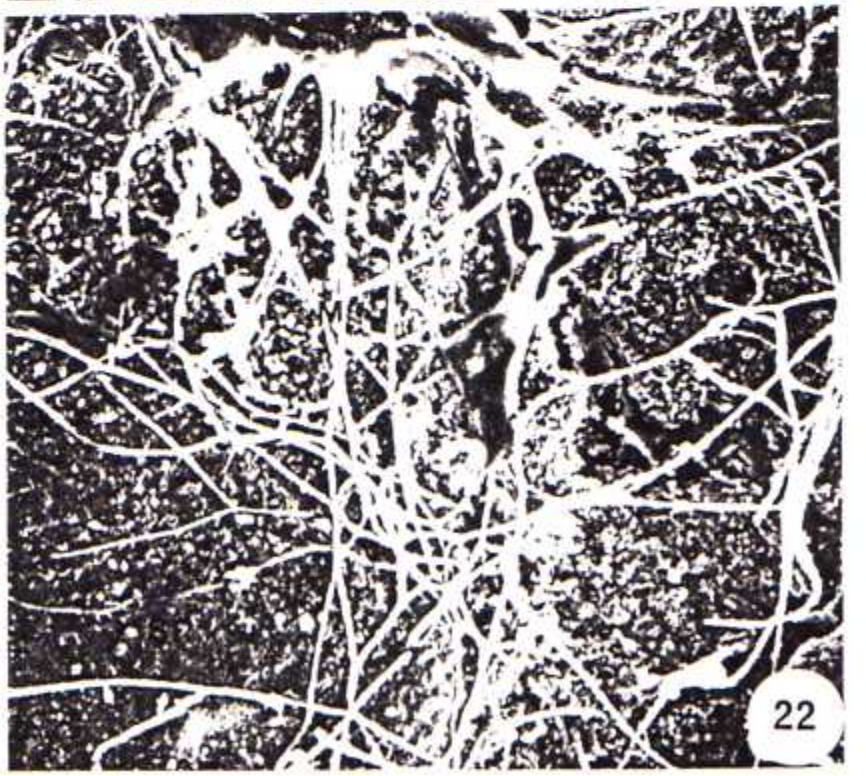
PE: poro estomático.

Figura 22: Lesión sobre la superficie del fruto a los 7 días de la inoculación. (293 X).

SF: superficie del fruto, M: micelio, L: lesión.



21



22

Resulta interesante destacar que frutos que fueron inoculados en el laboratorio únicamente con una suspensión de conidios, presentaban gran cantidad de bacterias del tipo bacilo. Dichas bacterias se encontraron distribuídas por toda la superficie del fruto, tanto como en las cavidades subestomáticas y en los tejidos internos, donde la lesión era más notable (Figuras 23, 24 y 25).

Frutos con lesión provenientes del campo, examinados posteriormente al microscopio electrónico, revelaron la presencia en su interior de gran cantidad de bacterias, aparentemente de las mismas observadas en lesiones desarrolladas en el laboratorio (Figura 26). Los cortes realizados al microscopio de luz revelaron la presencia de otros hongos, que invadían posterior a la inoculación y que posiblemente eran del tipo saprófito.

Lesiones por bacteria.

Aproximadamente a los 16 días de realizada la inoculación se encontraron lesiones que se manifiestan como un pequeño halo alrededor de la herida que con anterioridad había sido provocada. Al microscopio de luz se observó que dicha lesión se caracterizó por la producción de un engrosamiento en las paredes de las células que circundaban la herida y por una granulación del citoplasma en algunas de esas células. Además hubo un relleno de los espacios intercelulares (Figura 27).

En las células rotas por efecto de la lesión provocada, se observó una invasión posterior de hongos aparentemente saprófitos (Figura 28). Finalmente, alrededor de la lesión se desarrollaron gran cantidad de inclusiones de apariencia cristalina de composición no determinada (Figura 29).

Figura 23: Estoma mostrando el desarrollo de gran cantidad de bacterias dentro de su cavidad. (2666 X).

pe: poro estomático; B: Bacterias.

Figura 24a: Bacterias creciendo sobre la superficie de frutos inoculados con Ascochyta phaseolorum (1066 X).

es: esporas; b. bacterias.

24b: Ampliación del recuadro que aparece en la figura 24a. (5330 X).

b. bacterias.

23

24 b

24 a

Figura 25: Bacterias creciendo dentro de hospederos inoculados en laboratorio con Ascochyta. (8000 X).
LE: lesión, B: Bacterias.

Figura 26a: Bacterias creciendo dentro de las células del mesocarpo en frutos con lesión, colectados en el campo. (333 X).
LE: lesión, B: Bacterias.

26b. Ampliación del recuadro que aparece en la Figura 26a.
B: Bacterias.

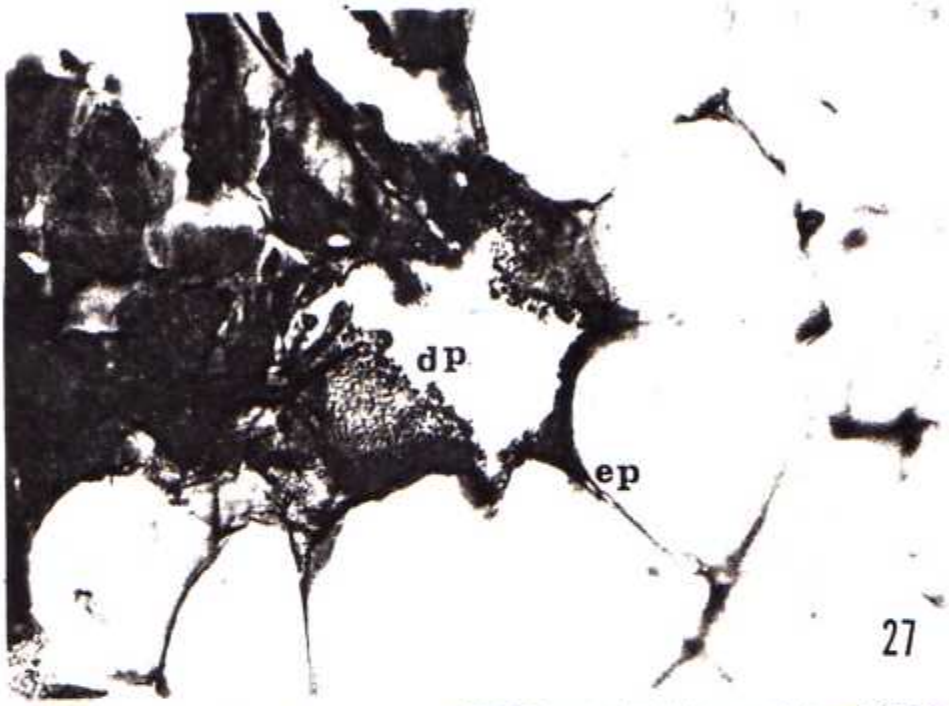
25

26 b

26 a

Figura 27: Lesión causada por bacterias dentro del laboratorio, mostrando desintegración de protoplasto. (640 X). dp: desintegración de protoplasto, ep: engrosamiento de paredes.

Figura 28: Inoculación realizada en el laboratorio, mostrando desarrollo posterior de hongos saprófitos. (640 X). le: lesión, hs: hongos saprófitos.


dp
ep
27

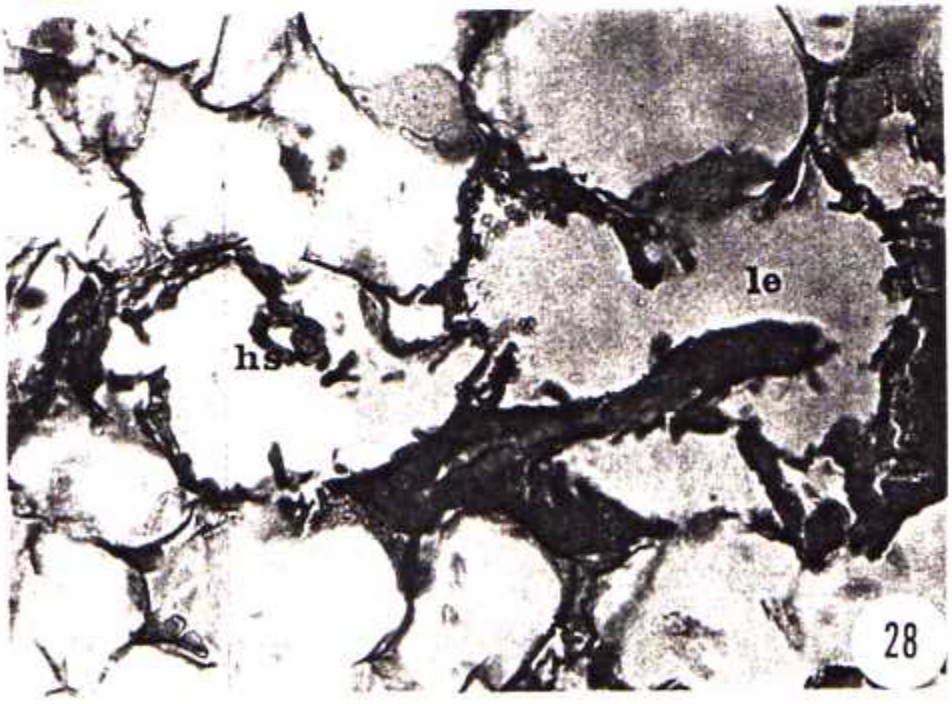

le
hs
28

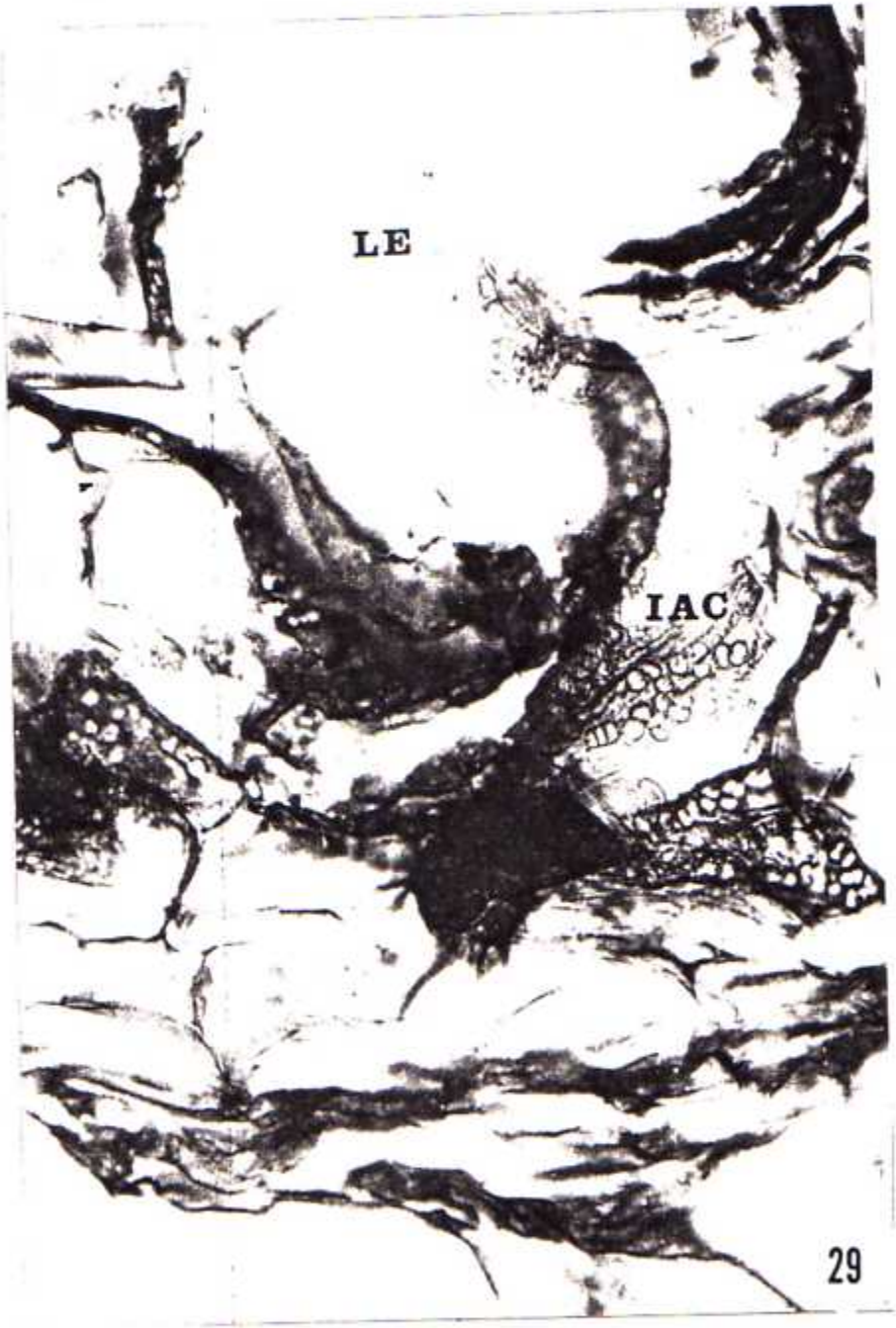
Figura 29: Inoculación realizada en el laboratorio con bacterias donde se muestran inclusiones de apariencia cristalina. (800 X).

LE: Lesión, IAC: Inclusiones de apariencia cristalina.

bac-

rien-

cris-



29

Los primeros días después de realizada la inoculación, mostraron un desarrollo de un pequeño halo acuoso alrededor de la herida; sin embargo, examinadas posteriormente al microscopio no mostraron desarrollo interno de la lesión.

Las lesiones que si se desarrollaron nunca fueron de grar consideración. En ninguna de las lesiones causadas por bacteria, fue posible observar el desarrollo de dicho agente infeccioso.

DISCUSION

La forma irregular de la superficie externa de las células epidérmicas 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 esporas, los ápices de algunos tubos germinativos se "hinchan" para formar una estructura especializada, denominada apresorio. El apresorio es una estructura funcional únicamente en el proceso de infección del hongo (Kunch, 1982). En los sitios en que se localizó, se observó rompimiento de la pared de las células epidérmicas. Esto sugiere, que al igual que en otros casos, una sustancia, puede ser secretada de los ápices apresoriales a la cutícula y a las paredes de las células del hospedero, precisamente en los sitios de penetración (Kunch, 1982). La formación de estos apresorios, al parecer, responden sobre todo a estímulos físicos más 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 epidermales. 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 envueltos procesos de digestión enzimática (Baker y Bateman, 1978). Esto coincide con el trabajo de gran cantidad de autores (Reshetnikova y Uspenskaya, 1978; Shrivastrava, 1982; Uspenskaya, 1976; Steekelenburg, 1978 y 1982) en que a diferentes especies del género Ascochyta, se atribuyen propiedades enzimáticas que ayudan al hongo en su penetración. Las enzimas son celulolíticas, proteolíticas y pectolíticas.

Tanto el micelio como los apresorios, ejercen acción enzimática, facilitando el ingreso del micelio 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).

Con respecto al grosor y composición químicas de la cutícula, se ha dicho que juega un papel importante en la inhibición de la actividad fungosa mediante la reducción de la germinación de esporas o penetración de las hifas (Agrios, 1978). Jaroz, Sheets y Levy (1982) por otro lado, sostienen que el grosor de la cutícula puede variar dependiendo de las condiciones ambientales por los que la cutícula según Martín y Juniper(1970) cobra importancia únicamente en lo que a su composición química se refiere.

Las inoculaciones realizadas sobre frutos jóvenes y maduros, provocando heridas, no desarrollaron lesión. Estos frutos excretan gran cantidad de mucílago o gomas en respuesta al daño físico. Esa formación de gomas puede proporcionar una barrera física activa y efectiva contra la invasión del hongo, o por lo menos retarda su acción, inhibiendo durante algún tiempo la ger

minación de las esporas (M. González, com. pers.).

Frutos jóvenes y maduros inoculados y colocados en una cámara húmeda dentro del invernadero, no desarrollaron lesión. Las altas temperaturas alcanzadas en ese lugar durante los meses de enero y febrero (época seca) en que se realizó el estudio, detuvieron el desarrollo del micelio y aparentemente inhibieron la penetración del mismo; no produciéndose lesiones sobre la superficie de dichos frutos. Esto coincide con investigaciones realizadas con 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 x 5 de ancho, en que las fibras localizadas debajo de la epidermis aún conservaban su protoplasto vivo. Esos frutos jóvenes, inoculados en el laboratorio, presentaron lesiones de mayor consideración que los frutos maduros, lo que era de esperar, si se toma en cuenta que los primeros tienen menos cantidad de tejido con paredes lignificadas, además de que la capa de cutícula era más delgada.

La actividad fungal se inicia en la epidermis, siendo éste el primer tejido afectado. Posteriormente el hongo invade tejidos subyacentes a ésta, causando un colapso total de los mismos y desintegración de su protoplasto. Hay un engrosamiento de las paredes de las células invadidas, que casi siempre se caracterizan por poseer paredes primarias. Los tejidos con paredes secundarias, endurecidos por la presencia de lignina o suberina, o tejidos con paredes celulares gruesas son más resistentes al ataque que aquellos con

paredes celulares delgadas.

Se ha citado que la formación de lignina es un mecanismo de resistencia a enfermedades en plantas. La lignina es resistente a la degradación por la mayoría de los microorganismos, y puede ser formada como una respuesta a penetración microbial y daño mecánico (Sherewood y Vance, 1982). De acuerdo a numerosos autores (Sherewood y Vance, 1982; Kuc, 1982; Ride, 1980), la lignificación puede inhibir el crecimiento fungal debido sobre todo a que proporciona una barrera mecánica a la hifa; 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 las hifas), y finalmente, protege las paredes del hospedero de la degradación enzimática.

En la mayoría de las lesiones estudiadas, una vez que el hongo ha invadido 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, localizárdolo y restringiendo su extensión; no obstante bajo ciertas condiciones éste puede atravesar esas demarcaciones y proseguir su acción infectiva (Fernández, 1952).

Comparaciones de lesiones de campo con lesiones producidas en el laboratorio, revelan un tipo de lesión muy similar; excepto que en las de campo, le demarcación histológica al igual que la formación de picnidios es más clara.

Finalmente, inoculaciones realizadas con una suspensión de colonias bacteriales, demuestra que la lesión producida por éstas, no es realmente de gran consideración, sino que se limitan únicamente a desintegrar el protoplasto de las células invadidas y producen gran cantidad de cristales de composición no determinada. Las células afectadas depositan paredes gruesas; se ignora si esto es inducido por la bacteria o si representa una respuesta de la planta a la infección.

Debido a que se encontró numerosas colonias bacterianas (tipo bacilo) creciendo sobre la superficie de frutos inoculados únicamente 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 de las pertenecientes al género Pseudomonas, que vive sobre 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 (Leben, 1981; Hirano, 1983).

Es posible que las heridas provocadas al órgano en que se desarrollan dichas bacterias (fruto en este caso), permitan el ingreso de este microorganismo a los tejidos internos, en donde se multiplican rápidamente, contribuyendo de esta forma, al desarrollo y expansión de la lesión al permitir el reinicio del crecimiento micelial del hongo que había sido limitado por el hospedero.

El hecho de que dichas bacterias no se encontraran en ninguno de los cortes observados al microscopio de luz, no significa que no estén presen-

tes, sino que por algún motivo no fue posible observarlas.

LITERATURA CITADA:

Agrios, G.N. 1978. Plant Pathology. Academic Press, N.Y.

Aung, L. y Flik, G. 1976. Gibberellin induced seedles fruit of chayote Sechium edule Swartz. Hort. Sci. 11(5): 460-462.

Baker, L.J. y Bateman, D. 1978. Cutin Degradation by plant pathogenic Fungi. Phytophat. 68:1577-1584.

Brewer, D. 1960. Studies in Ascochyta pisi Lib. Can. Jour. Bot. 38:705-717.

-Chupp, Ch. y A. Sherf. 1960. Vegetable diseases and their control. Ronald Press, N.Y. 693 p.

-Crossan D.F. 1958. The relationships of seven species of Ascochyta ocurring in North Carolina. Phytophat. 48: 248-255.

Fernández, M. 1952. Introducción a la Fitopatología. Segunda Edición Talleres Gráficos Gadola, Buenos Aires, Argentina. 872 p.

Gaudet, D.A., y Kokko, E.G. 1984. Application of Scanning Microscopy to Paraffin - Embedded Plant Tissues to Study Invasive Processes of Plant Pathogenic Fungi. Phytophat. 74(9): 1078-1080.

- González, L.C. 1976. Introducción a la Fitopatología. San José, Costa Rica. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. 148 p.

Hayward, A.C. 1974. Latent infections by Bacteria. Ann. Rev. Phytophat. 12: 87-97.

Heitefuss, R. y P.H. William (eds). Physiological plant pathology. Springer Verlag, Berlin, New York. 890 p.

Hirano, S. 1983. Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant pathology. Ann. Rev. Phytopat. 21: 243-269.

Jaroz, A.M., M. Sheets y M. Levy. Cuticle thickness in Phlox and resistance to powdery mildew; and unreliable line of defense.Am. Jour of Bot. 6(9): 824-828. 1982.

Johansen, D.A. 1940. Plant Microtechnique. New York., Mc Graw-Hill Book Co., 523 p.

Kuć, J.1982 . The inmunization of Cucurbits against fungal, bacterial, and viral diseases. In:

Kunoh, H. 1982. Primary Germ Tubes of Erisiphe graminis conidia. In: Japan Scientific Societies. Press-Tokyo, Springer-Verlag, Plant Infection, Berlin-New York. 361 p.

Leben, G. 1981. How plant - pathogenic bacteria survive. Plant Disease 65(8): 633-637.

León, J. 1968. Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales. Lima, Perú, Editorial Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. 487 p.

Lionti, R. Osservazioni sulla coltivazione del Sechium edule Sw. a Firenze. Agric. Subtrop. Trop. (Italia) 53: 197-202. 1959.

Maffioli, A. 1981. Recursos genéticos del chayote Sechium edule (Jacq) Swartz, Cucurbitaceae. Turrialba, Costa Rica, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Unidad de Recursos Genéticos. 151 p.

Martin, J.T. y Juniper, B.E. 1970. The Cuticles of Plants. Arnold (Pub) Ltd. p.347.

Medina, J. 1969. Una planta totalmente comestible?. El Surco Latinoamericano, Nov.-Dic. p. 17.

Messian, C. Las horalizas, México, ed. Blume. 1979.

Moreno, R. 1975. Diseminación de Ascochyta phaseolorum en variedades de frijol de costa bajo diferentes sistemas de cultivo. Turrialba 25(4): 361-364.

Núñez, E. 1978. Plantas medicinales de Costa Rica y su folclore. Segunda Edición, San José, Costa Rica. Editorial Universidad de Costa Rica. 318 p.

Oku, M. and Nakanishi, T. 1963. A toxic metabolite from Ascochyta favae having antibiotic activity. Phytopath. 53:1321-1325.

Pineda, M. 1973. Algunos aspectos sobre el cultivo del chayote (Sechium edule Sw). Tesis de grado de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Costa Rica, Facultad de Agronomía, Departamento de Fitotecnia. 55 p.

Reshetnikova, I.A. y Uspenskaya, G.D. 1979. Pectolitic enzymes of Ascochyta species. Biologiches Kie Nauki (U.R.S.S.) N°6, 97-100. Compendiado en Review of Plant Path. (Inglaterra) 58(2): 1060.

Reshetnikova, I.A. y Uspenskaya, G.D. 1979. Enzyme Activity of Ascochyta cucumerinea. Biologiya (U.R.S.S.) N° 2; 47-50. Compendiado en Review of Plant Path. (Inglaterra) 58(2): 1441.

Ride, J.P. 1980. The effect of induced lignification on the resistance of cell walls to fungal degradatin. Phys. 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. y Ma. A. Rocca. 1975. *Fitopatología*. Buenos Aires, Argentina. Editorial Hemisferio Sur. 364 p.

Sharman, B.C. 1943. Tanic acid and iron alum with safranin and organge G in studies of the shoot apex. Stain Tech. 18:105-111.

Sherwood, R. and Carroll, P. Vance. 1982. *Initial Events in the epidermal layer durin penetration. In: Japan Scientific Societies Press* Tokyo, Springer-Verlag. Plant Infection. Berlin-New York. 361 p.

Shrivastrava, R.C. 1982. Fungi causing plant iseases at jampur. Indian Phytopathology 33(2): 221-224. Compendiado en Review of Plant Pathology (Inglaterra) 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 Didymiela bryoniae (Ascochyta cucumerines) in cucumbers. Netherlands Journal of Plant Pathology 84 (1):27-34. Compendiado en Rev. Plant. Path. 57(8): 3691.

Steekelenburg, N.A. Van. 1982. Factors influencing external fruit rot of cucumber; caused by Didymiella bryoniae. Netherlands Plant. Path. 88(2): 47-56. Compendiado en Microbiological Abstracts (U.S.A.) Serie A: Industrial and App. Microbiology 17(7):5249-A 17.

Subirós, J.F. 1984. Estudio morfológico de la antracnosis en tallos y hojas de Guanábana (Annona muricata L.) causados por Colletotrichum glceoesporioides Tenz. Tesis de grado de Ingeniero Agrónomo, Universidad de Costa Rica, Facultad de Agronomía, Escuela de Fitotecnia. 52 p.

Sundararajan, B. 1979. Chow - Chow and economical crop. Kisam World (India) 66(5):17-18.

Sutton, B.C. y Waterston, J.M. 1966. Ascochyta phaseolorum. In: Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. Commowealth Mycological Institute, Surrey, England.

Uspenskaya, G. y Reshetnikova, I.A. 1981. Cellulolitic enzymes of Ascochyta and Phoma. Mikologiya: Fitopatologiya (U.R.S.S.) 15(1):27-32. Compendiado en Reviw of Plant Path. 61: 5714.

Vance, C.P. y Kirk, T.K. 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. Ann. Rev. Phytopat. 18: 259-88.

Wynn, W. 1976. Appresorium formation over stomates by the Dean Rust Fungus: Response to a Surface contact Stimulus. Phytopat. 66:136-146.