



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRICOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGIA

**CALIDAD POSTCOSECHA DEL BRÓCOLI E HISTOPATOLOGÍA DE
LA RESPUESTA VARIETAL AL MILDIU *Hyaloperonospora parasitica***

MA DE LOURDES FRAIRE CORDERO

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2008

La presente tesis, titulada: **Calidad postcosecha del brócoli e histopatología de la respuesta varietal al mildiu *Hyaloperonospora parasitica***, realizada por la alumna: **Ma de Lourdes Fraire Cordero**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: _____

DR. DANIEL NIETO ANGEL

ASESOR: _____

DR. GABRIEL GUTIÉRREZ ALONSO

ASESOR: _____

DRA. ELIZABETH CÁRDENAS SORIANO

ASESOR: _____

DR. RAFAEL BUJANOS MUÑIZ

ASESOR: _____

DR. HUMBERTO VAQUERA HUERTA

**Calidad postcosecha del brócoli e histopatología de la respuesta varietal al mildiu
*Hyaloperonospora parasitica***

Ma de Lourdes Fraire Cordero, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2008

La calidad postcosecha de Brócoli está asociada con la buena sanidad de los floretes. En los últimos años, la ‘pudrición de florete’ ha causado pérdidas por afectar la calidad; sin embargo, a pesar de algunos estudios, los agentes causales no han sido completamente identificados. Durante el 2005 y 2006 se colectaron floretes con síntomas de pudrición, de los cuales se aisló e identificó, morfológica y molecularmente, a *Alternaria tenuissima*, *A. alternata* y *Fusarium oxysporum*. Las pruebas de patogenicidad confirmaron a esos hongos como los causantes de la enfermedad. En un trabajo posterior, se observó que *A. tenuissima* penetró a través de los estomas de los sépalos, entre las 16 y 18 h después de que el conidio fue depositado en la superficie. Y la colonización de los órganos florales por el hongo se desarrolló en un lapso de 96 h, provocando necrosis de células y maceración de tejidos. De los tres hongos causantes de la ‘pudrición de florete’ *A. alternata* presentó mayor virulencia, por lo que el aislamiento fue expuesto a cinco fungicidas con el fin de evaluar su sensibilidad *in vitro*, el fungicida pyraclostrobin+boscalid fue el más efectivo para inhibir de crecimiento micelial y la germinación de conidios (100%) a dosis de 1, 10, 100 y 200 ppm del ingrediente activo de pyraclostrobin. El diámetro del florete y el tallo hueco son dos factores importantes en la calidad del florete y están aparentemente asociados a la densidad de plantación. Tres densidades de plantación (55, 65, 75 mil plantas/ha) fueron evaluadas. Los resultados mostraron que la densidad tiene un efecto inversamente proporcional al diámetro de florete y de tallo hueco. El cultivar 'Monaco' presentó el diámetro mayor de florete (17-22 cm) y 'Ironman' el menor diámetro de tallo hueco (0.05-0.7 cm). Otro factor que afecta la calidad del brócoli es el mildiu causado por *Hyaloperonospora parasitica*. Para determinar cuál era la principal defensa del brócoli en etapa de plántula, se inocularon con el patógeno cuatro cultivares con diferente grado de susceptibilidad al mismo, se observó que la principal defensa de la planta fue el desarrollo de reacción de hipersensibilidad en los sitios de infección, ésta se presentó rápida y abundantemente en los cultivares ‘Heritage’ y ‘Maximo’.

Palabras clave adicionales: *Brassica oleracea* var. *italica*, resistencia, *Peronospora parasitica*.

**Postharvest quality of broccoli and histopathology of the varietal answer to mildew
*Hyaloperonospora parasitica***

Ma de Lourdes Fraire Cordero, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2008

Postharvest quality of broccoli is associated with the good health of the florets. In the last years, quality losses have been caused by the disease 'rotting of floret'; nevertheless, in spite of some studies, the causal agents have not been identified. During 2005 and 2006 florets with symptoms of the disease were collected. From those florets, *Alternaria tenuissima*, *A. alternata* and *Fusarium oxysporum* were isolated and identified morphologically and molecularly. The pathogenicity tests confirmed to those fungi as the causes of the disease. Further test revealed that *A. tenuissima* penetrate through the stomata of the sepals, from 16 to 18 h after the inoculation, and the colonization of the floral organs by the fungus was developed for a long 96 h causing necrosis of cells and maceration of tissues. *A. alternata* presented major virulence; reason why the fungus was set out to five fungicides with the purpose of to evaluate its sensitivity *in vitro*, the fungicide pyraclostrobin+boscalid was most effective to inhibit of growth mycelial and the germination of conidia (100%) to dose of 1, 10, 100 and 200 ppm of the active ingredient of pyraclostrobin. Floret diameter and hollow stem, as important characteristics for quality, are apparently related to plant density. Three different plantation densities (55, 65, 75 thousands plant/ha) were evaluated. The results showed that the plant density is related inversely proportional to the diameter of floret and hollow stem. Cultivar 'Monaco' presented the greater diameter of floret (17-22 cm) and 'Ironman' the smaller diameter of hollow stem (0.05-0.7 cm). Another factor that affects the quality of broccoli is the mildew caused by *Hyaloperonospora parasitica*, from determine which was the main defense of broccoli in cotyledon stage, four cultivars with different degree of susceptibility to pathogen were inoculated with this. The main defense observed was the development of hypersensitivity reaction in the infection sites, which appeared fast and abundantly in the cultivars 'Heritage' and 'Maximo'.

Index words: *Brassica oleracea* var. *italica*, resistance, *Peronospora parasitica*

Dedico esta tesis a:

*A la persona que más amo en el mundo... **GASPAR** doy gracias a Dios por haberlo encontrado y por permitirme compartir su vida.*

*A mis padres **Adolfo** y **María**, por ofrecerme lo mejor de ellos y por estar siempre allí para mí.*

*A mis hermanos **José Ángel** y **Javier**, por su espíritu de lucha y por compartir sus logros y experiencias conmigo.*

*A mi hermana **Rosalba**, por apoyarme en todo momento y por compartir conmigo los buenos y malos momentos que he vivido.*

*A mi hermana **Guadalupe** por impulsarme con su ímpetu a conseguir mis anhelos.*

*A mi hermana **Silvia** por escucharme y por compartir conmigo sus anhelos y sus ideas.*

Con todo mi amor *Lulú Fraire*



AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que a través de sus impuestos permitieron que el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Colegio de Postgraduados me brindaran educación de calidad.

Al **Dr. Daniel Nieto Ángel**, por su gran paciencia y su apoyo en todos los sentidos, sin su ayuda e impulso no hubiera realizado muchas de las actividades que lleve a cabo y que sigo realizando. Fue un gran consejero durante mi estancia en el Colegio.

Al **Dr. Gabriel Gutiérrez Alonso** por sus sugerencias para el trabajo de tesis, pero sobre todo por estar siempre disponible a ayudar, también le agradezco a él y a la compañía SEMINIS por haber facilitado la realización del experimento en campo.

A la **Dra. Elizabeth Cárdenas Soriano** por haber aceptado asesorarme en el proyecto de tesis, por las correcciones al trabajo y por estar siempre pendiente de las necesidades para concluir el trabajo.

Al **Dr. Rafael Bujanos Muñiz** por sus sugerencias al trabajo de tesis y por su apoyo para la realización de los experimentos.

Al **Dr. Humberto Vaquera Huerta** por su gran ayuda en el análisis de los datos y por sus atinadas correcciones al trabajo de investigación.

A la maestra **Victoria Ayala** por ser mi amiga y por haber compartido conmigo un poco de su conocimiento sobre los hongos y sus experiencias.

Al Dr. Cristian, MC Jorge Valdez, Dr. Teliz, Dra Emma, Dra. Reyna y a todos mis profesores por compartir un poco de su conocimiento conmigo.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio 222 de Fitopatología (Paty, Rafa, Andrés, Misael, Alfonso) por sus pláticas que hicieron menos pesado el trabajo. A Acatitla, Omar, Francisco, Alfonso V, Alma, Alejandra, Lupita, y a todos mis demás compañeros por compartir conmigo las aulas y todo lo que esto conlleva.

A Greta por ayudarme con el trabajo de microscopía electrónica y por compartir su alegría.

A Vero, Hilda, Irene, Gude, Mirna y a todo el personal de Fitosanidad que siempre me ayudaron en lo que necesitaba.

Por último le agradezco a Silvia mi hermana por hacer todo el trámite para mi titulación y a mi esposo Gaspar por ayudarme en la revisión de la tesis.

CONTENIDO

	Página
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
Literatura citada.....	2
CAPÍTULO I. IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS CAUSANTES DE LA PUDRICIÓN DEL FLORETE DE BRÓCOLI	3
Resumen.....	3
Introducción.....	3
Materiales y métodos.....	4
Resultados	7
Discusión.....	11
Conclusiones.....	12
Literatura citada.....	13
CAPÍTULO II. INFECCIÓN Y COLONIZACIÓN DE <i>Alternaria tenuissima</i> (KUNZE:FR) WILTSHIRE EN EL FLORETE DE BRÓCOLI (<i>Brassica oleracea</i> L. var <i>Italica</i>).....	16
Resumen.....	16
Introducción.....	16
Materiales y métodos.....	18
Resultados y discusión.....	19
Conclusiones.....	25
Literatura citada.....	26
CAPÍTULO III. SENSIBILIDAD DE <i>Alternaria alternata</i> FUNGICIDAS IN VITRO.....	29
Resumen.....	29
Introducción.....	29
Materiales y métodos.....	30
Resultados y discusión.....	31
Conclusiones.....	34
Literatura citada.....	35
CAPÍTULO IV. EFECTO DE LA DENSIDAD DE PLANTACIÓN EN LA CALIDAD FÍSICA DEL FLORETE DE BRÓCOLI	37
Resumen.....	37
Introducción.....	37
Materiales y métodos.....	39

Resultados y discusión	41
Conclusiones	53
Literatura citada	54
CAPÍTULO V. HISTOPATOLOGÍA DE LA RESPUESTA VARIETAL DE BRÓCOLI A <i>Hyaloperonospora parasitica</i>	57
Resumen	57
Introducción	58
Materiales y métodos	59
Resultados	62
Discusión	66
Conclusiones	69
Literatura citada	70
CONCLUSIONES GENERALES	73

INTRODUCCIÓN GENERAL

El cultivo del brócoli es una de las hortalizas más importantes en México, para el 2006 se sembraron aproximadamente 19,000 ha, de las cuales 12,000 ha aproximadamente fueron sembradas en el estado de Guanajuato (SIAP-SAGARPA, 2006). El brócoli es una importante fuente de vitamina C y sustancias con propiedades anticarcinogénicas, es un vegetal que presenta una rápida senescencia, caracterizada por amarillamiento, pérdida de turgencia, desarrollo de olores desagradables, incremento de la actividad enzimática y reducción del valor nutricional (Carvalho y Clemente, 2004). Es común que el brócoli una vez cosechado pase varias horas a temperatura ambiente mientras es clasificado y empacado, un entendimiento de los primeros cambios fisiológicos que sufre durante este periodo es esencial para interpretar adecuadamente la senescencia postcosecha (King y Morris, 1994). Rodríguez, 1997 menciona que la calidad de un producto está definida por cualidades o atributos genéticos, físicos, sanitarios y fisiológicos y está determinada por factores como la oportunidad de cosecha, el método de cosecha y la presencia o ausencia de plagas. Otro factor que reduce la calidad del brócoli son las enfermedades. En el estado de Guanajuato, México, durante el verano del 2002 y 2003 se presentó un incremento considerable en la incidencia de pudriciones y manchado del florete de brócoli en campo, los síntomas se asociaron con *Alternaria* spp, *Phoma* spp y *Fusarium* spp (Narro-Sánchez *et al.*, 2005). Además de los patógenos anteriores, también suele presentarse el mildiu causado por *Hyaloperonospora parasitica*, el cual causa daños en follaje y floretes del brócoli, ésta enfermedad es un problema a nivel mundial, cuando se presenta en altos niveles puede reducir la calidad del producto evitando que éste pueda comercializarse (Dickson y Petzoldt, 1993).

Considerado lo anterior, se plantearon tres objetivos principales relacionados con la calidad del florete. En el primero se planteo la necesidad de determinar los agentes causales de las enfermedades que causaron manchado del florete durante el 2002 y 2003, con el fin de diseñar estrategias de control y reducir su impacto en la calidad y comercialización del florete. En el segundo objetivo se relacionó con la demanda constante por cultivares con características que se adapten a las necesidades del mercado es constante, por lo que continuamente las empresas

semilleras generan nuevos cultivares que difieren en sus características anatómicas y fisiológicas, que los hacen más o menos atractivos para su venta en el mercado fresco o para las empacadoras de productos vegetales, a este respecto se generó información sobre algunas características físicas de 12 cultivares de brócoli y cómo influye la densidad de plantación en estas características relacionadas con la calidad del florete. Por último el tercer objetivo se sustentó en otra enfermedad que se presenta continuamente en las zonas productoras de brócoli es el mildiu causado por *Hyaloperonospora parasitica*, ésta enfermedad también influye ampliamente en la calidad del florete de brócoli, actualmente existen en el mercado cultivares que presentan cierto grado de resistencia a la enfermedad, por lo anterior se planteo determinar las características anatómicas y reacciones de defensa en etapa de plántula que estuvieran relacionadas con su resistencia a nivel de plántula a fin de tener parámetros para la selección de cultivares desde etapas tempranas.

LITERATURA CITADA

- Carvalho P. de T., E. Clemente. 2004. The influence of the broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) fill weight on postharvest quality. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas 24:646-651.
- Dickson M. H., and R. Petzoldt. 1993. Plant Age and Isolate Source Affect Expression of Downy Mildew Resistance in Broccoli. *HortScience* 28: 730-731.
- King, G. A., and S. C. Morris. 1994. Physiological changes of broccoli during early postharvest senescence and through the preharvest-Postharvest continuum. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119:270-275.
- Rodríguez, F. S. 1997. Daño físico ocasionado por diferentes métodos de trilla y su impacto sobre la calidad fisiológica y sanitaria en semillas de frijol. Tesis. Colegio de Postgraduados, Edo. de México, México. 109 pp.
- SIAP, SAGARPA. 2006. Anuario. Cultivo de Brócoli. www.siap.sagarpa.gob.mx (consultada el 30 de agosto de 2008)

CAPÍTULO I. IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS CAUSANTES DE LA PUDRICIÓN DEL FLORETE DE BRÓCOLI

RESUMEN

Durante los meses de julio-octubre del 2005 y 2006, manchas necróticas circulares, café oscuras fueron observadas en floretes de brócoli en cultivos localizados en Guanajuato, México. Floretes de brócoli con síntomas fueron colectados y del tejido sintomático se aislaron *Alternaria tenuissima*, *A. alternata* y *Fusarium oxysporum*, los cuales, fueron identificados morfológica y molecularmente. Las pruebas de patogenicidad mostraron que los tres hongos son agentes causales de la pudrición o manchado del florete de brócoli. A las 48 h se observaron los primeros síntomas. *A. tenuissima* y *A. alternata* causaron una necrosis de tejidos y una pudrición café oscura aguanosa de los granos y de los tallos más próximos a los botones florales. *Fusarium oxysporum* causó una pudrición gris seca de los pedicelos y botones florales, abundante micelio blanquecino y pudrición de los tallos próximos a los botones florales. *A. alternata* fue el más agresivo causando desintegración de tejidos en menor tiempo que *A. tenuissima* y *Fusarium oxysporum*.

Palabras clave adicionales: identificación, necrosis, crucíferas.

INTRODUCCIÓN

El brócoli es uno de los cultivos de mayor importancia socioeconómica en la región del Bajío en México (Montesinos, 2005), sin embargo, durante el verano las condiciones climáticas favorecen la presencia de enfermedades que limitan la producción (Narro-Sánchez *et al.*, 2005). Enfermedades causadas por hongos son un problema significativo para la producción de crucíferas en varias partes del mundo (Hodgkin y MacDonald, 1986; Dillard *et al.*, 1998; Pattanamahakul y Strange, 1999) incluyendo México (Narro-Sánchez *et al.*, 2005). Entre los hongos que causan mayores daños al follaje o a la germinación de las semillas son: *Alternaria brassicae* (Tewari, 1983), *A. brassicicola* (Babadoost y Gabelson, 1979) *A. alternata*, *A. raphani* (Gupta y Chaudhury, 1992) *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* (Gaetán, 2005); y *Phoma lingam* (Moreno-Rico *et al.*, 2005).

La incidencia de micoflora presente en el follaje de las plantas varía dependiendo de la etapa fenológica (Singh y Rai, 1980) y algunos de estos hongos se comportan como patógenos

importantes en cosecha o postcosecha causando pérdidas significativas en el cultivo de brassicas. *Alternaria brassicae* causó pérdidas de un 30% en las cabezas de coliflor por pudriciones antes de la cosecha (Tamayo *et al.*, 2001), y reducción en la calidad de la col por la aplicación de fungicidas para el control de la enfermedad, además de la necesidad de remover las hojas infectadas (Dillard *et al.*, 1998). Ceponis *et al.*, (1987), encontraron pudriciones hasta de 50% de las cabezas de col en embarques muestreados en el mercado de Nueva York atribuibles a *A. brassicae*. Menniti y Casalini, (2000), reportan a *A. brassicicola* causando serios problemas postcosecha en coliflor. En floretes de brócoli almacenados por largos períodos a baja temperatura y en atmósferas controladas Mercier *et al.*, (1991), identificaron a *Fusarium avenaceum* creciendo sobre la inflorescencia limitando el tiempo de almacenaje. *A. brassicicola* y *A. brassicae* son las especies que causan los mayores problemas en la producción de crucíferas sobre todo por su capacidad de sobrevivir en las semillas por varios meses a diferentes temperaturas y humedades relativas (Kumar y Gupta, 1994; Abul-Fazal *et al.*, 1994).

En el estado de Guanajuato, México, durante el verano del 2002 y 2003 se presentó un incremento considerable en la incidencia de pudriciones y manchado del florete de brócoli en campo, los síntomas se asociaron con los hongos *Alternaria* spp, *Phoma* spp y *Fusarium* spp (Narro-Sánchez *et al.*, 2005). El propósito de este estudio fue identificar los agentes causales de los síntomas del manchado y pudrición del florete en los cultivos comerciales localizados en Guanajuato, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de los hongos presentes en los floretes de brócoli con síntomas de manchas y pudriciones. Durante los meses de julio a octubre del 2005 y 2006 en el estado de Guanajuato, Méx., se colectaron floretes de brócoli en la etapa de cosecha de los cultivares comerciales ‘Marathon’, ‘Patron’ (Compañía Sakata) y ‘Monaco’ (Compañía Syngenta-Rogers), con síntomas de manchas café oscuras y pudriciones en los botones florales. De cada florete se tomaron 5 trozos de tejido de 0.5 cm² de la zona de avance de la enfermedad, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5% por dos minutos y se lavaron tres veces consecutivas con agua destilada estéril. En total se hicieron 150 siembras de tejido en cajas de Petri con el medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA, Bioxon[®]). Cada colonia desarrollada

se separó y se purificó por cultivo monospórico, la identificación preliminar del 2005 reveló que el 70% de las colonias presentaban pequeñas esporas catenuladas relacionadas con el género *Alternaria* y el 30% presentaban conidios elipsoidales, multicelulares y colonias rosadas algodonosas pertenecientes al género *Fusarium*, en el 2006 el 80% de las colonias aisladas correspondieron al género *Alternaria* y el 20% al género *Fusarium*. Las colonias de *Alternaria* se dividieron en dos grupos por el color que presentaban, ya que algunas eran de color café-verdoso (A1) y otras verde olivo (A2).

Pruebas de patogenicidad de *Alternaria* spp. y *Fusarium* sp. en floretes de brócoli. Para los tres aislamientos dos de *Alternaria* (A1 y A2) y uno de *Fusarium* se realizaron pruebas de patogenicidad. Se utilizaron 40 floretes en etapa de cosecha del cultivar ‘Marathon’, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5% por 2 minutos y se lavaron con agua destilada estéril, para cada aislamiento se utilizaron 10 floretes en un arreglo completamente al azar, cada florete se inoculó colocando sobre su superficie (domo) cuatro gotas de 0.5 mL de una suspensión de conidios en agua destilada estéril (1×10^5 conidios/mL) de cada uno de los aislamientos procedentes de cultivos monospóricos. Las colonias monospóricas de A1 y A2 se cultivaron en cajas de Petri con medio de cultivo papa-zanahoria-agar (PZA) y la de *Fusarium* en cajas de Petri con PDA, y se mantuvieron a una temperatura de laboratorio ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) con 8 horas diarias de luz blanca fluorescente (lámparas Philips®, 21w/33). Después de dos semanas los conidios se filtraron en una malla de algodón estéril y se preparó la suspensión conidial antes mencionada. Como testigo se utilizaron los 10 floretes restantes, los cuales se inocularon con agua destilada estéril con el mismo procedimiento. Los 40 floretes inoculados se colocaron en charolas de unicel de 40x30 cm desinfectadas con etanol al 70%, se cubrieron con una bolsa de polietileno y se incubaron a una temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ y 80% de humedad relativa, los síntomas se registraron diariamente por seis días en el caso de los inoculados con A1 y A2 y siete días en el caso de *Fusarium* sp. De los síntomas observados en los sitios de inoculación se hicieron cortes para observar el avance de los hongos dentro de los tejidos, a las 144 h después de la inoculación (DI) para A1 y A2 y a las 168 h DI en el caso de *Fusarium* sp. De las zonas de avance de los hongos en los tejidos dañados, se tomaron 10 fracciones de tejido de 0.5 cm^2 y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5% durante 2 min, posteriormente se lavaron tres veces consecutivas con agua destilada estéril y se

sembraron en medio de cultivo PDA. Las características morfológicas de las colonias y hongos reaislado se compararon con las originalmente inoculadas.

Identificación de *Alternaria* spp. y *Fusarium* sp. como posibles agentes causales de la pudrición del florete. Se utilizaron tres colonias monoconidiales de *Alternaria* A1 y A2 se sembradas en PZA y tres colonias monoconidiales de *Fusarium* sembradas en PDA, las cuales se mantuvieron por 10 días a una temperatura de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ con 8 horas diarias de luz blanca fluorescente (lámparas Philips®, 21w/33). La identificación se hizo con base a las características del micelio, color de la colonia, forma de conidióforos; y forma, tamaño y color de los conidios. Para observar estas estructuras se hicieron preparaciones permanentes de los hongos en glicerol al 50% acidificado con cinco gotas de HCl al 12N y se observaron en el microscopio compuesto Carl Zeiss. Con la ayuda de las claves de Barnett y Hunter (1972); Rotem (1994), Simmons (1995) y Nelson *et al.*, (1983) se identificaron los aislamientos a nivel de especie. Para confirmar la identificación morfológica se llevó a cabo la extracción de ADN (ácido desoxirribonucleico) de micelio de una colonia monoconidial de los hongos de acuerdo a la metodología de Ahrens y Seemüller (1992), se amplificaron las regiones internas ITS1 e ITS2 de los genes ribosomales (rARN) localizadas entre la subunidad pequeña 18S rRNA, 5.8S y la subunidad larga 28S rRNA, con los iniciadores universales ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') e ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') (White *et al.*, 1990) por PCR y el producto se purificó con el kit wizard (PROMEGA®) y se envió a secuenciar al Instituto de Fisiología Celular de la UNAM en un secuenciador Genetic Analyzer mod. 3100, APPLIED BIOSYSTEM, la secuencia ITS fue alineada en la base de datos del Banco de Genes del Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI), USA por medio del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). La preservación de los cultivos monospóricos se hizo en tubos de ensaye con medio PDA y cubiertos con aceite mineral esterilizado.

RESULTADOS

Expresión de síntomas. Durante el muestreo en campo se observó que la pudrición en los floretes es más frecuente cuando se presentan condiciones de alta humedad provocadas por precipitaciones pluviales continuas durante la etapa de formación del florete. Los síntomas de manchas café oscuras se encontraron principalmente en los puntos de unión entre los minifloretes, donde no se conserva la pendiente del florete y quedan pequeños hundimientos, es posible que en ésta zona las gotas de lluvia se conserven por más tiempo, lo que propicia la infección de los hongos. También se encontraron floretes con pudriciones en los puntos de crecimiento de los minifloretes donde los botones florales más jóvenes son más pequeños de tal forma que también se forma un hundimiento donde se conserva la humedad con facilidad.



Figura 1. Esquema de un florete de brócoli compuesto de varios minifloretes

Pruebas de patogenicidad de *Alternaria* spp. y *Fusarium* sp. en floretes de brócoli. Todos los floretes inoculados con las cepas monospóricas de *Alternaria* A1, A2 y *Fusarium* sp., produjeron síntomas de necrosis y pudrición. *Alternaria* A1 y A2 a las 48 h DI produjeron puntos negros de aproximadamente 1 mm de diámetro en los sépalos de los botones florales (granos), pero no se observó micelio evidente. A las 96 h DI A1 y A2 desarrollaron una mancha de 2.5-3 cm de diámetro aproximadamente. El micelio de A1 tomó un coloración café-amarillenta en el centro de la lesión y en los alrededores una coloración amarillenta, los granos infectados tomaron una coloración café oscuro pero no se desintegraron con facilidad (Fig. 1A). El micelio de A2 tomó una coloración café oscuro en el centro de la lesión y se produjo abundante esporulación, alrededor de la lesión el micelio fue de color blanquecino y los granos infectados tomaron un color café oscuro pero tuvieron una consistencia acuosa y se desintegraron con facilidad (Fig. 1D). Posteriormente a las 144 h DI las manchas se unieron

cubriendo el 80% de la superficie del florete. En los cortes transversales realizados en las zonas inoculadas, se observó que las cepas de *Alternaria* después de causar una pudrición café acuosa en los botones florales, invadieron los pedicelos y los tallos más delgados (2-3 mm de diámetro) (Fig. 1B y 1D), en el caso de A2 también invadió tallos gruesos de 2-3 cm de diámetro.

En el caso de *Fusarium*, a las 48 h DI se observó micelio externo superficial de color blanco, creciendo lento sobre los granos, entre las 72 y 96 h DI el crecimiento fue lento pero ya había formado una mancha de micelio blanquecino de 3 cm de diámetro en promedio y no se observó esporulación. Posteriormente las manchas de micelio blanquecino algodonoso se unieron de tal forma que cubrieron el 80% de la superficie a las 168 h DI (Fig. 1G). Los cortes transversales revelaron una pudrición acuosa de granos y pedicelos en el centro de la lesión y una necrosis gris seca de los granos y pedicelos en los alrededores de la lesión. El hongo produjo abundante micelio superficial y llegó a invadir tallos florales delgados en los sitios de inoculación (2-7 mm de diámetro) (Fig. 1H). En los floretes utilizados como testigos no se observó manchas o crecimiento de micelio externo sobre la superficie de los granos, y tampoco pudrición de tejidos. De todos los floretes con síntomas se tomó tejido dañado se reaislaron los hongos en cultivo puro, coincidiendo con las características de los hongos aislados. El aislamiento A2 fue el mayor grado de virulencia, ya que causa una desintegración de tejidos mayor y es capaz de invadir tallos gruesos de 2-3 cm de diámetro.

Identificación de *Alternaria* spp. y *Fusarium* sp. como agentes causales de la pudrición del florete. En total se identificaron tres especies de hongos causantes del manchado o pudrición del florete de brócoli.

Alternaria A1 presentó colonia verde grisácea en medio de cultivo PZA, conidios obclavados, muriformes, con ornamentación rugosa-punteada, con septación transversal y longitudinal variable de 4 a 6 y 2 a 3 respectivamente y un tamaño variable de conidios de 11 a 42 x 7.7 a 11 μm con conidióforos primarios de 31-88 x 3.3 a 4.4 μm , estas características correspondieron a la especie *Alternaria tenuissima* de acuerdo a las claves y descripciones de Barnett y Hunter (1972); Rotem (1994) y Simmons (1995).

Alternaria A2 presentó colonia verde olivo en medio de cultivo PZA, conidios obclavados, muriformes, con ornamentación rugosa-punteada, con septación transversal y longitudinal variable de 3 a 7 y 0-1 respectivamente y un tamaño variable de conidios de 12 a 42 x 6.7 a 13

µm con conidióforos primarios de 16-71 x 3.3 a 4.4 µm. La catenulación puede poseer de 5 - 10 conidios, presenta ramificación secundaria y puede presentar ramificación terciaria, estas características correspondieron a la especie *Alternaria alternata* de acuerdo a las claves y descripciones de Barnett y Hunter (1972); Rotem (1994) y Simmons (1995).

Fusarium sp. presentó colonia de coloración rosada a púrpura con apariencia algodonosa, esporodoquios abundantes errupentes de coloración color salmón o naranja, macroconidios en forma de hoz, delgados con la célula apical atenuada y la célula basal en forma de pie producidos en esporodoquios, las características correspondieron a la especie *Fusarium oxysporum* de acuerdo a las claves y descripciones de Barnett y Hunter (1972) y Nelson *et al.*, (1983).

Identificación molecular. Las regiones internas ITS1 e ITS2 de los genes ribosomales (rARN) amplificadas por PCR para *Alternaria* A1 fue de 578pb que correspondió a una secuencia completa de ambas regiones ITS1 e ITS2. En el banco de genes (NCBI), la secuencia se alineó en primer lugar con secuencias correspondientes a especies de *Alternaria* no especificadas y a algunos hongos de suelo, la primera especie de *Alternaria* con la que se alineó fue *Alternaria tenuissima* (número de acceso AY154712.1) con un valor de 1020 (score) y con un índice de similaridad de 99%, el índice de similaridad fue el mismo para *Alternaria tenuissima* (número de acceso AY154712.1) y para las secuencias de especies no especificadas, así como para otras especies como *A. mali* y *A. longipes* con las cuales se alineó posteriormente con los mismos valores, sin embargo por la morfología presentada se corroboró que la especie de estudio era *A. tenuissima*.

Las regiones internas ITS1 e ITS2 de los genes ribosomales (rARN) amplificadas por PCR para *Alternaria* A2 fue de 558 pb que correspondió a una secuencia completa de ambas regiones ITS1 e ITS2. En el banco de genes (NCBI), la secuencia se alineó en primer lugar con *A. arborescens* (DQ242505.1), en segundo lugar con una especie de *Alternaria* no especificada (número de acceso AY714482.1) y en tercer lugar con *A. alternata* (número de acceso AF397236.1) , posteriormente con *A. grisea* (número de acceso AF314581.1) todas presentaron los mismos valores (Score 979 y con 100% de índice de similaridad), se decidió tomar a *A. alternata* (número de acceso AF397236.1), apoyados en la identificación morfológica realizada.

Las regiones internas ITS1 e ITS2 de los genes ribosomales (rARN) amplificadas por PCR para *Fusarium* sp. fue de 540 pb que correspondió a una secuencia completa de ambas regiones ITS1 e ITS2. En el banco de genes (NCBI), la secuencia se alineó en primer lugar con *F. oxysporum* (número de acceso EF495235.1); con un valor de 950 y un índice de similaridad de 99 %, en este caso no hubo alineamientos con otras especies de *Fusarium*, pero si con secuencias de especies no especificadas de hongos habitantes del suelo.



Figura 1. Fotografías de floretes de brócoli cv. ‘Marathon’ inoculados con *A. tenuissima*, *A. alternata* y *Fusarium oxysporum*. A- Crecimiento de micelio café amarillento de *A. tenuissima* en el centro de la lesión a las 96 h DI. B- *A. tenuissima* invadiendo botones y

pedicelos florales en un corte transversal de un florete después de 144 h DI. C- Fotomicrografía de conidios de *A. tenuissima*. D- Crecimiento de micelio café oscuro de *A. alternata* en el centro de la lesión a las 96 h DI. E- *A. alternata* invadiendo botones y pedicelos florales en un corte transversal de un florete después de 144 h DI. F- Fotomicrografía de conidios de *A. alternata*. G- Crecimiento de micelio blanco algodonoso de *Fusarium oxysporum* a las 168 h DI. H- *F. oxysporum* invadiendo botones y pedicelos florales en un corte transversal de un florete después de 168 h DI. I- Fotomicrografía de conidios de *F. oxysporum*.

DISCUSIÓN

En este estudio se encontró evidencia suficiente de que *Alternaria tenuissima*, *A. alternata* y *Fusarium oxysporum* causan los síntomas de pudrición y manchado del florete de brócoli. Los síntomas iniciales de *A. tenuissima* y *A. alternata* en los sépalos de los granos de brócoli, fueron similares a los producidos por *A. brassicicola* y *A. brassicae* en plántulas de col, donde también se observaron puntos necróticos al inicio de la infección (Babadoost y Gabrielson, 1979). La pudrición de tejidos producida por *A. tenuissima* y *A. alternata* en etapas avanzadas de la infección, pudo deberse a la producción de toxinas y/o enzimas; normalmente éstos factores juegan un papel determinante en el proceso de infección estas especies de hongos (Thomma, 2003; Eshel *et al.*, 2000; Nutsugah *et al.*, 1994). *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* es un patógeno que ha sido reportado atacando brassicas en campo, donde causa un amarillamiento de hojas y posteriormente necrosis y defoliación (Rangavajhyala *et al.*, 1998; Farnham *et al.*, 2001); en este caso *F. oxysporum*, no causó amarillamiento de los granos, solo necrosis gris-seca y al igual que *F. avenaceum* en floretes de brócoli (Mercier *et al.*, 1991), el micelio cubrió gran parte de la inflorescencia.

A. alternata fue la especie más agresiva desintegrando los tejidos infectados más rápidamente que *A. tenuissima* y *F. oxysporum*, lo cual puede ser atribuible a la producción de algún compuesto fitotóxico que no producen las otras dos especies, o a la presencia de algún compuesto producido por el hospedero ante la presencia del hongo, el cual aceleró la senescencia de los tejidos. Hay al menos 12 toxinas hospedante-específico que son producidas por especies del género *Alternaria*, de las cuales la mayoría están presentes en variantes de *A. alternata* (Thomma, 2003), Akamatsu *et al.*, (1997) mencionan, que algunos patotipos de *A.*

alternata producen toxinas hospedante específico que no solamente inducen necrosis, sino también suprimen las defensas del hospedante. La producción de enzimas también juega un papel importante en el grado de patogenicidad de ésta especie (Thomma, 2003); Eshel *et al.*, (2000) mencionan que endoglucanasas están relacionadas con el síntoma de manchas negras en frutos de persimonia atacados por *A. alternata*.

A. alternata y *A. tenuissima* son especies ampliamente relacionadas por lo que existen numerosos aislamientos con características intermedias de ambas especies, lo que dificulta la separación taxonómica (Pryor y Michailides, 2002); ésta semejanza morfológica también se reflejó en la identificación molecular, donde las secuencias ITS1 e ITS2 de ambas especies se alinearon con el mismo porcentaje con otras especies que comparten características, un caso similar reportan Pryor y Michailides, (2002) con aislamientos de *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens* y *A. infectoria* en pistacho.

Alternaria tenuissima, *A. alternata* y *Fusarium oxysporum*, no solo dañan los tejidos de la inflorescencia del brócoli, sino que posiblemente puedan contaminar las semillas, tal como lo hace *A. brassicicola* y *A. brassicae*, de las cuales se ha reportado que sus conidios pueden alojarse en las cavidades y depresiones del hilum (Knox-Davies, 1979) o como micelio ambas especies puede infectar la testa y el embrión de la semilla col (Knox-Davies, 1979; Maude y Humpherson-Jones, 1980).

CONCLUSIONES

Alternaria tenuissima, *A. alternata* y *Fusarium oxysporum* son agentes causales de la pudrición o manchado del florete de brócoli, al ocasionar necrosis de células y pudrición de tejidos. *A. alternata* fue el más patogénico, ya que fue capaz de invadir tallos gruesos de 2-3 cm de diámetro.

LITERATURA CITADA

- Abul-Fazal, M., Khan, M. I., and Saxena, S. K. 1994. The incidence of *Alternaria* species in different cultivars of cabbage and cauliflower seeds. *Indian Phytopathology* 47:419-421.
- Akamatsu, H., Itoh, Y., Kodama, M., Otani, H., and Kohmoto, K. 1997. AAL-toxin-Deficient Mutants of *Alternaria alternata* Tomato Pathotype by Restriction Enzyme-Mediated Integration. *Phytopathology* 87:967-972.
- Ahrens, U., and Seemüller, E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832.
- Babadoost, M., and Gabrielson, R. L. 1979. Pathogens causing *Alternaria* diseases of brassica seed crops in western Washington. *Plant disease reporter* 63(10): 815 -820.
- Barnett, H. L., and Hunter, B. B. 1972. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Burgess Publishing Company. Minnesota, USA. 241 p.
- Ceponis, M. J., Cappellini, R. A., and Lightner, G. W. 1987. Disorders in Cabbage, Bunched Broccoli, and Cauliflower Shipments to the New York Market, 1972-1985. *Plant Disease. Special Report*. 1151-1154.
- Dillard, H. R., Cobb, A. C., and Lamboy, J. S. 1998. Transmission of *Alternaria brassicicola* to Cabbage by Flea Beetles (*Phyllotreta cruciferae*). *Plant Disease* 82:153-157.
- Eshel, D., Ben-Arie, R., Dinour, A., and Prusky, D. 2000. Resistance of gibberellin-treated persimmon fruit to *Alternaria alternata* arises from the reduced ability of the fungus to produce endo-1,4- β -glucanase. *Phytopathology* 90:1256-1262.
- Farnham, M. W., Keinath, A. P., and Smith, J. P. 2001. Characterization of *Fusarium* yellows resistance in collard. *Plant Disease* 85:890-894.
- Gaetán, S. A. 2005. Occurrence of Fusarium Wilt on canola Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* in Argentina. *Plant Disease* 89:432.
- Gupta, D. K and Chaudhury, K. C. B. 1992. Occurrence and prevalence of *Alternaria* species in crucifers grown in Sikkim. *Indian Journal of Hill Farming*. 5:129-131.
- Hodgkin, T., and MacDonald, M. V. 1986. The Effect of a Phytotoxin from *Alternaria brassicicola* on Brassica Pollen. *New Phytologist* 104:631-636.

- Knox-Davies, P. S. 1979. Relationships between *Alternaria brassicicola* and *Brassica* seed. Trans. Br. Mycol. Soc. 73:235-248.
- Kumar, R., and Gupta, P. P. 1994. Survival of *Alternaria brassicae*, *A. brassicicola* and *A. alternata* in the seed of mustard (*B. juncea*) at different temperatures and relative humidities. Annals of Biology 10:55-58.
- Maude, R. B., and Humpherson-Jones, F. M. 1980. Studies on the seedborne phases of dark leaf spot (*Alternaria brassicicola*) and gray leaf spot (*Alternaria brassicae*) of brassicas. Ann. Appl. Biol. 95:311-319.
- Menniti, A. M., and Casalini, L. 2000. Prevention of post-harvest diseases on cauliflower. Colture Protette 29: 67-71.
- Mercier, J., Makhlof, J., and Martin, R. A. 1991. *Fusarium avenaceum*, a pathogen of stored broccoli. Canadian Plant Disease Survey 71:161-162.
- Montesinos, S. G. 2005. Modelo de manejo de las unidades calor en el cultivo de brócoli y sus principales plagas. Memorias del VI Seminario Técnico: Tecnología de producción de las crucíferas. COTECO. Guanajuato, México. 95 p.
- Moreno-Rico, O., Manzano-Flores, D. E., y Luna-Ruiz, J. J. 2005. Reacción de Variedades de Coliflor (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.) y Brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica* L.) a *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm. Revista Mexicana de Fitopatología 23: 206-210.
- Narro-Sánchez, J., Quijano-Carranza, J. A., y Rocha, R. R. 2005. Enfermedades del follaje y florete de brócoli en México. In: Memorias del VI Seminario Técnico: Tecnología de producción de las crucíferas. COTECO. 1 y 2 de septiembre. Celaya, Gto., México. pp: 95.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., and Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium* species: An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press. USA. 193 p.
- Nutsugah, S. K., Kohmoto, K., Otani, H., Kodoma, M., and Sunkerwari, R. R. 1994. Production of a Host-Specific toxin by germinating spores of *Alternaria tenuissima* causing leaf spot of pigeon pea. Journal Phytopathology 140: 19-30.
- Pattanamahakul, P., and Strange, R. N. 1999. Identification and toxicity of *Alternaria brassicicola*, the causal agent of dark leaf spot disease of *Brassica* species grown in Thailand. Plant Pathology 48:749-755.

- Pryor, B. M., and Michailides, T. J. 2002. Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with Alternaria late blight of pistachio. *Phytopathology* 92:406-416.
- Rangavajhyala, N., Ghorpade, V. M., and Kadam, S.S. 1998. Broccoli. *In: Handbook of Vegetables Science and Technology*. Salunkhe, D. K, and Kadam, S. S. (eds). Marcel Dekker. Inc. New York. USA. pp: 337-357.
- Rotem, J. 1994. The Genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology and Pathogenicity. American Phytopathological Society. St Paul, MN. USA. 326 p.
- Simmons, E. G. 1995. *Alternaria* themes and variations (112-144). *Mycotaxon* 55: 55-163.
- Singh D.F. and Rai, B. 1980. Studies on the leaf surface mycoflora of mustard (*Brassica campestris* L. cv. YS-42). *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 107: 447-452.
- Tamayo, M. P. J., Becerra, V. D. C., y Jaramillo, N. J. E. 2001. *Alternaria brassicae*, agente causal de pudrición de la cabeza en coliflor (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L. ASCOLFI Informa 27(2): 10-11.
- Tewari, J. P. 1983. Celular alterations in the blackspot of rapeseed caused by *Alternaria brassicae*. *Plant Pathology* 73(5): 831.
- Thomma, B. P. H. J. 2003. *Alternaria* spp: from general saprophyte to specific parasite. *Mol. Plant Pathology* 4(4):225-236.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. J. (eds). Academic Press, San Diego, CA. USA. Pp: 315-322.

**CAPÍTULO II. INFECCIÓN Y COLONIZACIÓN DE *Alternaria tenuissima*
(KUNZE:FR) WILTSHIRE EN EL FLORETE DE BRÓCOLI (*Brassica oleracea* L.
var *Italica*)**

RESUMEN

El presente trabajo describe el proceso infectivo y las alteraciones anatómicas causadas por *Alternaria tenuissima* en el florete de brócoli. Se inocularon conidios del hongo colectado de floretes de brócoli con síntomas de manchas necróticas, en floretes del cultivar comercial 'Marathon'. Estudios de microscopia electrónica de barrido y microscopia de luz, revelaron que *A. tenuissima* germina sobre la superficie de los sépalos de la flor a las 8 h después de la inoculación, y que el micelio penetra únicamente a través de los estomas entre las 16-18 h. En las primeras horas de la infección hubo deposición de un compuesto de color rojo en las células estomáticas y células contiguas, el cual fue de origen desconocido. El espacio dentro de la cámara subestomática fue más evidente debido al colapso de las células laterales en los sitios de penetración. En etapas más avanzadas de la infección se presentó necrosis de células; las áreas necrosadas fueron mayores conforme avanzó la colonización del hongo en los tejidos del sépalo. Se originaron infecciones secundarias de la emergencia de hifas de los sitios de infecciones primarias. La infección y colonización de los órganos florales por *A. tenuissima* se da en un lapso de 96 h, provocando necrosis de células y maceración de tejidos en los sépalos y demás órganos florales.

Palabras clave: Histopatología, microscopia electrónica, patogénesis.

INTRODUCCIÓN

Las crucíferas son una de las cadenas agroalimentarias de mayor importancia socioeconómica en la región del Bajío, México (Bujanos y Marín, 2005). En el estado de Guanajuato se sembraron alrededor de 12 mil hectáreas de brócoli durante el 2006 (SIAP-SAGARPA, 2006). Las enfermedades causadas por hongos del género *Alternaria* son un problema serio para la producción de crucíferas en varias partes del mundo (Hodgkin y MacDonald, 1986; Dillard *et al.*, 1998; Pattanamahakul y Strange, 1999; Chen *et al.*, 2003) incluyendo México (Narro-Sánchez *et al.*, 2005); las principales especies que causan manchas necróticas en el follaje o

reducen la germinación de las semillas son: *A. brassicae* (Babadoost y Gabelson, 1979, Tewari, 1983), *A. brassicicola* (Chen *et al.*, 2003), *A. raphani* (Pattanamahakul y Strange, 1999), *A. alternata* (Ahmad *et al.*, 1996).

Algunas especies de *Alternaria* también causan pudriciones en la parte comestible, tal es el caso de *A. brassicae* que puede afectar a 1.3% de los embarques de coliflor que llegan a Nueva York (Ceponis *et al.*, 1987) y causar pérdidas de un 30% en col (Tamayo *et al.*, 2001); *A. tenuissima* es causante de la pudrición café del florete en brócoli junto con *A. alternata*, los síntomas se manifiestan por manchas húmedas de color negro-café, las cuales abarcan varias florecillas (La etiología se describe en el capítulo I).

Aunque las especies de *Alternaria* comparten algunas similitudes en los patrones de infección, puede haber diferencias entre las especies por su grado de virulencia; las especies menos virulentas penetran al hospedante por medio de heridas o por los estomas, mientras las más virulentas pueden penetrar también directamente (Thomma, 2003). *A. tenuissima* es un hongo necrotrófico patógeno de cultivos como arándano (Wright *et al.*, 2004), pistacho (Pryor y Michailides, 2002), avellana y nuez (Belisario *et al.*, 2004), berenjena (Raja *et al.*, 2006) y chícharo (Singh, 2004). Sin embargo en *Amaranthus hybridus* puede actuar como endófito y patógeno, penetrando a las hojas a través de los estomas por medio de ramificaciones hifales sin formar apresorios (Blodgett y Swart, 2002). Puede presentar variabilidad en su grado de patogenicidad, correlacionada con su habilidad para producir metabolitos fitotóxicos (Nutsugah *et al.*, 1994; Rahman *et al.*, 2002). La respuesta al ataque de *Alternaria* es variada en los cultivos en el caso de colza y en mostaza los mecanismos de resistencia son las ceras epicuticulares preexistentes o la rápida acumulación de fenoles, orto-dihidroxi fenoles y fitoalexinas en los sitios de infección (Saharan *et al.*, 2003; Kushwaha y Narain, 2005).

Para entender el grado de asociación de un hongo patógeno con su hospedante, es necesario conocer a fondo el papel que juega cada uno de ellos en el proceso de patogénesis. El objetivo de este estudio fue el determinar los mecanismos y estructuras morfológicas involucradas en el proceso de infección y colonización de *A. tenuissima* en el florete de brócoli.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preinfección y penetración. Un cultivo monoconidial de *A. tenuissima* previamente colectado de floretes de brócoli con síntomas de manchas necróticas de color café oscuro (En el capítulo 1 se describe la etiología del hongo), fue cultivado en cajas de Petri con medio de cultivo PZA (papa-zanahoria-agar) a $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ con 8 horas diarias de luz blanca fluorescente. Después de dos semanas, los conidios del hongo fueron filtrados para preparar una suspensión de los mismos en agua destilada estéril a una concentración de 1×10^5 conidios/mL. La suspensión se utilizó para inocular cuatro floretes de brócoli del cultivar ‘Marathon’ (Compañía Sakata) recién cosechados en madurez comercial y previamente desinfectados con hipoclorito de sodio al 1.5% por dos minutos. La inoculación se realizó con una pipeta, colocando 5 gotas por florete de 0.5 mL de la suspensión de conidios en la superficie de este; una vez inoculados los cuatro floretes, se colocaron en charolas de unicel de 40x30 cm desinfectadas, se cubrieron con una bolsa de polietileno y se incubaron a $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ y 80% de humedad relativa. 34 horas después de la inoculación (DI) se tomaron muestras de 2 cm² de las zonas de inoculación. Las muestras se colocaron en gluteraldehído al 3% con amortiguador de fosfatos Sorensen’s 0.1 M, pH 7.2 (Ruzin, 1999) durante 24 h. Posteriormente, las muestras fueron lavadas en tres ocasiones a intervalos de un minuto con el amortiguador de fosfatos Sorensen’s y deshidratadas en una serie de alcohol etílico al 30, 40, 50, 60 y 70%, por 1 h en cada concentración. Los sépalos fueron separados del resto de la flor y colocados en alcohol etílico al 80, 90 y 100% por 1 h en cada cambio. Los sépalos se colocaron en una secadora de punto crítico Samdri-780A[®] (TOUSIMIS Research Corporation, Rockville, USA) a 31.1°C y 1073 psi; posteriormente, se pegaron sobre un portamuestras de latón de 9 mm de diámetro con cinta adhesiva-conductiva de cobre y se recubrieron con oro durante 4 minutos en una ionizadora JFC-1100[®] (JEOL LTD, Tokio, Japón). Las muestras se observaron en un Microscopio Electrónico de Barrido JSM 35-C (JEOL LTD, Tokio, Japón) operado a 15 Kv.

Colonización. Seis floretes del cultivar ‘Marathon’, con madurez comercial, previamente desinfectados se asperjaron con una suspensión de conidios de *Alternaria tenuissima* a una concentración de 1×10^5 conidios/mL. Los floretes inoculados se colocaron en charolas de unicel de 40x30 cm sobre toallas de papel húmedas, se cubrieron con bolsas de polietileno y se incubaron a $24\pm 2^{\circ}\text{C}$.

De cada florete inoculado se tomaron muestras de 1 cm² cada dos horas a partir de 8 h hasta 24 h DI; posteriormente cada 24 h hasta completar 144 h DI. Las muestras se colocaron en una solución fijadora FAA (etanol: ácido acético glacial: formaldehído: agua en proporción de 50:5:10:35, respectivamente) durante 15 días. La mitad de cada una de las muestras se utilizó para elaborar preparaciones temporales y la otra mitad para realizar la técnica de parafina; para esta última, las muestras se lavaron tres veces con agua corriente en intervalos de 15 minutos, y se colocaron en un cambiador automático de tejidos Tissue-Tek[®] II (Mod. 4640-B, Sakura Finetechnical Co., LTD. Tokio, Japan) con los siguientes reactivos: Alcohol etílico al 50, 70, 96, 100%, alcohol etílico absoluto-xileno (1:1), xileno tres cambios y dos cambios de Paraplast regular (Sigma Chemical Co. USA) a intervalos de 2 h. Las muestras infiltradas se colocaron en moldes cúbicos de papel con Paraplast y se realizaron cortes transversales y longitudinales de 10 y 12 µm de grosor con un microtomo rotatorio (Mod. Spencer 820, American Optical Company). Posteriormente, los cortes se desparafinaron y tiñeron con safranina-verde-rápido y finalmente se montaron con resina sintética (Johansen, 1940), se dejaron secar durante 72 h y se observaron en un microscopio Ultraphoto II Carl Zeiss.

Para las observaciones en preparaciones temporales, las muestras se tiñeron con fucsina ácida al 0.5%, por 30 seg, se lavaron dos veces con agua destilada estéril. Los sépalos se separaron del resto de la flor y se colocaron en un portaobjeto con una gota de glicerol al 50% acidificado con cinco gotas de HCl al 12N, para su observación en un microscopio de luz Carl Zeiss.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Preinfección y penetración. La germinación de los conidios de *A. tenuissima* sobre los sépalos de las florecillas de brócoli comenzó entre las 6 y 8 h DI; debido a que las muestras colectada a las 8 h DI presentaron hifas infectivas de igual longitud a la de los conidios, lo anterior se observó en las preparaciones permanentes. Usando microscopia electrónica de barrido se observó que los conidios presentaron de una a cinco hifas infectivas (Figuras 1A y B), lo cual es común en varias especies del género *Alternaria* (Gómez-Rodríguez *et al.*, 2001; Thomma, 2003). La variabilidad que existe dentro del género *Alternaria* permite algunas variaciones en los patrones de infección en su hospedante, de tal forma que la penetración puede incluir formación de apresorios, penetración directa de la cutícula y la epidermis, o penetración a través de los estomas o de heridas en el tejido (Rotem, 1994; Thomma, 2003).

En este caso, no hubo formación de apresorios sino que la punta de la hifa infectiva penetró directamente los estomas del hospedante, pero no todos los estomas al alcance del crecimiento hifal fueron invadidos (Figuras 1C y D). La penetración quizás fue influenciada por algunos estímulos químicos o por la topografía que presentaron estos estomas, los cuales eran hundidos y con estrías a su alrededor. El crecimiento y la ramificación de las hifas se extendió en todo el sépalo sin seguir un patrón determinado (Figuras 1C y E); algo similar mencionan McRoberts y Lennard, (1996), donde las hifas de aislamientos de *Alternaria brassicae*, *A. brassicicola* y *A. raphani* no siguieron una orientación aparente sobre la superficie de hojas de diversos hospedantes. En este estudio no se observó la penetración directa de las hifas infectivas a través de la cutícula y la epidermis del hospedante; esto concuerda con lo observado en *Amaranthus hybridus* donde las hifas infectivas de *A. tenuissima* únicamente penetraron al hospedante a través de los estomas (Blodgett y Swart, 2002).

Colonización. En los cortes histológicos se observó que la penetración de las hifas infectivas en los estomas fue entre las 16 y 18 h DI. Los primeros síntomas después de la penetración se observaron en las células guarda de los estomas a las 20 h DI, las cuales se tiñeron de un color rojizo con el colorante safranina; entre la 20 y 24 h DI las células alrededor del estoma se tiñeron también y las células guardas se necrosaron (Figuras 2^a y B). Esta sustancia que se tiñó de color rojizo pudo ser algún metabolito secundario liberado por el hongo (toxinas) que contribuye al establecimiento de la infección (Nutsugah *et al.*, 1994) o también pudo ser alguna sustancia de defensa de la planta que se liberó en las etapas iniciales del proceso de patogénesis como polifenoles (McRoberts y Lennard, 1996; Saharan, *et al.*, 2003; Kushwaha y Narain, 2005). También Martínez-Fernández *et al.* (2004) y Cárdenas-Soriano *et al.* (2003), mencionan la posible presencia de polifenoles o compuestos solubles tóxicos producidos por el hongo, durante el proceso colonización de *Botrytis cinerea* en nochebuena y *Septoria tritici* en trigo, dichos compuestos se observaron de color rojo en los cortes histopatológicos. En este caso las células estomáticas que se tiñeron de rojo se necrosaron haciendo más evidente la cámara subestomática (Figura 2B). Entre 24 y 48 h DI, la infección se extendió lateralmente en las células de la epidermis, posteriormente avanzó hacia el mesófilo presentándose una mínima alteración (coloración rojiza en las células). El número de sitios de infección exitosos del hongo en los sépalos de brócoli fue variable debido a que no todos los estomas fueron

penetrados; se presentaron de uno a cinco sitios (Figura 2C). Después de las 48 h DI, el hongo avanzó intra e intercelularmente en el mesófilo, pero ya no se observó la liberación del metabolito que ocasionó coloraciones rojizas en las etapas iniciales. En esta etapa y en las subsiguientes, las células infectadas tomaron una coloración café oscuro a negro (necrosis), los cloroplastos se desintegraron y las células se colapsaron (Figura 2D). Algo similar sucedió con *A. brassicae* en hojas de colza, donde en etapas tempranas de la infección los cloroplastos fueron afectados directa o indirectamente y posteriormente las células en el área necrótica quedaron completamente desprovistas de organelos celulares (Tewari, 1983). Entre las 72-96 h DI, el crecimiento de micelio en el sépalo fue abundante, de tal forma que las hifas siguieron creciendo entre los sépalos, llegando a invadir pétalos, pistilo y estambres. En algunos sitios de infección, el tejido necrosado se desprendió conforme avanzó el hongo a lo largo y ancho del sépalo (Figura 2E).

En este estudio *A. tenuissima* tuvo un comportamiento necrotrófico que causó necrosis celular, presentándose desde etapas iniciales de la infección. Para algunos hongos necrotróficos, la inducción de muerte celular como un mecanismo de defensa de la planta le es beneficiosa al hongo, de hecho puede ser un factor de virulencia en algunos de ellos (Glazebrook, 2005). En otros casos la necrosis puede ser causada por toxinas producidas por el hongo, tal es el caso de aislamientos de *A. tenuissima* inoculados en *Pistacia vera*, los cuales presentaron toxinas hospedante-no-específico (Pryor y Michailides, 2002), éstas generalmente actúan como un factor de virulencia o severidad, pero en general no preconditionan la enfermedad (Thomma, 2003). Nutsugah *et al.* (1994), mencionan que en chícharo *A. tenuissima* produce una toxina hospedante-específico que causa necrosis en hojas; esta toxina es liberada al momento de la germinación de los conidios, es determinante en la patogenicidad del hongo y juega un papel importante en los eventos iniciales del proceso de infección. La tinción con fucsina ácida permitió observar que después de la colonización de las células guarda de los estomas, el crecimiento de hifas fue abundante, de tal forma que algunas hifas después de las 72 h DI emergieron por los mismo estomas que penetraron y ocasionaron infecciones secundarias en estomas adyacentes. Un síntoma característico en muchas enfermedades ocasionadas por parásitos facultativos es la maceración o desintegración de las células de los tejidos invadidos del hospedante (Martínez-Fernández *et al.*, 2004). Este síntoma fue observado a las 144 h DI, cuando *A. tenuissima* provocó una

pérdida total de la estructura celular; las células necrosadas de los tejidos que componían los sépalos y los órganos florales se desintegraron (Figura 2F) sin observar un necrosamiento, probablemente porque en esta etapa avanzada el hongo contaba con abundantes mecanismos de infección como la producción de toxinas y enzimas (cutinasas y lipasas) que contribuyen al establecimiento de la infección en algunas especies de *Alternaria* (Thomma, 2003), y probablemente también ya había sobrepasado los mecanismos de defensa de la planta. En los cortes histológicos se observó que la colonización del gineceo y el androceo fue más rápida que la colonización de los sépalos, en estos órganos se presentó una desintegración de las paredes celulares sin presentar necrosis, debido probablemente a la condición de alta humedad que normalmente prevalece en el interior de la flor que fue más favorable para el hongo. Otro factor que pudo contribuir a la rápida desintegración de estas partes florales fue la colonización avanzada de los sépalos.

La coloración rojiza que se presentó en las células a las 18 h DI, permaneció durante todo el proceso de infección hasta que se presentó la maceración de los tejidos y la necrosis de los tejidos fue total, lo que indicó que este metabolito de la planta o metabolito producido por el hongo no es degradado durante todo el proceso de patogénesis. Algo semejante ocurrió con *Botrytis cinerea* en nochebuena, donde los compuesto de color rojo permanecieron aun cuando la lamina foliar estaba necrosada (Martínez-Fernández *et al.*, 2004). En etapas finales de la infección, la colonización del hongo en los sépalos y otras partes florales fue abundante, de tal forma que externamente se observó el crecimiento de micelio y producción de conidios. Los resultados indicaron que *A. tenuissima* puede infectar y colonizar botones florales de brócoli en 96 h.

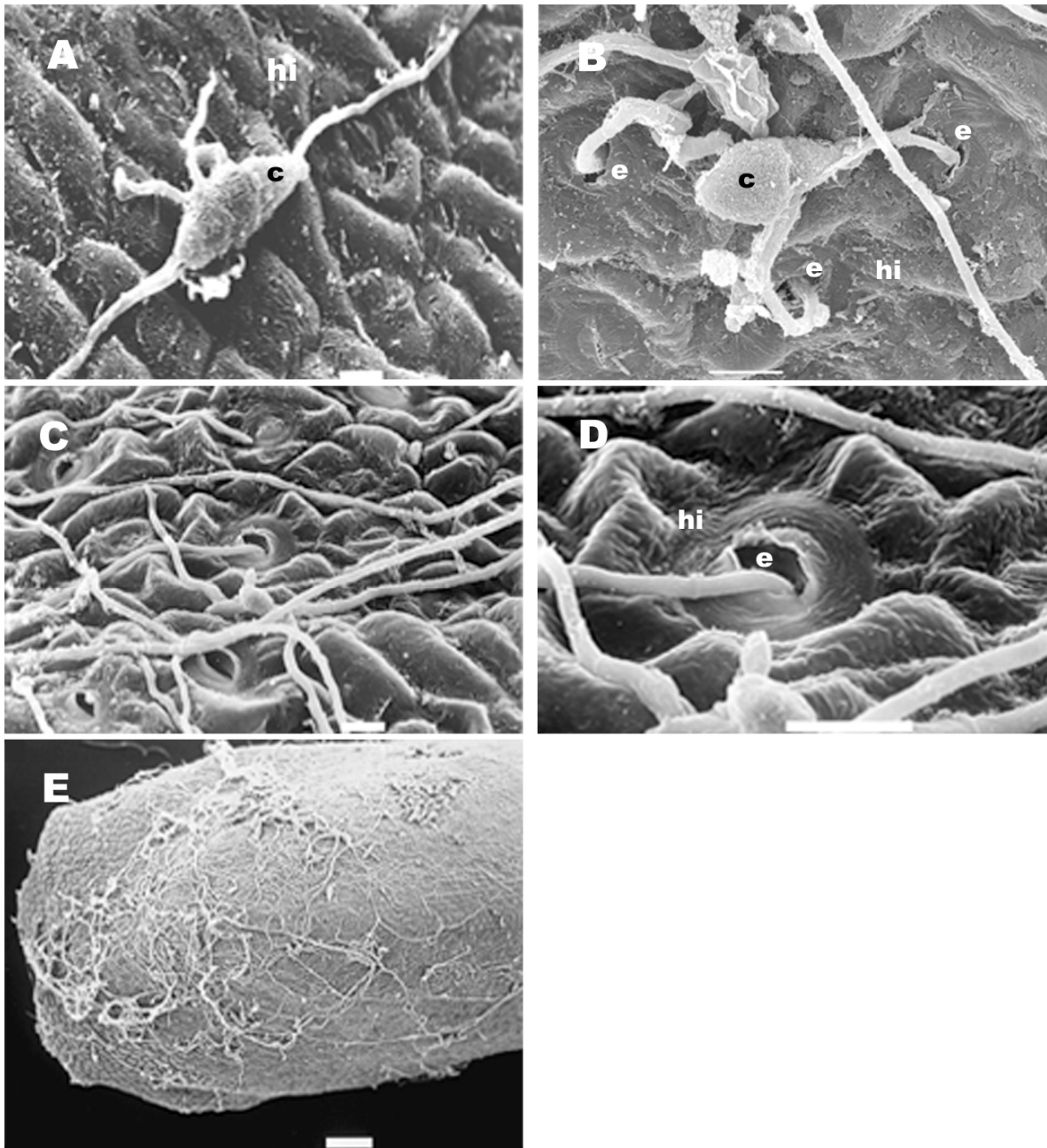


Figura 1. Fotomicrografías al microscopio electrónico de barrido de los sépalos de flor de brócoli cv. 'Marathon' inoculados con *A. tenuissima* 34 h DI. Hifas infectivas de una a cinco por conidio, barra = 10 μ m (A, B). Penetración de las hifas en los estomas, barra = 10 μ m (C, D). Desarrollo de micelio sobre la superficie del sépalo 34 h DI, barra = 100 μ m €. c = conidio; hi = hifa infectiva; e = estoma

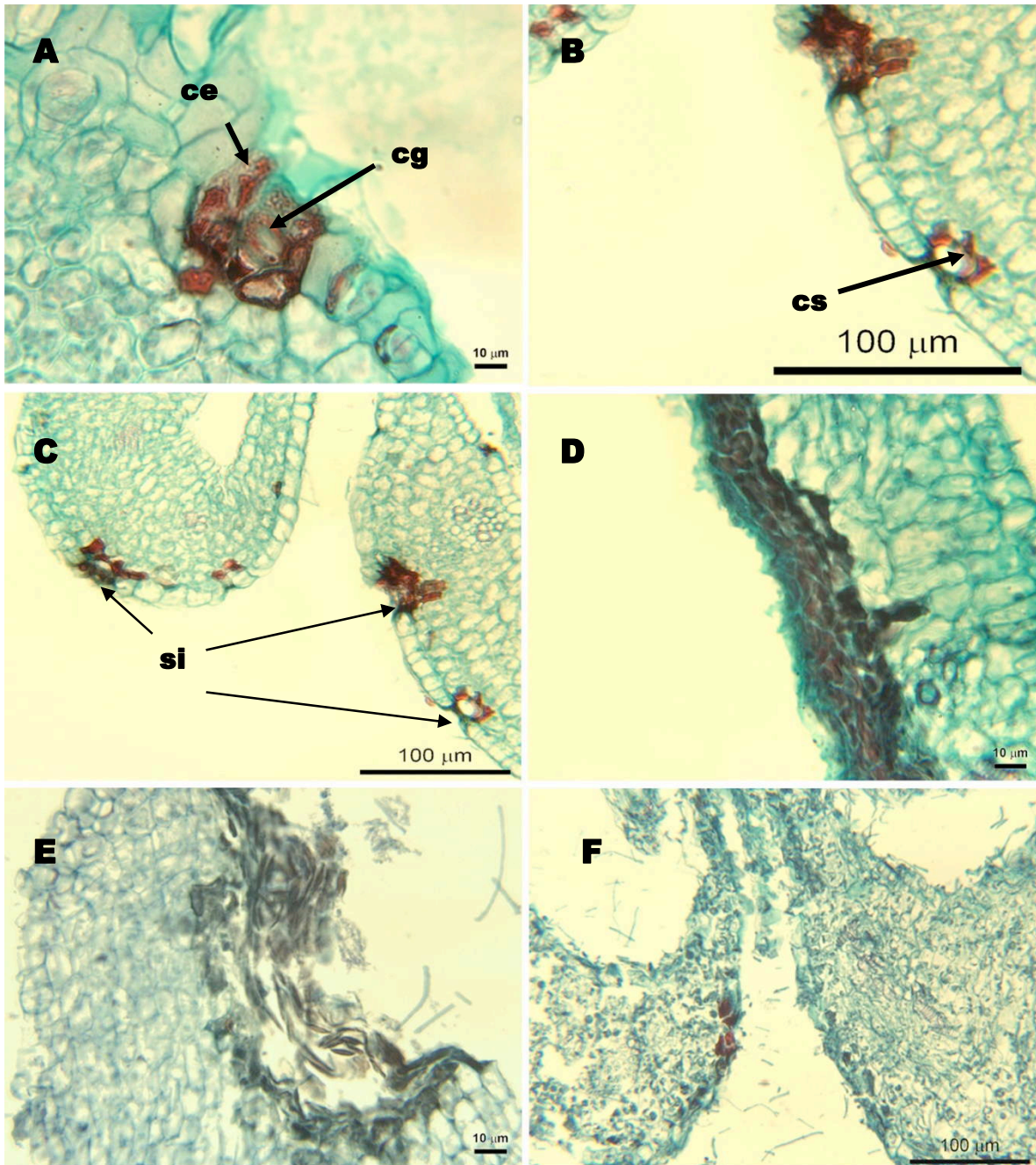


Figura 2. Fotomicrografías de los sépalos de brócoli cv. ‘Marathon’ infectados con *A. tenuissima*. Depósitos rojos en las células guarda de los estomas y en las células epidérmicas (A). Células guarda necrosadas y células parenquimatosas rodeando la cámara subestomática con depósitos rojizos (24 h DI) (B). Varios sitios de infección en un sépalo (C). Necrosis de células y colapso de tejidos del sépalo a las 48 h DI (D). Desprendimiento de células necrosadas (96 h DI) (E). Pérdida de la estructura celular debido a la desintegración de las

paredes celulares (144 h DI) (F). cg = células guarda; ce = células epidérmicas; cs = cámara subestomática; si = sitios de infección.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados histológicos se concluye que *Alternaria tenuissima* infecta los botones florales de brócoli del cultivar Marathon, penetrando por los estomas de los sépalos. La infección y colonización de los órganos florales por *A. tenuissima* se da en un lapso de 96 h, provocando necrosis de células y maceración de tejidos.

AGRADECIMIENTOS

A la unidad de microscopia electrónica del Colegio de Postgraduados, por su apoyo técnico en el procesamiento de muestras para microscopia de barrido.

LITERATURA CITADA

- Ahmad, M.A., B. A.Khan, Z. A. Shamsuddin, and A. Ahmed. 1996. Mycotoxin producing potential of *Alternaria alternata* isolated from mustard/rapeseeds. Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research. 39: 136-138.
- Babadoost, M., and R. L. Gabrielson. 1979. Pathogens causing *Alternaria* diseases of brassica seed crops in western Washington. Plant disease reporter. 63: 815-820.
- Belisario, A., M. Maccaroni, A. Coramusi, L. Corazza, B. M. Pryor, and P. Figuli. 2004. First report of *Alternaria* species groups involved in disease complexes of hazelnut and walnut fruit. Plant Disease. 88: 426.
- Blodgett, J. T., and W. J. Swart. 2002. Infection, colonization, and disease of *Amaranthus hybridus* leaves by the *Alternaria tenuissima* group. Plant Disease. 86:1199-1205.
- Bujanos M., R., y A. Marín J. 2005. Manejo integrado de la palomilla dorso de diamante *Plutella xylostella* (L.) en el Bajío, México. In: Memorias del VI Seminario Técnico: Tecnología de Producción de las Crucíferas. COTECO. 1 y 2 de septiembre. Celaya, Gto., México. pp: 95.
- Cárdenas-Soriano, E., L. I. Gilchrist-Saavedra, y S. G. Leyva-Mir. 2003. Histopatología del Tizón Foliar Inducido por *Septoria tritici* Roberge in Desmaz. En 13 líneas de Trigo (*Triticum aestivum* L). Revista Mexicana de Fitopatología. 21:137-142.
- Ceponis, M. J., R. A. Cappellini, and G. W. Lightner. 1987. Disorders in cabbage, bunched broccoli, and couliflower shipments to the New York market, 1972-1985. Plant disease. Special Report. 1151-1154.
- Chen, L. Y., T. V. Prince, and Z. Park-Ng. 2003. Conidial dispersal by *Alternaria brassicicola* on Chinese cabbage (*Brassica pekinensis*) in the field and under simulated conditions. Plant Pathology. 52:536-545.
- Dillard, H. R., A. C. Cobb, and J. S. Lamboy. 1998. Transmission of *Alternaria brassicicola* to cabbage by flea beetles (*Phyllotreta cruciferae*). Plant Disease. 82:153-157.
- Fraire-Cordero, M. L., D. Nieto-Ángel, E. Cárdenas-Soriano, G. Gutiérrez-Alonso, y R. Bujanos-Muñiz. 2006. Calidad del florete e identificación de hongos patógenos en variedades de brócoli (*Brassica Oleracea* L. *Itálica*) en Guanajuato, México. In: Memoria del XXXIII Congreso Nacional de Fitopatología. 17-20 de julio. Manzanillo, Col., México. Pp: L-20.

- Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:205-227.
- Gómez-Rodríguez, O., E. Zavaleta-Mejía, E. Cárdenas-Soriano, G-Valdovinos-Ponce, y V. A. González-Hernández. 2001. Histopatología de *Alternaria solani* en jitomate asociado con cempazúchil (*Tagetes erecta* L.) y alegría (*Amaranthus hypochondriacus* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología.* 19:182-190.
- Hodgkin, T., and M. V. MacDonald. 1986. The effect of a phytotoxin from *Alternaria brassicicola* on brassica pollen. *New Phytologist.* 104:631-636.
- Johansen, D. A. 1940. *Plant Microtechnique.* 1a ed. Mc GrawHill, New York, USA. 503 p.
- Kushwaha, K. P. S., and U. Narain. 2005. Biochemical changes in pigeon-pea leaves infested with *Alternaria tenuissima*. *Annals of Plant Protection Sciences.* 13: 415-417.
- Martínez-Fernández, E., E. Cárdenas-Soriano, E. Zavaleta-Mejía, y M. Soto-Hernández. 2004. Infección de *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. En dos cultivares de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzch). *Revista Mexicana de Fitopatología.* 22:290-298.
- McRoberts, N., and J. H. Lennard. 1996. Pathogen behaviour and plant cell reactions in interactions between *Alternaria* species and leaves of host and nonhost plants. *Plant Pathology.* 45:742-752.
- Narro-Sánchez, J., J. A. Quijano-Carranza, y R. Rocha R. 2005. Enfermedades del follaje y florete de brócoli en México. *In: Memorias del VI Seminario Técnico: Tecnología de Producción de las Crucíferas.* COTECO. 1 y 2 de septiembre. Celaya, Gto., México. pp: 95.
- Nutsugah, S. K., K. Kohmoto, H. Otani, M. Kodoma, and R. R. Sunkerwari. 1994. Production of a host-specific toxin by germinating spores of *Alternaria tenuissima* causing leaf spot of pigeon pea. *J. Phytopathology.* 140: 19-30.
- Pattanamahakul, P., and R. N. Strange. 1999. Identification and toxicity of *Alternaria brassicicola*, the causal agent of dark leaf spot disease of *Brassica* species grown in Thailand. *Plant Pathology.* 48:749-755.
- Pryor, B. M., and T. J. Michailides. 2002. Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with alternaria late blight of pistachio. *Phytopathology.* 92:406-416.

- Rahman, M. Z., Y. Honda, S. Z. Islam, N. Muroguchi, and S. Arase. 2002. Leaf spot disease of broad bean (*Vicia faba* L.) caused by *Alternaria tenuissima* – a new disease in Japan. *Journal of General Plant Pathology*. 68: 31-37.
- Raja, P., A. V. R. Reddy, and U.S. Allam. 2006. First report of *Alternaria tenuissima* causing leaf spot and fruit rot on eggplant (*Solanum melongena*) in India. *Plant Pathology*. 55:579.
- Rotem, J. 1994. The Genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology and Pathogenicity. American Phytopathological Society. St Paul, MN. USA. 326 p.
- Ruzin, S. E. 1999. Plant Microtechnique and Microscopy. Oxford University Press. New York, USA. 322 p.
- Saharan, G. S., M. Naresh, and M. S. Sangwan. 2003. Nature and mechanism of resistance to Alternaria blight in rapeseed-mustard system. *Annual Review of Plant Pathology*. 2: 85-128.
- SIAP 2006. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, estadística Básica del Año Agrícola 2006 del Estado de Guanajuato. <http://www.siap.gob.mx/>. Consultada el 24 de Septiembre de 2007.
- Singh, S. P. A. 2004. Survival of *Alternaria tenuissima* causing leaf spot of pigeon pea in diseased plant debris. *Annals of Plant Protection Sciences*. 12: 231-232.
- Tamayo, M. P. J., V. D. C. Becerra, y N. J. E. Jaramillo. 2001. *Alternaria brassicae*, agente causal de pudrición de la cabeza en coliflor (*Brassica oleracea* L. var. *Botrytis* L. ASCOLFI Informa. 27: 10-11.
- Tewari, J. P. 1983. Celular alterations in the blackspot of rapeseed caused by *Alternaria brassicae*. *Plant pathology*. 73: 831.
- Thomma, B. P. H. J. 2003. *Alternaria* spp: from general saprophyte to specific parasite. *Mol. Plant Pathology*. 4:225-236.
- Wright, E. R., M. C. Rivera, J. Esperón, A. Cheheid, and A. Rodríguez C. 2004. *Alternaria* leaf spot, twig blight, and fruit rot of highbush blueberry in Argentina. *Plant Disease*. 88:1383.

CAPÍTULO III. SENSIBILIDAD DE *Alternaria alternata* A FUNGICIDAS *IN VITRO*

RESUMEN

Cinco fungicidas comerciales: tebuconazole, pyrimetamil, iprodiona, boscalid y pyraclostrobin+boscalid fueron evaluados *in vitro* a dosis de 1, 10, 100 y 200 ppm de ingrediente activo con el fin de determinar su efectividad para inhibir el desarrollo de un aislamiento de *Alternaria alternata* colectado de floretes de brócoli. *A. alternata* fue sensible a todos los fungicidas, el desarrollo de micelio y germinación de conidios fue inhibido en diferentes porcentajes por todos ellos. El fungicida más efectivo para inhibir el crecimiento micelial y la germinación de conidios fue pyraclostrobin+boscalid con un 100% en todas las concentraciones, seguido de tebuconazole que presentó el efecto en la inhibición de crecimiento micelial (96%) que en la germinación de conidios (53%). Iprodiona y pyrimetamil tuvieron el mismo efecto en el crecimiento de micelio con un promedio de 87 y 83 % de inhibición, pero un efecto distinto en la inhibición de germinación de conidios. Para tebuconazole, iprodiona y pyrimetamil las concentraciones de 10-200 ppm fueron las más efectivas inhibiendo el desarrollo del micelio. El fungicida que mostró el promedio menor en el porcentaje tanto de inhibición de crecimiento micelial como de germinación de conidios fue boscalid con promedio de 73% y 2% respectivamente.

Palabras clave adicionales: Control químico, efectividad biológica, bioensayo, resistencia.

INTRODUCCIÓN

Alternaria alternata es un hongo que tiene varios patotipos, los cuales atacan a diversos frutos entre ellos tomate (Mesbah *et al.*, 2000), persimonia (Eshel *et al.*, 2000), pistacho (Pryor and Michailides, 2002). Prusky y Ben-Arie (1981), mencionan que *A. alternata* es el principal hongo causante de pudriciones en frutos en almacenamiento en Israel.

Varios fungicidas han sido usados para el control de *A. alternata*. Prusky y Ben-Arie, (1981), encontraron que el imazalil a dosis de 1000 µg/ml inhibió el desarrollo de la pudrición causada por *A. alternata* en manzanas inoculadas y almacenadas a 0°C, la misma respuesta se tuvo en peras y persimonia naturalmente infectados y almacenados a -1°C. Meena, *et al.*, (2006), evaluó el fungicida tebuconazole junto con otros cuatro fungicidas para el control de

A. alternata en frutos de berenjena, los resultados mostraron que tebuconazole fue uno de los que tuvo controles mejores junto con mancozeb+thiofanato-metil. Tu, (1983), menciona que de seis fungicidas evaluados, iprodiona controló a *A. alternata* y a *Sclerotinia sclerotiorum in vitro*, y en campo, fue el más efectivo para controlar dos enfermedades en frijol causadas por estos patógenos.

El fungicida pyraclostrobin ha sido usado para el control de la mancha café producida por *A. alternata* en tangerina (Reis *et al.*, 2006); el pyraclostrobin+boscalid se usó para el control del tizón tardío causado por el mismo patógeno en pistacho (Avenot, y Michailides, 2007), y el pyraclostrobin+nicobifen fue usado para el control de la pudrición del corazón de las manzanas Red Delicious causada por *A. alternata* (Reuveni, 2006).

El presente estudio se realizó con el objetivo de evaluar *in vitro* la sensibilidad de *A. alternata* causante de la pudrición café del florete de brócoli a fungicidas comerciales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante el 2005 y 2006, floretes de brócoli colectados en el estado de Guanajuato, México. Presentaron pudrición café en los granos (floreillas). Los postulados de Koch demostraron que los hongos *Alternaria alternata*, *A. tenuissima* y *Fusarium oxysporum* fueron los agentes causales de la pudrición y manchado del florete de brócoli, resultando *A. alternata* el de mayor grado de virulencia (Fraire *et al.*, capítulo I). Esta cepa de *A. alternata* se sembró en cajas con medio PZA (Papa-Zanahoria-Agar), las cuales se incubaron durante dos semanas a $24\pm 2^{\circ}\text{C}$. Los fungicidas a evaluados fueron tebuconazole (Folicur[®] 250EW 250 g i.a/L), pyrimetnil (Scala[®] 60SC 600 g i.a/L), iprodiona (Rovral[®] 50PH 500 g i.a/L), de Bayer Crop Science, Luverkusen, Alemania; Boscalid (Cantus[®] 500 g i.a/Kg) y pyraclostrobin+boscalid (Cabrio C[®] 128 y 252 g i.a/Kg respectivamente) de Basf A G, Ludwigshafen, Alemania. Las concentraciones evaluadas fueron 0, 1, 10, 100 y 200 ppm de ingrediente activo (i.a), en el caso de la mezcla pyraclostrobin y boscalid los cálculos de concentraciones se hicieron tomando en cuenta la cantidad de ingrediente activo de pyraclostrobin en el producto comercial.

Crecimiento miceliar. Los fungicidas se adicionaron a cajas de Petri junto con papa dextrosa agar (PDA) esterilizado y agitado (concentraciones finales 1, 10, 100 y 200 ppm de i.a), para la concentración 0 se utilizó PDA sin fungicida. De cada tratamiento se tuvieron 4 repeticiones. Un disco de medio (PZA) de 0.5 cm de diámetro conteniendo micelio del hongo se colocó en el centro de cada caja. Las cajas se incubaron a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ con luz fluorescente continua. Diariamente se midió el diámetro perpendicular de la colonia en el fondo de las cajas de Petri, hasta los 11 días que el hongo cubrió la superficie total del medio en las cajas sin fungicida (0 ppm).

El porcentaje de inhibición de cada concentración de fungicida fue calculado con la fórmula propuesta por Holmes y Eckert, (1999):

$$\% \text{ inhibición} = [(X - X_i) / X] * 100$$

Donde X fue la media del diámetro de colonia en el tratamiento sin fungicida (menos el disco de inóculo de 0.5 cm) y X_i fue el diámetro de la colonia de cada repetición con fungicida (menos el disco de inóculo de 0.5 cm).

Germinación de conidios. Para evaluar la germinación de conidios de *A. alternata*, 0.1 ml de una suspensión de conidios del hongo (aproximadamente 10^5 conidios/ml) se colocó sobre un disco de PDA de 1.5 cm de diámetro adicionado con cada uno de los fungicidas a razón de 0, 1, 10, 100 y 200 ppm de i.a. Para cada concentración de fungicida se tuvieron 5 repeticiones. La asignación de tratamientos fue en un diseño completamente al azar. Los discos fueron incubados durante 24 h a 25°C en cámara húmeda con luz fluorescente continua. 50 conidios fueron contados en cada una de las repeticiones para cada dosis de fungicida, el porcentaje de germinación fue comparado con el tratamiento sin fungicida (0 ppm).

Los datos de porcentaje de inhibición de crecimiento y de inhibición de germinación fueron analizados usando el análisis de varianza y el método de comparación de medias de Tukey ($\alpha=0.05\%$) con el paquete estadístico SAS[®] v8.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El hongo *Alternaria alternata* colectado de floretes de brócoli fue expuesto a cinco fungicidas, en donde resultó sensible a todos ellos, los cinco fungicidas mostraron diferencias

significativas ($P \leq 0.05$), en el porcentaje de inhibición de crecimiento micelial y en el porcentaje de inhibición de germinación de conidios.

El promedio mayor en el porcentaje de inhibición de crecimiento micelial e inhibición de la germinación de conidios lo mostró el fungicida pyraclostrobin+boscalid, el crecimiento del micelio fue inhibido totalmente en las cuatro concentraciones (100%), y el porcentaje promedio de inhibición de germinación de las cuatro concentraciones fue de 99.9%, en el Cuadro 1 se muestran los porcentajes de inhibición para las cuatro concentraciones evaluadas. Reuveni, (2006), reporta que pyraclostrobin+nicobifen inhibió la germinación y crecimiento de *A. alternata in vitro* a dosis de 79 $\mu\text{g/ml}$ y 4 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

El fungicida que mostró el menor porcentaje promedio tanto de inhibición de crecimiento micelial como de germinación de conidios fue boscalid con promedio de 73% y 2% respectivamente (Cuadro 1). Lo anterior puede ser debido a resistencia generada por el patógeno hacia este fungicida, esta resistencia ya ha sido reportada por Avenot y Michailides, (2007), en un estudio de sensibilidad *in vitro* evaluaron 108 aislamientos de *A. alternata* colectados de pistacho, 49 de ellos expuestos a boscalid previamente y encontraron que estos aislamientos presentaban una alta resistencia al fungicida, este estudio fue el primer reporte de resistencia de *A. alternata* a éste fungicida.

El fungicida tebuconazole inhibió en promedio un 96 % del crecimiento micelial, y 53% de la germinación de conidios, presentó mayor toxicidad sobre el crecimiento micelial (Cuadro 1). Meena, *et al.*, (2006), reporta a buen control por tebuconazole para el control de *A. alternata* en frutos de berenjena, éste fungicida mostró uno de los mejores controles junto con mancozeb+thiofanato-metil.

Iprodiona y pyrimetanil tuvieron el mismo efecto en el crecimiento de micelio con un promedio de 87 y 83 % de inhibición, pero un efecto distinto en la inhibición de germinación de conidios, iprodiona presentó mayor efecto en la inhibición (75% promedio), aun mayor que tebuconazole, mientras pyrimetanil solo presentó un promedio de 14 % de inhibición de germinación, el comportamiento anterior puede estar relacionado con el modo de acción de cada fungicida, iprodiona afecta la síntesis de ADN y el metabolismo de síntesis de lípidos desde la germinación de conidios, mientras pyrimetanil actúa inhibiendo la biosíntesis de la metionina, y su efecto es más evidente durante el crecimiento del micelio. Existe otros

fungicidas que no tiene el mismo efecto en la fase de crecimiento de micelio y germinación de conidios, en un estudio *in vitro* se encontró que azoxystrobin inhibía en un 98.5 y 99.5% la germinación de los conidios de *A. alternata* pero no reducía el desarrollo del micelio (Félix-Gastélum y Gálvez-Figueroa, 2002), lo anterior es necesario tomarlo en cuenta durante el manejo de la enfermedad.

Iprodiona presentó un control intermedio de *A. alternata*, ya antes había sido reportado su efecto para controlar este hongo. Kumar, *et al.*, (2006), reporta un 84.14% de inhibición de crecimiento micelial de una cepa de *A. alternata* que afecta frutos de mango; Tu, (1983), menciona que iprodiona controló a *A. alternata* y *Sclerotinia sclerotiorum* *in vitro* y en campo fue el más efectivo de seis fungicidas para controlar los dos patógenos en frijol.

Pero *A. alternata* no está exento de generar resistencia a fungicidas cuando es expuesto continuamente (Avenot, y Michailides, 2007), los fungicidas evaluados en este estudio pertenecen a diferentes familias químicas y con diferente sitios de acción por lo que la generación de resistencia es poco si se alterna su uso. Otras opciones para reducir el uso de fungicidas son los compuestos botánicos, Wu y XiaoDong, (2007), reportan el uso de aceites extraídos de eucalipto y cassia, los cuales tuvieron actividad antifúngica contra *A. alternata* *in vitro*, el aceite de cassia inhibió completamente el crecimiento del hongo a 300-500 ppm.

Cuadro 1. Influencia de fungicidas sobre el desarrollo micelial y germinación de conidios de *Alternaria alternata in vitro*.

Fungicida	Concentración (ppm)	PICM	PIG
Pyraclostrobin + boscalid	1	100 a	100 a
	10	100 a	99.5 a
	100	100 a	100 a
	200	100 a	100 a
Tebuconazole	1	84 bc	2.5 c
	10	100 a	8.5 c
	100	100 a	100 a
	200	100 a	99.5 a
Iprodiona	1	61 e	2 c
	10	99 ab	99 a
	100	95 b	100 a
	200	95 b	100 a
Pyrimetamil	1	64 e	3.5 c
	10	88 b	6.5 c
	100	90 b	41 b
	200	90 b	5.5 c
Boscalid	1	84 bc	3 c
	10	56 e	1.5 c
	100	72 d	2 c
	200	80 c	3 c

PICM= Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial

PIG= Porcentaje de inhibición de germinación de conidios

Medias con la misma letra no difieren estadísticamente (Tukey $\alpha= 0.05$).

CONCLUSIONES

Alternaria alternata fue más sensible al fungicida Pyraclostrobin+ Boscalid a las concentraciones de 1, 10, 100 y 200 seguido del Tebuconazole. Y el fungicida que mostró menos efectividad en inhibir tanto el desarrollo del micelio como la germinación de conidios fue boscalid.

LITERATURA CITADA

- Avenot, H.F., and T.J. Michailides. 2007. Resistance to boscalid fungicide in *Alternaria alternata* isolates from pistachio in California. *Plant Disease* 91:1345-1350.
- Eshel, D., R. Ben-Arie, A. Dinooor, and D. Prusky. 2000. Resistance of gibberellins-treated persimmon fruit to *Alternaria alternata* arises from the reduced ability of the fungus to produce endo-1,4- β -glucanase. *Phytopathology* 90:1256-1262.
- Félix-Gastélum, R., and Gálvez-Figueroa C.A. 2002. Control del moho negro, *Alternaria alternata* (Fr.:Fr) en el fruto de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) considerando unidades calor y variables ambientales para la aplicación de azoxystrobin en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20:72-76.
- Holmes, G.J., and J.W. Eckert. 1999. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to Postharvest citrus fungicides in California. *Phytopathology* 89:716-721.
- Kumar, M.K.P., V.B. Nargund, and A.N.A. Khan. 2006. Laboratory evaluation of fungicides and botanicals against *Alternaria alternata* causing post harvest disease in mango. *Mysore Journal of Agricultural Sciences* 40:21-26.
- Meena, S.C., S.C. Jain, S. Jacob. 2006. The post-harvest control of *Alternaria* fruit rot of brinjal using different fungicides and plant extracts. *Orissa Journal of Horticulture* 34:113-116.
- Mesbah, L.A., G.M. van der Weerden, H.J.J. Nijkamp, and J. Hille. 2000. Sensitivity among species of Solanaceae to AAL toxins produced by *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici*. *Plant Pathology* 49:734-741.
- Prusky, D., and R. Ben-Arie. 1981. Control by imazalil of fruit storage rots caused by *Alternaria alternata*. *Ann. Appl. Biol.* 98:87-92.
- Pryor, B. M., and T. J. Michailides. 2002. Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *Alternaria* late blight of pistachio. *Phytopathology* 92:406-416.
- Reis, R.F., A. de Goes, S.N. Mondal, T. Shilts, F.C. Brentu and L. W. Timmer. 2006. Effect of lesion age, humidify, and fungicide application on sporulation of *Alternaria alternata*, the cause of brown spot of tangerine. *Plant Disease* 90:1051-1054.

- Reuveni, M. 2006. Inhibition of germination and growth of *Alternaria alternata* and mouldy-core development in Red Delicious apple fruit by Bromuconazole and Sygnum. *Crop Protection* 25:253-258.
- Tu, J.C. 1983. Efficacy of iprodione against *Alternaria* black pod and white mold of white beans. *Canadian Journal of Plant Pathology* 5:133-135.
- Wu, F., and Z. XiaoDong. 2007. Essential oils to control *Alternaria alternata* *in vitro* and *in vivo*. *Food control* 18:1126-1130.

CAPÍTULO IV. EFECTO DE LA DENSIDAD DE PLANTACIÓN EN LA CALIDAD FISICA DEL FLORETE DE BRÓCOLI

RESUMEN

Durante el 2005 y 2006 se evaluaron ocho y doce cultivares comerciales de brócoli respectivamente, las cuales se sembraron a tres densidades de plantación (55, 65, 75 mil plantas/ha). Al momento de la cosecha se evaluó el diámetro del florete, diámetro de tallo hueco, número de minifloretes y se registró la pérdida de peso durante las 40 h posteriores a la cosecha. Los resultados mostraron que la densidad de plantación tiene un efecto inversamente proporcional al diámetro de florete y de tallo hueco. La densidad de 55,000 pl/ha produjo diámetros mayores de florete y de tallo hueco y la densidad de 75,000 pl/ha produjo diámetros menores. El cultivar 'Monaco' presentó el mayor promedio de diámetro de florete. 'Ironman' presentó el menor promedio de diámetro de tallo hueco. El número de minifloretes no estuvo influenciado por la densidad de plantación pero si por el cultivar, siendo 'Grandísimo' y 'Avenger' las que presentaron mayor cantidad de minifloretes. La menor pérdida de peso se registro en los floretes de brócoli procedentes de una densidad de plantación de 65,000 pl/ha. Palabras clave adicionales: *Brassica oleracea* var. *italica*, senescencia, postcosecha, calidad.

INTRODUCCIÓN

El brócoli (*Brassica oleracea* L.) es uno de los vegetales de mayor importancia económica a nivel mundial debido a sus valores medicinales y dietéticos, tanto las hojas como la inflorescencia tienen un alto valor nutricional debido a su contenido de proteínas, carbohidratos, fibra, calcio, hierro, etc., (Yanaguchi, 1983). El brócoli fresco es altamente perecedero con una vida de anaquel de 3 a 4 semanas a 0°C (Serrano, *et al.*, 2006; Makhoulf *et al.*, 1989) y 2 a 3 días a 20°C (Wang, 1977). El estrés de la cosecha es particularmente severo en los órganos que contienen tejidos inmaduros que estaban en crecimiento al momento de la cosecha (King y Morris, 1994), estos órganos son incapaces de mantener una homeostasis metabólica por lo que rápidamente senecen (Huber, 1987). Para mantener la calidad del brócoli después de la cosecha es esencial un preenfriamiento lo más rápido posible, para bajar la tasa de respiración y mantener los tejidos turgentes (Brennan and

Shewfelt, 1989). El deterioro del brócoli se manifiesta principalmente por la pérdida de peso, amarillamiento y endurecimiento del tallo (Serrano *et al.*, 2006). Las mayores pérdidas en azúcares, ácidos orgánicos y proteínas en minifloretes de brócoli fueron detectadas durante las primeras 6 h almacenado a 20°C en oscuridad (King y Morris, 1994), Finger *et al.*, 1999, mencionan que cabezas de brócoli almacenadas a 25°C y 96% de humedad relativa en oscuridad, mostraron una pérdida de turgencia y valor comercial a las 48 h después de la cosecha. Serrano *et al.*, (2006) encontraron que floretes del cultivar 'Marathon' almacenados a 1°C y 90% HR, perdieron un 46.3±1.04% de peso después de 20 días. Pramanik *et al.*, (2006), no encontraron cambios significativos en la pérdida de peso en floretes de brócoli almacenados por 7 y 14 días a 1°C, pero al transferirlos a 20°C por cinco días, la pérdida de peso se incremento gradualmente en ambos, registrándose una mayor tasa de respiración en los floretes almacenados por 7 días a 1°C.

El tamaño del florete (inflorescencia) es el principal carácter comercial en el brócoli (Wescott y Callan, 1990), y la densidad de plantación es el principal factor que afecta el rendimiento cuando este es expresado en base a un área (Wien y Wurr, 1997). Manipulando la densidad de plantación se puede ajustar el peso del florete a los diferentes mercados (Fernández *et al.*, 1991). La alta densidad de plantación en el cultivo del brócoli se ha relacionado con una reducción del tamaño y peso del florete, bajo número de retoños secundarios (Chung, 1982), menor diámetro de tallo, menor rendimiento por planta (Damato, 2000) y menor incidencia de tallo hueco (Zink y Ankana, 1951; Cutcliffe, 1972). Francescangeli *et al.*, (2006), encontraron que densidades de 2, 4, 6 y 8 plantas/m² no afectaban el periodo vegetativo ni reproductivo, así como tampoco el número de hojas del brócoli, pero si el área foliar, la longitud del tallo, la altura de la planta y el peso fresco y seco del florete, las tres primeras se incrementaron linealmente con el incremento en la densidad de plantación y las últimas dos decrecieron conforme la densidad de plantación se incremento. Albarracín *et al.*, (1995), mencionan que el diámetro de la inflorescencia es una característica importante en el brócoli, sobre todo cuando se comercializa por paquetes (una o varias inflorescencias atadas con una cuerda), ya que a mayor diámetro se necesitan menos inflorescencias para conformar la unidad de comercialización. La norma mexicana NMX-FF-046-1982 de la Secretaria de Comercio y Fomento Industrial establece que para la calidad México extra y México No. 1 el diámetro ecuatorial del brócoli debe ser mayor de 7 cm y que éste se encuentra en punto sazón

cuando las yemas están cerradas y la inflorescencia está compacta. Una de las características físicas que reducen la calidad del florete es la presencia del desorden llamado “Tallo hueco” es un defecto importante en la calidad del brócoli sobre todo para el mercado fresco, porque el tallo hueco, como su nombre lo indica es un hueco en el centro del tallo que se extiende por debajo del florete y queda expuesto al momento del corte (Hipp, 1974). El desorden es más severo cuando las plantas crecen rápidamente por altos niveles de fertilización de N, clima cálido, humedad adecuada y deficiencias de B (Vigier y Cutcliffe, 1985). La combinación de N y B en condiciones adecuadas para cada suelo y clima reducen la presencia de tallo hueco en brócoli (Moniruzzaman *et al.*, 2007).

Es esencial las evaluaciones de rendimiento y calidad de florete, para seleccionar cultivares que cumplan con los estándares del mercado actual (Sterrett *et al.*, 2004). El tiempo que transcurre entre la cosecha del brócoli y su consumo significa alteraciones en la composición del producto que pueden afectar su calidad. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del cultivar y densidad de plantación en parámetros de calidad física en el florete de brócoli.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ocho cultivares fueron evaluados durante el verano del 2005 y 12 durante el verano del 2006 en el campo experimental de SEMINIS-Estación de Investigación-Bajío, Apaseo el Grande, Guanajuato, México. Parcelas de aproximadamente 48 m² se trasplantaron con los cultivares 'Monaco', 'Domador', 'Heritage', 'Grandisimo', 'Marathon', 'Patron', 'Ironman' y 'Tlaloc' para el 2005 y para el 2006 fueron: 'Monaco', 'Domador', 'Heritage', 'Grandisimo', 'Marathon', 'Patron', 'Ironman', 'Legacy', 'Patriot', 'Avenger' y 'Maximo'. Las densidades de plantación fueron 55, 65, 75 mil plantas/ha, en una distribución de bloques al azar con dos repeticiones, el trasplante se realizó en el mes de julio y se cosechó la primera semana del mes de octubre para ambos años. Antes del trasplante se aplicó un herbicida, durante el desarrollo de la planta se aplicaron insecticidas y se hicieron dos escardas y un deshierbe manual, la fertilización fue 380-60-125 (N-P-K). La precipitación promedio en la región para los meses de julio a septiembre del 2005 fue de 89.8 y para el 2006 fue de 138.3 mm mensuales y la temperatura promedio fue de 20 °C para los mismos meses en ambos años (Estación CEBAJ Latitud: 20° 34' 00", Longitud: -100° 50' 00", Altitud: 1765 msnm).

Para las evaluaciones se tomaron floretes en madurez comercial, con grano compacto es decir sin abertura de flores.

Diámetro de cabeza y de tallo hueco. Se seleccionó una muestra de 10 floretes por parcela, al momento de la cosecha se marcaron y se midió en cada florete su diámetro ecuatorial y el diámetro del tallo hueco (desorden fisiológico) (Figura 1). Para realizar la evaluación se utilizó un vernier.

Número de minifloretes. De cada parcela se tomaron 4 floretes las cuales se seccionaron en minifloretes de acuerdo a la estructura de cada cultivar, los minifloretes se clasificaron en base a su diámetro en los siguientes: grandes (4.5-6 cm), medianos (3-4 cm) y pequeños (1-2 cm).

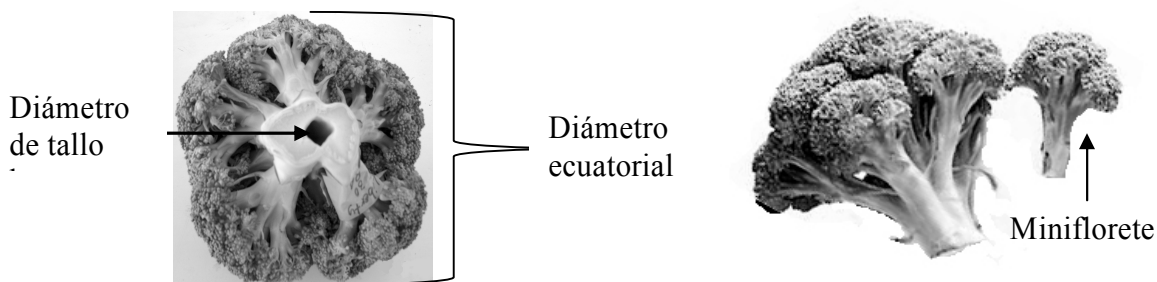


Figura1. Esquema de un florete de brócoli donde se muestran los parámetros evaluados.

Pérdida de peso. De cada parcela se tomó una muestra de 10 floretes de brócoli, las cuales se seleccionaron de la parte central de la parcela a fin de evitar la influencia de las orillas en el desarrollo del brócoli. Los floretes se marcaron y pesaron individualmente al momento de la cosecha, a las 5 h después de la cosecha (DDC) y posteriormente cada 10 horas hasta las 40 h DDC. Los floretes se almacenaron en contenedores de plástico de 50.9x 35.5x30.7 cm aproximadamente, con ranuras en los cuatro lados por donde circulaba el aire y se mantuvieron a una temperatura de ambiente de 18-25°C, con una humedad relativa promedio de 73% con 12 h luz y 12 horas oscuridad. Se utilizó una balanza portátil digital con capacidad de 6000 g y aproximación de 1 g (Ohaus Corp. Florham Park, NJ). La pérdida de peso acumulada fue expresada como porcentaje del peso original.

Análisis estadístico. Los datos obtenidos de cada una de las variables fueron analizados usando el análisis de varianza y el método de comparación de medias de Tukey ($\alpha=0.05\%$) con el paquete estadístico SAS[®] v8.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diámetro de florete. La densidad de plantación mostró efectos significativos ($P \leq 0.05$) en esta variable para ambos años. Para el 2005 cada una de las densidades de plantación tuvo un efecto estadísticamente diferente, el efecto de la densidad de plantación fue inversamente proporcional al diámetro de florete, ya que a mayor densidad de plantación menor fue el diámetro del florete (Cuadro 1). Y para el 2006 se observó una tendencia similar la densidad de 55,000 pl/ha produjo el mayor diámetro de florete (21 cm) pero las densidades de 65,000 y 75,000 pl/ha produjeron el mismo efecto con un diámetro de 20.1 y 19.6 cm respectivamente (Cuadro 1). El hecho de que a mayor densidad se obtengan diámetros de florete menores ya ha sido reportado por Damato (2000) y Chung (1982). Lo anterior es un aspecto positivo para las empresas procesadoras ya que es menor el número de cortes que requiere el florete para su procesamiento. A pesar de que se obtienen diámetros más pequeños de floretes en densidades altas, el rendimiento por área no es afectado, esto lo confirma un estudio realizado por Moniruzzaman *et al.*, (2007), donde decrece el peso del florete por un decremento en el diámetro del tallo, sin embargo el rendimiento es compensado con el incremento en la productividad por área.

El efecto del cultivar en el diámetro del florete fue significativo en ambos años ($P \leq 0.05$), para el 2005, 'Patron' y 'Monaco' tuvieron el mismo efecto registrando el mayor promedio en diámetro de florete 17.7 cm; 'Ironman' fue el cultivar que registró el menor promedio en diámetro de florete (14.8 cm) (Cuadro 2). La combinación entre densidades y cultivar no tuvo efectos significativos en el diámetro de florete para el 2005. Para el 2006 los cultivares 'Maximo' y 'Monaco' tuvieron el mismo efecto registrando el mayor promedio en diámetro de florete (22.1 cm), el cultivar que produjo el menor diámetro fue 'Grandísimo' con 17.3 cm promedio (Cuadro 3). La combinación de densidad y cultivar tuvo efectos significativos en el 2006, los cultivares 'Monaco' y 'Heritage' sembrados a 55,000 pl/ha tuvieron el mismo efecto en el diámetro de florete, registrando los promedios más altos (22.7 y 22.6 cm

respectivamente), el promedio en diámetro de florete más bajo lo registro la combinación 'Patriot' sembrado a 65,000 pl/ha (15.4 cm) (Figura 2B).

Albarracín *et al.*, 1995, evaluaron el diámetro de inflorescencias de cultivares de brócoli, en el municipio de Carayaca, Venezuela, los cultivares con los mayores diámetros (16 cm) fueron 'Green Valiant', 'Pirate' y 'High Sierra', en este caso el cultivar 'Monaco' registro el mayor diámetro de florete para ambos años, lo anterior puede ser importante cuando se requiere aumentar el rendimiento por unidad de área y no se puede aumentar la densidad de plantación, o cuando el mercado requiere de floretes con un diámetro grande. Albarracín *et al.*, (1995), afirman que cultivares con inflorescencias de mayor diámetro tienen más potencial de generar un ingreso mayor por unidad de área.

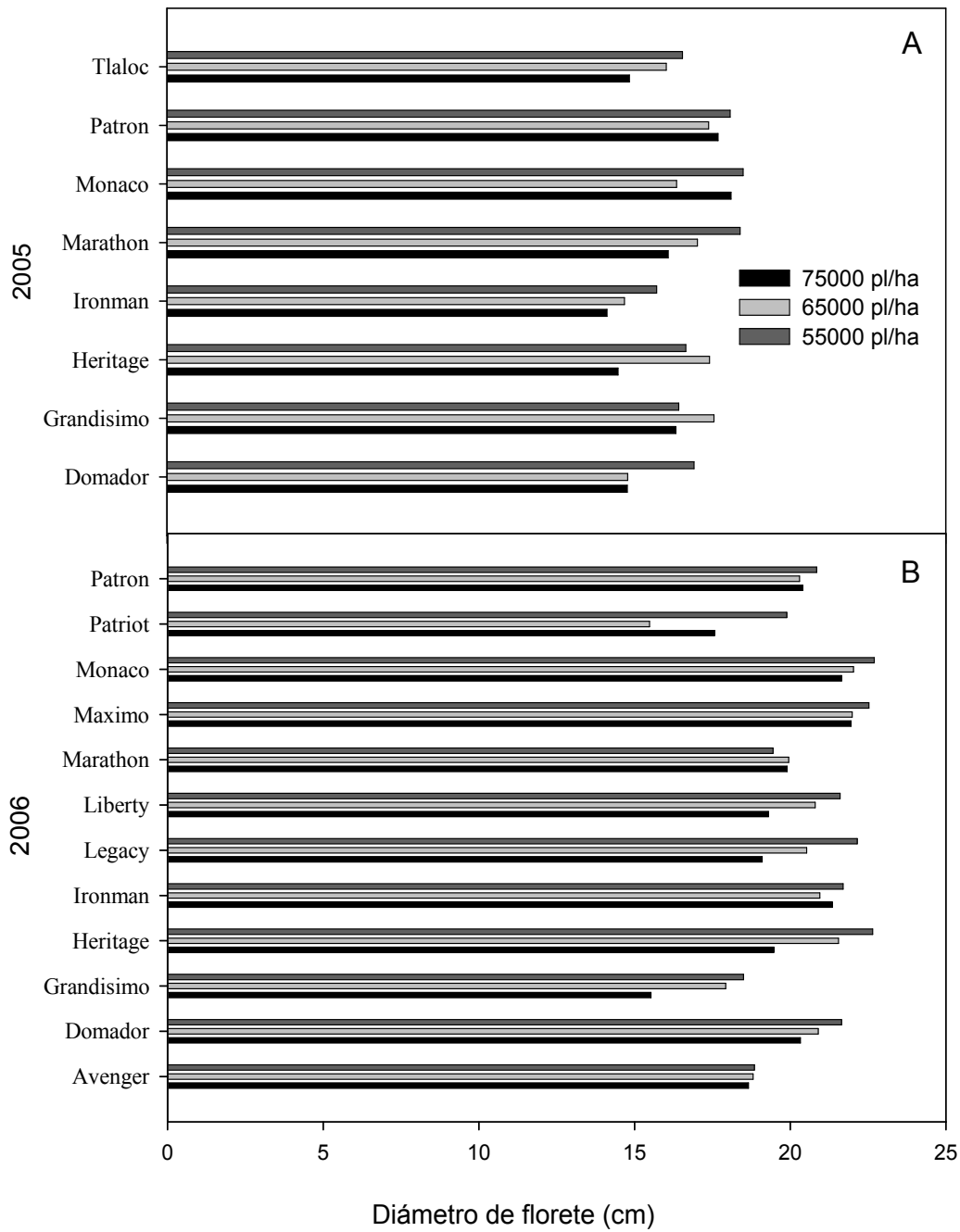


Figura 2. Diámetro de florete de los cultivares de brócoli sembrados a tres densidades de plantación durante el 2005 y 2006 en Apaseo el Grande, Guanajuato, México.

Diámetro de tallo hueco. La densidad de plantación tuvo efectos significativos en el diámetro de tallo hueco en ambos años ($P \leq 0.05$). En el 2005 cada una de las densidades de plantación tuvo un efecto diferente en la variable, la densidad de plantación fue inversamente proporcional al diámetro de tallo hueco, a mayor densidad se observó menor diámetro de tallo hueco (Cuadro 1). Para el 2006, las densidades de plantación de 55,000 y 65,000 pl/ha tuvieron el mismo efecto en el diámetro de tallo hueco presentaron los mayores promedios, 1.7 y 1.6 cm respectivamente. La densidad de 75,000 pl/ha registró el menor diámetro de tallo hueco (1.5 cm) (Cuadro 1). Los resultados obtenidos concuerdan con lo observado por Hipp, (1974) y Cutcliffe, (1972), donde a mayor densidad de plantación menor incidencia de “tallo hueco”, lo anterior pudo deberse a que la absorción de N por la planta (Moniruzzaman *et al*, 2007), fue más lenta por la competencia poblacional y por lo tanto se redujo su tasa de crecimiento lo que favoreció un menor diámetro de tallo hueco. Hipp (1974), menciona que es factible reducir la presencia de tallo hueco alargando el ciclo de crecimiento a más de 110 días entre el trasplante y la cosecha, en este estudio los ciclos fueron de 80 días aproximadamente por lo que si se observó presencia de tallo hueco en todos los cultivares como se menciona posteriormente.

El efecto del cultivar fue significativo en el 2005 y 2006 ($P \leq 0.05$). Para el 2005 los cultivares 'Monaco' y 'Tlaloc' tuvieron el mismo efecto presentando el promedio de diámetro de tallo hueco mayor 1.2 cm, el cultivar con menor promedio fue 'Ironman' con 0.5 cm (Cuadro 2). Para el 2006 el cultivar 'Maximo' presentó el mayor promedio (2.2 cm) y 'Ironman' presentó el menor promedio (0.9 cm) (Cuadro 3).

Las combinaciones de densidades con cultivares produjeron diferencias estadísticas durante el 2005 y 2006. Para el 2005 los cultivares 'Tlaloc', 'Domador', 'Monaco' y 'Heritage' a una densidad de plantación de 55,000 pl/ha registraron los promedios de diámetro de tallo hueco mayores 1.41, 1.37, 1.35 y 1.2 cm respectivamente (Figura 3A). El tratamiento que produjo el menor promedio en diámetro de tallo hueco (0.05 cm) fue el cultivar 'Ironman' a una densidad de plantación de 75,000 pl/ha (Figura 3A). Para el 2006 el cultivar 'Maximo' a una densidad de plantación de 65,000 pl/ha registró el mayor promedio de diámetro de tallo hueco (2.2 cm) y 'Ironman' a la densidad de 75,000 y 65,000 pl/ha produjo el menor promedio de diámetro (0.7 cm), como se muestra en la Figura 3B.

Para reducir el tallo hueco hay que combinar varios factores como son la fertilización combinando N y B de manera adecuada (Moniruzzaman *et al.*, 2007), una alta densidad de plantación y un cultivar que sea menos propenso al desarrollo del desorden, en este caso 'Ironman' fue el cultivar más tolerante al desorden de tallo hueco, en los dos años de estudio fue la que presentó menor diámetro, lo anterior es importante considerarlo cuando el florete será destinado al mercado fresco, ya que como menciona Hipp, (1974) es un defecto visible que le resta calidad al brócoli.

Tanto el diámetro de cabeza y el diámetro de tallo hueco fueron mayores en los cultivares cultivados durante el 2006 (Cuadro 1), posiblemente la gran diferencia entre ambos años, fue que durante el 2006 en los meses cultivo (julio a septiembre) la precipitación en la región fue de 138.3 mm mensuales, mientras que en los mismos meses del 2005 fue de 89.8 mm mensuales, este aumento en la precipitación durante el 2006 pudo haber influenciado un mayor y más rápido desarrollo de las plantas, lo que resultó en un mayor diámetro de florete y de tallo hueco.

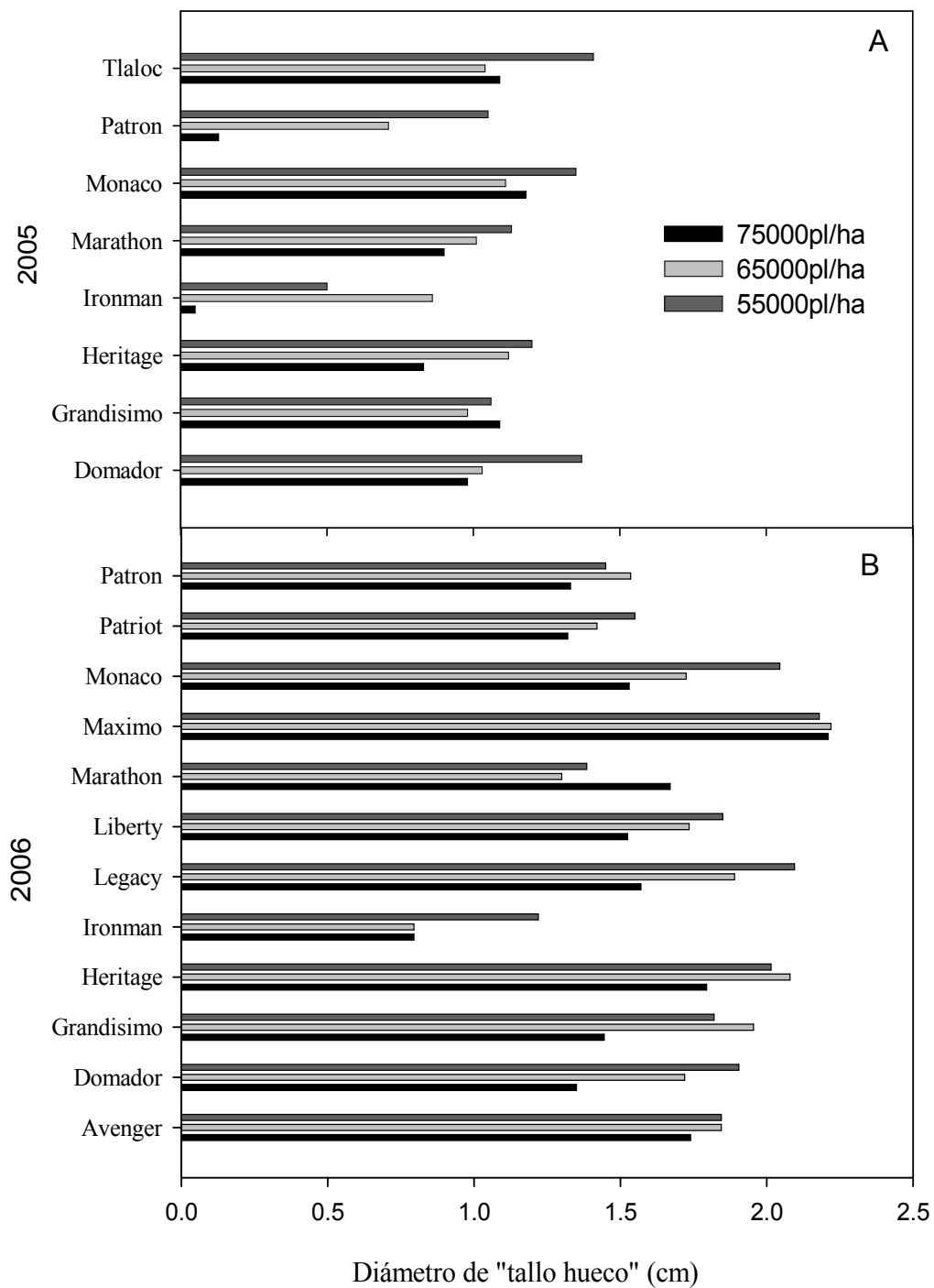


Figura 3. Diámetro de tallo hueco de los cultivares de brócoli sembrados a tres densidades de plantación durante el 2005 y 2006 en Apaseo el Grande, Guanajuato, México.

Número de minifloretes. Para ambos años, la densidad de plantación no mostró diferencias estadísticas en el número de minifloretes (Cuadro 1), pero si fue significativo para ambos años el efecto del cultivar en el número de minifloretes por cabeza. En el 2005 'Grandísimo' fue el cultivar que presentó un mayor número de minifloretes (11) y 'Ironman' fue el que presentó menor número (6) (Cuadro 2). No hubo diferencias estadísticas entre el número de minifloretes grandes, medianos y pequeños (promedio de 8 por cabeza) que se formaron durante los meses de cultivo del 2005 (Figura 4A).

Para el 2006, el cultivar 'Avenger' presentó el mayor número de minifloretes (9) y 'Patriot' el menor (7) (Cuadro 3). El promedio de minifloretes grandes fue significativamente mayor (13 por cabeza), que los medianos y pequeños los cuales se formaron 6 y 5 respectivamente (Figura 4B).

En este caso, el número de minifloretes que llegaron a formar las cabezas, únicamente fue influenciado por el cultivar. 'Grandísimo' y 'Avenger' presentaron la mayor cantidad de minifloretes, lo anterior puede estar relacionado con su genotipo que determina su estructura morfológica (Figura 4). El hecho de que durante el 2006 se obtuvieran mayor número de minifloretes grandes, posiblemente está relacionado con el mayor diámetro de florete obtenido por una mayor precipitación durante el periodo de cultivo, ya que la luz, la temperatura y la lluvia juegan un papel importante en el crecimiento y rendimiento del brócoli (Ahmen y Siddique, 2004).

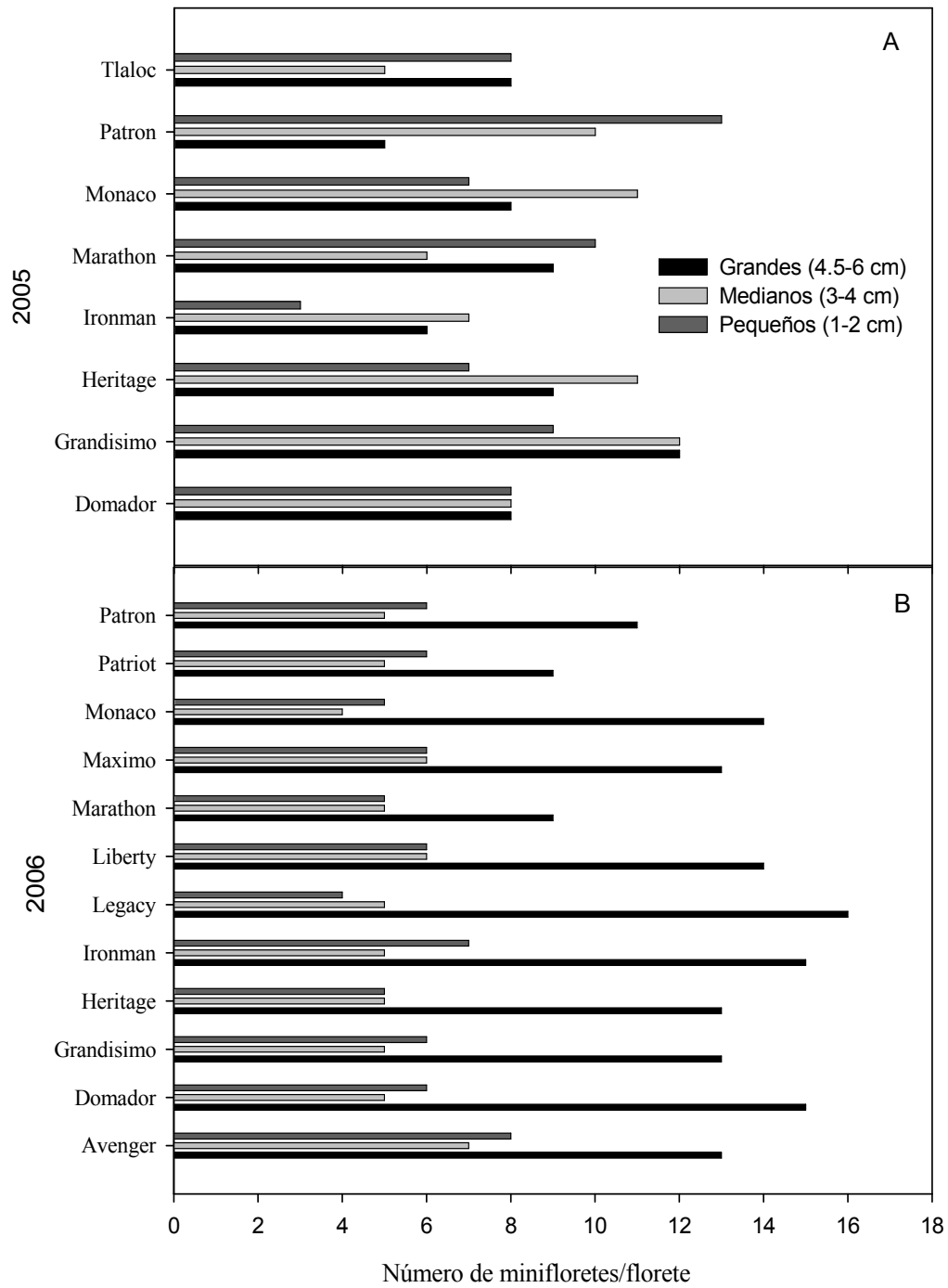


Figura 4. Número de minifloretes en los cultivares comerciales de brócoli sembrados durante el 2005 en Apaseo el Grande, Guanajuato, México.

Pérdida de peso. Las muestras procedentes de las tres densidades de plantación, a las cuales se les evaluó la pérdida de peso durante las 40 h posteriores a la cosecha mostraron una reducción progresiva del peso a través del tiempo. Las altas temperaturas (18-25°C) y la baja humedad relativa (73%) afectaron a todos los cultivares causando una deshidratación continua conforme transcurrió el tiempo, esta pérdida de agua se manifestó en la pérdida de turgencia (firmeza) en los tejidos, este comportamiento también fue observado por Finger *et al.*, (1999), en inflorescencias de brócoli almacenadas a 25°C y 96% de humedad relativa en obscuridad hasta la senescencia completa, los floretes mostraron ausencia de turgencia y valor comercial cuando la pérdida de peso alcanzó el 5%, coincidiendo con 48 h después de la cosecha. En este caso se registraron porcentajes de pérdida peso a las 40 h DDC de 10 a 16.9 % (Cuadros 2 y 3), con lo cual el valor comercial se había perdido por la flacidez que mostraban los tejidos. Toivonen, (1997), también reportó una tasa constante de pérdida de peso en brócoli almacenado a 13°C y 95% de humedad relativa, en floretes cubiertos y no cubiertos con película microperforada, además encontró que la firmeza se reduce por que la pérdida de peso está fuertemente asociada con ella. Pramanik *et al.*, 2004, encontró en floretes de brócoli almacenados durante 5 días a 20° C, una alta tasa de pérdida de peso durante el primer día, la cual decayó y se estabilizó durante las siguientes 24 h, además reportan la presencia de amarillamiento en el florete entre el 3 y 4 día como un síntoma de senescencia.

El análisis estadístico mostró que la densidad tuvo un efecto significativo en el porcentaje de pérdida de peso ($P \leq 0.05$) para ambos años. En el 2005, los floretes procedentes de la densidad de 75,000 pl/ha registraron la mayor pérdida de peso (14.3%) en las 40 h DDC, seguida de 55,000 pl/ha (13.2%) y la que registró menor pérdida de peso fue la de 65000 pl/ha con 13.1% (Cuadro 1). Para el 2006, la densidad de 75,000 y la de 55,000 pl/ha tuvieron el mismo efecto en la pérdida de peso, registrando los mayores promedios 14.6 y 14.4 % respectivamente, mientras la densidad de 65,000 pl/ha tuvo el menor porcentaje de pérdida de peso (13.2%) (Cuadro 1). Los resultados anteriores nos muestran que en términos generales la mayor y la menor densidad de plantación produjeron floretes que perdieron mayor porcentaje de peso, lo anterior puede ser explicado tomando en cuenta los diámetros de florete que se obtuvieron en cada una de ellas. En la densidad de 55,000 pl/ha se obtuvieron diámetros de floretes mayores por lo que el área expuesta al ambiente es mayor y por tanto se da una mayor pérdida de agua por deshidratación, que se traduce en un alto porcentaje de pérdida de peso

por florete. En el caso contrario los floretes pequeños procedentes de la densidad de 75,000 pl/ha, el área de exposición al ambiente es menor pero el porcentaje de pérdida de peso es alto en relación al peso original -el cual es menor que el peso de los floretes procedentes de 55,000 pl/ha-.

En cuanto al efecto del cultivar en el porcentaje de pérdida de peso no hubo diferencias significativas ($P \leq 0.05$) para el 2005 (Cuadro 2). Durante el 2006, el cultivar si mostró un efecto significativo en el porcentaje de pérdida de peso ($P \leq 0.05$), el cultivar que presentó mayor porcentaje de pérdida de peso fue 'Patriot' con 16.9 % y los que presentaron menor porcentaje fueron 'Marathon' (12.4%), 'Legacy' (12.6%), 'Domador' (12.7 %), 'Maximo' (12.7%) y 'Heritage' (13.1%) (Cuadro 3). En general se observó que los cultivares que produjeron un florete pequeño la pérdida de peso se traducía en un mayor porcentaje, la pérdida de peso también estuvo influenciada por la arquitectura del florete, ya que los cultivares con un domo compacto fueron menos propensas a la pérdida de peso, quizás por la reducción del área expuesta al ambiente lo que redujo la deshidratación de los tejidos.

Las combinaciones que registraron menor pérdida de peso durante el 2005 fueron 'Domador' a 65,000 pl/ha (12%) y 'Tlaloc' a 55,000 pl/ha (11.8%) (Figura 5B 5C). Y para el 2006 la combinación que registro menor porcentaje de pérdida de peso fue 'Maximo' a una densidad de 65,000 pl/ha (Figura 5E).

La pérdida de peso significa pérdidas económicas en la cadena de comercialización porque el peso del producto y su turgencia es menor. Para evitar la deshidratación y mantener una buena calidad del brócoli se recomiendan atmosferas modificadas, hidroenfriamiento y bajas temperaturas (Toivonen, 1997; Carvalho y Clemente, 2004; Serrano *et al.*, 2006).

Cuadro 1. Efecto de la densidad de plantación en las variables de calidad evaluadas durante el 2005 y 2006 en Apaseo el Grande, Guanajuato, México.

	Pérdida de peso (%)		Tallo hueco (cm)		Diámetro de florete (cm)		Número de minifloretes	
	2005	2006	2005	2006	2005	2006	2005	2006
55000 pl/ha	13.2 ab	14.7 a	1.1 a	1.8 a	17.1 a	21.0 a	8.7 a	8.3 a
65000 pl/ha	13.1 b	13.2 b	0.9 ab	1.7 a	16.4 ab	20.1 b	8.5 a	7.9 a
75000 pl/ha	14.3 a	14.4 a	0.7 b	1.5 b	15.8 b	19.6 b	7.7 a	7.7 a

Medias con la misma letra no difieren estadísticamente (Tukey $\alpha=0.05$).

Cuadro 2. Efecto del cultivar en las variables de calidad evaluadas durante el 2005 en Apaseo el Grande, Guanajuato, México.

	Pérdida de peso (%)	Tallo hueco (cm)	Diámetro de florete (cm)	Número de minifloretes
'Ironman'	15.1 a	0.5 c	14.8 b	5.5 b
'Heritage'	10.0 a	1.1 ab	16.2 ab	8.8 ab
'Patron'	13.8 a	0.6 bc	17.7 a	9.3 ab
'Marathon'	13.5 a	1.0 ab	17.2 ab	8.3 ab
'Grandisimo'	13.3 a	1.0 ab	16.8 ab	11.0 a
'Monaco'	12.9 a	1.2 a	17.7 a	8.4 ab
'Domador'	12.9 a	1.1 ab	15.5 ab	8.0 ab
'Tlaloc'	12.7 a	1.2 a	15.8 ab	7.3 ab

Medias con la misma letra no difieren estadísticamente (Tukey $\alpha=0.05$).

Cuadro 3. Efecto del cultivar en las variables de calidad evaluadas durante el 2006 en Apaseo el Grande, Guanajuato, México.

	Pérdida de peso (%)	Tallo hueco (cm)	Diámetro de florete (cm)	Número de minifloretes
'Marathon'	12.4 c	1.4 c	19.7 c	6.6 ab
'Legacy'	12.6 c	1.8 ab	20.5 b	8.1 ab
'Domador'	12.7 c	1.6 bc	20.9 ab	8.6 ab
'Maximo'	12.7 c	2.2 a	22.1 a	8.3 ab
'Heritage'	13.1 c	1.9 ab	21.2 ab	8.0 ab
'Ironman'	14.1 bc	0.9 d	21.3 ab	8.7 ab
'Monaco'	14.3 bc	1.7 bc	22.1 a	8.0 ab
'Liberty'	14.4 bc	1.7 bc	20.5 b	8.6 ab
'Avenger'	14.5 bc	1.8 ab	18.7 cd	9.2 a
'Patron'	15.6 ab	1.4 c	20.5 b	7.3 ab
'Grandísimo'	15.8 ab	1.7 bc	17.3 e	7.7 ab
'Patriot'	16.9 a	1.4 c	17.6 de	6.5 ab

Medias con la misma letra no difieren estadísticamente (Tukey $\alpha=0.05$).

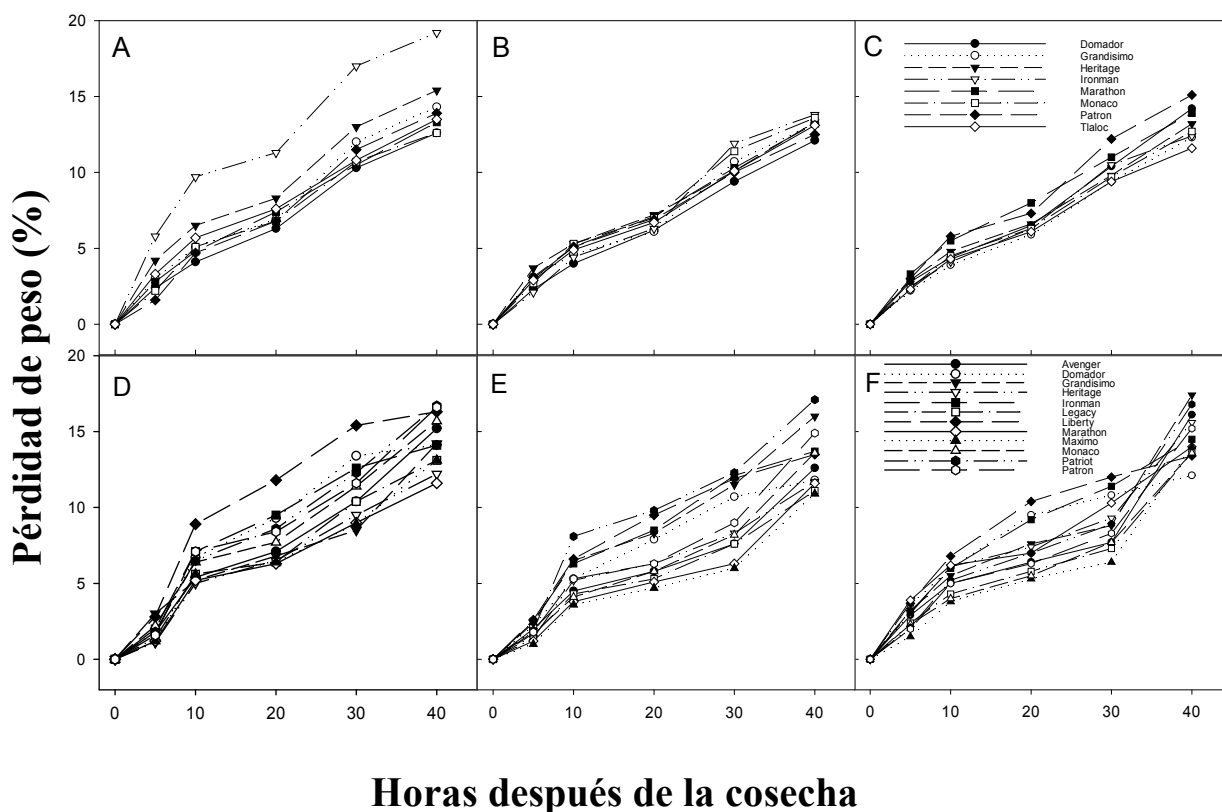


Figura 5. Porcentaje de pérdida de peso en cultivares de brócoli durante las 40 h posteriores a la cosecha (A) (B) y (C) cultivares evaluados durante el 2005, sembradas a una densidad de plantación de 75000, 65000 y 55000 pl/ha respectivamente; (D) (E) y (F) cultivares evaluados durante el 2006 sembradas a una densidad de plantación de 75000, 65000 y 55000 pl/ha respectivamente.

CONCLUSIONES

1. El diámetro de florete y de tallo hueco fueron significativamente menores en los floretes procedentes de la densidad de plantación de 75,000 plantas/ha, y la densidad de plantación de 55,000 pl/ha presentó los mayores diámetros de florete y de tallo hueco.
2. El cultivar 'Monaco' registró el mayor promedio de diámetro de florete al momento de la cosecha.
3. El cultivar 'Ironman' presentó el menor promedio de diámetro de tallo hueco

4. El número de minifloretes no estuvo influenciado por la densidad de plantación, pero si por el cultivar, 'Grandísimo' y 'Avenger' presentaron la mayor cantidad de minifloretes.
5. La menor pérdida de peso se registro en los floretes de brócoli procedentes de una densidad de plantación de 65,000 pl/ha.

AGRADECIMIENTOS

A la empresa SEMINIS-Estación de Investigación Bajío, por el apoyo brindado durante el establecimiento y desarrollo del experimento.

LITERATURA CITADA

- Albarracín M, C Berbin, W Machado (1995) Evaluación agronómica de cultivares de brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). Rev. Fac. Agron (Maracay) 21:71-83.
- Ahmed M J, W Siddique (2004) Effect of sowing dates on growth and yield of broccoli (*Brassica oleracea* L.) under rawalakot conditions. Asian J. Plant Sci. 3:167-169.
- Brennan P S, R L Shewfelt (1989) Effect of cooling delay at harvest on broccoli quality during postharvest storage. J. Food Quality 12:13-22.
- Carvalho P de T, E Clemente (2004) The influence of the broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) fill weight on postharvest quality. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas 24:646-651.
- Chung B (1982) Effects of plant density on the maturity and once over harvest yields of broccoli. J. Hortic. Sci. 57:365-372.
- Cutcliffe J A (1972) Effects of plant spacing and nitrogen on incidence of hollow stem in broccoli. Can. J. Plant Sci. 52:833-834.
- Damato G (2000) Late sowing dates and high plant density in six cultivars of broccoli for processing. Acta Hort. 533:267-274.
- Fernández J A, A González, S Bañón, A García (1991). La producción de brócoli: influencia de la densidad de plantación y de la disposición de las plantas. Hortofruticultura 10:58-64.
- Finger F L, L Endres, P R Mosquim, M Puiatti (1999) Physiological changes during postharvest senescence of broccoli. Pesq. Agropec. Bras., Brasília. 34:1565-1569.

- Francescangeli N, M A Sangiacomo, H Martí (2006) Effects of plant density in broccoli on yield and radiation use efficiency. *Sci. Hort.* 110:135-143.
- Hipp B W (1974) Influence of nitrogen and maturity rate on hollow stem in broccoli. *Hort Sci.* 9:68-69.
- Huber D J (1987) Postharvest senescence: an introduction to the symposium. *HortScience* 22:853-854.
- King G A, S C Morris (1994) Early compositional changes during postharvest senescence of broccoli. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119:1000-1005.
- Makhlouf J, C Willemot, J Arul, F Castaigne, J-P Emond (1989) Long-term storage of broccoli under controlled atmosphere. *HortScience* 24:637-639.
- Moniruzzaman M, S M L Rahman, M G Kibria, M A Rahman, M M Hossain (2007) Effect of boron and nitrogen on yield and hollowstem of broccoli. *J. Soil Nature* 1:24-29.
- Pramanik B K, T Matsui, H Suzuki, Y Kosugi (2004) Changes in activities of sucrose synthase and sucrose phosphate synthase and sugar content during postharvest senescence in two broccoli cultivars. *Asian J. Plant Sci.* 3:398-402.
- Pramanik B K, T Matsui, H Suzuki, Y Kosugi (2006) Compositional and some enzymatic changes relating to sugar metabolism in broccoli during storage at 1°C and subsequent senescence at 20°C. *Acta Hort.* 706:219-227.
- Serrano M, D Martínez-Romero, F Guillén, S Castillo, D Valero (2006) Maintenance of broccoli quality and functional properties during cold storage as affected by modified atmosphere packaging. *Post. Biol.Tech.* 39:61-68.
- Sterrett S B, K G Haynes, C P Savage, Jr (2004) Cluster analyses on quality attributes identify broccoli cultivars suitable for early and main-season harvests on the eastern shore of Virginia. *HorTechnology* 14:376-380.
- Toivonen P M A (1997) The effects of storage temperature, storage duration, hydro-cooling, and micro-perforated wrap on shelf life of broccoli (*Brassica oleracea* L., *italica* group). *Post. Biol. Tech.* 10:59-65.
- Vigier B, J A Cutcliffe (1985) Influence of boron and nitrogen rate on incidence of hollow stem in broccoli. *Can. J. Plant Sci.* 65:421-424.
- Wang C Y (1977) Effect of aminoethoxy analog of rhizobitoxine and sodium benzoate on senescence of broccoli. *HortScience* 12:54-56.

- Wescott H C, N.W Callan (1990) Modeling plant population and rectangularity effects on broccoli head weights and yield. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 115:893-897.
- Wien H D, D C E Wurr (1997) Cauliflower, broccoli, cabbage and Brussels sprouts. In: Wien H C (Ed). *The physiology of vegetable crops.* CAB International. 511-552 pp.
- Yanaguchi M (1983) *World vegetable principles, production and nutritive values.* AVI Publishing Company, INC. Westport, Connecticut, USA. 405 p.
- Zink F W, D A Ankana (1951). The effect of spacing on the growth of sprouting broccoli. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 58:160-164.

CAPÍTULO V. HISTOPATOLOGÍA DE LA RESPUESTA VARIETAL DE BRÓCOLI A *Hyaloperonospora parasitica*

RESUMEN

La respuesta de cuatro cultivares comerciales de *Brassica oleracea* var *italica* con diferente grado de susceptibilidad a *Hyaloperonospora parasitica* fue determinada usando técnicas histopatológicas. Plántulas de los cultivares ‘Monaco’-susceptible, ‘Patron’-tolerancia intermedia, ‘Heritage’-tolerancia alta y ‘Maximo’-resistente fueron inoculadas con el patógeno en etapa de cotiledón determinando el proceso de colonización del patógeno en cada cultivar, el número de haustorios, sitios de emergencia de esporangióforos, grosor de cutícula y número de estomas. Las reacciones diferenciales entre cultivares se observaron a partir del segundo después de la inoculación (DDI). La interacción compatible en el cultivar susceptible ‘Monaco’ fue caracterizada por una rápida dispersión de las hifas del patógeno entre las células de la epidermis y del parénquima con una alta formación de haustorios y esporangióforos, ausencia de células necrosadas (Reacción de hipersensibilidad (RH)). El cultivar ‘Patron’ presentó incompatibilidad parcial, la cual se caracterizó por presentar RH en pocos sitios de infección y solo en etapas tempranas del proceso de colonización, después del 3 DDI el desarrollo fue similar a la interacción compatible, aunque con un menor desarrollo de haustorios. Las interacciones incompatibles en los cultivares ‘Heritage’ y ‘Maximo’ se caracterizaron por presentar una rápida y abundante RH a partir del 2 DDI y continuó durante el proceso de colonización; presentaron un menor número de haustorios y en el caso de ‘Maximo’ no hubo desarrollo de esporangióforos. El número de estomas puede estar influyendo en el nivel de resistencia, ya que el cultivar susceptible presentó el mayor número de estomas por mm² y el cultivar resistente el menor número. ‘Maximo’ presentó mayor resistencia al patógeno, restringiendo su desarrollo mediante reacciones de hipersensibilidad. Palabras clave adicionales: patógeno biotrófico, *Peronospora parasítica*, resistencia, parásito obligado, mildiu.

INTRODUCCIÓN

Hyaloperonospora parasitica (Pers.:Fr) Constant., es un patógeno biotrófico obligado que causa el daños en varias plantas del género *Brassica* (Silué *et al.*, 1996; Coelho and Monteiro, 2003a; Mims *et al.*, 2004; Monteiro *et al.*, 2005). La infección en los semilleros es muy frecuente, principalmente en invernaderos, donde la densidad de plantación es muy alta (Monteiro *et al.*, 2005). Las infecciones severas en variedades susceptibles de *Brassica oleracea* pueden detener el crecimiento o causar la muerte de la plántula (Silué *et al.*, 1996). El brócoli (*Brassica oleracea*, var. *italica*) es susceptible a la infección por *H. parasítica* en todas sus etapas de desarrollo, la infección en etapa de plántula suele ser muy destructiva, ya que los cotiledones y las hojas jóvenes son muy vulnerables al ataque (Wang *et al.*, 2001; Farnham *et al.*, 2002). El uso de fungicidas para el control del mildiu tiene consecuencias adversas para el ambiente (Farnham *et al.*, 2002; Coelho and Monteiro, 2003b); y el desarrollo de resistencia por parte del patógeno (Brophy *et al.*, 1993; Coelho *et al.*, 1998), por lo que el uso de variedades resistentes es una alternativa eficiente para el manejo de la enfermedad (Thomas and Jourdain, 1990; Silué *et al.*, 1996; Farnham *et al.*, 2002).

La inoculación de cotiledones es un método rápido para distinguir variedades de brassicas altamente resistente, moderadamente resistentes y susceptibles a mildiu en invernadero (Natti, 1958). Natti *et al.*, (1967) y Farnham *et al.*, (2002), encontraron que la resistencia a *H. parasitica* en plántulas del género *Brassica* era gobernada por un gen dominante para cada raza del patógeno, Jensen *et al.*, (1999) y Wang *et al.*, (2000) mencionan que la selección de plantas resistentes en etapa de cotiledón puede ser efectiva para identificar plantas con altos niveles de resistencia en etapa adulta. Sin embargo, Dickson y Petzoldt, (1993), encontraron que la resistencia al patógeno en brócoli dependía de la edad, y que los genes que regulan dicha resistencia se modifican con la edad de la planta, ya que las variedades resistentes en etapa de plántula no fueron resistentes en etapa adulta. Greenhalgh y Mitchell, (1976), atribuyen la resistencia en plántulas de algunas brassicas a la habilidad de producir allyl isothiocianato, el cual es tóxico al patógeno.

Al evaluar la resistencia a *H. parasítica*, basada en parámetros bioquímicos y citológicos Kluczewski y Lucas, (1982), encontraron que en plántulas de *B. Napus*, parcialmente resistentes al patógeno, se desarrollaba una extensa necrosis en las células del mesófilo, así como una reducción del desarrollo micelial y de la esporulación del patógeno; por otra parte,

plántulas de *B. oleracea* susceptibles al patógeno, las células penetradas por los haustorios continuaban aparentemente sanas y sin necrosis por varios días, además presentaron un incremento en la salida de electrolitos, y en la actividad de las enzimas B-glucosidasa, ribonucleasa y peroxidasa.

Soylu *et al.*, (2004), documentaron la ultraestructura de *H. parasitica* en respuesta a interacciones compatibles e incompatibles con *Arabidopsis thaliana*. La interacción compatible se caracterizó por una dispersión rápida intercelular de las hifas, una frecuencia alta de formación de haustorios en las células del mesófilo y producción de esporangios en ausencia de células necrosadas del hospedero; la interacción incompatible se caracterizó por una esporulación leve, formación de manchas necróticas y principalmente por una ocurrencia rápida de la reacción de hipersensibilidad (HR). Türk, (2002), observó en cotiledones de *A. thaliana* una restricción temprana de *H. parasitica*, acompañada por respuesta de HR en variedades que con cierto grado de resistencia, mientras que en variedades susceptibles el patógeno creció extensamente en los espacios intercelulares con la formación de haustorios en células epidermales y del mesófilo sin ninguna respuesta por parte del hospedante.

Diferentes mecanismos de resistencia pueden operar en fases diferentes del proceso de infección (Heath, 1974). Los genotipos de las plantas difieren en los mecanismos de resistencia que operan pre y/o posthaustorial (Jacobs and Buurlage, 1990). El propósito de este estudio fue identificar histológicamente las reacciones de defensa en plántulas de cultivares comerciales de brócoli con diferentes grados de resistencia a *H. parasitica*, con el fin de definir en los diferentes tipos de interacción cual es el principal mecanismo que utiliza la planta para restringir el desarrollo del patógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de inóculo. El inóculo de *H. parasitica* se obtuvo de plantas de brócoli infectadas naturalmente. Se seleccionaron hojas de planta adulta de los cultivares comerciales ‘Monaco’, ‘Grandísimo’, ‘Marathon’ y ‘Domador’ con abundante esporulación del patógeno. Las hojas infectadas se mantuvieron a 4°C por 48 h, posteriormente se hizo un raspado y filtrado de esporangios del patógeno para obtener una suspensión de ellos en agua destilada estéril.

Material vegetal. Cuatro cultivares comerciales de brócoli con diferentes niveles de resistencia al patógeno fueron seleccionados para el estudio de las respuestas celulares a la infección por mildiu. ‘Heritage’ (Seminis, Inc. San Luis Missouri, EU) y ‘Maximo’ (Sakata Seed Co. Yokohama, Japón) fueron seleccionados por presentar bajos niveles de infección; ‘Patron’ (Sakata Seed Co. Yokohama, Japón) fue seleccionado por presentar una tolerancia intermedia y ‘Monaco’ (Rogers/Syngenta Seed, Inc. Basilea, Suiza) fue incluido como susceptible. 120 semillas de cada cultivar fueron sembradas en un sustrato de turba y vermiculita en charolas de unicel de 67x33x5 cm, las charolas se mantuvieron en invernadero con 12 h luz/ 12 h oscuridad y una temperatura de 18-25°C aproximadamente.

Inoculación y toma de muestras. Después de nueve días de emergidas, 30 plántulas de cada uno de los cultivares se inocularon con una suspensión del patógeno a una concentración de 19000 esporangios/mL, asperjando las hojas cotiledonares a punto de goteo en el haz y el envés. Las plántulas se cubrieron con una bolsa de polietileno y se mantuvieron con 12 h luz/ 12 h oscuridad y una humedad relativa de 85-90%. Se tomaron muestras diariamente hasta los 6 días después de la inoculación (DDI). Cada muestra constó de cinco hojas cotiledonares de cada cultivar, las cuales se colocaron en una solución fijadora FAA (etanol: ácido acético glacial: formaldehído: agua en proporción de 50:5:10:35, respectivamente), durante 15 días. Posteriormente las muestras se lavaron tres veces con agua corriente en intervalos de 15 minutos, y se colocaron en un cambiador automático de tejidos Tissue-Tek[®] II (Mod. 4640-B, Sakura Finetechnical Co., LTD. Tokio, Japan) con los siguientes reactivos: Alcohol etílico al 50, 70, 96, 100%; alcohol etílico absoluto-xileno (1:1), xileno tres cambios y dos cambios de Paraplast regular (SIGMA Chemical Co. USA) a intervalos de 2 h. Las muestras infiltradas se incluyeron en Paraplast y se realizaron cortes transversales de 12 μ m de grosor con un microtomo rotatorio (Spencer 820, American Optical Company). Posteriormente los cortes se desparafinaron y tiñeron con safranina-verde-rápido y finalmente se montaron con resina sintética (Johansen, 1940), se dejaron secar durante 72 h y se observaron en un microscopio Ultraphoto II Carl Zeiss a aumentos de 10 y 40x.

Producción de haustorios y sitios de emergencia de esporangióforos. 30 plántulas de cada uno de los cultivares de 13 días de emergidas, se inocularon con una suspensión del patógeno a una concentración de 6000 esporangios/ml, asperjando las hojas cotiledonares a punto de

goteo en el haz y el envés. Las plántulas se cubrieron con una bolsa de polietileno y se mantuvieron con 12 h luz/ 12 h oscuridad y una humedad relativa de 85-90%. Se tomaron muestras diariamente hasta los 9 días después de la inoculación (DDI). Cada muestra constó de cuatro hojas cotiledonares de cada variedad, las cuales se colocaron en una solución fijadora FAA (etanol: ácido acético glacial: formaldehído: agua en proporción de 50:5:10:35, respectivamente), durante 15 días. Posteriormente se realizaron preparaciones temporales colocando las hojas cotiledonares en portaobjetos con fucsina ácida al 0.5% en lactofenol, inmediatamente se realizó el conteo de haustorios y sitios de emergencia del patógeno (número de estomas por donde emergían esporangióforos) en el haz y el envés del área total de las hojas en un microscopio de luz Carl Zeiss a aumentos de 40x. Con los resultados obtenidos se hizo un análisis de varianza y los factores que presentaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) fueron sometidos a una prueba de medias (Tukey $\alpha=0.05$) (SAS versión 8.1).

Grosor de cutícula. Después de 13 días de emergidas, seis plántulas de cada cultivar fueron seleccionadas al azar, tomando de cada una de ellas las hojas cotiledonares. De cada cotiledón se hicieron cortes transversales con un bisturí y se tiñeron con Sudán IV, posteriormente se colocaron en un portaobjetos con una gota de glicerina al 50 % y se hicieron tres mediciones por hoja del grosor de cutícula, dichas evaluaciones se realizaron en un microscopio de luz Carl Zeiss a un aumento de 100x. Los resultados se sometieron a un análisis de varianza y una prueba de medias (Tukey $\alpha=0.05$) (SAS versión 8.1).

Número de estomas e índice estomático. Se seleccionaron al azar diez plántulas de cada cultivar de trece días de emergidas y se les tomaron impresiones epidérmicas a las hojas cotiledonares. Para tomar las impresiones epidérmicas se utilizó la pasta dental para impresiones de precisión Exactoden[®] (Casa IDEA S.A de C.V Cd. de México, México), para la cual se mezclaron dos gotas de pasta por una del endurecedor, posteriormente la mezcla se aplicó directamente en hojas cotiledonares en el haz y en el envés, se dejó polimerizar a temperatura ambiente y se separó de la hoja (impresión negativa), después se colocó una capa de barniz transparente en la cara que permaneció en contacto con la hoja, se dejó secar a temperatura ambiente y se retiró (impresión positiva). La impresión positiva de la hoja se

montó en un portaobjetos con unas gotas de glicerina al 50% dejando la superficie que permaneció en contacto con la hoja hacia arriba, posteriormente se colocó un cubreobjetos y se tomaron fotografías en un Fotomicroscopio III Carl Zeiss a 40X. En total se obtuvieron 20 fotografías del haz y 20 del envés de cada variedad, a partir de las cuales se hizo conteo de estomas y de células epidérmicas. Con los datos obtenidos se hizo un análisis de varianza y los factores que presentaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) fueron sometidos a una prueba de medias (Tukey $\alpha=0.05$) (SAS versión 8.1).

El índice estomático se calculó con la fórmula propuesta por Weyers y Meidner, (1990):

$$IE = (NE / (NE + NCE)) \times 100$$

Donde IE es índice estomático, NE es número de estomas y NCE es número de células epidérmicas.

RESULTADOS

Colonización. La observación de las preparaciones histológicas de los cuatro cultivares de *B. oleracea* var. *italica* infectadas reveló que la penetración del patógeno y el desarrollo de la primera hifa intercelular se da en el 1 día después de la inoculación (DDI), las hifas desarrolladas en esta primera etapa tuvieron un aspecto granuloso y se observaron entre las células del mesófilo. Las reacciones diferenciales de resistencia y susceptibilidad entre las variedades se observaron a partir de los 2 DDI, en el cultivar ‘Monaco’ se observó crecimiento de hifas intercelulares y producción de haustorios en el parénquima, sin alguna respuesta aparente del hospedero, en el cultivar ‘Patron’ hubo crecimiento de las hifas intercelularmente y producción de haustorios y solo en pocos casos se presentó un oscurecimiento del citoplasma de las células invadidas, lo que indicó una reacción de hipersensibilidad (RH) por parte del hospedero; a diferencia del cultivar anterior en ‘Maximo’ el oscurecimiento de células y necrosis de cloroplastos en los sitios de infección fue abundante y el crecimiento de las hifas fue muy lento (Figura 1G); el cultivar ‘Heritage’ no presentó crecimiento de la hifa y tampoco producción de haustorios a los 2 DDI.

A los 3 DDI ‘Monaco’ y ‘Patron’ presentaron crecimiento y ramificación de hifas intercelularmente con producción de haustorios en el parénquima y en la epidermis, no se presentaron RH. En ‘Heritage’ hubo RH pero no en todos los sitios de infección de tal forma que en algunos se observó la presencia de hifas y haustorios (Figura 1D), en ‘Maximo’ se

siguieron observando necrosis de células del hospedero y muerte de haustorios y un lento crecimiento de las hifas (Figura 1H). A partir del 4 DDI en las variedades ‘Monaco’ y ‘Patron’ se comportaron de manera semejante con abundante crecimiento de hifas y producción de haustorios que ocuparon la mitad o tres cuartas partes de las células del mesófilo (Figura 1A), en los cultivares ‘Heritage’ y ‘Maximo’ se observó que en muchos sitios donde se presentó una RH, los haustorios se necrosaron, a pesar de ello algunas hifas siguieron su crecimiento en las células adyacentes (Figuras 1D-H), la RH ayudó a retrasar el avance de la infección.

Al 5 DDI en los cultivares ‘Monaco’ y ‘Patron’ el desarrollo de hifas y haustorios fue abundante, observándose necrosis de células, como síntoma de una colonización avanzada y bien establecida (Figura 1B), en ‘Heritage’ y ‘Maximo’ se observó un crecimiento más lento del patógeno, abundancia de RH en las células con obscurecimiento del citoplasma de la célula (Figura 1D), necrosis de haustorios y el colapso de las células parenquimatosas necrosadas por la pérdida de la estructura celular (Figuras 1F-H). Entre el 5 y 6 DDI el patógeno produjo esporangióforos que se diferenciaron de las hifas intercelulares que se desarrollaron bajo la epidermis, cerca de los estomas, usualmente emergió uno por estoma, pero ocasionalmente fueron dos o más, lo anterior se observó en los cultivares ‘Monaco’ y ‘Patron’ (Figura 1C), en el caso de ‘Heritage’ la producción de esporangióforos fue mínima y en el cultivar ‘Maximo’ no hubo producción, el crecimiento hifal del patógeno en estos dos últimos cultivares fue muy localizado, por la RH que limitó su crecimiento.

En el análisis histológico el obscurecimiento de citoplasma fue asociado con la presencia de polifenoles producidos por los cultivares ‘Patron’, ‘Heritage’ y ‘Maximo’. La forma y tamaño de los haustorios fue similar en los cuatro cultivares, en general fueron piriformes y de apariencia granulosa, aunque se presentaron algunos haustorios acorazonados pero fueron poco frecuentes, y no se observaron estructuras de reproducción sexual durante el análisis histopatológico.

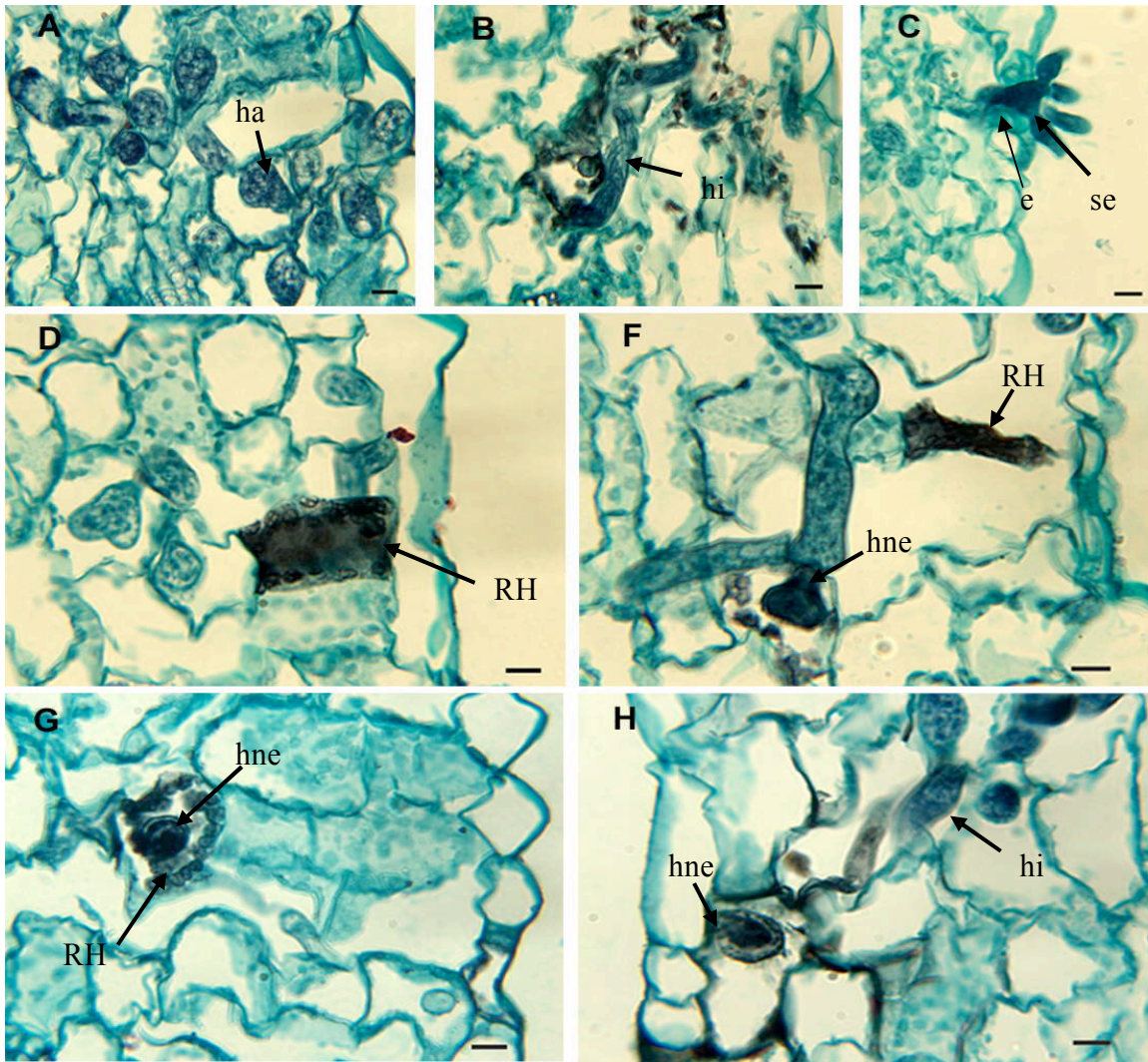


Figura 1. Fotomicrografías de hojas cotiledonares de Brócoli cv. ‘Monaco’, ‘Patron’, ‘Heritage’ y ‘Maximo’ infectadas con *H. parasitica*. A- Producción abundante de haustorios en las células parenquimatosas (‘Monaco’ 4 DDI). B- Hifas intercelulares y necrosis causada por el patógeno en ‘Monaco’ y Patron’ 5 DDI. C- Sitios de emergencia de esporangióforos en ‘Monaco’ y ‘Patron’ (6 DDI). D, F- Célula con obscurecimiento del citoplasma (RH) en el cultivar ‘Heritage’ y crecimiento de hifas intercelulares con necrosis de haustorios (5 DDI). G- Necrosis de cloroplastos y del haustorio en ‘Maximo’ (2 DDI). H- Haustorio necrosado en el cultivar ‘Maximo’ y crecimiento de hifas con poca producción de haustorios (5 DDI). ha = haustorio; hi = hifa intercelular; e = estoma; se = sitio de emergencia de esporangióforos; RH = reacción de hipersensibilidad; hne= haustorio necrosado. barra = 10 μ m.

Producción de haustorios y sitios de emergencia de esporangióforos. El número de haustorios aumentó de manera logarítmica en todos los cultivares, de tal forma que se observó un aumento paulatino conforme avanzó la infección, teniendo la mayor cantidad a los 8 DDI, posteriormente disminuyó en el noveno día posiblemente por tratarse de hojas donde la infección primaria no fue exitosa. El análisis de varianza y la comparación de medias (Tukey $\alpha= 0.05$) mostró diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el número de haustorios en las hojas cotiledonares, el cultivar susceptible ‘Monaco’ presentó el mayor número de haustorios (89 haustorios/ hoja); seguida del cultivar ‘Patron’ con 63, ‘Heritage’ con 9 y finalmente ‘Maximo’ con 0.1 (Cuadro 1).

En cuanto al número de estomas por donde estaban emergiendo los esporangióforos no se encontró diferencia significativa entre los cultivares sin embargo el cultivar ‘Monaco’ fue el que presentó un mayor número de sitios de emergencia (21.9 sitios), seguido de ‘Patron’ con 16.1 y finalmente ‘Heritage’ y ‘Maximo’ con 0.1 y 0.0 respectivamente (Cuadro 1).

Grosor de cutícula. En los cultivares estudiados el análisis de varianza no mostró diferencias significativas ($P=0.9046$) en el grosor de cutícula. Los cultivares presentaron los siguientes promedios de grosor de cutícula: ‘Heritage’ 15.2 μm , ‘Patron’ 14.8 μm , ‘Monaco’ 14.5 μm y ‘Maximo’ 14.3 μm .

Número de estomas e índice estomático. El número de estomas por unidad de superficie fue significativamente mayor en el envés de la hoja con respecto al haz. El cultivar susceptible ‘Monaco’ presentó la mayor cantidad de estomas (95 estomas/ mm^2), mientras ‘Patron’ y ‘Heritage’ presentaron semejante número de estomas (94 y 93 estomas / mm^2 respectivamente), el cultivar ‘Maximo’ presentó la menor cantidad de estomas (90 estomas/ mm^2), sin embargo estadísticamente no se presentaron diferencias entre ellos ($P=0.8808$) (Cuadro 1). El índice estomático mayor lo presentó el cultivar ‘Heritage’ con 22.2 seguida de ‘Monaco’ con 20.8, posteriormente ‘Patron’ y ‘Maximo’ con 19.9 y 19.8 respectivamente.

Cuadro 1. Comportamiento de las variables evaluadas en plántulas de brócoli inoculadas con *Hyaloperonospora parasitica*.

Cultivar	Haustorios/hoja	Sitios de emergencia/hoja	Índice estomático	Estomas/mm ²	Grosor de cutícula (µm)	Reacción planta-patógeno
‘Maximo’	0.1 a	0.1 a	19.8	89.7 a	14.4 a	Incompatible
‘Heritage’	9 ba	16.1 a	22.2	93.1 a	15.2 a	Incompatible
‘Patron’	63 bc	0.0 a	19.9	93.8 a	14.9 a	Intermedia
‘Monaco’	89 c	21.9 a	20.8	95.3 a	14.6 a	Compatible

Medias con la misma letra no difieren estadísticamente (Tukey $\alpha=0.05$).

DISCUSIÓN

La resistencia o susceptibilidad fue correlacionada con el desarrollo del patógeno en los tejidos infectados. Tres tipos de interacciones fueron observados entre *B. oleracea* var. *italica* y *Hyaloperonospora parasitica*: compatible, incompatible e interacciones intermedias. Las diferencias histológicas entre las interacciones se observaron a partir del 2 DDI. Donofrio y Delaney, (2001), mencionan que en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* con diferentes niveles de resistencia e inoculadas con *H. parasitica* se observaron diferencias hasta los 3 DDI.

La interacción compatible (‘Monaco’-*H. parasitica*) fue típicamente caracterizada por la ausencia de células necrosadas del hospedante, rápida colonización de las hifas entre las células de la epidermis y del parénquima, alta formación de haustorios y de esporangióforos que emergieron por los estomas. Las células de hospedero invadidas permanecieron aparentemente sanas durante varios días; un desarrollo semejante de *H. parasitica* ha sido descrito anteriormente por Donofrio y Delaney (2001), en fenotipos de *Arabidopsis nim 1-1* y por Kluczewski y Lucas, (1982) en *Brassica oleracea* y *B. napus*. En la interacción intermedia (‘Patron’-*H. parasitica*) se presentó necrosis de células en pocos sitios de infección y solo en las etapas tempranas (2 DDI), posteriormente el patógeno logró desarrollarse en las células adyacentes sin encontrar una respuesta de defensa por parte del hospedero, el número de haustorios fue ligeramente menor que en la interacción compatible, sin embargo los sitios de emergencia de esporangióforos fueron muy pocos, esto puede deberse al amarillamiento

temprano observado en las hojas cotiledonares lo que pudo no haber dado tiempo al patógeno de emerger por los estomas y producir esporangióforos. En interacciones intermedias de *H. parasítica* con *A. thaliana* (Soylu *et al.*, 2004) y de *Vitis rupestris* con *Plasmopara viticola* (Dai *et al.*, 1995), se ha observado un menor número de haustorios por la presencia RH en etapas tempranas, lo que ha restringido el desarrollo posterior del patógeno. Türk, (2002), comenta que la formación de un menor número de haustorios en interacciones intermedias puede ser la forma en que el parásito se sobrepone a las defensas de la planta, con la finalidad de que se le permita completar su ciclo de vida.

En las interacciones incompatibles ('Heritage', 'Maximo'-*H. parasítica*) se observó una necrosis de células del hospedero asociadas con la infección del patógeno al 2 DDI sobre todo en Máximo, posteriormente un lento crecimiento del micelio, baja producción de haustorios y ausencia de esporulación. Algo similar encontró Türk, 2002 en *A. thaliana* infectada por *Peronospora parasítica*, donde la RH se observó al 1 DDI en la variedad resistente. La reacción de granulación, obscurecimiento del citoplasma y necrosis, así como la delimitación del crecimiento que se presentó en las interacciones incompatibles, es un patrón que ha sido reportado sobre todo en patógenos biotróficos en interacciones incompatibles (Kluczewsky y Lucas, (1982); Dai *et al.*, 1995; Lebeda y Pink, 1998; Soyly *et al.*, 2004).

En este estudio la formación de haustorios por *H. parasítica* pareció ser fundamental para la colonización intercelular del patógeno, ya que el necrosamiento o la falta de ellos en los cultivares resistentes ('Heritage' y 'Maximo'), al parecer limitó el crecimiento de las hifas y por ende la producción de más haustorios, esto tal vez esté relacionado con la función de los haustorios de proporcionar nutrientes al parásito. Jurgens *et al.*, 2003, menciona que en *Pinus strobus* infectado con *Cronartium ribicola* la muerte de células por RH pudo haber creado una barrera física que inhibió la subsecuente colonización y redujo la habilidad del patógeno de obtener nutrientes. Türk, (2002) encontró que en *A. thaliana* infectada con *P. parasítica* la formación de haustorios pareció ser esencial para el establecimiento de las hifas intercelulares y menciona la posibilidad de que el haustorio provea al patógeno de una fuente adicional o diferente de nutrientes que no es capaz de encontrar el parásito en los espacios intercelulares. Voegelé y Mendgen, (2003) indicaron que los haustorios no solo absorben nutrientes, sino también tienen una función en la supresión de las respuestas de defensa del hospedero, la

redirección o reprogramación del flujo de metabolitos y la biosíntesis. En este estudio la RH solo fue observada en las células que contenían haustorios en su interior lo que podría indicar que además de las funciones antes mencionadas los haustorios juegan un papel en el reconocimiento entre la planta y el patógeno, lo anterior ha sido propuesto por Mendgen *et al.*, 2000 y Soyly *et al.*, 2004. El obscurecimiento del citoplasma normalmente se ha relacionado con la presencia de polifenoles en las células invadidas, sin embargo en este estudio no se determinó la naturaleza de los metabolitos que pudieron causar el obscurecimiento del citoplasma, Kushad *et al.*, (1999) mencionan que el brócoli tiene una alta cantidad de glucosinolatos, los cuales según Slusarenko y Schlaich, (2003), funcionan como potenciales fitoanticipinas las cuales son sustancias antimicrobiales preformadas, sin embargo generalmente están relacionadas con la resistencia no hospedero. La RH a *H. parasítica* en la familia Brassicaceae ha sido asociada con la producción de H₂O₂ (Hermanns *et al.*, 2003); con la fitoalexina camalexina (Slusarenko y Schlaich, 2003); con la presencia de collares de calosa alrededor del cuello del haustorio (Türk, 2002) y con el sistema del ácido salicílico el cual regula las respuestas de defensa de la planta (Donofrio y Delaney, 2001; Glazebrook, 2005). En cuanto a la forma de los haustorios fueron de apariencia piriforme tal como los describe Mims *et al.*, (2004), en *Arabidopsis thaliana*, y algunos llegaron a ocupar tres cuartas partes de las células del hospedero sobre todo en la variedad susceptible.

El que el cultivar susceptible ‘Monaco’ tuviera un mayor número de estomas pudo estar contribuyendo a incrementar los sitios de infección y los sitios de emergencia de esporangióforos, ya que el patógeno encontró más rápido sitios de entrada y salida para completar su ciclo. En el cultivar resistente ‘Maximo’ aparte de la RH que se presentó después de la penetración del patógeno, existió una menor cantidad de estomas y su índice estomático fue menor lo que contribuyó a reducir los sitios de emergencia de esporangióforos, la unión de las características anteriores propiciaron que no hubiera esporulación del patógeno. En ‘Heritage’ aun cuando tuvo el mayor índice estomático, la RH dentro de los tejidos de la hoja fue muy efectiva, de tal forma que el patógeno tuvo una baja colonización de tejidos y por tanto los sitios de emergencia de esporangióforos fueron mínimos. La ausencia de la esporulación de los patógenos en los cultivares resistentes a ellos ha sido reportada en varios patosistemas (Dai *et al.*, 1995; Türk, 2002; Soyly *et al.*, 2004).

La principal diferencia entre fenotipos fue la cantidad de sitios donde se llevó a cabo la RH y la cantidad de haustorios desarrollados y por ende el número de células invadidas. Los cultivares que presentaron resistencia en etapa de cotiledón como son ‘Heritage’ y ‘Maximo’, puede ser que en etapas posteriores de desarrollo esta resistencia sea similar, de acuerdo a lo mencionado por Natti, (1958) y Jensen *et al.*, (1999).

CONCLUSIONES

1. Los cultivares de brócoli ‘Heritage’ y ‘Maximo’, presentaron una reacción incompatible con *Hyaloperonospora parasitica*, caracterizada por abundantes reacciones de hipersensibilidad, sobre todo en ‘Maximo’, poca cantidad de haustorios formados y poca cantidad de estomas por mm².
2. El brócoli cultivar ‘Patron’ presentó una reacción intermedia-compatible con *H. parasitica*, mostró RH solo en etapas tempranas y posteriormente el patógeno se comportó de manera similar a la interacción compatible.
3. El brócoli cultivar ‘Monaco’ presentó una reacción compatible con *H. parasitica*, mostró una rápida dispersión de hifas intercelularmente y la alta formación de haustorios con la consecuente producción de esporangióforos, ausencia de células necrosadas (RH) y mayor cantidad de estomas por mm².

AGRADECIMIENTOS

A la empresa SEMINIS-Estación de Investigación Bajío, por el apoyo brindado para el establecimiento de las plántulas de brócoli.

LITERATURA CITADA

- Brophy, T. F., and M. D. Laing. 1992. Screening of fungicides for the control of downy mildew on container-grow cabbage seedlings. *Crop Prot.* 11:160-164.
- Coelho, P. S., and A. A. Monteiro. 2003a. Inheritance of downy mildew resistance in mature broccoli plants. *Euphytica* 131:65-69.
- Coelho, P. S., and A. A. Monteiro. 2003b. Expression of resistance to downy mildew at cotyledon and adult plant stages in *Brassica oleracea* L. *Euphytica* 133:279-284.
- Coelho, P., D. Leckie, D. Astley, I. R. Crute, K. Bahcevandziev, L. Valério, A. Monteiro, and I. Boukema. 1998. The relationship between cotyledon and adult plant resistance to downy mildew (*Peronospora parasitica*) in *Brassica oleracea*. *Acta Hort.* 459:335-342.
- Dai, G. H., C. Andary, L. Mondolot-Cosson, and D. Boubals. 1995. Histochemical studies on the interaction between three species of grapevine, *Vitis vinifera*, *V. rupestris* and *V. rotundifolia* and the downy mildew fungus, *Plasmopara viticola*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 46:177-188.
- Dickson, M. H., and R. Petzoldt. 1993. Plant age and isolate source affect expression of downy mildew resistance in broccoli. *HortScience* 28(7):730-731.
- Donofrio, N. M., and T. P. Delaney. 2001. Abnormal callosa response phenotype and hypersusceptibility to *Peronospora parasitica* in defense-compromised *Arabidopsis nim 1-1* and salicylate hydroxylase-expressing plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14:439-450.
- Farnham, M. W., M. Wang, and C. E. Thomas. 2002. A single dominant gene for downy mildew resistance in broccoli. *Euphytica* 128:405-407.
- Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanism of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:205-227.
- Greenhalgh, J. R., and N. D. Mitchell. 1976. The involvement of flavour volatiles in the resistance to downy mildew of wild and cultivated forms of *Brassica oleracea*. *New Phytol.* 77:391-398.
- Heath, M. C. 1974. Light and electron microscope studies of the interactions of host and nonhost plants with cowpea rust – *Uromyces phaseoli* var. *vignae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 4:403-414.

- Hermanns, M., A. J. Slusarenko, and N. L. Schlaich. 2003. Organ-specificity in a plant disease is determined independently of *R* gene signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16:752-759.
- Jensen, B. D., J. Hockenhull, and L. Munk. 1999. Seedling and adult plant resistance to downy mildew (*Peronospora parasitica*) in cauliflower (*Brassica oleracea* convar. botrytis var. botrytis). *Plant Pathology* 48:604-612.
- Jacobs, T., and M. B. Buurlage. 1990. Growth of wheat leaf rust colonies in susceptible and partially resistant spring wheats. *Euphytica* 45:71-80.
- Johansen, D. A. 1940. *Plant microtechnique*. 1a ed. Mc GrawHill, New York, USA. 503 p.
- Kluczewski, S. M. and J. A. Lucas. 1982. Development and physiology of infection by the downy mildew fungus *Peronospora parasitica* (Pers. ex Fr.) Fr. in susceptible and resistant *Brassica* species. *Plant Pathology* 31:373-379.
- Kushad, M. M., A. F. Brown, A. C. Kurilich, J. A. Juvik, B. P. Klein, M. A. Walling, and E. H. Jeffery. 1999. Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica oleracea*. *Agric. Food Chem.* 47:1541-1548.
- Lebeda, A., and D. A. C. Pink. 1998. Histological aspects of the response of wild *Lactuca* spp. and their hybrids, with *L. sativa* to lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*). *Plant Pathology* 47:723-736.
- Mendgen, K., C. Struck, R. T. Voegelé, and M. Hahn. 2000. Biotrophy and rust haustoria. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 56:141-145.
- Mims, C. W., E. A. Richardson, B. F. Holt III, and J. L. Dangl. 2004. Ultrastructure of the host-pathogen interface in *Arabidopsis thaliana* leaves infected by the downy mildew *Hyaloperonospora parasitica*. *Can. J. Bot.* 82:1001-1008.
- Monteiro, A. A., P.S. Coelho, K. Bahcevandxiev, and L. Valério. 2005. Inheritance of downy mildew resistance at cotyledon and adult-plant stages 'Couve Algarvia' (*Brassica oleracea* var. *tranchuda*). *Euphytica* 141:85-92.
- Natti, J. J. 1958. Resistance of broccoli and other crucifers to downy mildew. *Plant Disease Reporter* 42(5):656-662.
- Natti, J. J., M. H. Dickson, and J. D. Atkin. 1967. Resistance of *Brassica oleracea* varieties to downy mildew. *Phytopathology* 57:144-147.

- Silué, D., N. I. Nashaat, and Y. Tirilly. 1996. Differential responses of *Brassica oleracea* and *B. rapa* accessions to seven isolates of *Peronospora parasitica* at the cotyledon stage. *Plant Disease* 80:142-144.
- Slusarenko, A. J., and N. L. Schlaich. 2003. Downy mildew of *Arabidopsis thaliana* caused by *Hyaloperonospora parasitica* (formerly *Peronospora parasitica*). *Molecular Plant Pathology* 4:159-170.
- Soylu, E. M., S. Soylyu, and J. W. Mansfield. 2004. Ultrastructural characterization of pathogen development and host responses during compatible and incompatible interactions between *Arabidopsis thaliana* and *Peronospora parasitica*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 65:67-78.
- Thomas, C. E., and E. L. Jourdain. 1990. Evaluation of broccoli and cauliflower germplasm for resistance to race 2 of *Peronospora parasitica*. *HortScience* 25:1429-1431.
- Türk, M. 2002. Microscopic evaluation of interactions between varieties of *Arabidopsis thaliana* challenged by *Peronospora parasitica*. *Turk J. Agric. For.* 26:125-132.
- Voegele, R. T., and Mendgen, K. 2003. Rust haustoria: nutrient uptake and beyond. *New Phytol.* 159: 93-100.
- Wang, M., M. W. Farnham, and C. E. Thomas. 2000. Phenotypic variation for Downy mildew resistance among inbred broccoli. *HortScience* 35:925-929.
- Wang, M., M. W. Farnham, and C. E. Thomas. 2001. Inheritance of true leaf stage downy mildew resistance in broccoli. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126:727-729.
- Weyers, J. D. B., and H. Meidner. 1990. *Methods in stomatal research*. Longman Scientific and Technical, Harlow, UK.

CONCLUSIONES GENERALES

1. Los agentes causales de la pudrición o manchado del florete son *Alternaria tenuissima*, *A. alternata* y *Fusarium oxysporum*. La especie *Alternaria tenuissima* infecta y coloniza los órganos florales de la inflorescencia del brócoli en un lapso de 96 h, provocando necrosis y maceración de tejidos.
2. De cinco fungicidas evaluados para el control de *A. alternata* -la especie más patogénica-, el más efectivo para inhibir la germinación de conidios y el crecimiento de micelio (100%) fue pyraclostrobin+ boscalid a las concentraciones de 1, 10, 100 y 200.
3. De los 12 cultivares sembrados a tres densidades de plantación, a los cuales se les evaluó el diámetro de florete y diámetro de tallo hueco; el cultivar 'Monaco' presentó el mayor promedio de diámetro de florete al momento de la cosecha, y el cultivar 'Ironman' presentó el menor diámetro de tallo hueco. El efecto de la densidad de plantación fue inversamente proporcional al diámetro de florete y de tallo hueco.
4. La pérdida de peso que se da posterior a la cosecha se caracteriza por una pérdida de turgencia en los tejidos y por el tamaño del florete.
5. Las reacción de defensa del brócoli en etapa de plántula a *Hyaloperonospora parasítica*, se caracterizó por abundantes reacciones de hipersensibilidad y por delimitar el crecimiento del patógeno y su producción de haustorios, lo anterior se observó en los cultivares 'Heritage' y 'Maximo'.