

Invasión de *Ralstonia solanacearum* en tejidos de tallos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill)

Y. Hernández¹, N. Mariño¹, G. Trujillo¹ y C. Urbina de Navarro²

¹Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía, Instituto de Botánica Agrícola.

²Facultad de Ciencias, Centro de Microscopía Electrónica UCV.

Resumen

Ralstonia solanacearum, en Venezuela, ha venido señalándose como un patógeno que afecta cultivos de *Solanaceae*. Se realizó un estudio para determinar la forma de invasión de la bacteria en tejidos de tallos de tomate (*Lycopersicon esculentum*), usando microscopía óptica y electrónica. Se utilizaron plantas de tomate de la variedad Río Grande de 45 días de edad realizando heridas en la base del tallo y raíces. Luego inoculadas con una suspensión bacteriana ajustada a 10^9 cel/ml, aplicándola sobre el suelo. Plantas testigos fueron tratadas con agua destilada estéril. Se tomaron muestras de la parte media del tallo a los ocho y 12 días después de la inoculación. Para microscopía óptica, las secciones de tallos fueron colocadas en solución FAA. Se realizaron cortes a mano alzada y el tejido teñido con azul de toluidina y anilina. Para microscopía electrónica las muestras fueron fijadas en glutaraldehído y en tetraóxido de osmio. Se hizo una deshidratación con una serie de etanol y las muestras embebidas en resina, cortadas con un ultramicrotomo y teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo. Los resultados con microscopía óptica mostraron la invasión bacteriana en el xilema y floema. La invasión ocurrió principalmente en los vasos de mayor diámetro. Observaciones en microscopía electrónica, muestran que la invasión también ocurre en las células parenquimáticas que están cercanas al tejido conductor, en esta región, también fueron observadas tílides, cuya presencia podrían interpretarse como una respuesta de la planta al ataque de la bacteria.

Palabras clave: *Ralstonia solanacearum*, invasión, *Lycopersicon esculentum*.

Introducción

Ralstonia solanacearum, es un patógeno de gran importancia en las zonas tropicales y subtropicales, ya que afecta una gran diversidad de cultivos incluidos solanáceas como el tomate (*Lycopersicon esculentum* L. Mill), berenjena (*Solanum melongena* L.), papa (*Solanum tuberosum* L.), tabacco (*Nicotiana tabacum* L.) así como también bananos (*Musa* spp.), maní (*Arachis hipogea* L.), plantas ornamentales como heliconias (*Heliconia* sp.), entre otros (1, 14, 21). En estos cultivos, causa la enfermedad conocida como marchitez bacteriana.

Según Colombo, (4), cuando la bacteria afecta los cultivos de un país, región o zona, las posibilidades de diseminación son múltiples, como suelo infectado, aguas, labores culturales, etc., ya que es un patógeno del suelo y tiene la capacidad de persistir en él, aún sin el hospedante específico. Dicha capacidad va a depender de la raza presente, lo que dificulta la aplicación de medidas de control eficientes.

En Venezuela, esta bacteria se ha señalado causando problemas en papa en el estado Lara (2, 6), Monagas (19), Mérida (7). En tomate (11, 17), encuentran a *R. solanacearum* en los estados Aragua, Carabobo, Cojedes, Yaracuy y Guárico. También es señalada en bananos (21).

Modo de acción y localización

La bacteria invade los tejidos vasculares de la planta, a través de las raíces con heridas o aberturas naturales, originadas por la emergencia de

raíces secundarias (13). El xilema presenta células en forma de tubos denominados traqueas y traqueidas, con paredes lignificadas y perforaciones laterales (punteaduras), que permiten el transporte del agua en forma ascendente y en forma lateral hacia otros tejidos (5, 20). En este flujo de agua a través de los vasos se han localizado patógenos que disminuyen la circulación de agua y como consecuencia producen marchitez en la planta (20).

Las observaciones al microscopio de luz, de tejidos de tallos de tomate han mostrado la presencia de masas bacterianas, densamente teñidas en el xilema (9, 18). En observaciones al microscopio electrónico de transmisión, se detectó la presencia de la bacteria en el xilema primario, pero no en el secundario de un material resistente, mientras que en el material susceptible se observó tanto en xilema primario como secundario (9,18). La colonización bacteriana del tallo resulta en un empardecimiento del xilema, epinastia foliar y marchitez letal generalizada (3).

La invasión de un solo haz lateral en el peciolo de una hoja de tomate, produce decaimiento (epinastia), mientras la invasión de todos los haces produce el marchitamiento. Cuando resultan invadidos los haces vasculares del tomate, se presenta una tendencia a formar raíces adventicias que se desarrollan en el tejido, precisamente en la parte exterior del haz invadido. El marchitamiento, según se cree, es debido a la obstrucción mecánica gradual de los vasos del xilema, pero también pudiera ser que las ma-

terias tóxicas producidas por el patógeno pudieran suplir a los factores físicos en la producción de síntomas (16).

En esta investigación se plantea

determinar la forma de invasión de *R. solanacearum* en tejidos de tallos de tomate. Avances de esta investigación ya han sido presentados (12)

Materiales y métodos

Material vegetal utilizado:

Para realizar el ensayo se utilizaron 18 plantas de tomate de la variedad Río Grande de 45 días después del transplante, las cuales fueron sembradas a razón de dos plantas por envase en un medio que contenía una relación 3:1 de arena y tierra estéril, fueron mantenidas en condiciones de umbráculo hasta la inoculación. Esta variedad es tolerante al ataque de *R. solanacearum* (15)

Inoculación: se utilizaron cultivos bacterianos de *R. solanacearum* de 48 horas de crecimiento en el medio YCA (agar carbonato de calcio extracto de levadura), se hizo una suspensión ajustada a una concentración de 10^8 cel/ml con el tubo número 3 de la escala de Mc. Farland. Para la inoculación se realizaron heridas en las raíces y parte basal del tallo de las plantas con un escalpelo, se aplicó la suspensión bacteriana al suelo, humedeciéndolo bien. Por cada tratamiento se utilizaron 6 plantas y dejadas 6 plantas testigos las cuales fueron tratadas de igual forma pero humedecidas con agua destilada estéril. Una vez realizada la inoculación, las plantas fueron dejadas en cámara húmeda por 48 horas, luego pasadas a umbráculo y regadas diariamente. El ensayo fue realizado en el mes de julio donde se registró en el umbráculo una temperatura mínima de 20°C y

máxima de 32 °C. La humedad relativa fue mayor de 66%.

Toma de muestras: A los 8 y 12 días de la inoculación, se tomaron 6 muestras de tallos tanto de las plantas inoculadas como de los testigos. Por cada planta se cortaron dos entrenudos de la parte media.

Microscopía óptica: se cortaron secciones del entrenudo del tallo de 3 cm y se colocaron en solución FAA (etanol, acetona y ácido acético en volúmenes de 90, 5 y 5 ml respectivamente). Las muestras fueron conservadas en esta solución hasta su procesamiento. Luego se prepararon láminas con cortes transversales y longitudinales a mano alzada, se tiñeron con azul de toluidina y azul de anilina al 5% fueron mantenidos hidratados en agua-glicerina (1:1). Láminas procesadas se examinaron en un microscopio binocular Leitz. Posteriormente se tomaron fotografías de las preparaciones con los objetivos 4,10 y 40x, mediante una cámara acoplada al microscopio.

Microscopía electrónica de transmisión: se cortaron 12 porciones de tallos de aproximadamente 1 mm², se fijaron en glutaraldehído al 2% en buffer fosfato 0.1 M, pH 7.0 por 2 horas en condiciones de laboratorio y post fijados en 2% de tetraóxido de osmio en el mismo buffer por 2 horas a 4°C. Después se realizó la deshidrata-

ción con etanol en serie creciente (50, 70 y 95%) 15 minutos cada una, luego fue pasado dos veces por etanol al 100% por 15 minutos. Posteriormente de la deshidratación las muestras fueron embebidas en resina mas óxido de propileno en una relación 1:1 por 1/2 hora, luego en la misma mezcla pero en proporción 3:1 toda la noche. Después se realizaron dos cambios en resina pura (EPON LX12), el primer

cambio se dejó toda la noche y el segundo 1/2 hora, se incluyó en los moldes y se dejó 48 horas en estufa a 60°C. Se realizaron cortes finos del material con una cuchilla de diamante, en un ultramicrotomo, los cuales fueron recogidos en rejillas cubiertas con membranas de colodion y teñidas con acetato de uranilo al 2% y citrato de plomo. Posteriormente fueron observadas en un microscopio Hitachi 300.

Resultados y discusión

Las plantas, comenzaron a mostrar síntomas a los 5 días de la inoculación. Los síntomas se iniciaron con un amarillamiento de las hojas bajas que luego se extendió a las hojas más nuevas. Posteriormente se observó marchitamiento total. Estos síntomas se corresponden con los señalados por muchos autores para *R. solanacearum* (1, 4, 8). En las plantas testigos no se observó ningún tipo de síntoma.

Microscopia óptica

En las observaciones realizadas al microscopio de luz, de los cortes transversales del tallo, correspondientes a las plantas testigos de ocho y doce días después de la inoculación (figura 1A), se muestra la anatomía del sistema vascular (xilema y floema) donde el xilema está formado por vasos de diferentes diámetros, donde los de mayor diámetro están ubicadas en el xilema primario. Hacia la parte interior del tallo, este cilindro vascular encierra un tejido parenquimático médular. Los orificios de los vasos se observan limpios, sin ningún tipo de obstrucción. Igualmente ocurre en la

sección longitudinal (figura 1B), donde no se observa ninguna obstrucción o daño en las células básicas que conforman el xilema.

En las observaciones de los cortes transversales (figuras 1C) de tallo, correspondientes a las plantas ocho días después de inoculadas, se observaron pocas masas bacteriales en los vasos de mas reciente formación (xilema secundario) y en los vasos del xilema primario. También se observa en la figura 1C, una gran cantidad de puntos de color azul oscuro en las células del floema que denota la presencia de masas bacteriales. En los cortes longitudinales (figura 1D), no se observó la presencia de esas masas bacteriales. Esto último puede ser debido a que la infección es incipiente por lo que no se evidencia en los cortes realizados.

En los cortes transversales de las plantas inoculadas a los doce días, (figura 2A), se observa un sector del anillo vascular (xilema primario) con una mayor cantidad de vasos obstruidos por las masas bacteriales. Estas masas, se presentan con mayor den-

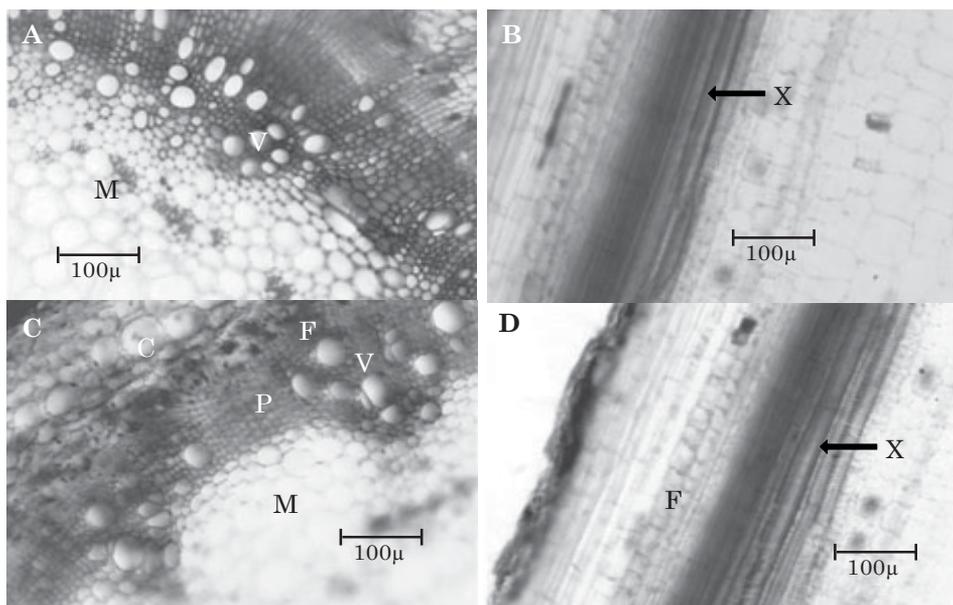


Figura 1. Cortes transversales y longitudinales de tallos de tomate a los 8 días después de la inoculación. A: testigo corte transversal. B: testigo corte longitudinal. C: corte transversal del tallo, se observa en el parenquima (P) masas bacteriales teñidas de color oscuro. Vasos de xilema primario (V) corteza (C) y parte del floema. D: cortel longitudinal del tallo inoculado con *R. solanacearum*. Xilema (X). Médula (M). Floema (F)

sidad y frecuencia en los vasos de mayor diámetro, ocupando todo el volumen del mismo (figura 2B y 2C).

En los cortes longitudinales, se observa una obstrucción completa a lo largo de los vasos mas desarrollados, mientras que en los de menor desarrollo, se observan solo porciones o trechos del vaso taponado y puntos de color oscuro en la región del floema (figura 2D).

El estudio al microscopio de luz reveló la presencia de masas bacteriales, observadas de un color azul oscuro, que se localizaron en los haces conductores de mayor diámetro sobre todo los que corresponden al xilema primario. Las masas

bacteriales, corresponden a *R. solanacearum*, esto corrobora lo señalado en la literatura de que la bacteria se aloja en el tejido conductor, principalmente en el xilema (1, 10).

Los tejidos de las plantas muestreadas a los ocho días de la inoculación, presentan una ligera tinción en las células del parenquima pertenecientes al tejido conductor y células de la corteza cercanas al mismo, lo que indica la presencia de la bacteria en esos tejidos. El paso de la bacteria desde los vasos del xilema al parenquima, pudiera explicarse con lo señalado por Nakaho, y colaboradores (18) de que las bacterias disuelven las paredes la-

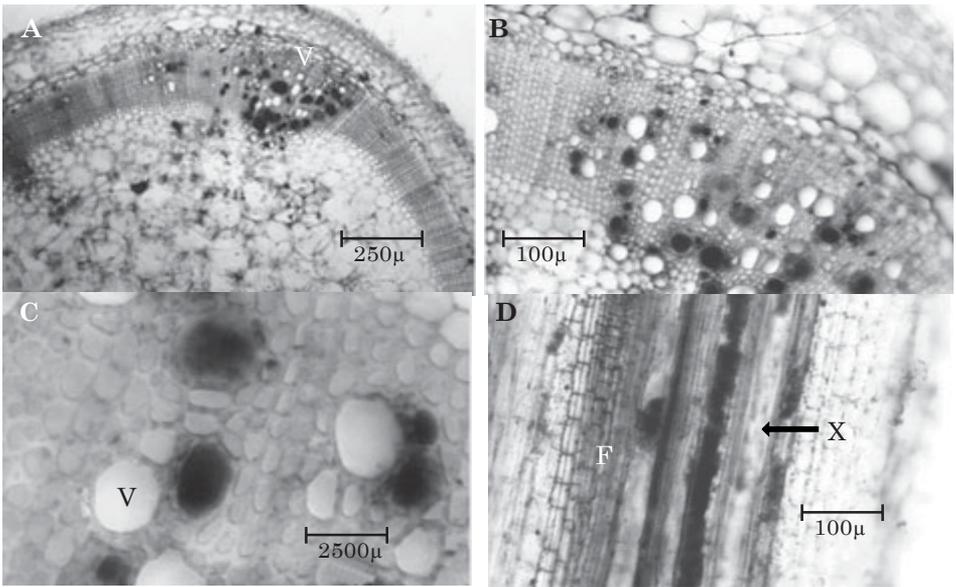


Figura 2. Cortes transversales y longitudinales de tallos de tomate a 12 días de inoculados. A: zona de los vasos de Xilema primario (V) mostrando masas bacteriales. B: detalle del xilema . C: vasos obstruidos (V). D: corte longitudinal mostrando el xilema taponado (áreas coloreadas de color intenso) y también parte del floema (F).

terales y pueden pasar de una célula a otra en ese tejido.

El hecho que sean los vasos conductores (xilema) de mayor diámetro (que llevan un flujo importante de agua a la planta) los que presentan estas masas bacterianas, indica que el movimiento de la bacteria es a través del flujo del agua y primeramente en forma ascendente. La obstrucción de los vasos de mayor diámetro trae como consecuencia una marchitez fisiológica por estrés hídrico (1). Los órganos de la planta que requieren mayor volumen de agua para la función fotosintética son las hojas, por lo tanto el amarillamiento generalmente comienza por ellas.

Microscopia electrónica de transmisión.

En los cortes de tejidos de plantas sanas (testigos), vistos al microscopio electrónico de transmisión, las células parenquimáticas del tejido conductor se observan túrgidas y no presentan daño ni presencia de bacterias (figura 3A), mientras que en las células parenquimáticas de las plantas inoculadas (figura 3B), se observan menos túrgidas, hay la presencia de bacterias, y segmentos de la pared celular mas reducidos o delgados (figura 4A y 4C).

En las figuras 4A, 4B, se observa la presencia abundante de bacterias en células parenquimáticas. En

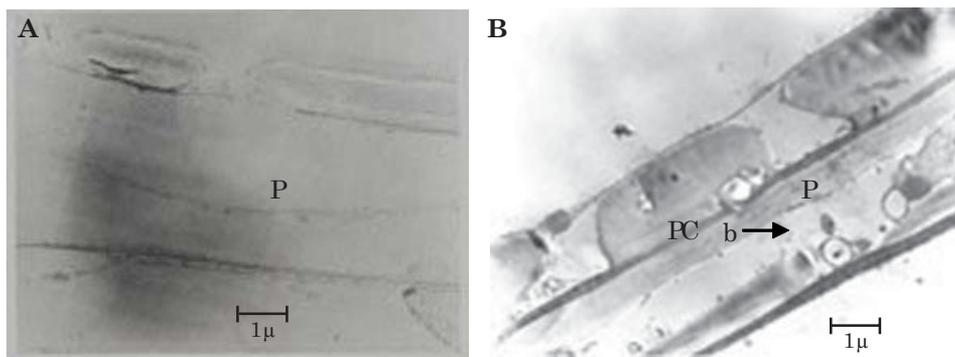


Figura 3. Células del tejido conductor, vistas al microscopio electrónico de transmisión. A: células del parénquima de plantas testigos (P: parénquima). B: células del parénquima de plantas inoculadas 12 días donde se observa la presencia de bacterias (b: bacteria) (PC: pared celular).

las paredes de estas células, hay la presencia de tilides (protuberancias de la membrana, en forma globosa que se proyectan hacia el interior de las células) que impiden la comunicación entre células vecinas a través de las punteaduras (figuras 4C). En algunos segmentos de la pared celular se presenta desintegración de la misma (figura 4A y 4C).

En este trabajo no se observó deterioro de las punteaduras como lo señala Nakaho, *et al.* (18), no obstante es probable que esto ocurra, pero debido al poco número de muestras procesadas, no se pudo observar.

La presencia de bacterias, tanto en los vasos del xilema como en las células del parenquima observadas en este trabajo, también es señalado por Grimault *et al* (9), lo que denota que la sintomatología que se manifiesta en las plantas afectadas en este caso

marchitamiento, se debe, principalmente a la obstrucción por parte de la bacteria del sistema conductor.

En esta investigación, también se observó la presencia de tilides, estructuras, que según la literatura (1), su formación está asociada a un trauma producido en la planta ya sea por patógenos u otro factor. Grimault y colaboradores (9) encontraron, en comparaciones de materiales de tomate resistentes y susceptibles a *R. solanacearum*, que los materiales resistentes formaban tilides al ser inoculados con la bacteria, mientras que en los cultivares susceptibles estas estructuras, no se formaban. En nuestro caso, el material utilizado se considera tolerante a la enfermedad (15), por lo tanto es posible que la formación de la tilides, esté asociado con una respuesta de la planta a la bacteria.

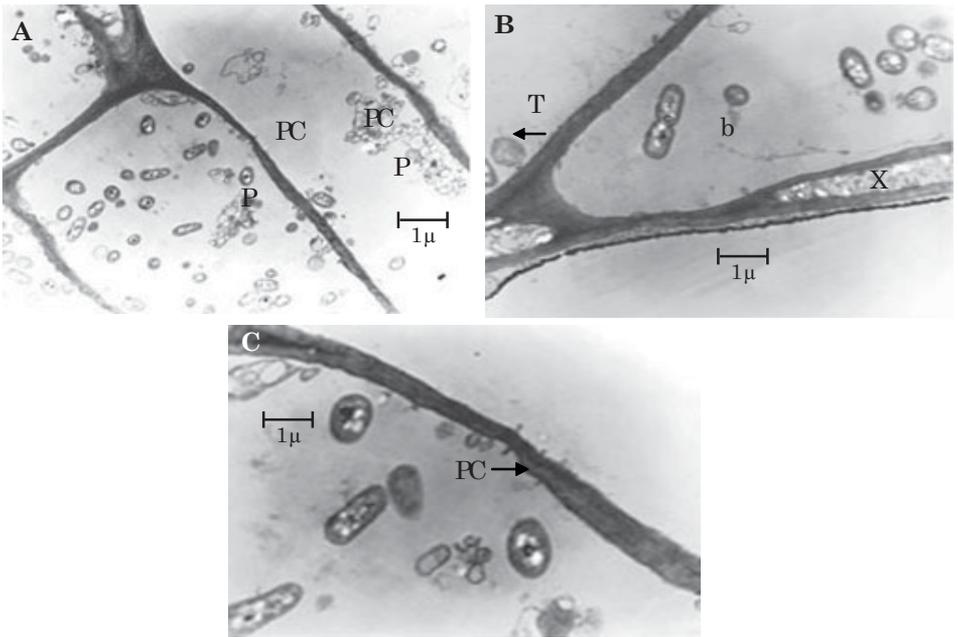


Figura 4. Células del tejido conductor, vistas al microscopio electrónico de transmisión. A: células del parénquima (P) invadidas por bacterias (b) se observa colapso de la pared celular (PC). B: células del parénquima invadidas por bacterias (b). C: presencia de tilides (T)

Conclusiones

Por microscopía óptica se comprobó la invasión del tejido conductor (xilema y floema) por *R. solanacearum*

La invasión ocurre principalmente en los vasos de mayor diámetro que corresponden al xilema primario.

Mediante la microscopía electrónica de transmisión se verificaron los resultados obtenidos por microscopía

óptica, constatándose que además de los vasos conductores, la invasión de *R. solanacearum*, también ocurre en las células parenquimáticas y floemáticas del tejido conductor.

Se observó la presencia de tilides en las células parenquimáticas, las cuales pueden estar asociadas a una reacción de la planta a la bacteria

Agradecimiento

Los autores agradecen a la profesora Romelia Parra por la revisión del manuscrito y la ayuda en la redacción del abstract y al ingeniero

Diego Diamont, por su colaboración en la realización de los cortes para microscopía óptica.

Literatura citada

1. Agrios, G. 1998. Fitopatología. UTEHA Noriega editores. Traducción de la tercera edición en inglés de la obra «Plant Pathology» 2ª/ed. México. 838 p.
2. Alcalá de Marcano, D., D. Narvaez y A. Pire. 1995. Desarrollo de la marchitez bacteriana de la papa (*Pseudomonas solanacearum*) bajo diferente manejo del cultivo en el estado Lara. Revista Forestal Venezolana. 1:153-154.
3. Buddenhagen, I. y A. Kelman. 1964. Biological and physiological aspect of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Ann. Rev. Phytopatol. 2:203-230.
4. Colombo, M. 1995. Marchitamiento del tomate en el Litoral Argentino. En: Revista La primera del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Buenos Aires. Argentina. 5 p.
5. Esau, K. 1972. Anatomía vegetal. Ediciones Omega, S.A. Barcelona. 779 p.
6. Faria, A., Y. Hernandez, y G. Trujillo. 1993. Presencia de la marchitez bacteriana de la papa en Sanare, Edo. Lara y caracterización del patógeno a nivel de biovar. Fitopatol. Venez. 6:43.
7. García, R., A. García y L. Delgado. 1999. Distribución, incidencia y variabilidad de *Ralstonia solanacearum*, agente causal de la marchitez bacteriana de la papa en el estado Mérida. Bioagro 11(1): 12-23.
8. Goto, M. 1992. Fundamentals of bacterial. Plant Pathology. New York, EE.UU. Academic Press. 342 p.
9. Grimault, V., B. Gelie, M. Lemattre, P. Prior y J. Schmit. 1994. Comparative histology of resistant and susceptible tomato cultivars infected by *Pseudomonas solanacearum*. Physiological and molecular plant pathology 44, 105-123.
10. Hayward, A. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Rev. Phytopathol. 29:65-87.
11. Hernández, Y., G. Trujillo y C. Muñoz. 1997. Diagnóstico de bacterias que afectan al tomate en algunas zonas de producción en Venezuela. Fitopatol. Venez. 10:24.
12. Hernandez, Y., N. Mariño, G. Trujillo y T. Urbina. 2003. Invasión de *Ralstonia solanacearum* en tejidos de tallos de tomate. XVIII Congreso Venezolano de Fitopatología. Maracay. Venezuela. Memorias.
13. Kelman, A. y L. Sequeira. 1965. Root-to-root spread of *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology. 55:304-309.
14. Kelman, A. 1985. Plant pathology at the crossroads. Annual Rev. Phytopathol. 23:1-11.
15. Mora, K. 2001. Estudio de algunos aspectos sobre el control de la marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Tesis de grado. Universidad central de Venezuela. Maracay, Venezuela.
16. Messiaen, C.; D. Blancard, F. Rouxel y R. Lafon. 1995. Enfermedades de las hortalizas. Ediciones Mundi. Prensa. Madrid. Barcelona, México. 576 p.
17. Muñoz, C. 1996. Detección de bacterias fitopatógenas en muestras de plantas provenientes de campo y en semillas de tomate usando la técnica de doble difusión en agar. Tesis de grado para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Maracay, Venezuela. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía.
18. Nakaho, K., H., Hibino y H. Miyawa. 2000. Possible mechanisms movement of *Ralstonia solanacearum* in resistant tomato tissues. J. Phytopathology 148: 181-190.

19. Ortega, E. y M. Leopardi de Ortega. 1991. Susceptibilidad de cultivares de papa a la infección por marchitez bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) en Guanaguana, estado Monagas. *Fitopatol. Venez.* 4:45.
20. Rost, T. 1996. Stem Vascular Tissue Section of Plant Biological Sciences. University of California, Davis. Disponible en URL: <http://www.pbl.ucdavis.edu/courses7pbl/tomato> [2001, agosto, 03]
21. Trujillo, G. 1998. Fundamentos de bacterias fitopatógenas. *Revista Alcance de la Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela.* 56:211 p.