

Inmovilización de *Xanthomonas phaseoli* (E.F. Smith) Dowson en hojas de frejol Tepary (*Phaseolus acutifolius*), resistente a la bacteriosis o tizón común¹

Claudio Cafati K.² y Alfred W. Saettler³

INTRODUCCION

La bacteriosis o tizón común del frejol causada por *Xanthomonas phaseoli* (E.F. Smith) Dowson, es considerada como una de las enfermedades transmisibles por semilla más importantes en la mayoría de las áreas de producción de frejoles a través del mundo (Coyné y Schuster, 1974; Saettler, 1977). Aunque la enfermedad puede ser controlada mediante el uso de semillas libres de la bacteria y de rotaciones adecuadas de cultivo, a corto plazo, un control práctico y económico sólo puede lograrse a través del desarrollo de cultivares resistentes. Un considerable esfuerzo ha sido dirigido hacia la búsqueda de fuentes de resistencia que puedan ser utilizadas en programas de mejoramiento genético (Coyné y Schuster, 1974; Leakey, 1973; Saettler, 1977) y, hasta la fecha, solamente ciertos tipos de frejol Tepary (*Phaseolus acutifolius*) han demostrado poseer un alto nivel de resistencia a diferentes aislamientos de *X. phaseoli*.

Estudios realizados bajo condiciones de invernadero y de campo, donde se comparó la multiplicación y distribución de *X. phaseoli* en

genotipos de frejol con diferentes niveles de resistencia, corroboraron resultados preliminares (Cafati y Saettler, 1979; Cafati, 1979). Aunque la bacteria sobrevivió por períodos relativamente largos de tiempo en hojas inoculadas de frejol Tepary (Arizona-Buff) la población bacteriana permaneció en fase estacionaria para posteriormente declinar. Por otra parte, Tepary presentó resistencia a la colonización sistémica del patógeno y nunca presentó síntomas de bacteriosis a través de todos los experimentos.

Las bases fisiológicas y bioquímicas que permiten explicar la resistencia a enfermedades de las plantas es un aspecto que ha permanecido en constante actualidad en la discusión científica. Recientemente, varios investigadores han informado que la "fijación" ("attachment") y "envolvimiento" (Sequeira, Gaard y De Zoeten, 1977) o "inmovilización" (Goodman, Huang y White, 1976), de bacterias incompatibles y/o saprofitas por las paredes celulares del huésped, parece ser un fenómeno bastante generalizado y se ha encontrado en varios sistemas bacteria-huésped (Bogers, 1972; Goodman *et al.*, 1976; Roebuck, Sexton y Mansfield, 1978; Sequeira *et al.*, 1977; Sing y Schroth, 1977). Este fenómeno ha sido propuesto como un importante mecanismo de defensa a bacterias (Goodman, *et al.* 1976; Sing y Schroth, 1977). Sequeira *et al.* (1977), sugirieron que este fenómeno podría presentarse también en combinaciones parásito-huésped resistente.

El presente estudio tiene por objeto investigar la posible presencia del fenómeno de inmovilización de *Xanthomonas phaseoli* en los espacios intercelulares de un huésped resistente, y de uno susceptible a la bacteria.

¹ Recepción originales: 28 de febrero de 1980.

Investigaciones Cooperativas de AR, SEA y U.S. Department of Agriculture y Michigan State University, East Lansing.

Los autores expresan sus agradecimientos a los doctores Gary R. Hooper y Karen Baker, por su asistencia en los trabajos de microscopía electrónica.

² Ing. Agr., Ph. D., Programa Leguminosas de Grano, Estación Experimental La Platina, Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Casilla 5427, Santiago, Chile.

³ Investigador Fitopatólogo, Ph. D., Agricultural Research, Science and Education Administration, U.S. Department of Agriculture, Michigan State University East Lansing, 48824.

MATERIALES Y METODOS

Plantas de frejol Tepary (Arizona-Buff) y cultivar Tuscola (*Phaseolus vulgaris*), resistente y susceptible a *X. phaseoli*, respectivamente, fueron inoculadas al estado de primera hoja trifoliada bajo condiciones controladas de invernadero. Las hojas fueron inoculadas con una suspensión bacteriana del aislamiento R15-1 de *X. phaseoli*, resistente a rifampicin (Cafati, 1979) con una concentración de 10^8 células por ml, en la superficie inferior de las hojas usando un pulverizador conectado a una línea de aire comprimido ($1,2 \text{ Kg/cm}^2$). Como resultado, los sitios de inoculación (aproximadamente 0,5-1,0 cm de diámetro), tanto de las hojas de la variedad resistente como susceptible, retuvieron una apariencia acuosa por aproximadamente 3 horas.

Después de 1, 3 y 18 horas y 4 y 8 días después de la inoculación, se tomaron muestras de hojas, las que fueron preparadas para observación al microscopio electrónico. Se cortaron secciones de 1 mm^2 de las áreas inoculadas las que se pusieron en 5% de glutaraldehído en 0,1 M de buffer fosfato (pH 7,2) a 4°C . Enseguida, los tejidos fueron lavados dos veces en el mismo buffer por períodos de una hora y luego fijados en 1% de tetraóxido de osmio en buffer fosfato a 4°C . El material fue luego lavado, deshidratado y dejado por un período de 12 horas en etanol 100%. Después de un período de transición en acetona, las secciones fueron embebidas en una mezcla de epon-araldite/ERL epoxy resina (Hopper, Baker y Fleger, 1979). Secciones ultrafinas fueron coloreadas en acetato de uranilo y luego en citrato de plomo. Las secciones fueron examinadas en un microscopio electrónico Phillips 300 operado a 60 kv.

RESULTADOS Y DISCUSION

Frejol Tepary (Resistente). En las hojas de Tepary, tres horas después de la inoculación, la mayoría de las bacterias se encontraron localizadas en los espacios intercelulares y muy próximas a las paredes celulares (Fig. 1). Se observó un tenue material fibrilar, posiblemente liberado por las paredes celulares del huésped, entre las paredes celulares y las bacterias (Fig. 2). A las 18 horas después de la inoculación se observó "fijación" de células bacterianas a las paredes celulares del huésped (Figs. 3, 4 y 5). Observaciones macroscópicas realizadas 48

horas después de la inoculación, indicaron que el tejido infiltrado presentaba bordes necróticos claramente definidos entre el área de infiltración y el tejido sano circundante. A las 72-96 horas, toda el área de inoculación se presentaba con una necrosis de color café; a nivel ultraestructural, se observó una destrucción completa de las organelas celulares.

En las microfografías al microscopio electrónico de células del mesófilo esponjoso en hojas de Tepary (*Ph. acutifolius*), resistente, se muestra la interacción entre la pared celular del huésped y *Xanthomonas phaseoli* (figuras 1 a 5).



Figura 1. Sección transversal de bacterias 3 horas después de la inoculación. Se observa un grupo de bacterias alineadas en proximidad a las paredes celulares del huésped ($\times 12.500$) (B = bacterias; W = pared celular)

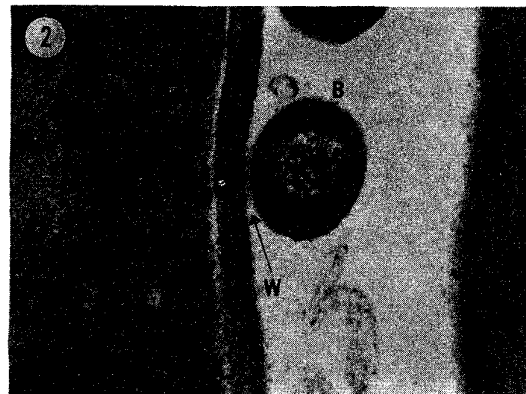
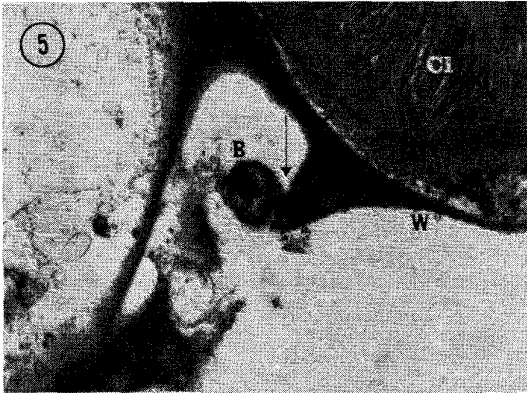
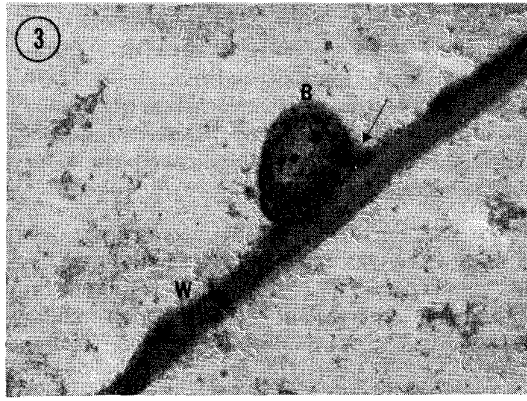


Figura 2. Sección transversal de la bacteria en los espacios intercelulares 3 horas después de la inoculación. Se observa un tenue material fibrilar entre la pared celular del huésped y la bacteria (flecha) ($\times 60.000$) huésped ($\times 12.500$) (B = bacteria; W = pared celular)



Figuras 3, 4 y 5. Secciones transversales de la bacteria fijadas a la matriz de la pared celular del huésped 18 horas después de la inoculación. Se observa la matriz fijada a la célula bacteriana (flechas) (Figuras 3 y 5 $\times 32.000$; figura 4 $\times 25.000$) (B = bacteria; W = pared celular; Cl = cloroplastos).

No se observó evidencia de multiplicación de las bacterias inmovilizadas en las paredes celulares, como tampoco una encapsulación total como la descrita en las hojas de tabaco (Goodman *et al.*, 1976; Sequeira *et al.*, 1977). Sin embargo, estructuras similares ("blister-like"), fueron encontradas frecuentemente, después de 24 horas, sólo en las paredes celulares de hojas inoculadas de Tepary (Fig. 6). El fenómeno de adherencia ocurrió previo a la reacción de hipersensibilidad; esto concuerda con observaciones de otras interacciones bacteria-pared celular del huésped (Goodman *et al.*, 1976; Sequeira *et al.*, 1977).

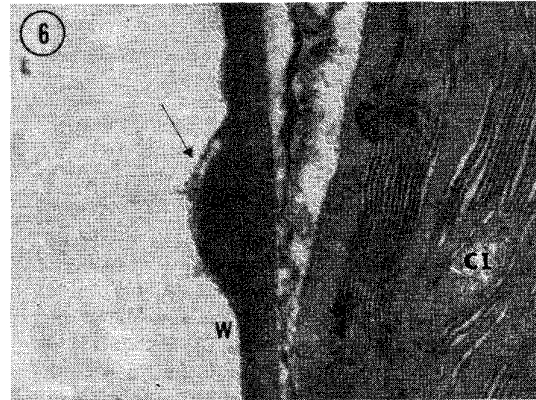


Figura 6. Sección transversal de espacios intercelulares 96 horas después de la inoculación. Estructura (flecha) semejante a las descritas en casos de encapsulación total de la bacteria ($\times 52.000$) (W = pared celular; Cl = cloroplastos).

Frejol Tuscola (Susceptible). En las hojas del cultivar Tuscola la apariencia acuosa reapareció en las áreas de infiltración 24 horas después de la inoculación; a las 96 horas ésta comenzó a expandirse y una tenue clorosis se presentó en la cara superior de las hojas inoculadas. Síntomas típicos de tizón bacterial se desarrollaron 8 días después de la inoculación. Las observaciones al microscopio electrónico no indicaron ninguna evidencia del fenómeno de "fijación" e "inmovilización" de las bacterias a las paredes celulares del huésped y, por el contrario, *X. phaseoli*, comenzó a multiplicarse a las pocas horas después de la inoculación. Gran número de bacterias se encontraron presentes en los espacios intercelulares 18 horas después de la inoculación (Fig. 7) y, a los 8 días, fue evidente una completa desorganización del citoplasma y un colapso total de las células del huésped (Fig. 8), coincidiendo con la manifestación externa de síntomas de la enfermedad antes mencionada.

Las figuras 7 y 8 muestran las microfografías al microscopio electrónico de células del mesófilo esponjoso de hojas del cultivar Tuscola (*Ph. vulgaris*), susceptible a la bacteriosis o tizón común del frejol.

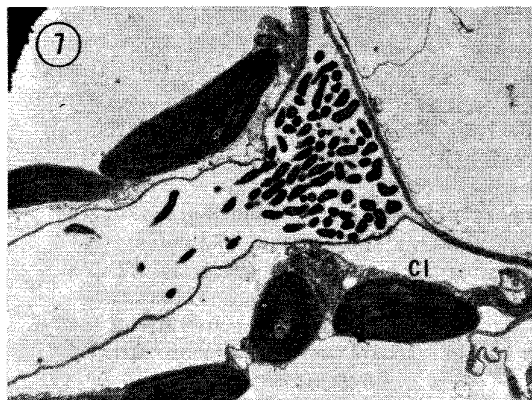


Figura 7. Bacterias en el huésped susceptible 18 horas después de la inoculación. Se observa gran número de células bacterianas en los espacios intercelulares ($\times 16.000$) (Cl = cloroplastos)



Figura 8. Bacterias en el área de la lesión en las hojas del genotipo susceptible 8 días después de la inoculación ($\times 3.200$)

La interacción entre bacteria-pared celular de las células del mesófilo de las hojas de tabaco y sus relaciones con los varios tipos de reacciones de resistencia que se presentan en esta especie, han sido descritas en detalle por Sequeira *et al.* (1977). La "fijación" de strains incompatibles de *Pseudomonas solanacearum* a las paredes de células del mesófilo de hojas de tabaco, parece ser un paso esencial en el proceso que determina la reacción de hipersensibilidad. De acuerdo con los autores, el proceso de "fijación" puede ser un fenómeno de reconocimiento que involucraría interacciones entre constituyentes de las paredes celulares de la bacteria y del huésped. Sing y Schroth (1977) reportaron un proceso de inmovilización de bacterias saprofitas en los espacios intercelulares de hojas de frejol, fenómeno que no fue observado cuando una bacteria patógena, *P. phaseolicola*, fue infiltrada en hojas de una variedad susceptible. Recientemente, Roebuck *et al.* (1978), informaron que la mayoría de las células bacterianas de *P. phaseolicola* parecían estar fijadas a las paredes celulares del huésped después de la infiltración en hojas de una variedad de frejol resistente. Los autores sugirieron que el fenómeno de "fijación" podría permitir la transferencia de algún factor entre la bacteria y los protoplastos, lo que desencadenaría la reacción de hipersensibilidad. Goodman *et al.* (1976), expresan que "es ante condiciones de bajos niveles de inóculo, situación más corriente a nivel de campo, cuando el proceso de inmovilización bacteriana asume real importancia como un mecanismo de resistencia".

El presente estudio indicó que *X. phaseoli*, bacteria patógena en frejol, es "fijada" en los espacios intercelulares de hojas de una variedad resistente (Tepary-Arizona-Buff); en cambio, este proceso no fue observado en el caso del huésped susceptible. Se considera necesario continuar las investigaciones para determinar si este fenómeno está directa o indirectamente involucrado en la reacción de resistencia o si, además, otros mecanismos de resistencia están también actuando en esta interacción patógeno-huésped.

RESUMEN

Las poblaciones de *Xanthomonas phaseoli* (bacteriosis o tizón común del frejol) permanecieron en fase estacionaria y después declinaron en hojas inoculadas de frejol Tepary (*Phaseolus acutifolius*), resistente; en hojas inoculadas del cultivar Tuscola (*Phaseolus vulgaris*), susceptible, las poblaciones bacterianas exhibieron típicas fases de crecimiento: logarit-

mica, estacionaria y de declinación. Estudios de microscopia electrónica revelaron que las células bacterianas se "fijaron" a las paredes celulares en las hojas de Tepary, pero no en el caso del cultivar Tuscola. El fenómeno de "fijación" fue observado 18 horas después de la inoculación de las hojas, antes de la manifestación de la reacción de hipersensibilidad.

SUMMARY

IMMOBILIZATION OF BEAN COMMON BLIGHT BACTERIA (*Xanthomonas phaseoli*) IN LEAVES OF TEPARY BEAN (*Phaseolus acutifolius*) RESISTANT TO THIS DISEASE

Populations of *Xanthomonas phaseoli* (bean common blight bacteria) remained at stationary phase and then declined in inoculated leaves of the resistant Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*); in inoculated leaves of the susceptible Tuscola bean (*Phaseolus vulgaris*), *Xp* populations exhibited the typical logarithmic, stationary, and decline phases. Transmission electron microscopy revealed that the *Xp* cells were attached to the host cell walls in the leaves of the resistant Tepary, but not in the susceptible Tuscola cv. Attachment appeared 18 hr after leaf inoculation, well before the visible appearance of hypersensitivity.

LITERATURA CITADA

- BOGERS, R.J. 1972. On the interaction of *Agrobacterium tumefaciens* with cells of *Kalanchoe daigremontiana*. In Proc. 3rd Int. Conf. Plant Pathogenic Bacteria, ed. H.P. Maas Geesteranus, pp. 239-50. Wageningen, the Netherlands: Cent. Agri. Publ. Poc. 365 p.
- CAFATI, C.R. 1979. Effect of host genotype on multiplication, distribution, and survival of bean common blight bacteria (*Xanthomonas phaseoli*). Ph. D. Thesis, Michigan State University, East Lansing. 127 p.
- CAFATI, C.R. and A.W. SAETTLER. 1979. Effect of host genotype on multiplication and distribution of bean common blight bacteria. Ann Rept. Bean Imp. Coop. 22: 43-45.
- COYNE, D.P., and M.L. SCHUSTER. 1974. Breeding and genetic studies of tolerance of several bean (*Phaseolus vulgaris* L.) bacterial pathogens. Euphytica 23:651-656.
- GOODMAN, R.N., HUANG, P.Y. and WHITE, J.A. 1976. Ultrastructural evidence for immobilization of an incompatible bacterium, *Pseudomonas pisi*, in tobacco leaf tissue. Phytopathology 66:754-757.
- HOPPER, G.R.; BAKER, K.K. and FLEGER, S.L. 1979. Exercises in electron microscopy: A laboratory Manual for Biology and Medicine. Appendix 6. Published by MSU, pp. 118-121.
- LEAKEY, C.L.A. 1973. A note on *Xanthomonas* blight of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and prospects for its control by breeding for tolerance. Euphytica: 132-140.
- ROEBUCK, P.; SEXTON, R. and MANSFIELD, J.W. 1978. Ultrastructural observations on the development of the hypersensitive reaction in leaves of *Phaseolus vulgaris* cv. Red Mexican inoculated with *Pseudomonas phaseolicola* (race 1). Physiological Plant Pathology 12:151-157.
- SAETTLER, A.W. 1977. Breeding dry edible beans (*Phaseolus vulgaris* L.) for tolerance to *Xanthomonas* bacterial blights. Fitopatologia Brasileira 2:179-186.
- SEQUEIRA, L., GAARD, G. and DE ZOETEN, G.A. 1977. Interaction of bacteria and host cell walls: its relation to mechanisms of induced resistance. Physiological Plant Pathology 10:43-50.
- SING, Y.O. and SCHROTH, M.N. 1977. Bacteria-Plant cell surface interactions: Active immobilization of saprophytic bacteria in plant leaves. Science 197:759-761.