Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

INVESTIGACION ULTRAESTRUCTURAL SOBRE LA PRESENCIA DE BACTERIAS EN EL EMBRION DEL CACAHUATE (Arachis hypogea L.)

T E S I S

Que para optar al título de:

B I O L O G O

p r e s e n t a :

Ana María Ramos Velázquez

México, D. F. 1977

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mis padres que me brindaron el apoyo, el cariño y las facilidades que me permitieron estudiar. Gracias.

A mis hermanos con cariño.

A Arturo con profundo amor.

A mis amigos.

A la facultad de Ciencias.

A G R A D E C I M I E N T O S

A la Dra. Carmen Tomás Martín, Directora de esta tesis, por su orientación y afecto presentes durante la realización de este trabajo.

Al M. en C. Federico Arana Arana por sus consejos, colaboración y revisión de esta tesis.

Agradezco especialmente a la Biol. Clara Esquivel Huesca por haberme brindado su amistad y su valiosa ayuda para la realización de la presente tesis.

Al Sr. Guillermo Ramos Gómez por su colaboración en la elaboración del material fotográfico para este trabajo.

I N D I C E

Introducción y objetivos 1
Estructura macroscópica del cacahuate 4
Estructura microscópica del cacahuate 5
Materiales y Métodos 14
Aislamiento de bacterias 17
Experimento No 1. Con aplicación de bactericida 22
Experimento No 2. Semillas inoculadas con bacterias 23
Resultados 28
Discusión de los resultados 42
Conclusiones 49
Referencias bibliográficas 50

INTRODUCCION Y OBJETIVOS

El cacahuate es originario del Nuevo Mundo. Prueba de ello es el descubrimiento por E.G. Squier, alrededor de 1875 (fidi mas non vidi, Gillier, P. y P. Silvestre. El cacahuate o maní. Ed. Blume. Barcelona. 1970), de granos, semejantes a los de las variedades actualmente cultivadas en Perú, en tumbas precolombinas situadas en Ancon, Pachacamac y otros lugares.

Aunque se desconoce en estado silvestre, la ausencia de especies del género Arachis en otras regiones del mundo y su abundante distribución como especie cultivada en la zona que va desde Brasil hasta Argentina, situada aproximadamente entre los 10° y los 35° de latitud sur, confirman el origen americano de la planta.

Tal parece que la distribución de la especie fue obra de los indios en tiempos precolombinos. Así el cacahuate pudo extenderse a

diferentes regiones de América del Sur, e islas antillanas así como América Central y México.

Posteriormente, a principios del siglo XIX, los portugueses la introducen en la costa occidental de Africa, mientras que los españoles, en la misma época, lo hacen en las Filipinas, a partir de la costa occidental mexicana. Desde allí, el cultivo del cacahuate pudo extenderse a China, Japón, sudeste asiático, India y la costa este de Australia. Es posible que, desde Ceilán o Malasia, llegara posteriormente a Madagascar y a la costa oriental africana. Por lo tanto, Africa se convirtió en punto de unión de dos rutas diferentes de propagación de la especie.

Por otra parte, a pesar de que la planta existía en diferentes lugares de América, fue introducida en los Estados Unidos de Norteamérica desde la costa occidental de Africa, por medio del comercio de los esclavos.

El origen y la historia de la difusión del

cacahuate, explican la gran diversidad de los tipos existentes en América del Sur y en otras regiones del mundo (Filipinas-Malasia-Indonesia y Africa occidental) a las que hay que mencionar como centros de diversificación secundaria.

En la República Mexicana el cacahuate se cultiva, principalmente, en Guanajuato, Guerrero, Sinaloa y parte de Jalisco. Su importancia comercial radica en que de la semilla se extrae un aceite que ocupa el segundo lugar entre los comestibles ya que el ajonjolí ocupa el primero. También es importante como producto principal para la elaboración de dulces y botanas, así como fruto de boca.

El género Arachis pertenece a la familia de las Leguminosas, subfamilia de las Papilionáceas y a la tribu de las Araquidíneas.

Todas las especies presentan unos caracteres botánicos comunes. Los principales son:

-Plantas herbáceas o leñosas en su base, perennes o anuales.

-Tubo del cáliz largo y con aspecto de pe-

dúnculo floral terminado por 5 lóbulos, cuatro de los cuales están soldados.

-Pétalos y estambres insertados en la parte superior del tubo del cáliz.

-Estambres reunidos en tubo sobre una parte de su longitud y en número de 10, alternativamente largos y cortos.

-Ovario sósil, sentado, que contiene de una a seis cámaras, filiforme, terminado en un pequeño estigma.

-Fructificación enterrada por elongación de la base del ovario.

El número cromosómico básico del género Arachis es n=10. El cacahuate cultivado Arachis hypogea L. es tetraploide con 2n=40 (Frahm-Leliveld, 1953 fidi mas non vidi, Darlington, C. D. y A. P. Wylie. Chromosome Atlas of Flowering Plants. George Allen and Unwin LTD. Londres. 1945).

Estructura macroscópica del cacahuate. La vaina o fruto, cuya maduración se lleva a cabo bajo tierra, varía de 1 a 6 cm de longi-

tud y de 0.5 a 2.5 cm de ancho (Altschul, 1958). Su pericarpio o cáscara es color crema, amarillo pálido o naranja y muestra una superficie a modo de red con líneas longitudinales interconectadas con líneas laterales o transversales. El fruto normalmente contiene 2 o 3 semillas en la parte terminal, en forma de abultamientos, generalmente colocadas en posición diagonal. Las semillas varían de forma, desde casi esféricas hasta exageradamente cilíndricas y miden de 10 a 20 mm. La variación de color está dada por la testa, que puede ser roja o color canela, pero también puede ser crema o morada. El rafe y sus ramas se ven claramente en la testa. La semilla consta de dos porciones laterales que son los cotiledones y el embrión propiamente dicho que está constituído por una zona radicular, una porción intermedia o hipocótilo y las plúmulas o epicótilo.

Estructura microscópica. La pared del fruto es el pericarpio que, a su vez, está constituído por dos capas: el epicarpio y el hi-

pocarpio. En sección transversal (Winton, 1906 y Winton, 1932) el epicarpio presenta excrecencias semejantes a los típicos pelos radiculares. La capa hipodérmica consta de varias capas de células organizadas radialmente; las más externas presentan paredes gruesas y cribosas. Estas células hipodérmicas cribosas son importantes en la identificación microscópica de la cubierta del cacahuate. Dentro de la región hipodérmica está el mesocarpio, constituído de parénquima. Embebido en este parénquima hay una zona de fibras muy característica la cual se extiende hacia los surcos del pericarpio. Tales proyecciones o prolongaciones normalmente se bifurcan y encierran paquetes fibrovasculares. Las fibras presentan gran variedad de formas (Winton, 1906 y Winton, 1932) y su arreglo entrelazado es una diferencia valiosa para la identificación de la cubierta del cacahuate.

Las capas más internas del pericarpio son de parénquima.

Testa.- La epidermis externa de la testa

es atípica de las Leguminosas las cuales suelen poseer células en empalizada. En lugar de esto, Arachis tiene muchas células características, latas, con diámetro superior de 25 micras en sección transversal y con las partes externas de las paredes muy engrosadas y cribosas.

Vistas superficialmente dichas células tienen un diámetro de 20 a 50 micras y debido a las cribas las paredes muestran unas marcadas proyecciones en forma de dedos.

El resto de la testa consiste de parénquima y algo de tejido vascular. Es una característica del parénquima que presenta una graduación desde una capa compacta de células que se encuentra inmediatamente abajo de la epidermis externa hasta capas esponjosas en que las células están más aplastadas.

Endospermo.- Fuertemente adherida a la superficie interna de la testa está una sencilla capa de células con diámetro tangencial, en sección transversal, de cerca de 30 mi-

cras. Contiene gotas de aceite y posiblemente pequeñísimos granos de aleurona. Esta capa ha sido interpretada a menudo como endospermo, como la capa interna de la testa o como perispermo (Winton, 1906 y Winton, 1932).

Embrión.- Los cotiledones están constituídos por células de parénquima, pero que no son del tipo de empalizada. Todas estas células tienen paredes cribosas, pero el grado de cribosidad es menor hacia la epidermis del cotiledón. Las células contienen gotas de aceite, granos de almidón con hílio central que miden de 4 a 12 micras de diámetro y gránulos de aleurona de 5 a 12 micras de diámetro.

Recientemente se descubrió en Londres (Excelsior 15-B 14, Noviembre, 1976) que una bacteria puede ahora utilizarse para sustituir los abonos nitrogenados, cuyo costo aumenta continuamente. Uno de los campos más prometedores de la investigación agrícola es el estudio de las bacterias que dan lugar a la fijación

del nitrógeno, elemento abundantísimo en la naturaleza.

Se entiende por fijación el proceso a través del cual el nitrógeno atmosférico -no utilizable directamente por las plantas- se convierte en compuestos de amonio que las plantas absorben y transforman en proteínas vegetales. Estas, absorbidas a su vez por los mamíferos, se transforman en proteínas animales, necesarias para la subsistencia.

El proceso de fijación de nitrógeno por bacterias se conoce desde hace mucho tiempo, sobre todo en lo referente a las bacterias del género Rhizobium. Estas bacterias se introducen en las raíces de las leguminosas, provocando la formación de nudosidades donde vive gracias a los compuestos del carbono que extrae de la planta. Esta, a su vez, se beneficia del nitrógeno fijado por las bacterias; estableciéndose así una simbiosis.

Desde hace muchos años, los agricultores conocen empíricamente esta simbiosis entre

Rhizobium y las plantas, pues regularmente siembran leguminosas cuando quieren enriquecer un territorio empobrecido. Ahora bien, Rhizobium sólo fija el nitrógeno cuando vive en simbiosis con las leguminosas. Se ha descubierto que la bacteria Spirillum lipoferum es capaz de una operación semejante con los cereales. Efectivamente, científicos brasileños del Instituto de Investigaciones Agropecuarias del Centro Sur (I.P.E.A.C.S.) han observado que en climas tropicales y en determinadas variedades de suelo, algunos tipos de Spirillum infectan las raíces del trigo y fijan el nitrógeno.

Los mismos resultados produce Spirillum en algunas variedades de hierba y, según investigaciones efectuadas en las Filipinas, en el arroz.

La fijación del nitrógeno por Spirillum da sus mejores resultados, según investigaciones de los científicos brasileños, cuando la temperatura del suelo oscila entre 31 y

40 grados centígrados. Ello significa que esta bacteria puede usarse especialmente en los climas tropicales, para sustituir los abonos nitrogenados, cuyo costo aumenta continuamente. En efecto, según un cálculo del Fondo Monetario Internacional, los países en vías de desarrollo gastaron durante 1974 en abonos químicos 1,400 millones de dólares, suma tres veces mayor que la que gastaron en 1971 para adquirir una cantidad análoga, compuesta en buena parte por abonos nitrogenados.

La posibilidad de usar el nitrógeno atmosférico mediante las bacterias puede ser una magnífica solución para resolver el gran problema del costo económico de los abonos artificiales. En numerosos países se investiga sobre las bacterias que dan lugar a la fijación del nitrógeno. Así por ejemplo la Torhmanfted Experimental Station of Hertfordshire (Inglaterra) está trabajando con 500 variedades de Rhizobium y con 50 de otras bacterias.

Inicialmente se intentó hacer un estudio morfológico ultraestructural de las células que constituyen el embrión del cacahuate. Al observarse la presencia de bacterias en el interior del embrión sin que aparentemente existiera daño celular, el objetivo original pasó a segundo término.

Problema: Cuál es la relación existente entre las bacterias y la semilla de Arachis hypogea L.?

Hipótesis: Las semillas de Arachis hypogea L. presentan bacterias en el embrión que les ayudan a la germinación.

Variable dependiente: la germinación

Variable independiente: las bacterias.

Control de variables: el control de variables que pudieran intervenir en los dos experimentos a realizar se llevó a cabo de la siguiente manera:

Para ambos experimentos:

Humedad y temperatura: constantes gracias a la germinadora.

Semillas: todas de la misma variedad y obtenidas de la misma cosecha.

Para el experimento No. 1.

No. de semillas: el mismo en ambos lotes: 100

Medio de desarrollo: el mismo para ambos lotes: algodón.

Cantidad de líquido: 600 ml de agua en la bandeja testigo y la misma cantidad de bactericida para el experimental.

Tiempo: el experimento finalizó a los 5 días para ambos lotes.

Para el experimento No. 2.

No. de semillas: el mismo en cada lote: 10

Medio de desarrollo: el mismo en cada lote: vermiculita.

Cantidad de líquido correspondiente: 30 ml.

Tiempo: el experimento finalizó para todos los lotes a los 5 días.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron semillas seleccionadas de Arachis hypogea L. obtenidas en la Productora Nacional de Semillas de la Secretaría de Agricultura y Ganadería, de tres variedades distintas: Florida, Criollo y RF-132. Se pusieron a germinar de la forma usual (entre papel secante y regadas con agua destilada) y a los 5 días de germinación, se aislaron los embriones de los cotiledones y se cortaron en tres partes: epicótilo o plúmulas, hipocótilo o porción intermedia y radícula.

Se llevó a cabo el procesamiento del material para microscopía electrónica de la siguiente manera:

1o. Fijación: Las partes señaladas del embrión, colocadas en tubos de ensaye, se fijaron con glutaraldehido al 3% disuelto en amortiguador de fosfatos a un pH de 7.4 durante media hora.

2o. Lavado: Enseguida se hicieron los la-

vados necesarios con amortiguador de fosfatos hasta la eliminación total del fijador.

3o. Post-fijación: Se llevó a cabo con tetróxido de osmio al 1% disuelto en amortiguador de fosfatos durante dos horas, hasta que los fragmentos del embrión tomaron color pardo oscuro.

4o. Deshidratación: La deshidratación se realizó con alcoholes graduales de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% durante media hora cada uno y tres cambios de alcohol absoluto, de 20 min cada uno. Posteriormente se hicieron tres cambios de óxido de propileno, de 20 min cada uno.

5o. Preinclusión: Al óxido de propileno del último cambio se le agregó un 25% de la siguiente mezcla de resinas epóxicas:

Mezcla A) Epón 812 ... 31 ml
DDSA ..... 50 ml
Mezcla B) Epón 812 ... 50 ml
NMA ..... 45 ml

Estando bien mezcladas las soluciones A y B por separado se prepara una mezcla de 5 ml cada una y por cada 10 ml de esta solución se añaden 0.18 ml de DMP (2,4,6 tri-dimetil-amino-metil-fenol) que actúa como catalizador.

Se fueron aumentando las concentraciones de Epón 812-óxido de propileno cada 12 horas, hasta obtener una concentración al 75% de Epón 812.

Al término de 12 horas, se destaparon los tubos que hasta el momento habían permanecido tapados y en refrigeración, hasta la completa evaporación del óxido de propileno, a temperatura ambiente.

6o. Inclusión: La inclusión se llevó a cabo en la mezcla de Epón 812, colocando las porciones del embrión en tabletas de inclusión y la polimerización se hizo en una estufa a 60°C durante 32 horas.

Los cortes se hicieron de un grosor de 500 a 600 Å, en un ultramicrotomo Sorvall MT-2, y fueron montados en rejillas de cobre.

Las preparaciones se tiñeron con una solución acuosa de citrato de plomo durante minuto y medio.

La observación y las fotografías se tomaron en un microscopio electrónico Zeiss EM 9.

Aislamiento de bacterias. Para el aislamiento de las bacterias se siguió el método indicado a continuación: Como en el caso anterior, se trabajaron las mismas variedades de Arachis hypogea L.: Florida, Criollo y RF-132, aplicándoles los siguientes tratamientos:

1.- Se lavaron semillas con bactericida BTC (Bálsamo blanco, Millmaster Onyx International 2125 50% No. 6912), a una concentración de $5X10^{-4}$%, durante 3 min y posteriormente para eliminar el exceso de bactericida, con agua destilada estéril. En este proceso fue importante no eliminar la testa de las semillas.

2.- Semillas lavadas con solución acuosa de hipoclorito de sodio en proporción 3:1 durante tres minutos y posteriormente para eliminar

el exceso de hipoclorito, con agua destilada estéril. Tampoco se eliminó el tegumento o testa de las semillas.

3.- Se lavaron las semillas con BTC durante 3 minutos y con agua destilada estéril. Posteriormente fueron colocadas sobre una gasa estéril y allí fueron desprovistas de su tegumento usando para ello pinzas flameadas y enfriadas en agua destilada estéril.

4.- Se procedió a lavar las semillas con hipoclorito de sodio durante 3 minutos y enjuagadas con agua destilada estéril. También fueron desprovistas de su testa por el procedimiento citado en el punto 3.

Todo esto se realizó cerca de dos mecheros con el fin de obtener un área estéril. De cada variedad de Arachis hypogea L. se utilizaron dos semillas para cada tratamiento antes descrito y se colocaron en tubos de ensaye con caldo nutritivo BHI (Brain Heart infusion dehydrated 0037-01, DIFCO) que se mantuvieron a 37°C durante 24 horas. El aisla-

miento se repitió en tres ocasiones.

Al cumplirse el plazo de incubación, las bacterias obtenidas se resembraron por técnica de aislamiento en los siguientes medios de cultivo: Bacto Mueller Hinton medium dehydrated 0757-01 (DIFCO), Bacto blood agar base dehydrated 0045-01 (DIFCO) (Lámina IV, figuras 1 y 2) y Mannitol Salt agar 11407 (BBL) e igualmente se mantuvieron a 37°C durante 24 horas.

Posteriormente, ya con cultivos puros, se realizaron pruebas bioquímicas para tratar de identificarlas.

Asimismo se hicieron frotis con los que se llevó a cabo la tinción de Gram para observar morfología y la de Wirtz para la verificación de esporas. Como la segunda resultara positiva, se llevó a cabo la técnica de cosecha de esporas (Esquivel y Herrera, 1977) de la forma siguiente:

Previa verificación de la pureza, se inocularon dos cajas de Petri con medio

nutritivo (antibiotic medium No. 1 DIFCO), estas cajas con inóculo masivo, se mantuvieron a 37°C durante 24 horas y con este primer inóculo se inoculó una botella de Roux que contenía 300 ml de medio nutritivo.

Se hizo la cosecha del cultivo de las cajas de Petri con 10 ml de solución salina estéril a una concentración de 8.5 g NaCl/1 lt agua y procurando recoger la mayor cantidad posible de bacterias, se preparó una suspensión que fue repartida uniformemente en la superficie del medio nutritivo de la botella de Roux. La botella se mantuvo a 37°C durante tres semanas para provocar la esporulación.

Este último cultivo se cosechó de la botella de Roux con 30 ml de agua destilada estéril, pasando el producto a tubos esterilizados de tapón de rosca; éstos se colocaron en un baño María a una temperatura de 65°C, durante 30 min , después se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos, eliminando el sobrenadante, y se agregó nuevamente agua

destilada estéril; los tubos se agitaron y se colocaron nuevamente a 65°C. El proceso de calentamiento y lavado se hizo tres veces y después solamente se centrifugó y eliminó el sobrenadante restituyendo el agua las veces que fue necesario hasta observar que quedara completamente transparente.

Ya obtenido el concentrado de esporas, se conservó en refrigeración a una temperatura de 4-8°C, para su uso posterior.

De los cultivos puros, se tomó una muestra que fue procesada para microscopía electrónica, sólo que en este caso los tiempos se redujeron a la mitad.

Las bacterias así obtenidas, se resembraron en cajas de Petri con medio de Bacto nitrate agar Dehydrated 0106-02(DIFCO) unas en completa aerobiosis y otras en anaerobiosis. Se realizaron frotis y tinción de Gram para ambas y se les tomaron fotografías de microscopía de luz. (Lámina V, figuras 1 y 2).

Con el propósito de averiguar si dichas

bacterias tenían o no influencia en la germinación del cacahuate se hicieron los siguientes dos experimentos.

Experimento No. 1. Con el fin de obtener un medio libre de gérmenes se esterilizaron dos bandejas de aluminio con algodón y se colocaron 100 semillas de Arachis hypogea L. var. Criollo, en cada una, siendo una de las bandejas el lote testigo y la otra el experimental. El primero se regó con agua destilada estéril y el segundo con bactericida BTC (Bálsamo Blanco, Hillmaster Onyx International 2125 50% No. 6912)a una concentración de $5X10^{-4}$%. Se utilizaron 600 ml de líquido en cada bandeja y se regaron uniformemente con pipetas. Posteriormente, con el fin de mantener la temperatura y la humedad constantes, fueron colocadas en una estufa germinadora a una temperatura de 30°C y se observaron periódicamente durante una semana, al final de la cual se realizó el recuento de semillas germinadas en ambas bandejas.

Experimento No. 2. En este caso se procedió a la inoculación de las semillas de Arachis hypogea L. var. Criollo, con las bacterias aisladas. La cosecha de bacterias se preparó de la siguiente manera: Se obtuvo un cultivo puro de la bacteria, sembrado por estrías, en una caja de Petri con medio de cultivo Bacto Mueller Hinton Medium dehydrated 0757-01 (DIFCO) que se mantuvo durante 24 horas a 37°C. Al día siguiente se tomaron de 2 a 5 colonias con una asa de sembrar estéril y se depositaron en un tubo de ensaye con 5 ml de solución salina estéril a una concentración de 1.5 g NaCl/1 lt agua, ya que a esta concentración se podía evitar una inhibición en la germinación de las semillas (Heimann, 1952). Para comprobar que las bacterias no resultaran dañadas a esta concentración, se realizó un frotis el cual se observó al microscopio de luz.

El tubo se agitó hasta obtener una suspensión de la cual se tomaron 2.5 ml para cada una de dos cajas de Petri con medio de

cultivo, moviendo las cajas de tal manera que los 2.5 ml de la suspensión cubrieran toda la superficie del medio. Posteriormente se eliminó el exceso de inóculo. Estas cajas se mantuvieron durante 24 horas a 37°C. Al día siguiente se levantó la cosecha del inóculo masivo de ambas cajas con solución salina estéril a una concentración de 1.5 g NaCl/1 lt agua, en un tubo de ensaye también estéril. Esta suspensión fue la que se utilizó para la inoculación de las semillas de Arachis hypogea L. var. Criollo.

Ahora bien, para conocer la cantidad de bacterias que se estaban inoculando, se llevó a cabo el método de recuento de microorganismos por dilución seriada en tubo, de la forma siguiente: de la suspensión anteriormente mencionada, se tomó una alícuota (4 ml) la cual fue diluída 1:10 (factor de dilución) en solución salina estéril. De esta dilución se tomó 1 ml y se colocó en 9 ml de solución salina estéril, obteniéndose esta vez una di-

lución de 1:100 y así sucesivamente hasta llegar a una dilución de $1X10^{23}$ bacterias. Ya hechas las diluciones, se tomó 1 ml de cada uno de los tubos y, por separado, se colocó en 15 ml de medio de cultivo fundido a una temperatura de 45°C para ser envasados en cajas de Petri estéril. Se dejó pasar el tiempo suficiente para que solidificara el medio a temperatura ambiente y posteriormente se mantuvieron a 37°C durante 24 horas.

Al día siguiente se observó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) en cada una de las cajas, previamente preparadas con las suspensiones de bacterias y se realizó el recuento en aquella caja que no tuviera más de 30 a 300 UFC y que se encontraran perfectamente distribuídas en toda la caja. El número de UFC obtenido se multiplicó por el factor de dilución ($1X10^{23}$) y de esta forma se obtuvo el número de bacterias por ml : $1.45X10^{23}$ UFC/ml

Para este experimento se utilizaron un to-

tal de 40 semillas puestas a remojar en vasos de precipitado durante 24 horas, de la siguiente manera:

10 semillas en agua destilada estéril.

10 semillas en solución salina estéril (0.5 g NaCl/1 lt agua)

10 semillas en solución salina estéril (1.5 g NaCl/1 lt agua)

10 semillas en 1.45×10^{23} UFC/ml

Cada vaso con 30 ml de líquido correspondiente. Con el fin de mantener la temperatura y humedad constantes, permanecieron las 24 horas dentro de la estufa germinadora.

Al día siguiente se colocaron las semillas en bandejas con vermiculita esterilizadas y después se metieron en la germinadora para contar las semillas germinadas al cabo de cinco días.

Una vez obtenidos los resultados experimentales de germinación y a los 30 días se

procedió a procesar para Microscopía electrónica con objeto de investigar a nivel ultraestructural la posible causa de que los resultados de la germinación no hayan sido los esperados, la radícula del cacahuate testigo y de aquel inoculado con bacterias en la forma que anteriormente se indica. Se realizaron los cortes y fotografiaron en la forma usual.

R E S U L T A D O S

Se observaron y fotografiaron los cortes de meristemo radicular de las tres variedades de Arachis hypogea L., Florida, Criollo y RF-132. La descripción del material observado puede verse en los pies de grabado de las Láminas I, II y III.

Con base en las pruebas bioquímicas y en las claves de identificación, se considera que las bacterias aisladas del cacahuate pertenecen al género Bacillus sp.

Estas bacterias presentan las siguientes características:

De cultivo:

Colonias de forma circular, de ± 1 mm de diámetro, superficie lisa, borde entero, planas y aspecto cremoso (Lámina IV).

Morfológicas:

Células de forma bacilar con extremos redondeados.

Tamaño promedio en aerobiosis: largo, 3.6

micras y 1 micra de ancho.

Tamaño promedio en anaerobiosis: largo, 10.0 micras y 1 micra de ancho.

Presencia de cápsula.

Presencia de una espora en cada uno de los extremos (Ver Lámina V, figuras 1 y 2).

Tinción de Gram: positiva.

Tinción de Hiss para cápsula: positiva.

Tinción de Wirz para esporas: positiva.

Movilidad: negativa.

Fisiológicas:

En medios nitratados producen nitrito pero no gas.

Desprendimiento de hidrógeno: negativo.

Hemólisis: positiva ∝

Indol: negativo.

Anaerobio facultativo.

Licuefacción o digestión de proteínas:

Gelatina: positiva.

Caseína: positiva.

Suero sanguíneo: negativa.

Reducción de indicadores:

Azul de metileno: negativa.

Producción de ácido:

Glucosa: positiva.

Lactosa: negativa.

Sacarosa: positiva.

Rafinosa: negativa.

Sorbitol: negativa.

Manitol: positiva.

Resultados del experimento No. 1. Con aplicación de bactericida.

Lote testigo: 88 semillas germinadas.

22 semillas no germinadas.

Lote experimental: 73 semillas germinadas.

27 semillas no germinadas.

Se aplicó la prueba de X^2 y se obtuvo un valor de 3.09.

Resultados del experimento No. 2. Semillas inoculadas con bacterias.

Semillas en agua destilada.

Germinadas 7

Semillas en solución salina estéril (8.5 g NaCl/1 lt agua).

Germinadas 6

Semillas en solución salina estéril (1.5 g NaCl/1 lt agua).

Germinadas 9

Semillas inoculadas con $1.45X10^{23}$ UFC/ml

Germinadas 3

En la lámina VI, fig 1, que corresponde al testigo del experimento No. 2, se observan células con escasas bacterias, presencia de vacuolas en el citoplasma y núcleos bien conservados con nucleolo en algunos casos. En las semillas testigo las bacterias se encuentran localizadas preferentemente en los espacios intersticiales (Lámina VI, fig 2) de donde posteriormente emigran al interior del citoplasma celular lisando la pared celular y la membrana plasmática. Se observan en el interior de las células diferentes grados de floculación del citoplasma, sin embargo no

se observa citólisis y se conserva la integridad celular (Lámina VI, figuras 1 y 2).

Al observarse al microscopio electrónico las células del embrión inoculado se encontró que había un alto grado de destrucción o lisis celular que llegaba hasta la médula, como puede apreciarse en la Lámina VII. Las células más internas que todavía conservan sus paredes y, sus membranas celulares, presentan una gran invasión de bacterias que tienden a formar conglomerados sobre las paredes celulares, destruyendo usualmente el núcleo y el resto de los organelos citoplasmáticos (Lámina VII, fig 2). Se considera que debido al hecho anterior el grado de germinación de las semillas fue mucho menor de lo esperado.

Al comparar las células del interior de la médula en las radículas testigo y en las inoculadas se observa que el daño debido a bacterias fue muy similar (Lámina VI, fig 1 y Lámina VII, fig. 1). Por lo tanto consideramos que este daño es debido a las bac--

terias inoculadas no penetraron a las capas más profundas, produciendo daño celular solamente en la periferia.

Lámina I.- Célula de la radícula de Arachis hypogea L. var. Criollo en la que el citoplasma tiene numerosas inclusiones lipídicas. El núcleo presenta dos nucleolos y dos bacterias Bacillus sp. muy próximas a la membrana nuclear, una de ellas introducida hasta la mitad del núcleo, a pesar de lo cual el núcleo se conserva íntegro. Aumento 51,800 X.

Arachis hypogea L.
var. Criollo

Lámina II.- Células de la radícula de Arachis hypogea L. var. Florida entre las que se observa la pared celular (pc) que separa las dos células. Los núcleos (n) presentan la heterocromatina localizada preferentemente sobre membrana nuclear y una bacteria Bacillus sp. introduciéndose al núcleo en una de las células. Aumento 56,000 X.

Arachis hypogea L. var. Florida

Lámina III.- Citoplasma de Arachis hypogea L. var. RF-132 que presenta inclusiones en forma de gránulos y glóbulos lipídicos. Sobre una vacuola se observa un cuerpo en forma de bacteria. Aumento 47,250 X.

Arachis hypogea L.
var. RF-132

Lámina IV.- Fig 1. Cultivo puro de Bacillus sp. en Bacto Mueller Hinton medium dehydrated 0757-01 (DIFCO). Fig 2. Cultivo puro de Bacillus sp. en Bacto blood agar base dehydrated 0045-01 (DIFCO). En ambas fotografías se pueden apreciar algunas de las características de las colonias formadas por Bacillus sp.

Cultivos puros

Lámina V.- Fig 1. Se observa a microscopía de luz un cultivo de bacterias (Bacillus sp.), en aerobiosis, que presentan forma de bastones cortos. Aumento 2,000 X. El recuadro corresponde a Bacillus sp. del mismo cultivo, a microscopía electrónica en corte trasversal y longitudinal. Aumento 14,581 X. Fig 2. Micrografía de microscopía de luz de un cultivo anaeróbico de bacterias que presentan forma de cadenas largas. Aumento 2,000 X. El recuadro representa la bacteria intracelular encontrada en la variedad Criollo. Aumento 77,000 X.

Bacillus sp.

Término VI.- Fig 1. Se observan al microscopio de luz las células con grandes espacios vacíos debidos a la acción bacteriana y en algunas células que la desintegración es total, quedando solamente la pared celular. En las células de la parte central se observan todavía el núcleo y el nucleolo. Aumento 985 X. Fig 2. Micrografía electrónica de bajo aumento en la que se observa:

a) espacio intersticial con gran cantidad de bacterias.

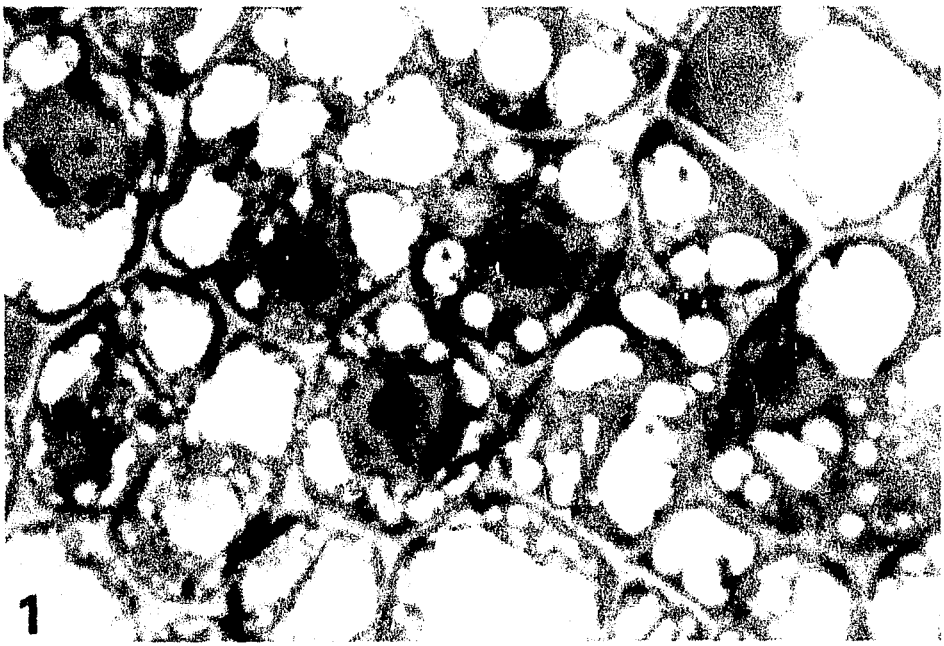
b) una célula que todavía conserva su núcleo y su nucleolo.

c) citoplasma parcialmente digerido por bacterias.

d) múltiples bacterias con el aspecto de una zona electrodensa rodeadas de un halo claro, frecuentemente adheridas en forma de racimo a la zona vacuolar de citoplasma licuado.

e) las células próximas ya no presentan contenido y solamente se observan algunos lisósomas y bacterias adheridas a la parte interna de la pared. Aumento 22,400 X.

Arachis hypogea L.
No inoculado



1

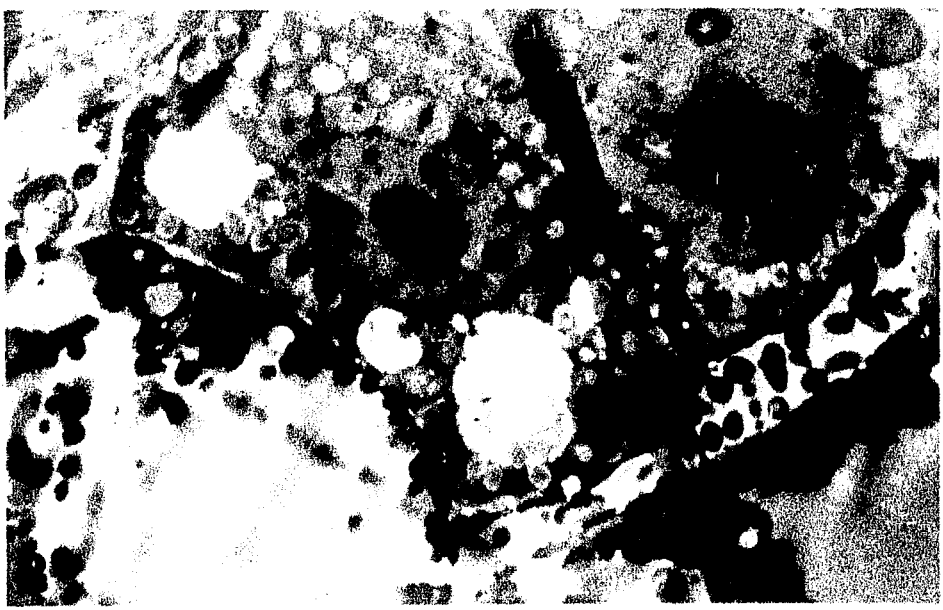


Lámina VII.- Fig 1. Micrografía de microscopía de luz en la que se observa gran cantidad de vacuolas en el citoplasma hay bacterias presentes. La lisis bacteriana llega al núcleo y se conserva solamente el nucleolo. Aumento 3,465 X. Fig 2. Micrografía de microscopía electrónica en la que se observa:

a) espacios intersticiales en los que no aparecen bacterias.

b) ninguna célula conserva núcleo ni nucleolo.

c) citoplasma totalmente digerido por las bacterias que presentan zonas sumamente vacuolizadas. Aumento 21,994 X.

Arachis hypogea L.
Inoculado

Lámina VIII.- Estructuras amiboideas observadas en la porción más externa de la radícula. Se observa: fig 1

a) vacuolas en el interior de las células que frecuentemente contienen Bacillus sp.

b) en ocasiones se encuentran también dentro de las vacuolas las llamadas figuras de mielina que corresponden a residuos de digestión lipídica. Aumento 17,500 X.

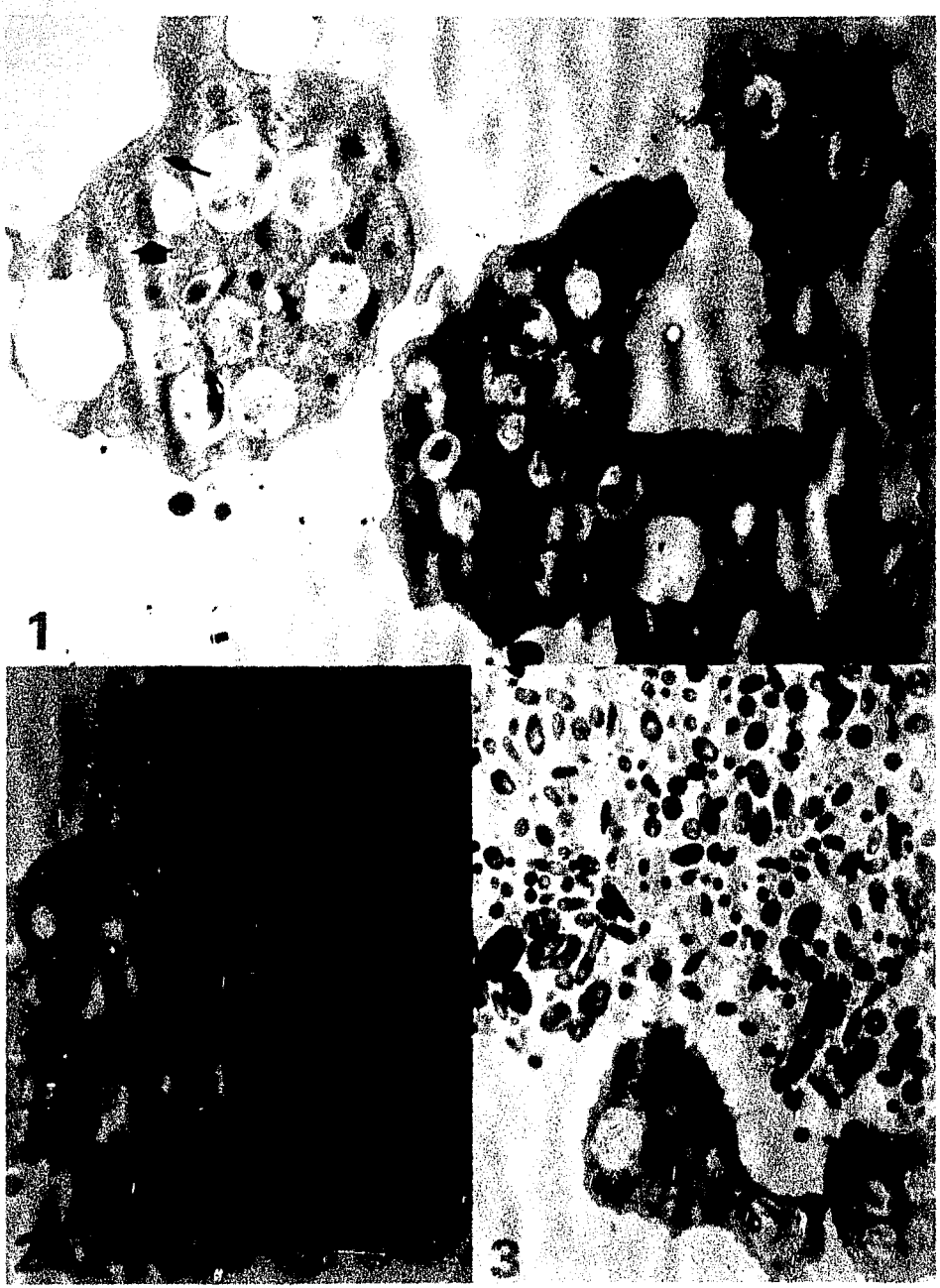
c) en las células de la fig 2 se observa el núcleo y el nucleolo. Aumento 10,570 X.

d) En los citoplasmas se observa retículo endoplasmático (flechas largas) y mitocondrias (flechas cortas).

e) se observan prolongaciones con aspecto de pseudópodos.

Fig 3. Aumento 22,400 X.

Estructuras amiboideas



DISCUSION DE LOS RESULTADOS

El principal problema con que nos enfrentamos al llevar a cabo esta investigación consistió en la falta de bibliografía respecto a la presencia de bacterias en embriones de semillas y su efecto sobre la germinación ya que las únicas publicaciones de que dispusimos se refieren principalmente a bacterias de tipo nitrificantes que no se encuentran propiamente en el embrión de las semillas sino en nódulos de las raíces de la planta y cuyo efecto fisiológico es bien conocido.

Al intentar separar los embriones del resto de la semilla para trabajarlo a microscopía electrónica, se encontró que, estando las semillas secas, la operación resultaba sumamente difícil pues con frecuencia dichos embriones quedaban dañados o incompletos. De ahí que se hiciera necesario poner las semillas a germinar durante 5 días para lograr una fácil separación y adecuada preservación

del embrión en radícula, epicótilo e hipocótilo.

Los tiempos de procesamiento para microscopía electrónica del cacahuate se redujeron, en el caso del procesamiento de las bacterias, a la mitad. Esto se explica porque el tiempo requerido por las células de Arachis hypogea L., que constituyen un tejido y además presentan una pared celular gruesa, dificulta la rápida penetración de los reactivos. En cambio, en el caso de las bacterias esta penetración es más rápida y, por tanto, el tiempo de procesamiento respecto a las células del cacahuate, disminuyó en un 50%.

Las bacterias se colocaron en medios de cultivo aeróbico y anaeróbico con objeto de observar fenómenos de pleomorfismo bacteriano.

El aspecto alargado que se observó en las bacterias en anaerobiosis es similar al que se presenta en el meristemo radicular de Arachis hypogea L., lo cual representa una

prueba objetiva de la presencia de Bacillus sp. en la porción radicular de la semilla del cacahuate. (Lámina V, fig 2).

Los experimentos realizados para tratar de determinar si la bacteria tenía alguna influencia en la germinación de las semillas de Arachis hypogea L., se hicieron con la variedad Criollo ya que en ella se observó por primera vez las bacterias intracelulares.

Con respecto a los resultados obtenidos del experimento No 1 (con aplicación de bactericida) cabe indicar lo siguiente: la prueba de χ^2 aplicada a los datos obtenidos, indica que si el experimento se repitiera habría un 50% de probabilidad de obtener los mismos resultados, es decir, que hasta el momento se mantiene la duda respecto a si Bacillus sp. ayuda o no a la germinación de Arachis hypogea L. Además es probable que en el experimento hayan intervenido ciertos factores como son: que el bactericida (BTC) ha dañado a las células de las

semillas, por lo que el porcentaje de germinación fue menor que en el lote testigo; que la concentración del BTC resultara quizá demasiado alta, aunque dicha concentración es la que se usa regularmente; que el BTC no hubiese penetrado lo suficiente y por lo tanto la influencia de Bacillus sp. continuara. Además el experimento sólo se realizó una vez.

En el primer caso, la solución sería utilizar una sustancia que garantizara únicamente la destrucción o inhibición de las funciones bacterianas sin dañar las células de la semilla del cacahuate, verificando la concentración y haciendo observaciones tales que nos permitan comprobar la total destrucción de las bacterias. En el segundo caso, la solución sería repetir el experimento varias veces así como aumentar el tamaño de la muestra.

Con respecto a los resultados obtenidos en el experimento No 2 (semillas inoculadas con bacterias) diremos que el número de se

millas germinadas cuando se usó agua destilada estéril y solución salina estéril a una concentración de 1.5 g NaCl/1 lt agua, son semejantes: 7 y 9, respectivamente. Es decir como se esperaba que ocurriera con las semillas inoculadas con bacterias, el porcentaje de germinación fue alto. En el caso de las semillas regadas con solución salina estéril a una concentración de 8.5 g NaCl/1 lt agua el resultado obtenido concuerda con el dato señalado en la bibliografía (Heimann, 1953).

Sin embargo, el resultado obtenido de la inoculación de las semillas, es el más importante por discutir, ya que se esperaba que el total de semillas germinadas fuese el más alto, puesto que se planteó como hipótesis que las bacterias influían positivamente en la germinación. Aunque esto no es definitivo, el experimento parece mostrar que no es así. Existen, en efecto, varias razones para no descartar la hipótesis:

1o El número de semillas utilizado en es-

te experimento no es representativo, por lo tanto, no se pueden aplicar pruebas estadísticas a los resultados obtenidos.

2o La concentración del inóculo utilizado, pudo ser excesiva. Esto se plantea pensando en que las bacterias, al encontrarse intracelularmente en la radícula del embrión y si intervienen en la germinación, podrían realizar funciones, que en mayor o menor grado, influyeran en las células radiculares del cacahuate. Si tomamos en cuenta que al empezar a realizar sus funciones, el número de bacterias era demasiado alto, las células del cacahuate se verían dañadas y no beneficiadas. De ahí podría resultar que, de acuerdo al resultado del experimento, el porcentaje de germinación disminuiría.

3o Lo anterior se confirmó observando la ultraestructura del material inoculado.

No se puede determinar exactamente cuál es la influencia de Bacillus sp. en la germinación del cacahuate en la proporción en

que normalmente aparece. Sin embargo sí se puede decir que esta proporción de bacterias aumenta notablemente durante la germinación sin que, aparentemente, tal fenómeno perjudique al proceso.

Se considera conveniente realizar una investigación sobre la presencia y cantidad de bacterias durante toda la vida de la planta, desde la germinación hasta la fructificación y posiblemente esto proporcione la información respecto a la influencia de la bacteria en la germinación.

C O N C I U S I O N E S

Es evidente la presncia de bacterias en el interior del embrión del cacahuate (Arachis hypogea L.).

En función de la viabilidad de los embriones se consideran a estas bacterias como simbiontes.

Con base en los resultados obtenidos se infiere que, en grandes concentraciones, Bacillus sp. es dañino para el embrión de Arachis hypogea L.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Altschul, A.M. 1958.- Processed Plant Protein Foodstuffs, Academic Press, New York.

Bagley, W.,B., Joe H. Cherry, Mary L. Rollins and Aaron M. Altschul. 1963.- A study of protein bodies during germination of peanut (Arachis hypogea L.) seed. Am. J. of Bot. 50: 523-531.

Breed, R.S., E.G.D. Murray and N.R. Smith. 1877.- Bergey's manual of determinative bacteriology. 7a. ed New York.

Burdon, K.L. y R.P. Williams. 1971.- Microbiología. Publicaciones Culturales. México.

Cronquist, A. 1969.- Introducción a la Botánica. Compañía Editorial Continental, S.A. Barcelona.

Darlington, C.D. and A.P. Wylie. 1945.- Chromosome atlas of flowering plants. ed George Allen and Unwin LTD. London.

Esquivel, M.C. y S.E. Herrera. 1977.- Prueba de un micrométodo para cuantificar un antimicrobiano en muestras muy pequeñas de plasma y líquido cefalorraquídeo de niños recién nacidos. UNAM. Tesis.

Excélsior 15-B Domingo 14, Noviembre, 1976.

Frahm-Leliveld, S.A. 1953.- Euphytica. 2, 46.

Gillier, P. y P. Silvestre. 1970.- El cacahuete o maní. Ed Blume. Barcelona.

Haggis, M.G.M.A. phd. 1966.- The electron microscope in molecular Biology. Longmans, Green and Co London.

Eshel, H. 1952.- The irrigation with saline water and the ionic environment. Doc. Multigraphié, Israel, Inst. of Techn., Dep. Chemestry.

Hill, B.A. 1965.- Principios de estudística médica. 3a ed "El Ateneo", Buenos Aires.

Levine, P. 1933.- An introduction to laboratory technique in Bacteriology. 3a ed MacMillan Co New York.

Pcanga, F. 1964.- Atlas de Microscopía Electrónica. Elsevier Publishing Company. Amsterdam.

Skerman, V.B.D. 1967.- A guide to the identification of the genera of Bacteria. 2a ed The William and Wilkins Co Baltimore.

Verna, L.C. 1945.- Técnicas Generales y Experimentación Bacteriológica. Ateneo Buenos Aires.

Winton, A.L. 1906.- The Microscopy of Vegetables Foods, John Wiley, New York.

Winton, A.L. and K.B. Winton. 1932.- The structure and composition of Foods. Vol 1 Cereals, Starch, Oil seeds, Nuts, Oils, Forage plants, John Wiley, New York.