

# Estudio ultraestructural de la presencia de bacterias en el embrión de dos variedades de cacahuete (*Arachis hypogea* L.) \*

ANA MARIA RAMOS-VELAZQUEZ  
Depto. de Fitopatología y Nematología  
Dirección General de Sanidad Vegetal  
S. A. R. H.  
México, D. F.

CARMEN TOMAS-MARTIN  
Depto. de Biología  
Fac. de Ciencias. U. N. A. M.  
México, D. F.

CLARA ESQUIVEL-HUESCA  
Depto. de Fitopatología y Nematología  
Dirección General de Sanidad Vegetal  
S. A. R. H.  
México, D. F.

RAMOS-VELÁZQUEZ, A. M., C. TOMÁS-MARTÍN, C. ESQUIVEL-HUESCA, 1980. Estudio estructural de la presencia de bacterias en el embrión de dos variedades de cacahuete (*Arachis hypogea* L.). *An. Esc. nac. Cienc. biol., Méx.* 20: 11-23.

RESUMEN: En el presente trabajo se hace un estudio morfológico ultraestructural del embrión de *Arachis hypogea* L. en sus variedades Criollo y Florida. Se encuentran bacterias en el interior de las células embrionarias. Estas bacterias son aisladas e identificadas como *Bacillus pumilus*.

## INTRODUCCIÓN

El cacahuete es originario del Nuevo Mundo. Prueba de ello es el descubrimiento por E. G. Squier, alrededor de 1875 (Gillier, P. y P. Silvestre, 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.

---

\* Una versión más amplia de este artículo se presentó en el VIII Congreso Nacional de Fitopatología del 5-7 de julio de 1978.

Tal parece que la distribución de la especie fue obra de los indios en tiempos precolombinos. Así el cacahuete 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 África, mientras que los españoles, en la misma época, lo hacen en las Filipinas y posiblemente en España, a partir de la costa occidental mexicana. Desde allí, el cultivo del cacahuete pudo extenderse a China, Japón, sudeste asiático, India y la costa este de Australia, y desde España y Portugal a otros países de Europa. Es posible que, desde Ceilán o Malasia, llegara posteriormente a Madagascar y a la costa oriental africana. Por lo tanto, África 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 África, por medio del comercio de los esclavos.

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

En la República Mexicana el cacahuete 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 Aracutidíneas.

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

- Plantas herbáceas o leñosas en su base, perennes o anuales.
- Tubo del cáliz largo y con aspecto de pedúnculo floral terminado por cinco 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 sésil, 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 del género *Arachis* es  $n = 10$ . El cacahuete cultivado *Arachis hypogea* L. es tetraploide con  $2n = 40$  (Darlington, C. D. y A. P. Wylie, 1945).

*Estructura macroscópica del cacahuete.* La vaina o fruto, cuya maduración se lleva a cabo bajo tierra, varía de 1 a 6 cm de longitud 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 salientes longitudinales intersectadas por líneas laterales o transversales. El fruto normalmente contiene 2 o 5 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 rate 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 constituido 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 constituido por dos capas: el epicarpio y el hipocarpio. En sección transversal (Winton, 1906, y Winton, 1932) el epicarpio presenta excrescencias semejantes a los típicos pelos radiculares. La capa hipodérmica consta de varias capas de células organizadas radialmente; las más externas presentan paredes gruesas y punteadas. Estas células hipocárpicas punteadas son importantes en la identificación microscópica de la cubierta del cacahuete. Dentro de la región hipocárpica está el mesocarpio, constituido 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 en paquetes fibrovasculares. Las fibras presentan gran variedad de formas (Winton, 1966 y Winton, 1932) y su arreglo entrelazado es una diferencia valiosa para la identificación de la cubierta del cacahuete.

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, altas, con diámetro superior de 25 micras en sección transversal y con las partes externas de las paredes muy engrosadas y criboosas.

Vistas superficialmente, dichas células tienen un diámetro de 20 a 50 micras y debido a las puntuaciones sus paredes muestran unas marcadas proyecciones.

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

*ENDOSPERMO.* Fuertemente adheridas a la superficie interna de la testa hay una sencilla capa de células con diámetro tangencial, en sección transversal, de cerca de 30 micras. 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).

*EMBRION.* Los cotiledones están constituidos por células de parénquima, pero que no son del tipo de empalizada. Todas estas células tienen paredes punteadas, pero en menor grado hacia la epidermis del cotiledón. Las células contienen

gotas de aceite, granos de almidón con hilo central que miden de 4 a 12 micras de diámetro y gránulos de aleurona de 5 a 12 micras de diámetro.

Es conocido el hecho de la frecuente presencia de bacterias en las raíces de las leguminosas, siendo las más conocidas las del género *Rhizobium*. Estas bacterias se introducen en las raíces de las plantas, provocando la formación de nódulos donde viven 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.

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 hierbas y, según investigaciones efectuadas en las Filipinas, en el arroz.

El presente trabajo tiene por objeto investigar la posible presencia de bacterias en el embrión del cacahuete (*Arachis hypogea* L.).

#### MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron semillas seleccionadas de *Arachis hypogea* L. obtenidas en la Productora Nacional de Semillas de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, de dos variedades distintas: Criollo y Florida. Se pusieron a germinar de la forma usual (entre papel secante y regadas con agua destilada en condiciones de asepsia); a los cinco días de germinación, se aislaron los embriones de los cotiledones y se cortaron en tres partes: epicótilo o plúmula, hipocótilo o porción intemedial y radícula.

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

1. La fijación se llevó a cabo en glutaraldehído al 3% disuelto en amortiguador de fosfatos a un pH de 7.4, durante media hora.
2. Las porciones señaladas se lavaron con amortiguador de fosfatos para eliminar el fijador.
3. La post-fijación se realizó con tetróxido de osmio al 1% disuelto en amortiguador de fosfatos, durante dos horas.
4. La deshidratación se realizó con alcoholes sucesivos de 50% a absoluto.
5. Se utilizó como intermediario de la preinclusión óxido de propileno. Esta se realizó agregando al óxido de propileno la siguiente mezcla de resinas epóxicas:

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

6. La inclusión se llevó a cabo en Epón 812 y la polimerización se hizo a 60°C durante 32 horas.

Se obtuvieron cortes de 500-600 Å en un ultramicrotomo Sorvall MT-2, y fueron montados en rejillas de cobre.

Las preparaciones se tiñeron con citrato de plomo. La observación y las fotografías se realizaron en un microscopio electrónico EM 9 Zeiss.

Las bacterias fueron aisladas por las técnicas bacteriológicas usuales. Los cultivos se realizaron por la técnica de Burdon y Williams (1971) y Verna (1945) en agar nutritivo Muller-Hinton y fueron incubadas a 37°C.

## RESULTADOS

Se observaron y fotografiaron los cortes de meristemo radicular de las variedades Florida y Criollo de *Arachis hypogea*.

En estas dos variedades se encontraron intracelularmente bacterias de la especie *Bacillus pumilus*.

En la lámina I se observa una célula de meristemo radicular de embrión de *Arachis hypogea* L. de la variedad criollo en la que se presenta la pared celular atravesada por una bacteria en el margen inferior izquierdo de la lámina. Se observa también otra bacteria bordeando la membrana nuclear y, sobre ella una tercera que se encuentra atravesando el núcleo y próxima al nucleolo. Las tres bacterias mencionadas presentan una pared celular como una línea tenue que las circunscribe. En el núcleo se presentan dos nucleolos y en el citoplasma abundantes inclusiones lipídicas, algunas vacuolas y gránulos electrodensos que probablemente correspondan a lisosomas o a resultado de digestión lisosomal.

En la lámina II se observa la pared celular que separa dos células vecinas. El citoplasma celular presenta múltiples inclusiones de lípidos. El núcleo presenta dos nucleolos y la heterocromatina está especialmente localizada sobre la membrana nuclear.

Una bacteria se encuentra atravesando la membrana nuclear. Se considera importante para investigaciones que actualmente se están llevando a cabo, el hecho de que esta bacteria carece de pared celular. Es importante también hacer notar que en el extremo terminal de la bacteria que se encuentra dentro del núcleo se observa alrededor una zona de lisis de diferente electrodensidad que podría sugerir cambios bioquímicos a nivel de cromatina. Este fenómeno también puede observarse en la región de la membrana nuclear que está siendo atravesada por la bacteria, en donde los gránulos de heterocromatina que se encuentran bordeando esta zona han desaparecido.

En la lámina III en las cajas de Petri con placas de medio de cultivo sólido, las cuales se sembraron por el método de separación por estría, se observa (figuras 1 y 2) el desarrollo de colonias redondas, lisas, de aspecto cremoso. Estas colonias se obtienen después de 24 horas de incubación a 36°C.

Con base en las pruebas bioquímicas y en las claves de identificación, se considera que las bacterias aisladas del cacahuate corresponden a la especie *Bacillus pumilus*.

Estas bacterias presentan las siguientes características:

#### CULTIVOS

Colonias de forma circular, de  $\pm 1$  mm de diámetro, superficie lisa, borde entero, planas y aspecto cremoso (Lámina III).

#### MORFOLOGÍA

Células de forma bacilar con extremos redondeados.

Tamaño promedio en aerobiosis: largo, 3.6 micras y 1 micra de ancho.

Presencia de cápsula.

Presencia de una espora en cada uno de los extremos.

Tinción de Gram: positiva.

Tinción de Hiss para cápsula: positiva.

Tinción de Wirtz para esporas: positiva.

Movilidad: negativa.

#### FISIOLOGÍA

En medios nitrados produce nitrito pero no gas.

Desprendimiento de hidrógeno: negativo.

Hemólisis: alfa positiva.

Indol: negativo.

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.

#### DISCUSIÓN 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 en particular del cacahuete, ya que las únicas publi-

caciones de que dispusimos se refieren principalmente a bacterias de tipo nitrificante 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 observarlos en 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 cinco días para lograr una fácil separación y adecuada preservación del embrión.

Se desconoce por el momento el significado fisiológico de la presencia de *Bacillus pumilus* en *Arachis hypogea* L. Se están realizando actualmente investigaciones en este sentido.

Dado que la clasificación de la bacteria presentó serias dificultades se recurrió a la ayuda de la Dra. Ruth E. Gordon del Waksman Institute of Microbiology en Estados Unidos de Norteamérica, quien clasificó a la bacteria como *Bacillus pumilus*.

#### CONCLUSIONES

- 1o. Se señala la presencia de una bacteria en las variedades Florida y Criollo de *Arachis hypogea*.
- 2o. Esta bacteria fue aislada e identificada como *Bacillus pumilus*.
- 3o. Se localiza *Bacillus pumilus* generalmente en el núcleo de las células del embrión de *Arachis hypogea* L. en las dos variedades antes citadas.

#### SUMMARY

An ultrastructural morphological study of *Arachis hypogea* L. embryo is made. Bacteria are found inside the embryo cells. This bacteria has been isolated and identified as *Bacillus pumilus*.

#### BIBLIOGRAFÍA

- ALTSCHUL, A. M., 1958. Processed Plant Protein Foodstuffs, Academic Press, New York, 325 p.p.
- BAGLEY, W., B., J. H. CHERRY, M. L. ROLLINS and A. 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, 1977. Bergey's manual of determinative bacteriology, 7a. ed. New York, 1529 p.p.
- BURDON, K. L. y R. P. WILLIAMS, 1971. Microbiología. Publicaciones Culturales. México, 830 p.p.
- DARLINGTON, C. D. and A. P. WYLIE, 1945. Chromosome atlas of flowering plants. George Allen and Unwin LTD. London, 173 p.p.
- ESQUIVEL, H. C. y S. N. 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. 32 págs. (No publicado).

- FRAHM-LELIVELD, S. A., 1953. *Euphytica*, vol. 2, pp. 46.
- GILLIER, P. y P. SILVESTRE, 1970. El cacahuate o maní. Ed. Blume. Barcelona. 281 p. p.
- HAGGIS, H. G. M. A., 1966. The electron microscope in molecular Biology. Longmans, Green and Co. London. 84 p.p.
- HEIMAN, H., 1952. The irrigation with salina water and the ionic environment. Doc. Multigraphié, Israel, Inst. of Techn., Dep. Chemistry. 15 p.p.
- HILL, B. A., 1965. Principios de estadística médica. 3a. ed. "El Ateneo". Buenos Aires. 365 p.p.
- LEVINE, M., 1933. An introduction to laboratory technique in Bacteriology. 3a. ed. MacMillan Co. New York. 413 p.p.
- SCANGA, F., 1964. Atlas de Microscopía Electrónica. Elsevier Publishing Company. Amsterdam. 331 p.p.
- SKERMAN, V. B. D., 1967. A guide to the identification of the genera of Bacteria. 2a. ed. The William and Wilkins Co. Baltimore. 303 p.p.
- VERNA, L. C. 1945. Técnicas Generales y Experimentación Bacteriológica. Ateneo Buenos Aires. 315 p.p.
- WINTON, A. L., 1906. The Microscopy of Vegetables Foods, John Wiley, New York. 415 p.p.
- 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. 267 p.p.



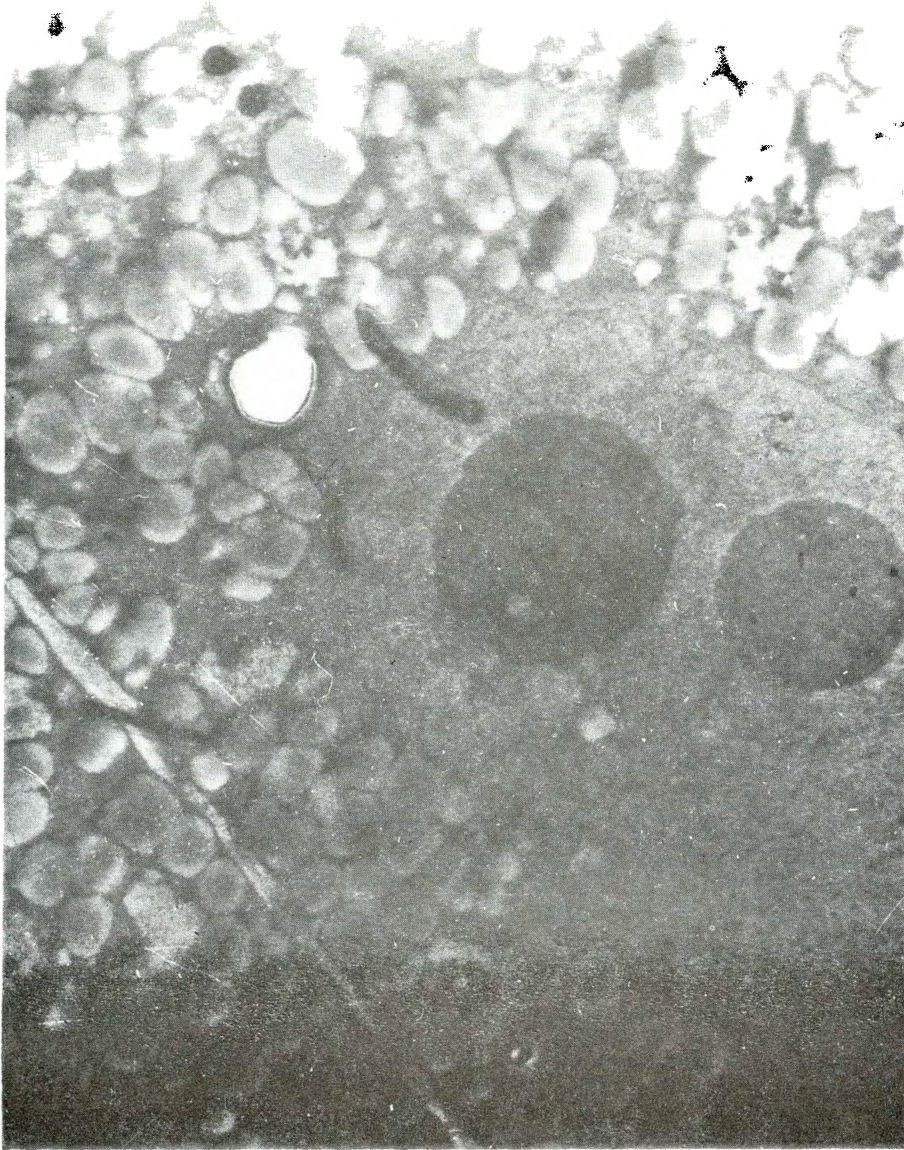


LÁMINA 1. Células de la radícula de la variedad Criollo de *Arachis hypogea* L. en la que el citoplasma tiene numerosas inclusiones lipídicas. El núcleo presenta dos nucleolos y dos bacterias *Bacillus pumilus* muy próximas a la membrana nuclear, una de ellas introducida hasta su mitad en el núcleo, a pesar de lo cual el núcleo se conserva íntegro. Aumento 51,800 X.



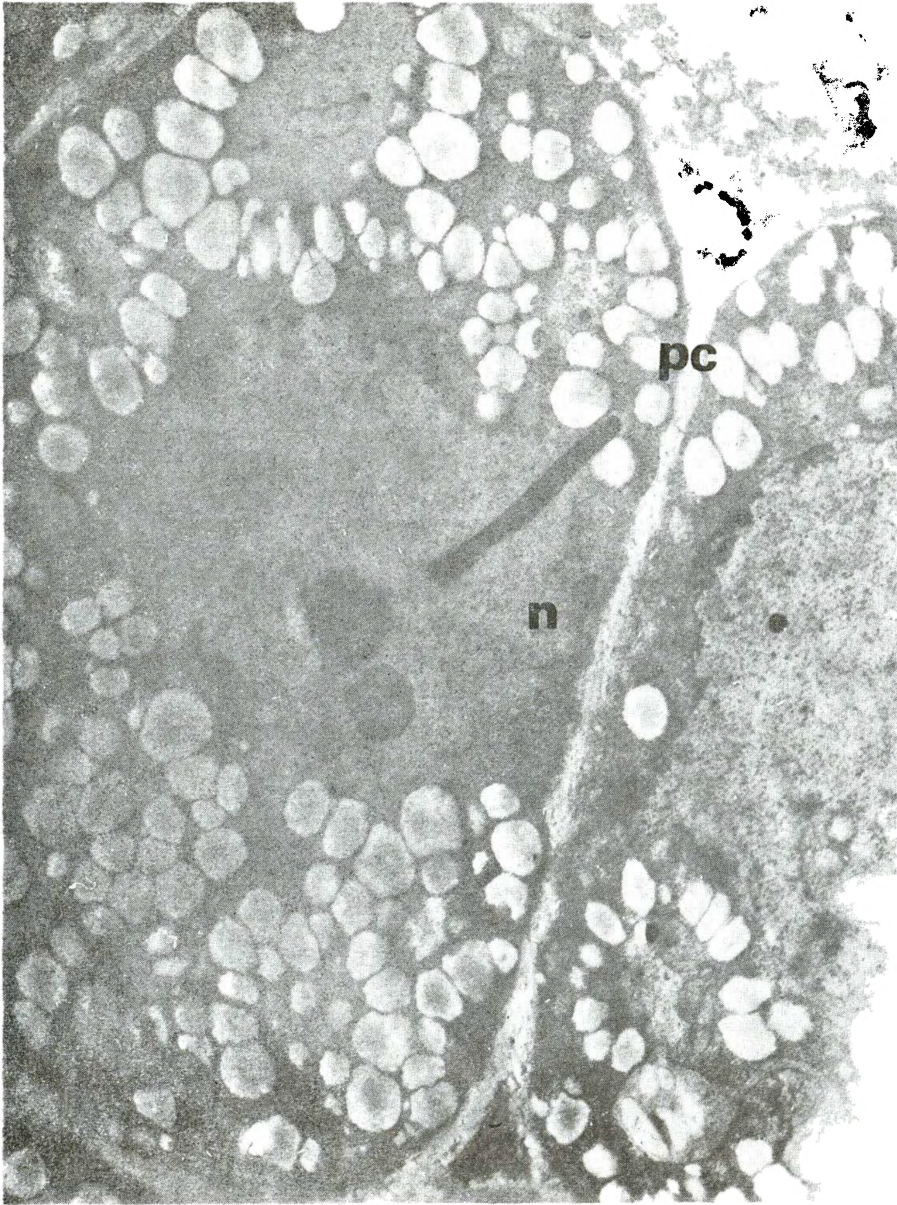


LÁMINA 2. Células de la radícula de la variedad Florida de *Arachis hypogea* L. entre las que se observa la pared celular (pc) que separa las dos células. Los núcleos (n) presentan la heterocromatina localizada preferentemente sobre la membrana nuclear y una bacteria *Bacillus pumilus* introduciéndose al núcleo en una de las células. Aumento 56.000 X.



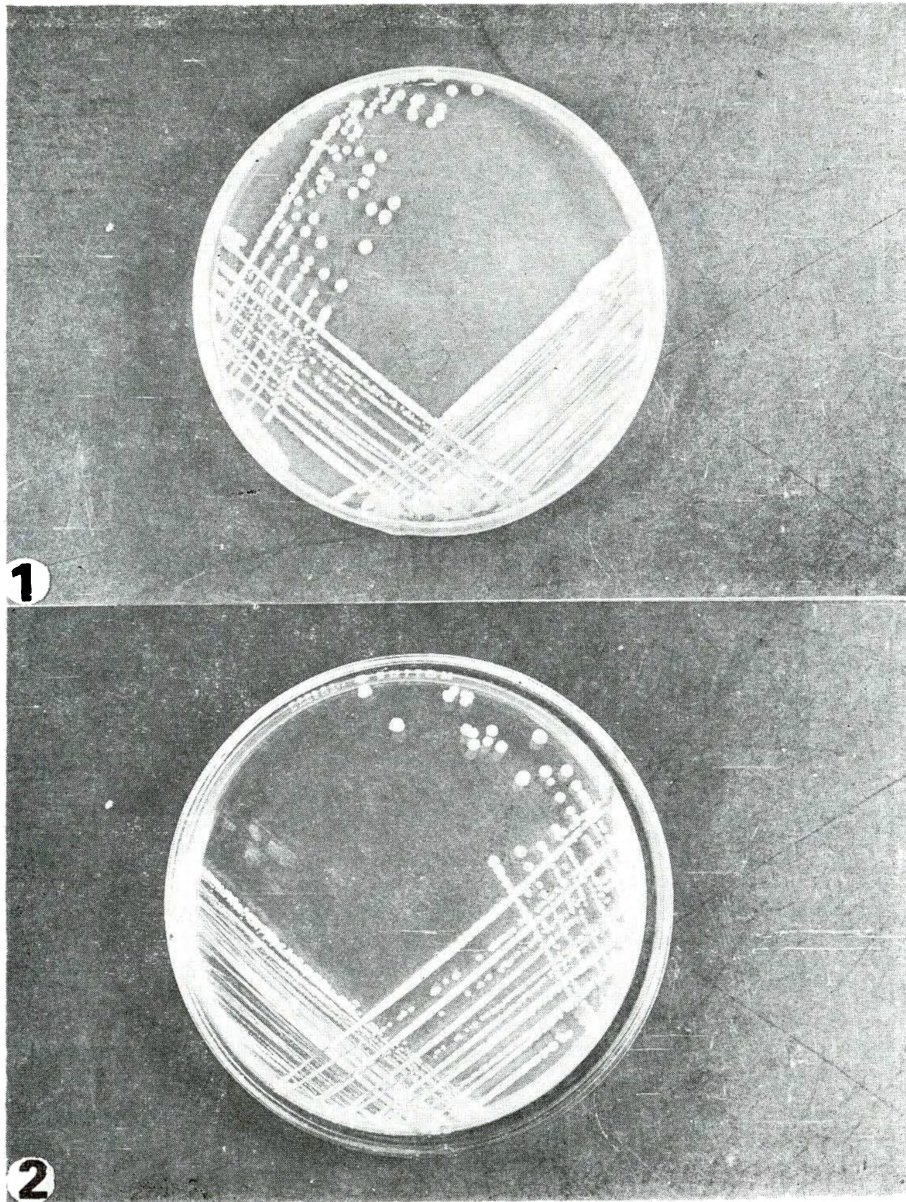


LÁMINA 3. Fig. 1. Cultivo puro de *Bacillus pumilus* en medio deshidratado Muller Hinton 0757-01 (DIFCO). Fig. 2. Cultivo puro de *Bacillus pumilus* en Base Bacto agar-sangre deshidratado 0045-01 (DIFCO). En ambas fotografías se pueden apreciar algunas de las características de las colonias formadas por *Bacillus pumilus*.