

Artículo reseña

INTERACCIÓN PLANTA-BACTERIAS FITOPATÓGENAS: CASO DE ESTUDIO *Ralstonia solanacearum*- PLANTAS HOSPEDANTES

Ivonne González, Yailén Arias y Belkis Peteira

Dpto. de Fitopatología, División de Protección Vegetal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de Las Lajas, La Habana, Cuba. E-mail: marquetti@censa.edu.cu

RESUMEN: *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi es el agente causal de la marchitez bacteriana. Esta enfermedad afecta a numerosos cultivos de importancia económica tales como: tomate, papa, tabaco, banana, berenjena y algunas plantas ornamentales, especialmente en las zonas tropicales y subtropicales. La amplia gama de hospedantes, su distribución y elevada variabilidad, hacen difícil el control de la enfermedad. En este trabajo se exponen los mecanismos de patogenicidad de esta bacteria, así como los mecanismos moleculares mediante los cuales se ejerce la resistencia natural e inducida en la planta.

(Palabras clave: Interacción hospedante patógeno; *Ralstonia solanacearum*; genes de avirulencia; mecanismos de defensa)

PLANT-PHYTOPATHOGEN BACTERIA INTERACTION: CASE STUDY *Ralstonia solanacearum*-HOST PLANTS

ABSTRACT: *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi is the causal agent of bacterial wilt. This disease affects some important crops such as: tomato, potato, tobacco, banana, eggplant and some ornamental crops specially in tropical and subtropical areas. It has been very difficult to control the disease due to its wide host range, distribution and high variability. In this paper, the bacterial pathogenicity mechanisms as well as the molecular ones for the natural and induced resistance in plants are exposed.

(Key words: host-pathogen interaction; *Ralstonia solanacearum*; avirulence genes; defense mechanisms)

INTRODUCCIÓN

La marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi es una enfermedad que devasta numerosos cultivos de importancia económica entre los que se cuentan el tomate, la papa, el plátano y algunas plantas de interés ornamental (1, 2). Adquiere gran importancia en las zonas tropicales y subtropicales (2), aunque además se plantea que su gama de hospedantes y distribución específica dependen también de la raza y del biovar del patógeno (3).

Después de la infección, la bacteria coloniza la corteza y, posteriormente, los vasos xilemáticos propagándose por toda la planta. Las masas bacterianas interrumpen el

flujo de agua desde las raíces a las hojas, resultando en la marchitez de la planta. La severidad de la enfermedad depende del tipo, temperatura y humedad del suelo (lo cual influye en la humedad y en el desarrollo del microorganismo), los hospedantes susceptibles y la virulencia de las cepas. Las altas temperaturas (30-35°C) y humedad son los principales factores asociados con la alta incidencia y severidad de la marchitez bacteriana (4).

Se han informado pérdidas de un 29% en la producción de frutos frescos provenientes de híbridos de tomate. En este cultivo, en Indonesia, las pérdidas varían de 24% a 32% en tierras bajas y de 15% a 26% en las variedades transplantadas (5). Las pérdidas causadas por la enfermedad, en general son enor-

mes, pero no pueden ser estimadas con certeza debido a que hasta el año 2008 su impacto en la agricultura de subsistencia ha sido elevado, aunque indocumentado, y por el abandono en muchas partes del mundo de cultivos susceptibles a la marchitez (6).

R. solanacearum se considera un complejo de especies que constituye un grupo heterogéneo de razas. Históricamente, este complejo de especies se ha subdividido en cinco razas según la gama de hospedantes y en cinco biovares en función de su habilidad para producir ácidos a partir de un grupo de carbohidratos. En base a la secuencia de algunos genes existe un esquema de clasificación que divide el complejo de especies en cuatro filotipos. Este agrupa a las cepas por origen geográfico: las cepas de Asia son del filotipo I, las de América son del filotipo II, las de África son del III y otras de Indonesia, que es el aparente centro de diversidad, corresponden al filotipo IV. Los filotipos también pueden ser agrupados dentro de secuevares (grupos de aislamientos con secuencia de ADN altamente conservada de endoglucanasas o del gen *mutS* divergentes por menos del 1%) y clones (grupo de cepas que exhiben el mismo *fingerprint* genómico) (3,7).

Esta elevada variabilidad hace que incluso técnicas como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real pudieran dar algunos falsos positivos bajo ciertas condiciones y que se recomiende utilizar al menos dos métodos de diagnóstico independientes para confirmar la presencia de determinados aislamientos de *R. solanacearum*, teniendo en cuenta el alto costo de un diagnóstico errado (7).

La amplia gama de hospedantes, su distribución y alta variabilidad, hacen difícil el manejo de esta enfermedad. El uso de prácticas culturales adecuadas, rotación de cultivos y hospedantes resistentes pueden brindar un mejor control de la misma (1,8). Los aceites esenciales derivados de plantas como el timol y la palmarosa son biofumigantes efectivos contra *R. solanacearum* en invernaderos, pero se necesitan evaluaciones en campo antes de su uso práctico para el manejo de la enfermedad (9). Se han desarrollado algunos cultivares de tomate "resistentes" a *R. solanacearum* para la producción fresca de la hortaliza, pero se ha comprobado que solo son moderadamente resistentes y no han sido ampliamente adoptadas por los productores o su resistencia está limitada a localidades, clima, raza y características del suelo (9). Otra alternativa atractiva es la inducción de resistencia sistémica en las plantas. Se ha encontrado que el acibenzolar-S-methyl (Actigard® 50WG, Syngenta Crop Protection) en cultivares moderadamente resistentes aumentan la resistencia a la enfermedad pro-

duciendo rendimientos significativamente altos en comparación con el control no tratado (4), aunque estos experimentos deben ser llevados a nivel de campo para su profundización. A pesar de ello, el empleo de variedades resistentes o métodos que propicien la inducción de resistencia, continúa siendo una alternativa atractiva en el manejo de esta enfermedad (10).

El objetivo del presente trabajo es exponer los mecanismos de patogenicidad y moleculares de esta bacteria mediante los cuales se efectúa la resistencia natural e inducida en la planta.

PARTE ESPECIAL

Modo de acción, localización y desarrollo de la enfermedad

R. solanacearum invade los tejidos vasculares de la planta, a través de las raíces con heridas o aberturas naturales, originadas por la emergencia de raíces secundarias. El xilema presenta células en forma de tubos denominados tráqueas y traqueidas, con paredes lignificadas y perforaciones laterales, que permiten el transporte del agua en forma ascendente y en forma lateral hacia otros tejidos (2).

Al realizar, al microscopio óptico, observaciones de cortes transversales del tallo, correspondientes a plantas inoculadas, se observan a los ocho días, baja concentración de esta bacteria en los vasos de más reciente formación (xilema secundario) y en los vasos del xilema primario. También se observa una gran cantidad de puntos de color azul oscuro en las células del floema que denota la presencia de biomasa bacteriana. En los cortes transversales de las plantas inoculadas a los doce días, se observa un sector del anillo vascular (xilema primario) con una mayor cantidad de vasos obstruidos por las masas de *R. solanacearum*. Estas masas se presentan con mayor densidad y frecuencia en los vasos de mayor diámetro, ocupando todo el volumen del mismo. En los cortes longitudinales, se observa una obstrucción completa a lo largo de los vasos más 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 (2).

La presencia de biomasa de *R. solanacearum* en los vasos conductores (xilema) de mayor diámetro (que transportan un flujo importante de agua en la planta) 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. Los órganos de la planta

que requieren mayor volumen de agua para la función fotosintética son las hojas, por lo tanto, es por esta zona por donde comienza generalmente el amarillamiento (2).

En los cortes de tejidos de plantas, vistos al microscopio electrónico de transmisión, las células parenquimáticas de las plantas inoculadas, se observan menos turgentes, existe la presencia de bacterias, y segmentos de la pared celular más reducidos o delgados. Se observa la presencia abundante de bacterias en células parenquimáticas. En las paredes de estas células, hay presencia de tilides (protuberancias de la membrana, en forma globosa que se proyectan hacia el interior de las células), las cuales se asocian a materiales resistentes a la bacteria e impiden la comunicación entre células vecinas a través de las punteaduras (2).

Una vez establecidos en los vasos xilemáticos, la bacteria es capaz de entrar a los espacios intercelulares de las células del parénquima en la corteza y la médula en varias áreas de la planta. Aquí, *R. solanacearum* es capaz de disolver la pared celular y crear bolsillos viscosos de bacteria y debris celular. La producción de polisacáridos altamente polimerizados aumenta la viscosidad del xilema lo cual resulta en tupidación (3).

Genes de avirulencia

La motilidad resuelve muchos de los problemas que confrontan los microorganismos: ella les permite obtener más y mejores nutrientes, evadir sustancias tóxicas o ambientes desfavorables, encontrar al hospedante y dispersarse de forma efectiva. Muchas especies de bacterias incluyendo la mayoría de las especies del suelo estudiadas hasta la fecha pueden moverse nadando, deslizándose, tirando bruscamente, o pululando. *R. solanacearum* es esencialmente inmóvil en la planta, aunque puede ser altamente móvil en cultivos. La motilidad natatoria es una forma de translocación bacteriana sobre superficies firmes que requieren de los pelos retráctiles de tipo IV y tiene su mayor contribución a la virulencia en los estados tempranos de la invasión y colonización del hospedante (6,11).

Se han desarrollado otras investigaciones para analizar la envoltura de los apéndices de la superficie bacteriana de tipo III en la interacción con la célula hospedante. Dos papeles han sido propuestos para estos apéndices tipo III dependientes: la unión a la célula eucariota y/o la liberación de proteínas dentro de la célula hospedante. El constituyente principal de este Hrp-pili es la proteína HrpY. Esta proteína es la segunda que transita a través del sistema de secre-

ción Hrp de *R. solanacearum*. Esta se ensambla en exoestructuras que son primero, aparentemente fijadas a la superficie de la bacteria y luego, subsecuentemente liberadas al ambiente. La secuencia de HrpY no está relacionada con ningún otro pilin ya caracterizado. Mutantes *hrpY* no producen pili y son incapaces de interactuar con las plantas. *R. solanacearum* es capaz de unirse por la vía de sus pili a la célula vegetal pero Hrp-pili o los genes *hrp* no son requeridos para este proceso. En contraste, los Hrp-pili son esenciales para la secreción de PopA (una proteína esencial en el proceso de patogénesis, como se verá posteriormente) (12).

Muchos productos de genes son requeridos para la infección exitosa del hospedante por *R. solanacearum* (13). Los estudios sobre los factores de patogenicidad fortalecen el entendimiento del proceso de la enfermedad en esta bacteria. Algunos de estos factores se describen a continuación.

Exopolisacáridos y producción de enzimas extracelulares

R. solanacearum produce una variedad de productos extracelulares que contribuyen a su habilidad para colonizar las plantas hospedantes y causar la enfermedad. Uno de los más importantes es un polisacárido extracelular ácido de alta masa molecular EPS I (del inglés extracellular polysaccharide) pues es posible que sea el principal factor de virulencia de *R. solanacearum* (14).

Los estudios en planta con mutantes deficientes de EPS I sugieren que este último causa la marchitez de las plantas infectadas ya que bloquea el sistema vascular y por lo tanto altera el movimiento del agua, aunque ninguno de estos mutantes deficientes de EPS I fue totalmente no patogénico. Estudios recientes muestran que dichos mutantes colonizan pobremente el tallo de las plantas infectadas, por lo que se plantea que el EPS I puede contribuir a minimizar o evadir el reconocimiento de estructuras de la superficie bacteriana por los mecanismos de defensa de la planta (13).

Las bacterias Gram negativas han desarrollado un número limitado de sistemas de secreción a través de los cuales las proteínas atraviesan su membrana externa. *R. solanacearum* posee información genética para las seis vías principales de secreción de proteínas que han sido caracterizadas en este tipo de bacterias. Hasta la fecha, solo dos han sido estudiadas experimentalmente y ambas mostraron ser esenciales para la patogenicidad de *R. solanacearum*: el Tipo II y el Tipo III. Mutantes defectuosos en cualquiera de estos sistemas o vías son severamente afectados en la colonización y multiplicación en la planta (15).

El Sistema de secreción Tipo II (T2SS) es una extensión del sistema de secreción general que conlleva a la translocación de exoproteínas a través de la membrana externa de la bacteria. Doce genes que codifican para esta vía han sido identificados en la cepa de referencia GMI1000. Uno de estos, el gen *pilD*, se requiere para la síntesis de pili del Tipo IV (15). Se ha demostrado que al menos seis importantes proteínas transitan por esta vía, incluyendo enzimas degradadoras de la pared celular de las plantas (una pectinasa, Pme, una endoglucanasa, Eg1, una β -1,4 celobiohidrolasa, CbhA y tres poligalacturonasas, PglA, PehB y PehC), y Tek, una proteína de 28-kD de función desconocida (13, 14, 15, 16).

Los mutantes incapaces de secretar estas exoproteínas dependientes del sistema Tipo II, pierden completamente la habilidad de causar los síntomas de la enfermedad y colonizar de manera eficiente los tallos de las plantas, mientras que mutaciones individuales en alguna de la enzimas degradadoras de pared vegetal dan origen solamente a fenotipos de la bacteria de virulencia menor, en los cuales la marchitez se manifiesta más tardíamente. Estos hallazgos sugieren que este grupo de exoproteínas se requiere para la infección y muerte de la planta hospedante (15, 17).

La expresión de los factores de patogenicidad en *R. solanacearum* es controlada por una red regulatoria compleja que responde a condiciones ambientales, presencia de células hospedante y densidad bacteriana (18). En el centro de esta red se encuentra PhcA, un regulador transcripcional de la familia LysR, el cual directamente o a través de genes intermediarios reguladores coordina la expresión de los EPS y varias enzimas degradadoras de la pared vegetal. La PhcA activa es regulada en respuesta a la densidad celular por un mecanismo que involucra a la molécula autoinductora específica 3-hidroxi metil ester ácido palmítico (3-OH PAME). A baja densidad celular presumiblemente correspondiente a la vida saprofítica y colonización temprana de la planta, la PhcA no se expresa en cultivo, conllevando a la expresión de factores de virulencia de la enfermedad promisorios, incluyendo algunas poligalacturonasas y la motilidad de la célula nadando o por pulsos (19). En estados posteriores de la infección, en presencia de altas densidades celulares, la acumulación de 3-OH PAME provoca la activación de PhcA y subsecuentemente a la producción de EPS y activación de potentes celulasas y pectin metilesterasa.

El Sistema de Secreción Tipo III (T3SS) de patógenos de plantas ha provocado gran interés en

los últimos 15 años, debido a que cumple una función principal en algunos patógenos importantes que difieren en la gama de hospedantes y modo de vida. Mutantes deficientes del sistema de secreción tipo III de *R. solanacearum* son incapaces de desarrollar los síntomas de la enfermedad en plantas hospedantes o de inducir la respuesta hipersensible HR (del inglés hypersensitive response) en plantas resistentes (12, 20). Esto ilustra la importancia colectiva de las proteínas efectoras que son inyectadas dentro de la célula vegetal por este sistema. El T3SS está codificado por un grupo de genes *hrp*. Sin embargo, los genes *hrp* no son esenciales en el proceso de invasión de la raíz de la planta por el patógeno, ya que los mutantes de este sistema retienen su habilidad de invadir el sistema vascular de plantas de tomate infectadas de forma natural, aunque sus niveles poblacionales permanecen muy bajos en comparación con los alcanzados por las cepas salvajes. Se presume que esto sea consecuencia de una baja disponibilidad de nutrientes y/o de respuestas generales de defensa de la planta. Por esta razón se sugiere que los efectores de T3SS pueden suprimir las respuestas de defensa del hospedante y de alguna forma promover el desarrollo de la enfermedad, asegurando una rápida multiplicación de la bacteria durante los estados iniciales de la infección de las raíces (15).

Este sistema requiere la producción de una pilus-Hrp, proteína estructural codificada por el gen *hrpY*, de la cual se plantea que dirige la translocación de proteínas a través de la pared celular vegetal. Otras tres proteínas son secretadas al medio extracelular por el sistema de secreción Hrp de *R. solanacearum*: PopA, PopB y PopC, las cuales son codificadas por genes localizados en el grupo *hrp* y reguladas por el regulador transcripcional HrpB. PopA causa una respuesta similar a la HR cuando se infiltra en tejidos vegetales a altas concentraciones. PopB y PopC tienen características estructurales similares a las encontradas en otras bacterias patógenas (12, 20). Sin embargo mutantes de algunas de estas proteínas tienen virulencia normal, probablemente debido a redundancia funcional (13). Se sugiere que las plantas pueden reconocer PopA cuando se expresa temprano durante el desarrollo de la enfermedad, y responder con defensas efectivas en los espacios intercelulares (21). La bacteria suprime la expresión de *popA* para escapar de las defensas de la planta inmediatamente después de la invasión. Se sugiere por tanto que la proliferación de la bacteria en los espacios intercelulares es un determinante cuantitativo de la patogenicidad de *R. solanacearum* y depende de los genes *hrp* (20).

Esta vía de secreción Tipo III es regulada a través de una compleja cascada regulatoria integrada por los reguladores PrhJ, HrpG, y HrpB (20, 22, 23). Esta cascada de señales de transducción que responde al menos a dos señales ambientales: una, detectada cuando la bacteria crece en un medio mínimo similar al apoplasto y la segunda, es una señal de inducción específica percibida en presencia de células vegetales. Se ha demostrado que, en las células de *R. solanacearum*, la máxima expresión del gen regulador *hrpB* es inducida en respuesta al contacto físico de la bacteria con células vegetales o fragmentos de su pared celular (22). Esta activación dependiente del contacto pudiera asegurar la translocación de las proteínas efectoras dentro de las células del hospedante en el tiempo y lugar apropiados (13).

El candidato a receptor de los compuestos de la pared celular de la planta inductor de *hrp* es la proteína externa de membrana PrhA (22). PrhA, junto a otros dos reguladores PrhI y PrhR, forman un sistema de transducción de señales triple que permiten la modulación de la expresión de los genes *hrp* en respuesta a estímulos desde la superficie de la bacteria, constituyendo una forma a través de la cual la bacteria reconoce la célula vegetal diana (13, 24).

Después de la invasión de los espacios intercelulares de la corteza de la raíz, *R. solanacearum* reconoce las señales de las células de la planta a través de PrhA. Las señales son transferidas para la expresión de *hrpB* a través de la vía de cascada de señales PrhA-PrhR/PrhI-PrhJ-HrpG (22, 23, 24). Se conoce que los genes *eps* responsables de la producción de EPS son inducidos en etapas tardías del proceso de infección en una célula dependiente de la densidad de PhcA. Mientras la expresión de *prhA* es constitutiva, otros genes en el regulón *hrp* son dependientes de la densidad celular. Se conoce que la expresión de *phcA* es activada de manera dependiente de la densidad celular. Se presume que después de la invasión de los espacios intercelulares, se induce la expresión de *hrpB* en respuesta a señales de la planta y se activa el regulón *hrp*, el cual construye a TTSS. La bacteria puede proliferar en los espacios intercelulares con la ayuda de las proteínas secretadas a través de T3SS. Cuando la densidad de células alcanza un límite, se activa la expresión de *phcA*. Finalmente, la represión de la expresión de *prhIR* por PhcA resulta en la represión de los genes regulados por *hrpB* y la activación de los genes *eps* genes resulta en la producción de EPS (20).

La naturaleza del inductor vegetal es desconocida. Sin embargo, teniendo en cuenta que la señal inductora de los *hrp* es resistente al calor y a trata-

mientos con proteasas, se supone que sea una molécula de carbohidratos presente en la fracción péptica/celulósica, de acuerdo con las observaciones de que el material de la pared celular de las plantas hospedantes es un inductor potente (13, 22). Después de la proliferación en los espacios intercelulares, la bacteria infecta sistémicamente a la planta hospedante a través de los vasos xilemáticos y produce EPS (20).

Existe cooperación de T2SS con T3SS. Se sugiere que T2SS puede influir en la secreción de proteínas específicas de T3SS tales como PopB. La expresión de algunos genes que codifican para proteínas secretadas a través de T2SS, las cuales están involucradas en la patogenicidad de la bacteria, es coregulada por los efectores del tipo III (20). Por lo tanto, se resume que los estados de infección de *R. solanacearum* se dividen en dos: los estados tempranos que incluyen la invasión y la proliferación en los espacios intercelulares con la invasión de los vasos xilemáticos y el estado posterior que incluye la proliferación y producción de EPS en los vasos xilemáticos. La patogenicidad de *R. solanacearum* es cuantitativamente regulada en el estado temprano y es dependiente de los genes relacionados con la patogenicidad tales como: genes regulados por HrpB y negativamente regulados por PhcA. En el estado posterior, es regulada por genes positivamente regulados por PhcA tales como los *eps* (20).

Otros mecanismos pueden ser por ejemplo la producción de otras enzimas como las polifenol oxidasas (PPOs). Estas, son un grupo de enzimas cooperativas capaces de catalizar la oxidación de compuestos aromáticos. Hay dos tipos principales de PPOs: lacasas y tirosinasas. La secuenciación del genoma de *R. solanacearum* reveló algunos genes que pudieran codificar para las PPOs. Tres PPOs diferentes son expresadas. La caracterización preliminar de mutantes obtenidos indicaron que las PPOs expresadas por *R. solanacearum* pueden participar en la resistencia a compuestos fenólicos a través de la oxidación de los *o*-difenoles producidos por las plantas. Estos resultados sugieren una posible función en los procesos patogénicos para evitar los mecanismos de resistencia de la planta que involucran la participación de compuestos fenólicos (25).

Además de los ya analizados, otros aspectos novedosos pudieran tener una función importante en la aptitud parasítica de *R. solanacearum*. Se plantea la aparición de una nueva enzima degradadora de la pared celular de plantas, una exoglucanasa (1,4 β -celobiosidasa) que sorprendentemente, tiene los rasgos de un gen recientemente adquirido. Por otra par-

te, se conoce que *R. solanacearum* produce gas del etileno, auxinas y cantidades sustanciales de *trans*-zeatina y citoquininas. La implicación de estas moléculas señaladoras en el proceso de la enfermedad es similar (en algunas plantas, como el tomate, las raíces adventicias excesivas se pueden formar en la infección). Estos aspectos requieren aún de la investigación extensa al nivel molecular (20).

Resistencia

Las plantas han desarrollado un amplio rango de respuestas de defensa para controlar a los patógenos. Además de ellos, la presencia o ausencia de pares complementarios de genes de resistencia en el hospedante y genes de avirulencia (*avr*) en el microorganismo invasor determina el resultado de muchas interacciones planta-patógeno. En un modelo elicitor-receptor propuesto para esta teoría gen a gen (26), los genes *avr* codifican elicitores que sirven de ligandos a receptores codificados por los genes *R*, los cuales desatan una compleja respuesta de defensa. Aunque algunos genes *R* de plantas de diferentes especies y los correspondientes genes *avr* han sido aislados (27), la interacción directa entre esos genes ha sido demostrada en unos pocos casos. Sin embargo, la teoría simplificada del gen a gen no explica todos los tipos de resistencia a enfermedades en las plantas. Algunas resistencias a hongos, oomycetes y virus, son conferidas por genes recesivos, sugiriendo un mecanismo de elevada complejidad. Los mecanismos moleculares en este tipo de resistencia permanecen solo como hipótesis, pero la reciente identificación de mutaciones recesivas conferidoras de altos niveles de resistencia a varios patógenos, muestra una luz dentro de la diversidad de mecanismos involucrados (28, 29).

Las interacciones planta-patógeno pueden ser explicadas por dos vías. La primera incluye interacciones entre los mecanismos generales de defensa constitutivos de la planta y los factores de virulencia producidos por el patógeno encaminados a destruir la defensa. La segunda, seguido del reconocimiento inicial, la planta induce resistencia adquirida mientras que el patógeno trata de escapar a esta resistencia (29).

La defensa general de la planta consiste de factores químicos y físicos. Las defensas físicas incluyen cutículas, las cuales son fuertes cubiertas de polímeros de las superficies externas de la planta, pectinas que existen en las paredes celulares y lámina media que afectan la adherencia entre las células, y las paredes celulares, las cuales protegen a las células vegetal de los daños externos (29).

La composición y estructura de los polisacáridos de la pared celular de secciones del tallo se investigó en plantas de tomate sanas e inoculadas con *R. solanacearum* en los genotipos L390 y Hawaii 7996, susceptible y resistente a la marchitez bacteriana respectivamente por análisis inmunohistoquímico. Se manifestaron diferencias constitutivas en los genotipos en la distribución de methyl-ester del homogalacturonano (HG), arabinano y galactano en la cadena de ramnogalacturonano I (RG I) y arabinogalactan-proteína (AGP) en el parénquima del xilema y pared celular. Después de la inoculación, se observó el aumento del marcaje con todos los anticuerpos específicos para epítopes de HG, RG I y AGP, en el parénquima del xilema y alrededor de los vasos del xilema del tallo del genotipo L390, pero no de Hawaii 7996. También las paredes celulares fueron fuertemente teñidas después de la inoculación en el genotipo L390. En Hawaii 7996, la reacción a la inoculación se observó solo en las paredes, con incremento significativo del número de vasos teñidos (5 y 9 veces para epítopes de RG I de arabinano y galactano, respectivamente). Las diferencias en la estructura de la pared celular del xilema pueden tener una función en los mecanismos de constitutivos de resistencia multigénica de tomate frente a la marchitez, mientras que cambios después de la inoculación pueden contribuir a inducir resistencia basal al nivel de pared celular (30).

La distribución y aparición de *R. solanacearum* en los tejidos superiores del hipocotilo de raíces de posturas de tomate inoculadas del cultivar resistente LS-89 (una selección del genotipo Hawaii 7998) y el cultivar susceptible Ponderosa fueron comparadas para aclarar el mecanismo que limita el movimiento de la bacteria en los tejidos del tomate resistente. En tallos de plantas marchitas, la bacteria colonizó los tejidos del xilema primario y secundario. La bacteria fue más abundante en vasos, en los cuales, las membranas a menudo estaban degeneradas. Todas las células del parénquima adyacente a los vasos con bacteria estaban necróticas y algunos de ellos colonizados por la bacteria. En los tallos de las plantas de LS-89 no se mostraron síntomas discernibles de marchitez, la bacteria se observó en los tejidos xilemáticos primarios pero no en los secundarios. La necrosis en las células del parénquima adyacente se observó ocasionalmente. Las membranas fueron a menudo más gruesas con alta densidad electrónica. La lámina electrónicamente densa interior de la pared celular de las células del parénquima y los vasos fue más gruesa y más llamativa en los tejidos del xilema infectado de LS-89. Los materiales electrónicamente den-

sos se acumularon en o alrededor de las cavidades de las células del parénquima cercano a vasos con la bacteria y en los vasos con la bacteria. Muchas bacterias aparecieron normal en los vasos, excepto para aquellos en contacto con las membranas. Estos resultados indican que *R. solanacearum* se mueve de vaso a vaso en tejidos infectados a través de membranas degeneradas y el movimiento restringido en los tejidos del xilema fue característico en LS-89. La limitación del movimiento bacteriano puede estar relacionada con el grosor de las membranas y/o la acumulación de materiales densos electrónicamente en los vasos y las células del parénquima (31).

Ejemplos de defensas químicas son las fitoanticipinas, tales como las saponinas, compuestos fenólicos y proteínas inducidas (32, 33, 34, 35). Se ha demostrado que una mezcla de *Bacillus amyloliquefaciens* Fukumoto cepa IN937a y *Bacillus pumilus* Meyer y Gottheil cepa IN937b dieron protección sistémica contra múltiples enfermedades en diferentes cultivos. Posteriormente se investigaron las respuestas de enzimas relacionadas con la defensa en plantas, inducidas por la mezcla de IN937a y IN937b contra diferentes patosistemas. Uno de los patosistemas seleccionados fue tomate-*Ralstonia solanacearum*. Las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y la peroxidasa (PO) se estudiaron teniendo en cuenta su importancia en la defensa de las plantas. Durante el ensayo, se detectaron bajos niveles de actividad natural de SOD y PO en los controles sanos no retados. Después del reto con el patógeno, las plantas tratadas con la mezcla de las bacterias tuvieron actividades SOD y PO del 25–30% superiores a los controles con patógeno, así como a las plantas que no habían sido pre-tratadas con la mezcla. El incremento de la actividad de las enzimas SOD y PO resultó en una protección significativa contra *R. solanacearum* por lo tanto, tales enzimas parecen tener una importante función en la defensa en este patosistema (36).

Otro aspecto interesante son las hormonas. La interacción de las hormonas vegetales ABA y etileno son importantes en el desarrollo de la planta. Esto incluye elongación de la raíz, senescencia de los órganos, iniciación de la respuesta adaptativa a varias condiciones ambientales y resistencia a patógenos conduciendo a una compleja red de interacciones sinérgicas y antagónicas (37, 38). Estudios genéticos de componentes de las vías de ABA y el etileno sugieren una interacción antagónica entre estas dos vías en las respuestas de las plantas a estreses bióticos y abióticos. Por ejemplo: mutantes de la señalización del etileno (*etr1*, *ein2*, *ein3*), y mutantes de la vía del

ABA (*aba1*, *aba2*, *abi1*, *abi2*) han sido informados como antagonistas de la expresión de los genes de defensa y de respuestas a estrés, modulando las respuestas de las plantas (37). Hay evidencia creciente de que el ABA esta involucrado en la regulación de la respuesta de las plantas a los patógenos. Las aplicaciones exógenas de ABA antes de la inoculación aumenta la susceptibilidad a varios patógenos (38). Por el contrario, mutantes deficientes de ABA muestran una reducción en la susceptibilidad a *Botrytis cinerea* Pers ex. Fr (39). Sin embargo investigaciones recientes muestran que el ABA aumenta la resistencia por afectaciones en la deposición de calosa (40) y síntesis de ácido jasmónico (AJ) (41), sugiriendo una posible regulación sinérgica de las vías etileno/AJ y ABA en la resistencia.

El entendimiento de los complejos mecanismos de interacción entre las vías etileno y ABA ayudará a los mejoradores en el desarrollo de cultivos resistentes a patógenos. Los factores proteicos de la respuesta del etileno (ERF) se presume modelan múltiples respuestas, incluyendo la respuesta a patógenos y el desarrollo vegetal (42). En tales procesos las proteínas ERF son reguladas por ETR1, CTR1, EIN2, y EIN3 (37, 38, 43). La mayoría de las proteínas ERF identificadas tales como tomate Pti4/5/6 (44), *Arabidopsis* ERF1 (45), AtERFs (46), se unen a la caja GCC y modulan la expresión de los genes de las PR que funcionan en la resistencia a patógenos. Algunas proteínas ERF, como CBF1 (47), interactúan con elementos responsables de la deshidratación (DRE) involucrados en el estrés por sequía, salinidad y frío (48). El elemento de respuesta a ABA unido al elemento 1 (CE1), es importante en la determinación de la expresión específica de los genes de respuesta a ABA. Las proteínas ERF Tsi1 (49) y TERF1 (50) regulan la expresión de los genes que contienen la caja GCC y DRE. Por lo tanto, las plantas tienen aumentada la tolerancia a estrés biótico o abiótico, sugiriendo que las proteínas ERF son importantes reguladores en las respuestas a patógenos mediadas por las vías de etileno y ABA. No está claro como el ABA afecta la respuesta mediada por proteínas ERF. Algunas proteínas ERF pueden ser el componente *downstream* de EIN3, el cual es regulado por reguladores *upstream* en la vía del etileno. Esta cascada de regulación al final resulta en un incremento de la expresión de los genes de PR (37, 38, 43). Recientemente se demostró que componentes de la vía del etileno como la MAPK quinasa 2, la cual es inducida después de la infección con patógenos, modula los niveles de AJ y AS (51). Por afectación de la biosíntesis de AJ, el ABA modula la expresión de los genes de defensa (41, 52).

Previamente se demostró que una proteína ERF, la TSRF1, aumentaba significativamente la resistencia a *R. solanacearum* en tabaco y tomate por activación de los genes conteniendo la caja GCC (50). Se plantea que la resistencia regulada por TSRF1 es modificada por la aplicación de ABA. TSRF1 activa la expresión de genes relacionados con la síntesis de ABA, resultando en un incremento de la biosíntesis de ABA, lo cual estimula posteriormente la producción de etileno. La aplicación de ABA decrece, mientras el inhibidor de la síntesis de ABA, fluridone incrementa la resistencia aumentada por TSRF1. Esta observación es apoyada por el hecho de que ABA y fluridone modifican reversiblemente la habilidad de TSRF1 de unirse a la caja GCC de respuesta etileno, alterando la expresión de elementos de genes controladores. Se establece que la resistencia regulada por TSRF1 a *R. solanacearum* puede ser modificada en tabaco por ABA (52).

En tomate, la resistencia a *R. solanacearum* es poligénica y algunos loci que gobiernan la resistencia han sido identificados. Cepas diferentes inducen síntomas en diferentes ecotipos de *Arabidopsis thaliana*. Después de la inoculación la bacteria virulenta se encuentra predominantemente en los vasos y se propaga sistémicamente en toda la planta, lo que lleva al marchitamiento de los ecotipos susceptibles en 5–10 días. La resistencia de *A. thaliana* a *R. solanacearum* difiere marcadamente de otras bacterias en crucíferas, pues no hay reacción HR (28).

Se ha informado la identificación de dos genes de *A. thaliana* involucrados en la determinación de resistencia recesiva a algunas cepas de *R. solanacearum*. Los alelos dominante *RRS1-S* y recesivo (*RRS1-R*), susceptible y resistente respectivamente, codifican para proteínas predichas de alta similitud que difieren en longitud. Aunque genéticamente se define como alelo recesivo, *RRS1-R* se comporta como un gen de resistencia dominante en plantas transgénicas. El análisis de secuencia del gen *RRS1* presente en dos líneas recombinantes intragénicas homocigóticas indicó que algunos dominios de *RRS1-R* son esenciales para su función de resistencia. Además la resistencia mediada por *RRS1* es parcialmente dependiente del AS y dependiente de *NDR1* lo que sugiere la existencia de vías de señalización similares a aquellas controladas por genes de resistencia de resistencia específica (28). Los hallazgos antes mencionados denotan que aún queda mucho por investigar en el tema de la resistencia a *R. solanacearum*.

Resistencia inducida

En la actualidad, para muchos investigadores, el incremento y la estabilización de la resistencia del

hospedante dentro del marco de un manejo integrado es un enfoque adecuado para controlar la enfermedad.

En el caso de la interacción *R. solanacearum*-tomate, se perfilan diferentes variantes. Wryda *et al.* (10), desarrollaron un estudio para probar el efecto de la silicóna en la supresión de un patógeno bacteriano en una planta de tomate no acumuladora e identificar antagonistas efectivos de *R. solanacearum* en un sistema modelo con su hospedante tomate y dilucidar los modos de acción de estos tratamientos. Los tratamientos de silicóna aumentaron la concentración de silicóna en las raíces de las plantas de tomate en alrededor de 80%. Las enmiendas con silicóna redujeron significativamente la incidencia de la marchitez para los genotipos de tomate susceptible (26.8%) y moderadamente resistente (56.1%) comparadas con las plantas no tratadas creciendo en cultivo hidropónico. La reducción del número de bacterias en tallo, aunque la silicóna solo estuviera acumulada en raíces, indica que un efecto de resistencia inducida desata los mecanismos de defensa en las plantas de tomate frente a *R. solanacearum*. Las razones de este aumento de la resistencia pueden estar localizadas a nivel de la pared celular ya que se ha observado, en estudios inmunohistoquímicos de plantas tratadas e infectadas, un incremento de polisacáridos, proteínas de la pared galactano, arabinano y arabinogalactano y una disminución en los patrones de esterificación del dominio de homogalacturonan de pepsina.

En plantas de tomate tratadas con antagonistas aislados de la rizosfera de tomate, la incidencia de la marchitez fue significativamente menor que en las plantas no tratadas con antagonistas. La microscopía de fluorescencia demostró una reducida autofluorescencia de las sustancias fenólicas que son producidas en la reacción a la infección, y fluorescencia más intensa de las paredes celulares de los vasos causada por un incremento de los epítopes de la proteína arabinogalactano (AGP). Esto indica que el antagonista cepa A9 tiene potencial como desatador del incremento de la síntesis de AGPs, la cual pertenece al grupo de las glicoproteína ricas en hidroxiprolina (HRGPs), conocidas como factores bioquímicos de resistencia. Tanto los tratamientos con silicóna como con el antagonista mostraron efectos supresivos en el desarrollo de la marchitez. Se observó una alta influencia del genotipo de la planta en cualquier tratamiento. Por lo tanto, antes de usar silicóna o antagonistas como medidas para la reducción de la enfermedad, sus efectos en combinación deben ser estudiados y su aplicación optimizada para el genotipo

a plantar. Sin embargo, los resultados obtenidos revelan a la silicona y los antagonistas como elementos prometedores en un control integrado de la marchitez (10).

Recientemente han sido identificados compuestos activadores de la SAR en plantas. Uno de ellos es el acibenzolar-S-methyl (ASM; Actigard 50 WG, Syngenta, Basel, Switzerland), que muestra actividad frente a distintas bacterias. La aplicación de ASM también reduce la incidencia de la marchitez en tomate cuando las plantas son inoculadas a bajas concentraciones de *R. solanacearum* (10^5 o 10^6 CFU/ml) en condiciones de invernadero (9).

El efecto sobre la marchitez bacteriana en cultivares moderadamente resistentes mantenidos bajo condiciones de campo y en casa de cristal fue particularmente adecuado para la prevención de la diseminación interna de *R. solanacearum* hacia los tejidos de la parte superior del tallo de la planta de tomate (9).

La incidencia de la enfermedad se evaluó en hojas marchitas y en plantas. Los síntomas se incrementaron lentamente en los tres cultivares donde ASM fue asperjado sobre las plantas. Este efecto fue significativo hasta cuatro semanas después del trasplante a suelo infestado con *R. solanacearum* (53).

Otros estudios se han encaminado hacia la aplicación de un método usando timol como un tratamiento de suelo antes de plantar para el control de la marchitez y los nematodos formadores de agallas en tomate. Además el acibenzolar-S-methyl (ASM), fue aplicado junto al timol para determinar si la combinación de estas tácticas mejora el manejo de la marchitez. Los sitios analizados fueron infestados artificialmente con *R. solanacearum* y *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood, el timol fue aplicado a través de las líneas de irrigación a razón de $73\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ en 2004 y 2005. El ASM fue aplicado primero como aspersión foliar a concentración de $25\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. En las parcelas tratadas con timol los por cientos de plantas marchitas fueron 26,0 y 22,6% en 2004 y 2005, respectivamente, en las no tratadas fue de más del 95% de las plantas en cada año. El número de juveniles se redujo significativamente en las parcelas tratadas con timol y ASM para ambos años. La combinación produjo la mayor reducción del agallamiento comparado con las otras variantes. Las parcelas tratadas con timol produjeron rendimientos superiores a las no tratadas y la combinación con ASM incrementó significativamente el rendimiento comparado con las variantes solas. Estos resultados indican que el uso

de ambos fue beneficioso en el control de la marchitez y los nematodos (54).

Otro agente inductor de resistencia es el quitosano (55). El quitosano indujo resistencia y redujo el índice de la enfermedad. El tratamiento que fue asperjado dos veces con quitosano incrementó el valor pico de las actividades PAL, PPO, PO y SOD en relación a la resistencia respectivamente a 46.24, 51.77, 121.22 y 36.49%. Los contenidos de clorofila en hojas después del tratamiento fueron significativamente superiores a aquellos con inoculación normal (56).

También se ha experimentado en la aplicación de micorrizas (57). Se ha encontrado inhibición de *R. solanacearum* como resultado del aumento de los fenoles inducidos local o sistémicamente por una micorriza arbuscular. En macetas la población de *R. solanacearum* en la rizosfera, sobre la superficie de la raíz y en el xilema, decreció en 26.7, 79.3 y 81.7%, respectivamente después de la inoculación de plantas de tomate con *Glomus versiforme* Berch. La colonización de las plantas por ambos *R. solanacearum* y *G. versiforme* aumentó los contenidos de fenoles solubles y pared celular unida a fenoles en los tejidos de la raíz, pero con diferentes patrones. Mientras *R. solanacearum* preferiblemente promovió el contenido de fenoles unido a la pared celular, *G. versiforme* preferiblemente aumentó el contenido de fenoles solubles (58).

CONCLUSIONES

Muchas investigaciones aún se encaminan a dilucidar los mecanismos mediante los cuales se ejerce la resistencia a *R. solanacearum* en los cultivos con interés económico, así como al aislamiento de los genes que codifican para las proteínas estructurales y reguladoras de los procesos patogénicos de esta bacteria, con el objetivo de contribuir a la obtención de genotipos resistentes y/o al desarrollo de productos que puedan inducir resistencia en estas variedades propiciando nuevas estrategias para el manejo de la enfermedad.

REFERENCIAS

1. Pradhanang PM, Momol MT, Olson SM, Jones JB. Effects of plant essential oils on *Ralstonia solanacearum* population density and bacterial wilt incidence in tomato. Plant Dis. 2003;87:423-427.
2. Hernández Y, Mariño N, Trujillo G, Urbina de Navarro C. Invasión de *Ralstonia solanacearum* en tejidos de tallos de tomate (*Lycopersicon*

- esculentum* Mill). Rev Fac Agron. 2005;22:181-190.
3. Olson HA. *Ralstonia solanacearum*. Pathogen profile. PP 728 Soilborne Plant Pathogens, Spring 2005.
 4. Momol T, Ji P, Pernezny K, McGovern R, Olson S. Three soilborne tomato diseases caused by *Ralstonia* and *Fusarium* species and their field diagnostics. Plant Pathology Department, Florida Cooperative Extension Service, University of Florida/ IFAS, EDIS Extension Published Fact Sheet PP-205. (Consultado: 2 mar 2008). Disponible en: <http://www.edis.ifas.ufl.edu>.
 5. García R, García A, Delgado L. Marchitez bacteriana del tomate causada por el biovar 2^a de *Ralstonia solanacearum* en algunas localidades del estado de Mérida-Venezuela. Rev Forest Venez. 1999;43(2):183-189.
 6. Tans-Kersten J, Huang H, Allen C. *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. J Bacteriology. 2001;183(12):3597-3605.
 7. Ji P, Allen C, Sanchez-Perez A, Yao J, Elphinstone JG, Jones JB, Momol MT. New diversity of *Ralstonia solanacearum* strains associated with vegetable and ornamental crops in Florida. Plant Dis. 2007;91:195-203.
 8. Priou S, Barea O, Aley P. Manejo integrado de la marchitez bacteriana de la papa. Folleto técnico para el manejo de la marchitez bacteriana. 2006. Centro Internacional de la Papa (CIP).
 9. Pradhanang PM, Ji P, Momol MT, Olson SM, Mayfield JL, Jones JB. Application of acibenzolar-S-methyl enhances host resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum*. Plant Dis. 2005;89:989-993.
 10. Wydra K, Diogo R, Dannon E, Semrau J. Soil amendment with silicon and bacterial antagonists induces resistance against bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* in tomato. Tropentag 2005: Conference on International Agricultural Research for Development. Stuttgart-Hohenheim 2005, October 11-13.
 11. Liu H, Kang Y, Genin S, Schell MA, Denny TP. Twitching motility of *Ralstonia solanacearum* requires a type IV pilus system. Microbiology. 2001;147:3215-3229.
 12. Van Gijsegem F, Vasse J, Camus J-C, Marena M, Boucher C. *Ralstonia solanacearum* produces Hrp-dependent pili that are required for PopA secretion but not for attachment of bacteria to plant cells. Mol Microbiol. 2000;36(2):249-260.
 13. Genin S, Boucher C. Pathogen profile *Ralstonia solanacearum*: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome. Mol Plant Pathol. 2002;3(3):111-118.
 14. Tsujimoto S, Nakaho K, Adachi M, Ohnishi K, Kiba A, Hikichi Y. Contribution of the type II secretion system in systemic infectivity of *Ralstonia solanacearum* through xylem vessels. J Gen Plant Pathol. 2008;74:71-75.
 15. Genin S, Boucher C. Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. Ann Rev Phytopathol. 2004;42:107-134.
 16. Liu H, Zhang S, Schell MA, Denny TP. Pyramiding unmarked deletions in *Ralstonia solanacearum* show that secreted proteins in addition to plant cell-wall-degrading enzymes contribute to virulence. Mol Plant Microbe Interact. 2005;18(12):1296-1305.
 17. Huang Q, Allen C. Polygalacturonases are required for rapid colonization and full virulence of *Ralstonia solanacearum* on tomato plants. Physiol Mol Plant Pathol. 2000;57(2):77-83.
 18. Schell MA. Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. Annu Rev Phytopathol. 2000;38:263-292.
 19. Tans-Kersten J, Brown D, Allen C. Swimming motility, a virulence trait of *Ralstonia solanacearum*, is regulated by FlhDC and the plant host environment. Mol Plant Microbe Interact. 2004;17:686-695.
 20. Hikichi Y, Yoshimochi T, Tsujimoto S, Shinohara R, Nakaho K, Kanda A, et al. Global regulation of pathogenicity mechanism of *Ralstonia solanacearum*. Plant Biotechnol. 2007;24:149-154.
 21. Kanda A, Ohnishi S, Tomiyama H, Hasegawa H, Yasukohchi M, Kiba A, et al. Type III secretion

- machinery deficient mutants of *Ralstonia solanacearum* lose their ability to colonize, proliferate and induce host responses immediately after invasion, resulting in loss of their virulence. *J Gen Plant Pathol.* 2003;69:250-257.
22. Aldon D, Brito B, Boucher C, Genin S. A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. *EMBO J.* 2000;19:2304-2314.
 23. Cunnac S, Boucher C, Genin S. Characterization of the *cis* acting regulatory element controlling HrpB-mediated activation of the type III secretion system and effector genes in *Ralstonia solanacearum*. *J Bacteriol.* 2004;186:2309-2318.
 24. Brito B, Aldon D, Barberis P, Boucher C, Genin S. A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contact-dependent signal controlling *Ralstonia solanacearum* *hrp* genes. *Mol Plant Microbe Interact.* 2002;15:109-119.
 25. Hernández-Romero D, Solano F, Sanchez-Amat A. Polyphenol oxidase activity expression in *Ralstonia solanacearum*. *Appl Environ Microbiol.* 2005;6808-6815.
 26. Flor HH. Current status of the gene-for-gene concept. *Ann Rev. Phytopathol.* 1971;9:275-296.
 27. Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, Dinesh-Kumar SP. Signalling in plant-microbe interactions. *Science.* 1997;276:726-733.
 28. Deslandes L, Olivier J, Theulieres F, Hirsch J, Xin Feng D, Bittner-Eddy P, et al. Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes. *PNAS.* 2002;99(4):2404-2409.
 29. Tsutomu A, Hideki T, Motoichiro K, Tohru T. Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. *Plant Biotechnol.* 2007;24:135-147.
 30. Wydra K, Beri H. Immunohistochemical changes in methyl-ester distribution of homogalacturonan and side chain composition of rhamnogalacturonan I as possible components of basal resistance in tomato inoculated with *Ralstonia solanacearum*. *Physiol Mol Plant Pathol.* 2007;70(1-3):13-24.
 31. Morassutti C, De Amicis F, Skerlavaj B, Zanetti M, Marchetti S. Production of a recombinant antimicrobial peptide in transgenic plants using a modified VMA intein expression system. *FEBS Lett.* 2002;519:141-146.
 32. Raj PA y Dentino AR. Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. *FEMS Microbiology Lett.* 2002;206:9-18.
 33. Ganz T. Antimicrobial polypeptides. *J Leukoc Biol.* 2004;75:34-38.
 34. Castro MS, Fontes W. Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein and Peptide Letters.* 2005;12:11-16.
 35. Nakaho K, Hibino H, Miyagawa H. Possible mechanisms limiting movement of *Ralstonia solanacearum* in resistant tomato tissues. *J Phytopathol.* 2000;148(3-1):181-190.
 36. Jetiyanon K. Defensive-related enzyme response in plants treated with a mixture of *Bacillus* strains (IN937a and IN937b) against different pathogens. *Biol Control.* 2007;42(2):178-185.
 37. Anderson JP, Badruzaufari E, Schenk PM, Manners JM, Desmond OJ, Ehlert C et al. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signalling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2004;16:3460-3479.
 38. Guo H, Ecker JR. The ethylene signalling pathway: new insights. *Curr Opin Plant Biol.* 2004;7:40-49.
 39. Audenaert K, Meyer G, Hofte MD. Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signalling mechanisms. *Plant Physiol.* 2002;128:491-501.
 40. Ton J, Mauch-Mani B. β -amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant J.* 2004;38:119-130.
 41. Adie BA, Perez-Perez J, Perez-Perez MM, Godoy M, Sanchez-Serrano JJ, Schmelz EA, Solano R. ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2007;19:1665-1681.

42. Chakravarthy S, Tuori RP, D'Ascenzo MD, Fobert PR, Despres C, Martin GB. The tomato transcription factor Pti4 regulates defense-related gene expression via GCC box and non-GCC box *cis* elements. *Plant Cell*. 2003;15:3033-3050.
43. Alonso JM, Stepanova AN. The ethylene signaling pathway. *Science*. 2004;306:1513-1515.
44. Gu Y-Q, Wildermuth MC, Chakravarthy S, Loh YT, Yang C, He X, et al. Tomato transcription factors *pti4*, *pti5*, and *pti6* activate defense responses when expressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2002;14:817-831.
45. Solano R, Stepanova A, Chao Q, Ecker JR. Nuclear events in ethylene signalling: a transcriptional cascade mediated by ethylene-insensitive 3 and ethylene-response-factor 1. *Genes Dev*. 1998;12:3703-3714.
46. Fujimoto SY, Ohta M, Usui A, Shinshi H, Ohme-Takagi M. *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell*. 2000;12:393-404.
47. Cook D, Fowler S, Fiehn O, Thomashow MF. A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of *Arabidopsis*. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2004;101:15243-15248.
48. Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Organization of *cis*-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends in Plant Science*. 2005;10:88-94.
49. Park JM, Park CJ, Lee SB, Ham BK, Shin R, Paek KH. Overexpression of the tobacco *Tsi1* gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. *Plant Cell*. 2001;13:1035-1046.
50. Zhang H, Li W, Chen J, Yang Y, Zhang Z, Zhang H et al. Transcriptional activator TSRF1 reversely regulates pathogen resistance and osmotic stress tolerance in tobacco. *Plant Mol Biol*. 2007;63:63-71.
51. Brader G, Djamei A, Teige M, Palva T, Hirt H. The MAP kinase kinase MKK2 affects disease resistance in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Inter*. 2007;20:589-596.
52. Zhou J, Zhang H, Yang Y, Zhang Z, Zhang H, Hu X et al. Abscisic acid regulates SRF1-mediated resistance to *Ralstonia solanacearum* by modifying the expression of GCC box-containing genes in tobacco. *J Exp Bot*. 2008;59(3):645-652.
53. Araujo JS, Rodrigues R, Gonçalves KS, Ribeiro RdeLD, Polidoro JC. Resistance to tomato bacterial wilt induced by acibenzolar – S- methyl. *Acta Horticulturae 695: I International Symposium on Tomato Diseases*. (Consultado: 2 mar 2008). Disponible en <http://www.actahort.org/>.
54. Momol PJ, Rich MT, Olson JR, Jones SM, Jeffrey B. Development of an integrated approach for managing bacterial wilt and root-knot on tomato under field conditions. *Plant Dis*. 2007;91(10):1321-1326.
55. Anith KN, Momol MT, Kloepper JW, Marois JJ, Olson SM, Jones JB. Efficacy of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, Acibenzolar-S-Methyl, and Soil Amendment for Integrated Management of Bacterial Wilt on Tomato. *Plant Dis*. 2004;88(6):669-673.
56. Sen Yan S, Zhuang Zhi F, Xu Ting C, Yue Jian Y, Li Xiang M. Tomato resistance to *Ralstonia solanacearum* induced by chitosan. *Acta Phyto Sinica*. 2005;32(2):120-124.
57. Lwin M, Ranamukhaarachchi SL. Development of biological control of *Ralstonia solanacearum* through antagonistic microbial populations. *Int J Agri Biol*. 2006;8(5):657-660.
58. Zhu HH, Yao Q. Localized and systemic increase of phenols in tomato roots induced by *Glomus versiforme* inhibits *Ralstonia solanacearum*. *J Phytopathol*. 2004;152(10):537-542.

(Recibido 12-11-2008; Aceptado 27-4-2009)