

Nematodos Asociados al Arroz (*Oryza sativa* L.) en Costa Rica.  
III. Microscopía Electrónica de Rastreo de *Meloidogyne* y *Tylenchorhynchus annulatus*<sup>1</sup>

R. López\*, L. Salazar\*

ABSTRACT

The external morphology of females, males and second-stage juveniles of *Meloidogyne salasi* and of females of *Tylenchorhynchus annulatus*, two plant-parasitic nematode species of rice in Costa Rica, was observed with the scanning electron microscope (SEM). The presence of two rounded pores on each spicular tip of *M. salasi* males and the characteristics of *T. annulatus*, as seen with the SEM, are illustrated for the first time.

COMPENDIO

Se observó e ilustró la morfología externa de hembras, machos y juveniles en el segundo estudio de *Meloidogyne salasi* y hembras de *Tylenchorhynchus annulatus*, dos nematodos parásitos del arroz en Costa Rica, con la ayuda del microscopio electrónico de rastreo (MER). La presencia de dos poros redondos en cada espícula de los machos de *M. salasi* y las características de las hembras de *T. annulatus*, vistas con el MER, son ilustradas por primera vez.

INTRODUCCION

El uso del microscopio electrónico de rastreo (MER) para la observación de la morfología de los nematodos fitoparásitos se ha extendido considerablemente en los últimos años. Avances logrados como la gran resolución, la profundidad de campo, la facilidad de interpretación de las imágenes obtenidas y la versatilidad en los movimientos de la platina en que se colocan los especímenes para examen, han hecho del MER un instrumento extremadamente

útil para estudiar la taxonomía de estos parásitos, al hacer posible su observación y la toma de fotografías desde numerosos ángulos; esto permite una mejor interpretación de los rasgos microtopográficos (6, 11).

Por otra parte, en Costa Rica se ha iniciado un estudio de la nematofauna asociada al arroz (*Oryza sativa* L.) que tiene, entre otros, los objetivos de caracterizar en forma detallada y ampliar la información disponible sobre la morfología de los nematodos parásitos de este cultivo. En este trabajo se presentan los resultados de observaciones hechas con el MER en dos especies: *Meloidogyne salasi* López, 1984 y *Tylenchorhynchus annulatus* (Cassidy, 1930) Golden, 1971 (= *T. martini*).

MATERIALES Y METODOS

Los especímenes de *M. salasi* fueron colectados de raíces de arroz en la localidad de Los Chorros, cantón de Corredores, en el Sur de Costa Rica, mientras que los de *T. annulatus* se recogieron de un suelo infestado en un arrozal localizado en las cercanías del aeropuerto La Managua, cantón de Quepos; ambos lugares pertenecen a la provincia de Puntarenas, Costa Rica.

<sup>1</sup> Recibido para su publicación el 13 de octubre de 1986.

Parte del Proyecto 312-85-028 de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica. Los autores agradecen la financiación otorgada por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica y la ayuda técnica para la Srita. Carmen Gutiérrez y del personal de la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad de Costa Rica.

\* Laboratorio de Nematología, Escuela de Fitotecnia. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. El primer autor es beneficiario del CONICIT de Costa Rica.

Los especímenes, hembras, machos y juveniles, en el segundo estadio (J2), de *M. salasi* fueron extraídos siguiendo un método previamente descrito (8), mientras que las hembras de *T. annulatus* fueron extraídas del suelo mediante la técnica de tamizado y centrifugación en solución azucarada (7). Los nematodos fueron aislados en un volumen conocido de agua destilada y enfriados a 5°C durante 1 h en un refrigerador; posteriormente, se agregaron dos gotas de glutaraldehído al 4% (v/v) en una solución amortiguadora de fosfatos ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 M), pH 7.2, a intervalos de 30 minutos hasta duplicar el volumen inicial de agua destilada. Los especímenes fueron fijados durante 72 h adicionales a 5°C en la solución resultante de glutaraldehído al 2%; al final de este periodo fueron trasladados a una pequeña cámara plástica que tenía una malla fina en el fondo (abertura de 15  $\mu\text{m}$ ) y lavados tres veces en una solución amortiguadora de fosfatos, pH 7.2, en un periodo de 15 minutos; luego, fueron posfijados en una solución de tetraóxido de osmio al 2% (v/v) en la solución amortiguadora de fosfatos a 5°C. Los especímenes fueron mantenidos en esta solución durante 18 h y luego fueron lavados tres veces en la solución amortiguadora de fosfatos a 5°C por un periodo de 15 minutos. Inmediatamente después se procedió a deshidratarlos en una serie graduada de etanol a 21-23°C (5-10-20-35-50-65-80-95-100-100-100% de etanol, v/v), con intervalos de 15 minutos entre cada paso. Una vez que los nematodos estaban en la última etapa con etanol absoluto, se colocó una tapa de malla fina sobre la cámara plástica que los contenía. Los nematodos fueron secados inmediatamente en un secador de punto crítico Hitachi HCP-2, con siete cambios de  $\text{CO}_2$  de 10 minutos de duración cada uno. Los nematodos secos fueron montados en forma inclinada sobre fragmentos de cabello humano que descansaban horizontalmente sobre la superficie engomada de una platina de aluminio. Los especímenes fueron cubiertos con oro durante 5 minutos en un colector iónico GIKO 1B-3 y observados en un MER Hitachi S-570 a 15 Kv de voltaje acelerador. En cada caso, se observaron 15 especímenes de cada especie o estado del ciclo de vida. Para la descripción de la morfología de los diferentes estados de *M. salasi* se siguió la terminología propuesta por varios autores (2, 3, 4).

## RESULTADOS

La Fig. 1 ilustra la morfología de la parte frontal y los diseños perineales de hembras de *M. salasi*. En la parte frontal, el redondeado disco labial aparecía levemente elevado, con el estoma redondeado u ovalado en el centro; las sensilas labiales internas eran difíciles de observar, pero, cuando fueron visibles, aparecieron como pequeños poros redondos al-

rededor del estoma. Los labios medios (ventral y dorsal) estaban fusionados con el disco labial; el ventral era de mayor tamaño que el dorsal; ambos tenían el borde externo ligeramente curvo. Los labios laterales eran levemente arqueados. Las aberturas anfidiales eran rectangulares y se localizaron entre los labios laterales y el disco labial, debajo de este último. La región cefálica aparecía como un solo anillo, marcado por cortas líneas longitudinales; con frecuencia este anillo apareció incompleto.

Los diseños perineales (Fig. 1D-F) eran ovalados, con las estrias externas finas y las internas un poco más gruesas; las estrias externas eran mayormente lisas y continuas. La vulva, en forma de una rendija alargada, estaba orientada en el eje lateral del diseño. El arco dorsal era ancho, relativamente alto y cuadrado.

En la Fig. 2 se ilustra la morfología de la parte anterior y de las espículas del macho. Visto de frente, el disco labial aparecía grande y redondeado, ligeramente elevado sobre los labios medios, con los bordes laterales levemente arqueados. El ovalado y relativamente grande preestoma estaba localizado en el centro del disco labial y circundado por seis sensilas labiales internas, en forma de pequeños poros redondos. La abertura del estoma tenía la forma de una rendija, orientada en el eje dorso-ventral. Los labios medios eran un poco más anchos que el disco labial y tenían, cada uno, dos sensilas cefálicas en forma de pequeñas depresiones cuticulares. En algunos especímenes (Fig. 2B, C), se observaron unas protuberancias, en número variable, que yacían a la par de las sensilas cefálicas. Se encontró un espécimen aberrante (Fig. 2D) que tenía unos lóbulos de forma irregular localizados entre el disco labial y uno de los labios medios. En todos los especímenes observados los labios laterales eran inconspicuos y estaban marcados por cortas incisuras que se iniciaban en la conjunción del disco labial con los labios medios, extendiéndose sobre la región cefálica. Las aberturas anfidiales aparecían como rendijas relativamente largas, colocadas debajo de los bordes laterales del disco labial (Fig. 2A-E). La región cefálica presentaba de dos a tres hileras de anulaciones cortas e incompletas, colocadas en diferentes niveles de la misma. Las espículas presentaban cada una dos poros circulares, uno en su porción distal y el otro un poco más atrás (Fig. 2F).

La Fig. 3 muestra la morfología de la parte anterior de los J2. El elongado disco labial estaba levemente elevado sobre los labios medios y presentaba los bordes laterales rectos o levemente arqueados. El ovalado preestoma se localizaba en el centro del disco labial y estaba rodeado por seis sensilas labiales internas, en forma de pequeños poros redondos. El

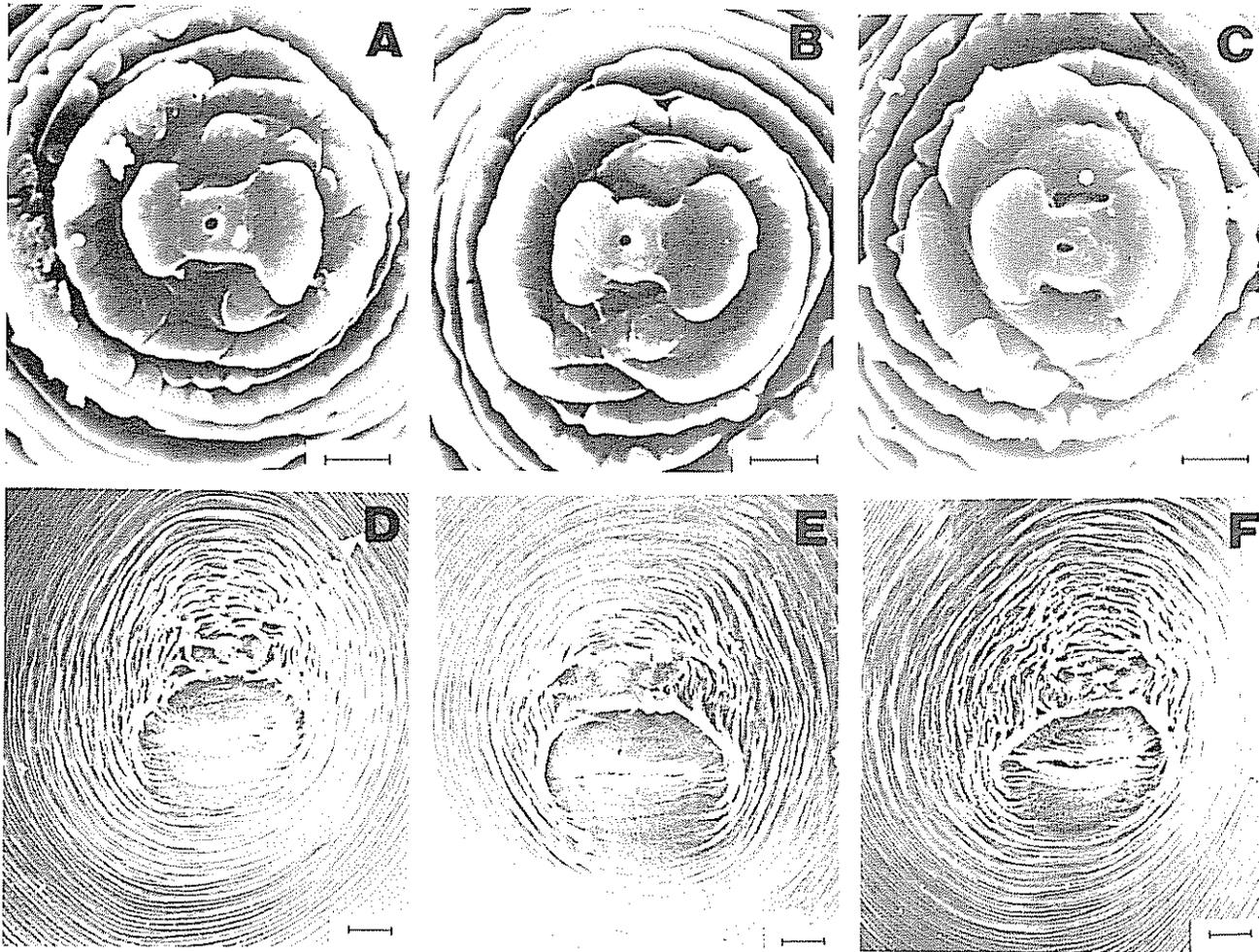


Fig. 1. Fotomicrografías de la porción frontal (A-C) y el diseño perineal (D-F) de hembras de *Meloidogyne salasi*. La barra en A-C = 10  $\mu$ m; en D-F = 2  $\mu$ m

estoma tenía una abertura en forma de rendija, difícil de observar. Los labios medios eran más anchos que el disco labial, tenían los bordes redondeados y en conjunto, con el disco labial, formaban una estructura similar a un corbatín. Los labios laterales eran angostos; sus bordes eran rectos o ligeramente arqueados y corrían paralelos a los bordes laterales del disco labial. Las aberturas anfidaes aparecían en forma de rendijas colocadas debajo de los bordes laterales del disco labial. La región cefálica era lisa, sin anulaciones

La Fig. 4 ilustra algunas características morfológicas de las hembras de *T. annulatus*. Vista lateralmente (Fig. 4A), la parte anterior aparecía levemente redondeada o aplanada (Fig. 4B). La región cefálica no presentó ninguna anulación marcada que la separara del resto del cuerpo. El disco labial (Fig. 4C, D) era rectangular, con la parte más larga en el sentido dorso-ventral y la más corta en el sentido lateral; las

uniones de los bordes laterales del disco labial, con los bordes orientados dorso-ventralmente, eran angulares. Las aberturas anfidaes se localizaban hacia el centro de los bordes laterales del disco labial; tenían forma de óvalos relativamente grandes y ocupaban parte del disco labial y parte de la porción lateral de la región cefálica. La abertura del estoma tenía forma ovalada, era relativamente pequeña y estaba orientada dorso-ventralmente; en apariencia, alrededor de la misma, se localizaban seis sensilas, tres a cada lado (Fig. 4B) pero esta característica no pudo ser observada claramente en vistas de la porción frontal (Fig. 4C, D). Los campos laterales se iniciaban como dos incisuras localizadas a 15-16 anillos del disco labial (Fig. 4A). Al observar esta parte del cuerpo con mayor aumento (Fig. 4E) se notó que, a unos 6-7 anillos del inicio de los campos laterales, aparecía una tercera incisura en el centro de los mismos, la que los dividía en dos sectores del mismo ancho; los bordes externos eran

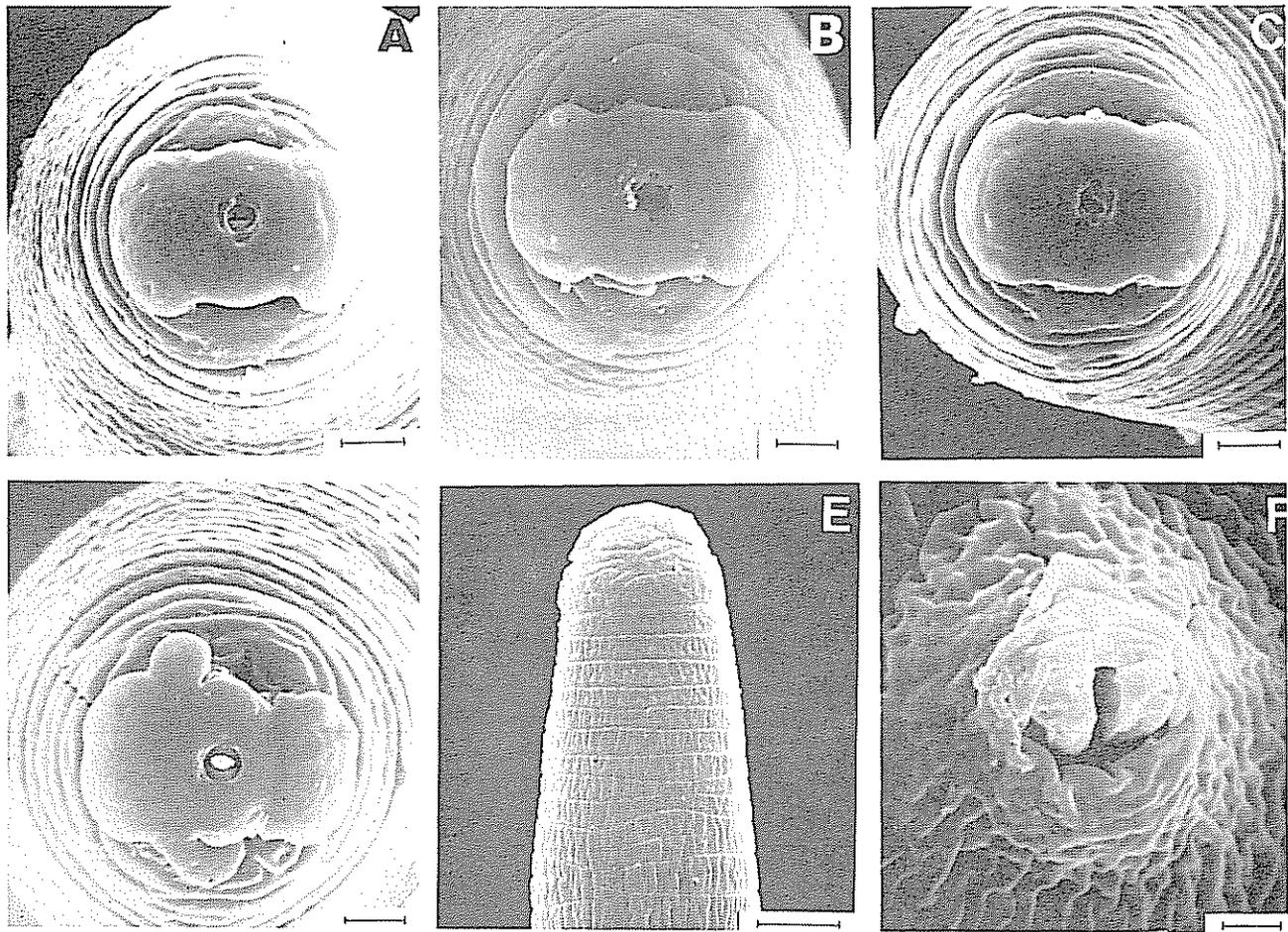


Fig 2 Fotomicrografías de la porción frontal (A-D) porción anterior (E, lateral) y de las espículas (F) de machos de *Meloidogyne salasi*. La barra en A-D = 2  $\mu$ m; en E = 5  $\mu$ m y en F = 1  $\mu$ m

arqueados y había correspondencia entre las anulaciones del cuerpo y las incisuras transversales en los campos laterales; en pocas oportunidades, las incisuras transversales atravesaron los campos hasta llegar a la incisura central, produciendo una areolación incompleta. En esta parte del cuerpo los campos laterales ocupaban 1/5 de su diámetro. A mitad del cuerpo (Fig. 4F), los campos laterales presentaban cuatro incisuras que los dividían en un sector central angosto y dos sectores laterales, aproximadamente iguales entre sí pero de mayor ancho que el central; los bordes externos de los campos laterales conservaban su característica de arqueados, pero, las incisuras transversales no los atravesaban por lo que no había areolación de los mismos. En esta parte del cuerpo los campos laterales ocupaban aproximadamente 1/3 de su diámetro.

La porción caudal (Fig. 4G, H) era subcilíndrica, con una parte terminal redondeada. Los fasmidios se localizaban en la banda central de los campos laterales

y se abrían al exterior, a través de un poro redondeado. Los campos laterales estaban delimitados por cuatro incisuras, de manera similar a lo observado a mitad del cuerpo. Las cuatro incisuras llegaban hasta el último anillo de la cola donde se fusionaban; las dos incisuras externas tenían los bordes arqueados.

#### DISCUSION

La morfología de la población de *M. salasi* utilizada en este estudio fue muy similar a la de la población usada para la descripción de la especie (8), excepto por unos pequeños detalles. Así, se podría mencionar que la forma de la porción frontal de las hembras difirió de la descrita como típica de *M. salasi*, ya que el labio ventral no era puntiagudo. Sin embargo, fue idéntica a la de una variante poco frecuente en la población usada para la descripción de la especie (8, Fig. 3D). Entonces, podría decirse que la morfología de la población utilizada en este estudio se mantuvo

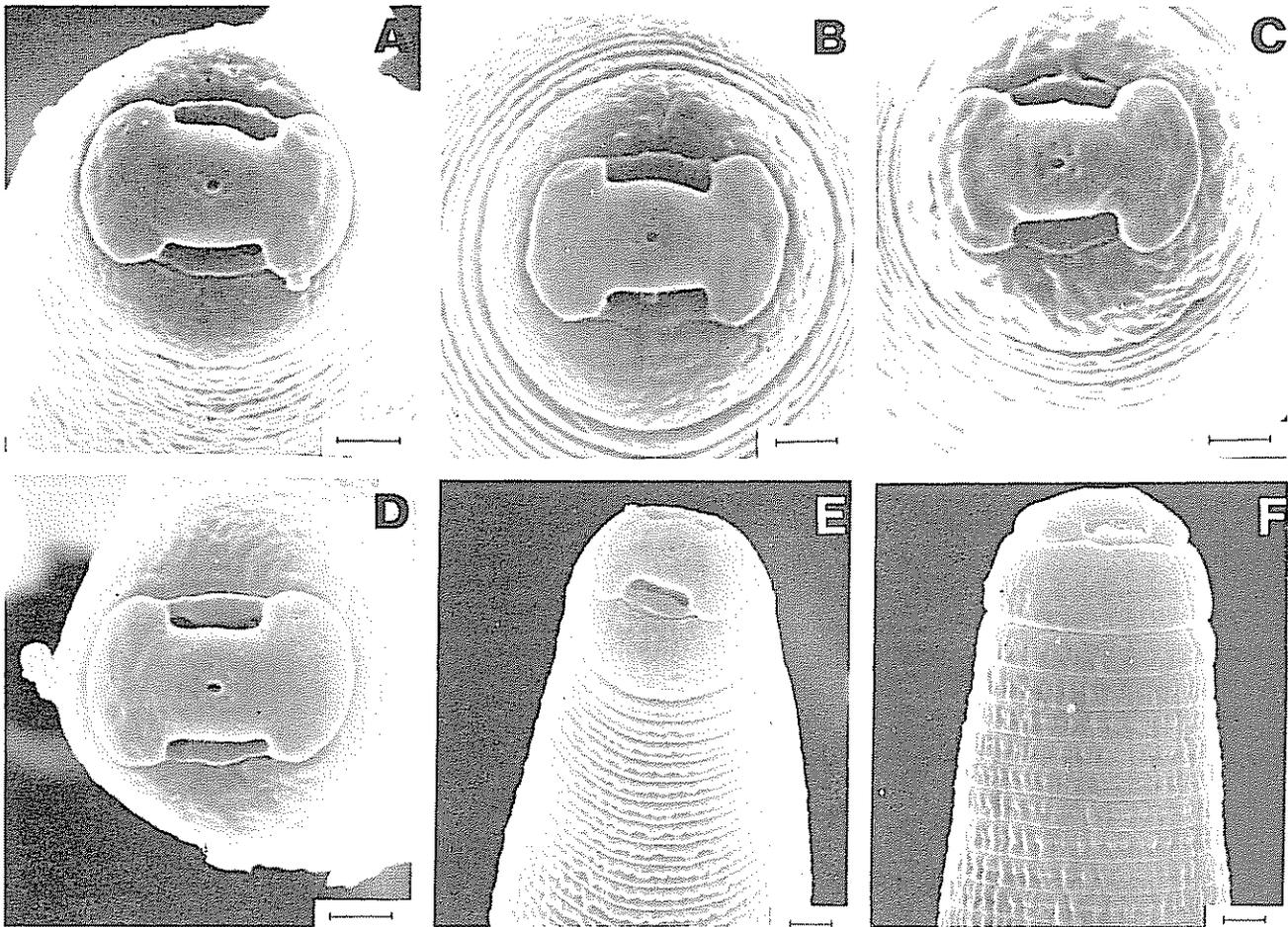


Fig 3 Fotomicrografías de la porción frontal (A-D) y la porción anterior (E = lateral, F = laterodorsal) de segundos estados juveniles de *Meloidogyne salasi*. La barra en A-F = 1  $\mu$ m

dentro de la variación propia de *M. salasi*. Otro de los aspectos diferentes fue la presencia de dos poros circulares en cada una de las espículas de los machos; originalmente (8), se mencionó que cada espícula tenía una abertura transversal. La observación de los especímenes obtenidos en este estudio y su comparación con los usados en la descripción original permiten asegurar que los de este estudio estaban en mejores condiciones de preservación cuando fueron observados con el MER, por lo que posiblemente la primera observación fue de especímenes un poco distorsionados por el proceso de fijación y secado. En este sentido, pareciera entonces que la condición normal de las espículas de machos de *M. salasi* es la de tener dos poros redondos en sus extremos; esto concordaría con lo anotado por Eisenback (1), de que las terminaciones nerviosas que entran por la base de cada espícula en los machos de *Meloidogyne* spp. abren al exterior a través de dos po-

ros en la punta. La mejor preservación de los especímenes usados en este estudio permitió también ilustrar con mejor detalle la morfología de la porción anterior del cuerpo de los J2; las fotografías de la parte frontal de los J2 en la descripción original (8, Fig 3E, F) están un poco fuera de foco, mientras que las aquí presentadas tienen una mejor resolución y están mejor enfocadas.

En cuanto a *T. amulatus*, esta parece ser la primera vez en que tal nematodo es observado con el MER ya que después de un exhaustivo análisis de la literatura sólo se logró encontrar ilustraciones hechas con la ayuda del microscopio de luz (5, 10). Las observaciones hechas en esta investigación sirvieron para, en ciertos casos, confirmar y en otros ampliar la información existente sobre la morfología de esta especie. Por ejemplo, no se observó incisura alguna que separara en forma clara la región cefálica del resto del

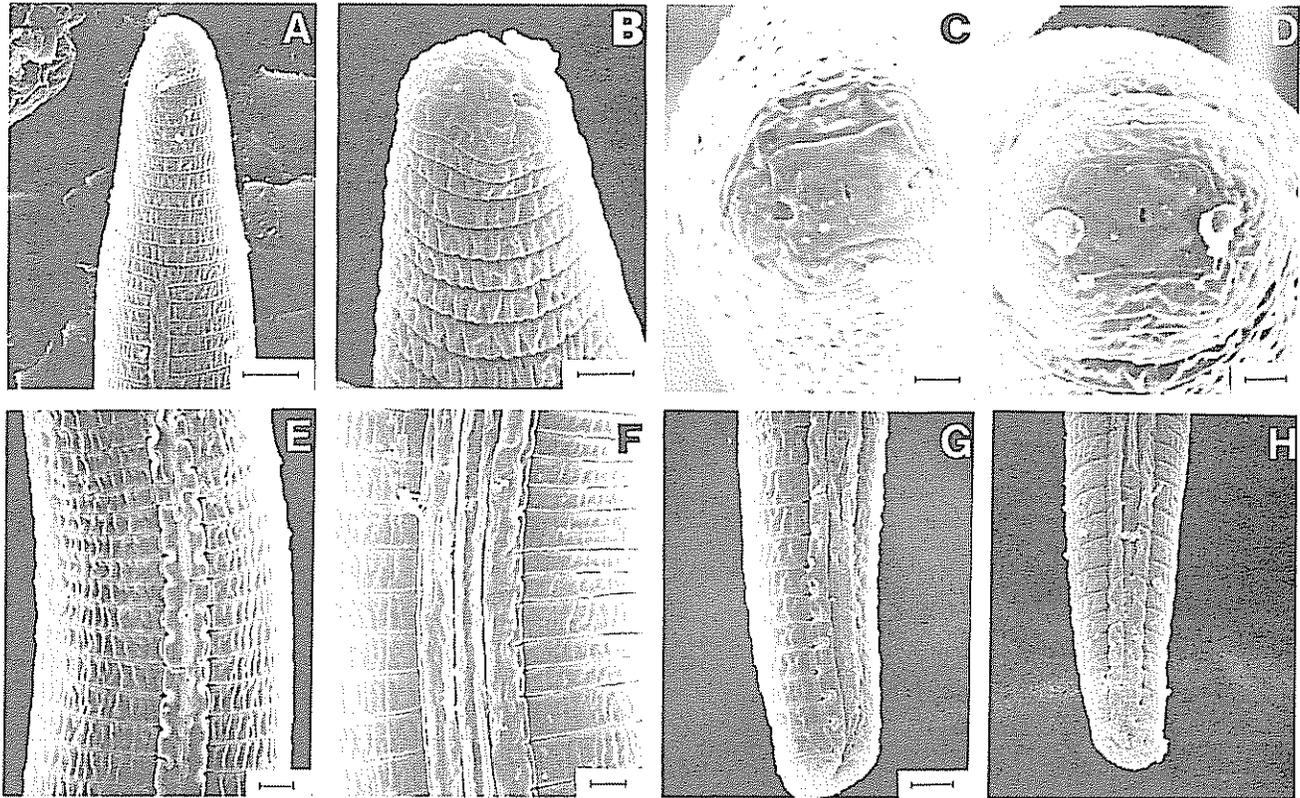


Fig 4 Fotomicrografías de hembras de *Tylenchorhynchus annulatus* (A-H). A: parte anterior; B: región cefálica; C y D: porción frontal; E: inicio del campo lateral; F: como lateral a mitad del cuerpo; G y H: cola. La barra en A = 4  $\mu\text{m}$ ; en B = 2  $\mu\text{m}$ ; en C y D = 1  $\mu\text{m}$ ; en E y F = 2  $\mu\text{m}$ ; en G y H = 4  $\mu\text{m}$

cuerpo (Fig. 4A). En estudios realizados con el microscopio de luz se ha mencionado que la región labial tiene tres anillos (5, 9, 10); Siddiqi (10) también ha mencionado que la región cefálica está levemente separada del resto del cuerpo por un mayor diámetro, mientras que según Fielding (5) la región cefálica está separada por una ligera constricción. Las observaciones hechas con el MER no confirmaron lo anotado por estos dos últimos autores, ya que no se observó incremento alguno en el diámetro de la región cefálica o constricción que la separara del resto del cuerpo; por esta razón, no se podría afirmar que la región cefálica tiene tres anillos, aunque esto sea visible con el microscopio de luz. Por otra parte, las características de los campos laterales en las partes media y caudal del cuerpo ya habían sido observadas e ilustradas previamente (5, 9, 10), así como las de la porción terminal de la cola y las de los fasmidios (9, 10). La morfología de la región labial y la de los campos laterales en su inicio no habían sido ilustradas previamente, por lo que pareciera que ésta es la primera vez que son observadas en detalle.

#### LITERATURA CITADA

- 1 EISENBACK, J.D. 1985 Detailed morphology and anatomy of second-stage juveniles, males, and females of the genus *Meloidogyne* (root-knot nematodes). In An advance treatise on *Meloidogyne* Vol I Biology and control. Ed. by J.N. Sasser, Carter, C.C., Raleigh, N.C. North Carolina State University Graphics. p 47-77.
- 2 EISENBACK, J.D.; HIRSCHMANN, H. 1979 Morphological comparison of second stage juveniles of six populations of *Meloidogyne hapla* by SEM. *Journal of Nematology* 11(1):5-16.
- 3 EISENBACK, J.D.; HIRSCHMANN, H. 1980 Morphological comparison of *Meloidogyne* males by scanning electron microscopy. *Journal of Nematology* 12(1):23-32.
- 4 EISENBACK, J.D.; HIRSCHMANN, H.; TRIANTAPHYLLOU, A.C. 1980 Morphological comparison of *Meloidogyne* female head structures, perineal patterns, and stylets. *Journal of Nematology* 12(4):300-313.

- 5 FIELDING, M.J. 1956. *Tylenchorhynchus martini*, a new nematode species found in the sugarcane and rice fields of Louisiana and Texas. Proceedings of the Helminthological Society of Washington 23(1): 47-48.
- 6 HIRSCHMANN, H. 1983. Scanning electron microscopy as a tool in nematode taxonomy. In Concepts in nematode systematics. Ed. by A.R. Stone, H.M. Platt, L.F. Khalil. New York: Academic Press. p. 95-111.
- 7 JENKINS, W.R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. Plant Disease Reporter 48:692.
- 8 LOPEZ, R. 1984. *Meloidogyne salasi* sp. n. (Nematoda: Meloidogynidae), a new parasite of rice (*Oryza sativa* L.) from Costa Rica and Panamá. Turrialba 34(3):275-286.
- 9 LOPEZ, R.; SALAZAR, L. 1986. Nematodos asociados al arroz (*Oryza sativa* L.) en Costa Rica. II. Variaciones intraespecíficas en *Tylenchorhynchus annulatus* (Cassidy, 1930). Golden, 1971. Turrialba 36(3):321-328.
- 10 SIDDIQI, M.R. 1976. *Tylenchorhynchus annulatus* (= *T. martini*). Commonwealth Institute of Helminthology. Descriptions of Plant Parasitic Nematodes No. 85. 4 p.
- 11 WERGIN, W.P. 1981. Scanning electron microscopic techniques and applications for use in nematology. In Plant parasitic nematodes Vol. III. Ed. by B.M. Zucherman, R.A. Rhode. New York: Academic Press. p. 175-204.

## Reseña de libros

VLECK, P.L.G. Micronutrients in tropical food crop production. M. Nijhoff/Dr. W. Junk Publ. Dordrecht, Holanda. 260 p.

Este volumen presenta 10 capítulos escritos por expertos de la materia de cuatro continentes e intenta la tarea difícil de resumir la bibliografía fuertemente dispersa sobre el tema en capítulos bien organizados. Reunir la materia dispersa en publicaciones más o menos conocidos y presentarla en un conjunto sistemático es el mayor mérito de los 16 autores, especialmente del editor Dr. Paul L.G. Vlek del Centro Internacional para el Desarrollo de Fertilizantes.

Otra contribución importante de la obra es la de incluir las bibliografías a finales de cada capítulo.

El primer capítulo, es el más largo, discute en forma general la química de los oligoelementos en suelos. Los puntos de vista son generales y este capítulo igual a las 45 referencias, en su mayoría de tipo de obras de referencia, proporcionan información general incluyendo la década de los setenta.

El segundo capítulo sobre las necesidades de oligoelementos de los cultivos alimenticios tropicales, presenta información muy útil y difícil de obtener.

Es particularmente interesante un subcapítulo que relacione los problemas de oligoelementos con técnicas de manejo de cultivos y niveles de rendimientos. Las 80 referencias reúnen mucha información poco conocida pero bastante útil para el lector Latinoamericano.

El tercer capítulo se refiere a los problemas de micronutrientes en la Asia tropical. Las 171 referencias indican el trabajo voluminoso y la importancia de este problema en la región. Las investigaciones en la India y en las Filipinas son las más voluminosas y los problemas de arroz inundado han recibido una considerable atención. Los problemas parecen ser múltiples y en muchos lugares el trabajo es incipiente.

El cuarto capítulo, el segundo más largo del volumen, se dedica a los problemas de oligoelementos en Latinoamérica y se ajusta al título de la obra, estudiando principalmente la bibliografía de tipo general y relacionada a los cultivos alimenticios, y aún así se llega a 169 citas que incluyen información hasta en revistas publicadas en 1982. Se presentan los proble-

mas en relación a las propiedades geológicas y climatológicas de los ecosistemas de Latinoamérica

En el quinto capítulo se analiza los problemas de oligoelementos en la parte tropical de Africa. Este capítulo, un poco más corto que los dos anteriores y con solamente 111 referencias indica que se conoce menos sobre la problemática en este continente, a pesar de que este capítulo incluye en su discusión alguna información también sobre cultivos perennes, que no se hace en los otros capítulos.

El sexto capítulo se dedica a los oligoelementos y a la agroecología de regiones tropicales y mediterráneas. En este capítulo se aprovecha información de un amplio estudio de la FAO que incluyó 24 países mediterráneos y tropicales. Un subcapítulo analiza las relaciones de oligoelementos y clima, otro las relaciones entre tipos de suelo y éstos. Solamente 28 referencias, pero de gran amplitud de información concluyen el capítulo. La determinación de los micronutrientes en suelos tropicales es el tópico del séptimo capítulo, por desgracia las 45 referencias solamente conciernen a los aspectos generales del capítulo y no informan sobre la variable metodología usada, siendo así difícil ir a las fuentes de la información.

El capítulo octavo, uno de los más breves, se refiere al análisis de tejidos vegetales como técnica para determinar deficiencia y excesos. La bibliografía bastante amplia de 121 referencias se refiere a trabajos de importancia general, casi sin mencionar trabajos del trópico. Por desgracia se presenta también un punto de vista relativamente estrecho del autor, dejando sin mencionar enfoques tan importantes como el

sistema DRIS, aplicable también para análisis de oligoelementos.

Una parte valiosa del capítulo es su enfoque en la problemática analítica y en un análisis útil de errores posibles y métodos para controlarlos.

El noveno capítulo se dedica al abonamiento con oligoelementos y a los abonos que contienen estos materiales. Se analiza aquí las fuentes de estos materiales, y su eficiencia agronómica.

Esta es una información bastante escasa y las 56 referencias serán una buena contribución a la información de los lectores.

El último capítulo se refiere a las fuentes de materiales para la producción de fertilizantes de oligoelementos.

Aunque esta información es de poco uso, la mayoría de los investigadores ayuda a entender los materiales empleados y así contribuyen a un mejor manejo.

El libro tiene una presentación sencilla y los autores o el editor se preocuparon por un estilo claro y comprensible aún para lectores sin un profundo dominio del inglés y no debe faltar en las referencias de quienes en una u otra forma están relacionados con la investigación o enseñanza sobre oligoelementos en los trópicos.

ELEMER BORNEMISZA  
CIA  
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA