

# Histopatología de los nematodos *Radopholus similis*, *Pratylenchus coffeae*, *Rotylenchulus reniformis* y *Meloidogyne incognita* en plátano (*Musa acuminata* x *M. balbisiana*, AAB)<sup>1,2</sup>

Domingo Oramas-Nival<sup>3</sup> y Jessé Román<sup>4</sup>

J. Agric. Univ. P.R. 90(1-2):83-97 (2006)

## RESUMEN

*Radopholus similis* causó lesiones deprimidas que modificaron la anatomía cilíndrica normal de la raíz del plátano en condiciones de necrosis severa. Las lesiones causadas por *R. similis* fueron similares a las ocasionadas por *Pratylenchus coffeae* con la excepción de que el último no alteró la turgencia de la raíz. Al nivel celular *R. similis* indujo hipertrofia del núcleo y del nucleolo de las células; sin embargo, *P. coffeae* no produjo una respuesta similar. *Rotylenchulus reniformis* concentró su acción patológica sobre las raíces absorbentes y causó necrosis en el área de alimentación. El nematodo reniforme logró acceso al periciclo a través de las células de paso en la endodermis donde produjo un sincitio compuesto por catorce a veinte células que se extendieron longitudinalmente y circunferencialmente en el periciclo. Las células del sincitio, el núcleo y el nucleolo sufrieron hipertrofia. En algunas de las células del sincitio se observaron dos nucleolos. El citoplasma del sincitio era granular, denso y contenía inclusiones esféricas. Entre la célula de alimentación y el periciclo se observó una estructura sólida en forma de bigote, que llamamos filtro de alimentación. El nematodo nodulador, *Meloidogyne incognita*, causó nodulación abundante en la raíz, hendidura de la corteza y exposición del tejido interno, principalmente en la parte distal de las raíces principales. Internamente, *M. incognita* penetró la endodermis y el periciclo y produjo un sincitio compuesto por cinco a siete células parénquimas vasculares de múltiples núcleos hipertrofiados.

Palabras clave: plátano, nematodos, histopatología

## ABSTRACT

**Histopathology of the nematodes *Radopholus similis*, *Pratylenchus coffeae*, *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne incognita* in plantain (*Musa acuminata* x *M. balbisiana*, AAB)**

<sup>1</sup>Manuscrito sometido a la junta editorial el 19 de septiembre de 2002.

<sup>2</sup>Parte de una tesis sometida por el autor principal en cumplimiento parcial para el grado de Maestro en Ciencias, Departamento de Protección de Cultivos, Colegio de Ciencias Agrícolas, Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayaguez.

<sup>3</sup>Nematólogo Auxiliar (Retirado), Departamento de Protección de Cultivos, Estación Experimental Agrícola, Universidad de Puerto Rico.

<sup>4</sup>Nematólogo y Profesor Emérito, Departamento de Protección de Cultivos.

*Radopholus similis* produced sunken lesions that modified the normal cylindrical anatomy of the plantain root under severe necrotic conditions. The lesions caused by *R. similis* were similar to those caused by *Pratylenchus coffeae*, except that the latter did not alter the turgid condition of the root. At cellular level, *R. similis* induced hypertrophy of the nucleus and nucleolus of the cortical cells; however, *P. coffeae* did not produce a similar reaction. *Rotylenchulus reniformis* concentrated the parasitic activity on the feeder roots, thus causing necrosis at the feeding site. The reniform nematode induced a syncytia made up mainly of fourteen to twenty longitudinal and circumferential cells of the pericycle. The cells, the nucleus and the nucleolus of the syncytia were hypertrophied. Two nucleoli were observed in some of the syncytial cells. The cytoplasm of the syncytia was granular, dense and had spheric inclusions. A solid and mustache-like structure that we called feeding filter was observed between the feeding cell and the pericycle. The root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, caused profuse root galls and cortical cracks in the roots and exposition of the internal tissue, mainly at the distal portion of the main roots. *Meloidogyne incognita* penetrated the endodermis and the pericycle and induced hypertrophy on five to seven of the vascular parenchymal cells with multiple hypertrophied nuclei.

**Key words:** plantain, nematodes, histopathology

### INTRODUCCIÓN

La rizosfera del plátano (*Musa acuminata* × *M. balbisiana*, AAB) es un medioambiente complejo y dinámico con una gran diversidad de organismos entre los cuales se encuentran los nematodos fitoparasíticos. Entre las especies de nematodos asociadas a la rizosfera del plátano, el nematodo barrenador, *Radopholus similis* (Cobb) Thorne; el nematodo lesionador, *Pratylenchus coffeae* (Zimmermann) Filip. y Schuur-Stekh; el nematodo reniforme, *Rotylenchulus reniformis* Lindford y Oliveira; y el nematodo nodulador, *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitw., constituyen las especies de mayor densidad poblacional e historial patogénico en el cultivo en Puerto Rico (Oramas y Román, 1982; Oramas, 1986; Román, 1978). Dos de estas especies, *R. similis* y *P. coffeae*, están catalogadas como nematodos endoparásitos migratorios y las dos especies restantes, *M. incognita* y *R. reniformis*, como nematodos endoparásitos y semi-endoparásitos sedentarios, respectivamente. En el proceso de obtener su alimento, estas especies causan daño fisiológico o mecánico, interna o externamente. Las larvas de los nematodos migratorios penetran y se mueven a través del tejido cortical y se desarrollan y multiplican dentro del mismo. En su acción parasítica estas larvas causan decoloración o necrosis del tejido y extensas cavidades internas (Blake, 1966; Pinochet, 1978). El nematodo migra de la raíz y necrotiza al cormo, por lo que Ashby (1915) le llamó "cabeza negra" a la condición producida por *R. similis* en banano. La enfermedad, que también ocurre en plátano, se inicia con la destrucción de las raíces laterales y la reducción de la absorción de nutrientes. Posteriormente, se observa un ennegrecimiento y deterioro de las raíces primarias y el cormo, reduciéndose el anclaje de la

planta y aumentando el arranque prematuro de éstas (Román, 1978). El parasitismo y la patología causada por *P. coffeae* son muy similares a las producidas por *R. similis*, aunque de menor importancia (Román, 1978). Los nematodos sedentarios invaden el tejido causando daño mecánico en el punto de entrada. Insertan la porción anterior del cuerpo en el cilindro vascular y producen alteraciones fisiológicas en las células parénquimas próximas al punto de alimentación (*M. incognita*) (Christie, 1936) o del periciclo (*R. reniformis*) (Endo, 1975).

Existen varios estudios sobre las alteraciones anatómicas inducidas por estas cuatro especies de nematodos en las raíces de un gran número de plantas, no así en plátano. Los efectos histopatológicos de *M. incognita* y *R. reniformis* han sido los más estudiados. La histopatología de *M. incognita* ha sido estudiada en batata (Krusberg y Nielsen, 1958), caña de azúcar (Román, 1961), ñame (Fawole, 1988) y tabaco (Sosa-Moss et al., 1983). Con *R. reniformis* se han realizado estudios en los cultivos de girasol (Robinson y Orr, 1980), melón "Cantaloupe" (Heald, 1975), algodón, tomate y menta (Cohn, 1973), cítricos (DuCharme, 1959) y palmas ornamentales (Inserra et al., 1994). Blake (1966) realizó un estudio histopatológico de *R. similis* en *Musa ornata* Roxb, y Vovlas y Ekanayake (1985) realizaron uno en banano, *Musa* AAA.

Los estudios sobre las alteraciones histopatológicas causadas por estas cuatro especies de nematodos en plátano son muy limitados. Pinochet (1978) estudió las alteraciones producidas por *P. coffeae* en el cultivo. Con igual propósito, O'Farril (1982) realizó un estudio con el nematodo reniforme. Estos estudios histopatológicos parecen ser los únicos reportados hasta el presente en el cultivo. Este estudio se realizó con el propósito de contribuir al conocimiento de la patología de *R. similis*, *P. coffeae*, *R. reniformis* y *M. incognita* en el plátano.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar este estudio histopatológico se utilizaron raíces obtenidas de los tratamientos de inoculaciones individuales de un ensayo de patogenicidad e interacción de *R. similis*, *P. coffeae*, *R. reniformis* y *M. incognita* en plátano (Oramas, 1986). Tres de las cuatro especies utilizadas, *R. similis*, *R. reniformis* y *M. incognita*, originalmente se extrajeron de raíces de plátano procedentes de los pueblos de Corozal, Juana Díaz y Añasco, Puerto Rico, respectivamente. *Pratylenchus coffeae* se aisló de tejido de ñame procedente de un predio en Corozal. Los cultivos para el inóculo de las diferentes especies se incrementaron en plantas de plátano cv. Maricongo a cuyos cormos se les eliminó la corteza y se trataron con agua caliente a 55° C por 15 min, 24 horas antes de la siembra. Para el estudio, los nematodos se extrajeron de estos cultivos. El inóculo se

ajustó para aplicar una concentración de 2,000 especímenes de *R. similis*, *P. coffeae* y *R. reniformis* y 2,000 huevos de *M. incognita* por planta en un volumen de 10 ml de agua destilada esterilizada.

El ensayo se estableció bajo condiciones de invernadero en la Estación Experimental Agrícola en Río Piedras. Para el estudio se utilizaron plantas de plátano del cultivar Maricongo de 45 días de edad, desarrolladas mediante la técnica de cultivo de tejido, con una altura media de 21.2 cm. Las plantas se sembraron en tiestos de 12.5 cm de diámetro conteniendo 600 g de una mezcla esterilizada de suelo Inseptisol con materia orgánica y arena fina en proporción de 1:1, con un pH medio de 4.9. Los tiestos se colocaron sobre mesas con rejillas de metal. Las plantas se inocularon concurrentemente, a través de tres tubos de cristal colocados a su alrededor en ángulo aproximado de 45°, utilizando una macro pipeta Oxford (Lancer, St. Louis, MO)<sup>5</sup> de alta precisión. Los nematodos se mantuvieron en suspensión durante cada aplicación utilizando un agitador de cristal. Una alícuota equivalente a 10 ml de agua destilada estéril sin nematodos se aplicó a las plantas testigo, en la forma antes descrita. Las plantas se regaron diariamente con aproximadamente 200 ml de agua del grifo. Se aplicó un fertilizante de fórmula 20-20-20 a razón de 5.28 g/L, 30 días después de la siembra. La temperatura del invernadero fluctuó entre 19.5 y 29.4° C durante el ensayo.

Tres meses después de la inoculación se tomaron muestras de raíces en los tratamientos inoculados individualmente y en el testigo, para análisis histológico. Las raíces se lavaron con agua del grifo, se cortaron en secciones de 5 a 10 mm de largo y se fijaron en FAA (Sass, 1951). Las secciones de raíces se deshidrataron en alcohol butílico terciario, se infiltraron e incrustaron en Paraplast (Sherwood Medical Industries, Inc. Bridgeton, Mo.) a una temperatura de 56 a 57° C (Johansen, 1940). Utilizando un micrótopo de rotación se obtuvieron secciones longitudinales y transversales cortadas en serie a 12, 15 ó 20 micras ( $\mu\text{m}$ ) de espesor. Las bandas de tejido se fijaron con adhesivo de Haup y formalina al 3% sobre laminillas de cristal. Luego se tiñeron con una combinación de safranina, "fast green" y "orange G" o safranina y "fast green". Cada laminilla se fijó permanentemente con pegamento "Permount" (Fisher Scientific Co.) y se examinó bajo un microscopio compuesto para determinar los efectos patológicos de los nematodos en las células y los tejidos.

<sup>5</sup>Las marcas registradas sólo se usan para proveer información específica y su uso no constituye garantía por parte de la Estación Experimental Agrícola de la Universidad de Puerto Rico ni endoso sobre otros productos o equipo que no se mencionan.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las raíces de las plantas testigo no se observó decoloración ni malformación del tejido externo o interno (Figura 1). Secciones transversales de las raíces mostraron una organización normal del cilindro vascular y la corteza que concuerda con los resultados obtenidos por Riopel y Steeves (1964) en raíces de *Musa acuminata* cv. Gross Michel (Figura 1B). En el cilindro vascular de la raíz se observaron múltiples vasos de xilema en distintas etapas de desarrollo rodeados de células parénquimas. No se observó diferencia en tamaño entre las células del periciclo y las células parénquimas vasculares. El cilindro vascular estaba separado de las células parénquimas de la corteza por una endodermis bien diferenciada de paredes engrosadas. Las células parénquimas de la corteza interna y externa estaban separadas por una capa de cavidades de tendencia ovalada denominada laguna lisiginosa (Riopel y Steeves, 1964).

### *Radopholus similis* y *Pratylenchus coffeae*

Las lesiones producidas por *R. similis* y *P. coffeae* en la raíz del plátano fueron muy similares en términos de color y de tamaño. Ambas especies causaron pequeñas lesiones rojizas en forma de estrías y lesiones rojizas o necróticas de tamaño variable en el área cortical de la raíz (Figura 2A, B). En lesiones necróticas extensas *R. similis* causó depresiones del tejido que modificaron la anatomía cilíndrica original de la raíz. Las lesiones extensas causadas por *P. coffeae* no alteraron la turgencia natural del tejido radical.

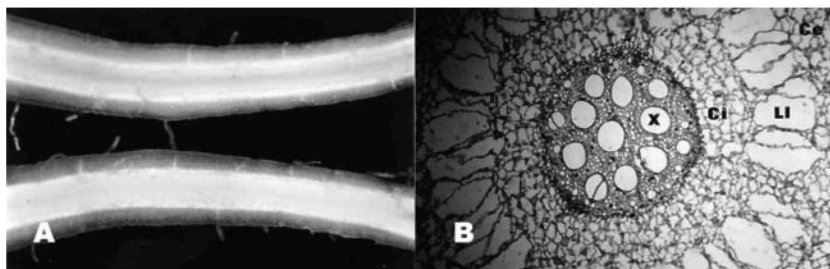


FIGURA 1. Raíces de plátano de plantas testigo no infectadas con nematodos. A—Corte longitudinal mostrando el eje central y la zona cortical completamente sanos y normales. B—Sección transversal de raíz mostrando la estructura normal interna del cilindro vascular y la corteza: corteza externa (Ce), laguna lisiginosa (LI), corteza interna (Ci), y vasos del xilema (X) rodeados de parénquimas en el cilindro vascular ( $\times 21$ ).

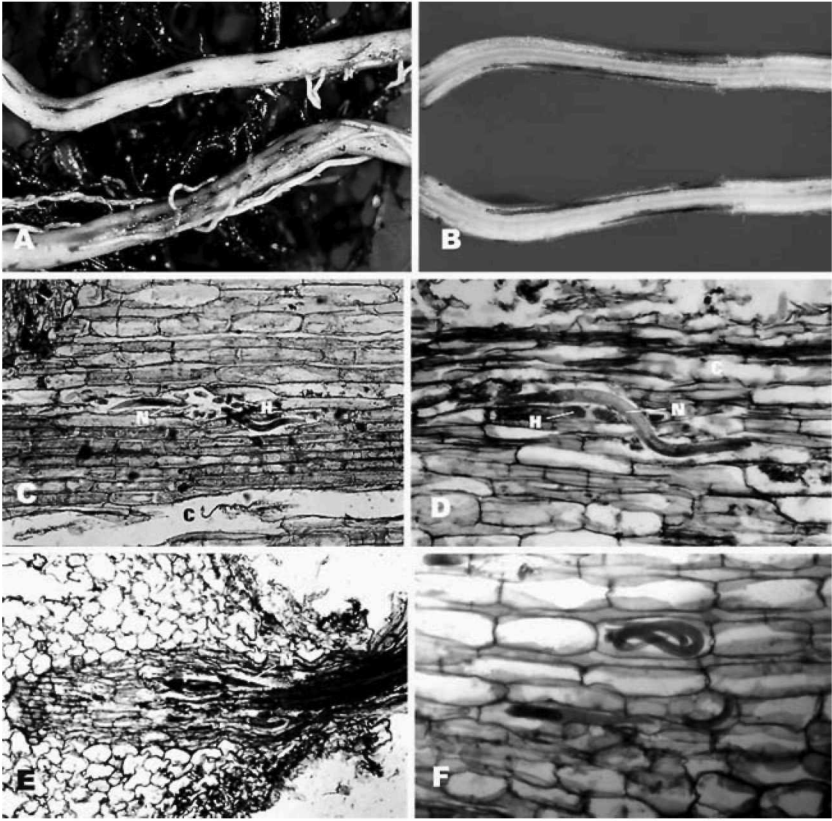


FIGURA 2. Raíces enteras y seccionadas de plátano mostrando el daño causado por *R. similis* y *P. coffeae*. Lesiones longitudinales: A—Raíces enteras mostrando daño externo causado por *R. similis*, B—Raíces seccionadas longitudinalmente mostrando daño interno causado por *P. coffeae*. C—F—Raíces seccionadas longitudinalmente al micróscopo. C—Mostrando huevos (H) y especímenes de *R. similis* (N) agrandando una cavidad en zig-zag; D—Mostrando huevos (H) y especímenes de *P. coffeae* (N) abriendo una cavidad en zig-zag; E—Mostrando especímenes de *R. similis* (N) migrando paralelo al eje central; F—Mostrando varios especímenes de *P. coffeae* (C y E 56x; D y F 100x).

Secciones longitudinales y transversales de raíces de plantas inoculadas individualmente con ambos nematodos mostraron un gran número de células corticales destruidas, galerías, necrosis y presencia de nematodos en distintas etapas de desarrollo (Figura 2C-E). No se observó daño al tejido vascular causado por ninguna de las dos especies. Estos nematodos, además de penetrar en forma directa a las raíces principales, lograron acceso a éstas a través de las raíces laterales

(Figura 2E). Los nematodos causaron una gran destrucción de las células parénquimas de la corteza induciendo grandes cavidades en los tejidos de la corteza externa, la laguna lisiginosa y la corteza interna. Nuestros resultados coinciden con los estudios de *P. coffeae* en plátano realizados por Pinochet (1978), y para *R. similis* en banano por Blake (1961, 1966).

En nuestro estudio observamos a *R. similis* y *P. coffeae* fuera del cilindro vascular, generalmente paralelos al eje central de la raíz (Figura 2E). Al igual que en banano (Blake, 1966), el tejido vascular central no es invadido debido a que la endodermis sirve de barrera protectora contra la invasión. Sin embargo, en cítricos *R. similis* ataca al cilindro vascular (DuCharme, 1959)

Dentro de las células se observaron larvas y adultos de *P. coffeae* entrelazados (Figura 2F), confirmándose las observaciones de Pinochet (1978). Ocasionalmente, observamos especímenes de *R. similis* con una invaginación en la cutícula a ambos lados del nematodo. La invaginación podría estar asociada con la presión ejercida por el nematodo sobre la pared celular. Esto demuestra la flexibilidad del nematodo para penetrar por cavidades más pequeñas que el diámetro de su cuerpo. El estudio de raíces con *R. similis* reflejó hipertrofia del núcleo y del nucleolo de las células. Por el contrario, no observamos a *P. coffeae* causar alteraciones intra-celulares similares. Estos resultados concuerdan con los reportados por Blake (1966) para *R. similis* en banano y por Pinochet (1978) para *P. coffeae* en plátano. A su vez, estos hallazgos comprueban que *R. similis* no sólo causa daño físico sino que, además, causa daño fisiológico.

### *Rotylenchulus reniformis*

*Rotylenchulus reniformis* parasitó las raíces absorbentes y causó necrosis en el área de alimentación de las raíces del plátano (Figura 3A, B). El nematodo se observó en forma perpendicular al eje central atacando las raíces absorbentes, lo que concuerda con los hallazgos de otros investigadores (Vovlas y Ekanayake, 1985; Jones y Dropkin, 1975). También se observó en forma transversal (Figura 3G). La larva se encontró atravesada en la región cortical con su cabeza orientada hacia el cilindro vascular, donde estableció contacto con el periciclo a través de una de las células de la endodermis. En ocasiones, en lugar de establecer contacto con la célula endodérmica ubicada frente a él, se observó la parte anterior del nematodo bordeando el cilindro vascular lateralmente con su parte frontal situada frente a una célula endodérmica. Esta posición sugiere que el nematodo no se alimenta al azar del cilindro central sino que selecciona células específicas de la endodermis

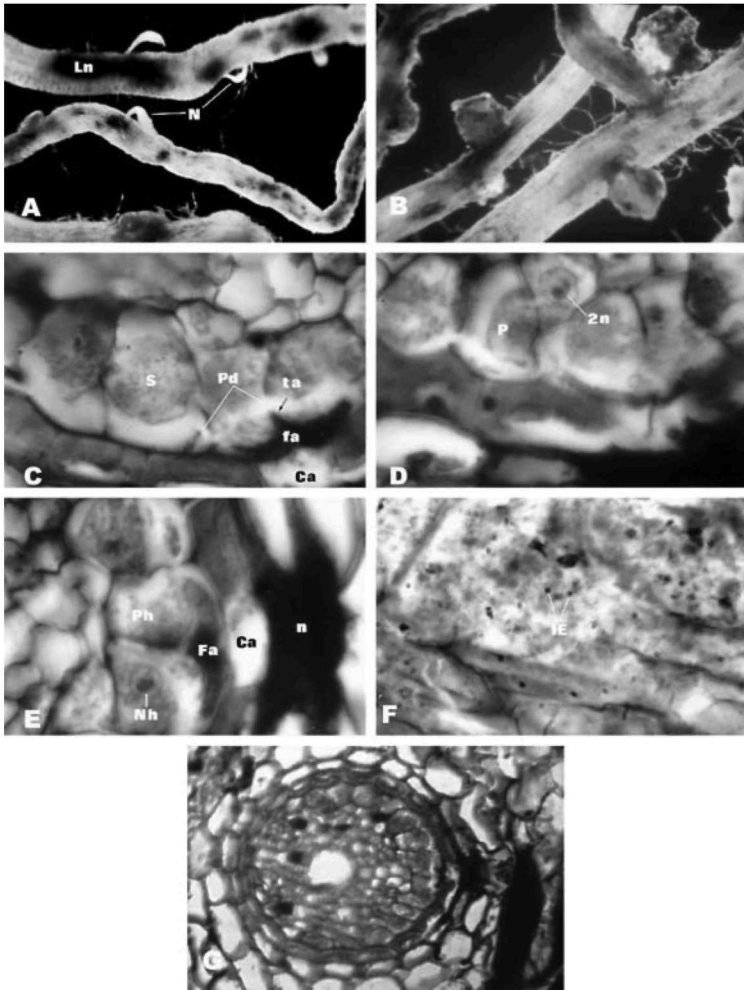


FIGURA 3. Raíces de plátano; absorbentes enteras y cortes al micrótopo mostrando el daño ocasionado por *Rotylenchulus reniformis*. A—Lesiones necróticas en raíces enteras causadas por hembras de *Rotylenchulus reniformis* no cubiertas por masas de huevo. B—Lesiones necróticas en raíces enteras causadas por hembras adultas cubiertas por masas de huevo. C-G—Cortes al micrótopo de raíces absorbentes. C—Corte transversal mostrando: sincitio (S), célula de alimentación (Ca), filtro (Fa), tarugo (Ta) y canal (Pd) de alimentación; D—Corte transversal mostrando: Células del periciclo (P) y 2n, núcleo con dos nucleolos. E—Corte transversal mostrando: necrosis en el punto de infección (N), célula de alimentación (Ca), filtro (Fa) de alimentación, núcleo y nucleolos (Nh) y células del periciclo (Ph) hipertrofiados; F—Corte longitudinal mostrando: inclusiones esféricas en un sincitio (IE); G—Corte transversal mostrando en la región cortical una silueta negra del nematodo ubicada transversalmente con respecto al cilindro vascular (C, D, E y F 1,540x; G 640x).



para su alimentación. Estas células específicas podrían ser las células endodermales no desarrolladas llamadas por Guttenberg "células de paso" (Rioped y Steeves, 1964). Rebois et al. (1975) llamaron a la célula endodermal "prosincitio" o "célula sincitial inicial". Heald (1975) le llamó "célula de alimentación".

Las células corticales adyacentes a la hembra resultaron presionadas y destruidas. El nematodo produjo necrosis en las parénquimas corticales cercanas a su parte anterior y alrededor del cilindro vascular (Figura 3C-E). La pared celular externa de la célula de alimentación sufrió un engrosamiento considerable. El engrosamiento se extendió en menor grado a la pared celular de varias células endodermales cercanas y de varias células parénquimas de la corteza interna. El nematodo también indujo la separación de las células endodermales más cercanas a él.

El efecto más importante observado en los tejidos radicales del plátano fue la producción de un sincitio (Figura 3C-G). El sincitio estaba compuesto por las células del periciclo y la célula de alimentación de la endodermis. Las células del periciclo se hipertrofiaron. La mayor hipertrofia se observó en las células adyacentes a la parte anterior del nematodo descendiendo en tamaño según se distanciaban del mismo. Generalmente, las células del sincitio desarrollaron un tamaño de dos a cuatro veces mayor que el de las células normales. Las células del sincitio se extendieron de 14 a 20 células, longitudinal y circunferencialmente, del punto de alimentación. Ocasionalmente y directamente correlacionado con el grado de infección, formaron parte del sincitio células hipertrofiadas sobrepuestas que ocuparon parte de la zona vascular. Consideramos que estas células formaban parte del periciclo y se desplazaron de su contorno original debido a la hipertrofia celular. Tomando en consideración estas células sobrepuestas, el sincitio podría consistir de varios cientos de células. En soya, Rebois et al. (1975) y Jones y Dropkin (1975) estimaron entre 100 a 200 las células que componen el sincitio en dicho cultivo.

En las células del sincitio se observó el citoplasma granulado y denso. Además, se observó que tanto el núcleo como el nucleolo de las células hipertrofiadas estaban agrandados y aunque, generalmente, las células mantuvieron su condición uninucleada original (Figura 3E), algunas de las mismas tenían dos nucleolos (Figura 3D). Aparentemente, éste es el primer informe sobre la presencia de dos nucleolos en células de raíces infectadas con *R. reniformis*. En batata se observaron dos o más nucleolos inducidos por *M. incognita* (Krusberg y Nielsen, 1958).

Secciones longitudinales de las células del periciclo próximas a la célula de alimentación mostraron la presencia de un número indeterminado de inclusiones esféricas dentro del citoplasma (Figura 3F). Rebois et al. (1975) y Razak y Evans (1976) observaron inclusiones es-

féricas similares en raíces de soya y de frijol de costa, respectivamente, ante la presencia de *R. reniformis*. La composición química y procedencia de estas inclusiones esféricas debe ser objeto de estudio. Las mismas podrían ser producto del desecho de la desintegración de las paredes celulares del periciclo y de la pared celular de la célula de alimentación y células endodermales contiguas. En ocasiones en nuestro estudio, encontramos que la pared celular de la célula de alimentación estaba completamente vacía. Además, las inclusiones esféricas parecen ser el agregado que conforma el “filtro de alimentación”.

Los citoplasmas de las células del sincitio se fusionaron a través de las paredes celulares disueltas parcialmente. La disolución de la pared permitió la formación de un canal a través del citoplasma que desembocó en la célula de alimentación (Figura 3C-E). Entre ésta y las células del periciclo se formó una estructura gruesa, sólida y oscura en forma de “bigote” que actuó como filtro del contenido citoplásmico a la que llamamos “filtro de alimentación” (Figura 3C, E). Una proyección del filtro de alimentación, al igual que toda la pared interna de la estructura, parecía formar parte de la pared celular. Razak y Evans (1976) también observaron una proyección similar en raíces de frijol de costa que albergaba el estilete del nematodo y la denominaron “tarugo de alimentación”. Estos investigadores observaron, además, un tubo hialino de forma helicoidal que brotó del tarugo de alimentación, al que llamaron “tubo de alimentación”. En banano, Vovlas y Ekanayake (1985) también observaron una estructura en forma de tarugo conteniendo el estilete del nematodo y detectaron secreciones tubulares hialinas en la célula de alimentación. En nuestro estudio no observamos una estructura helicoidal similar a la descrita por Razak y Evans (1976) en frijol de costa, ni las secreciones tubulares hialinas descritas por Vovlas y Ekanayake (1985) en banano, pero sí observamos el tarugo de alimentación (Figura 3C). O’Farrill (1982) no observó estructuras ni secreciones hialinas en plátano.

### *Meloidogyne incognita*

El nematodo nodulador, *M. incognita*, causó hinchazón o nodulación abundante y conspicua en las raíces, observándose una congregación de múltiples hembras adultas en el área infectada (Figura 4A, B). Además, causó hendiduras en la corteza y exposición del tejido interno, principalmente en la parte distal de las raíces principales.

La respuesta histopatológica más notable en la raíz del plátano fue la producción de células gigantes en el cilindro vascular (Figura 4C-G). Las células gigantes se produjeron alrededor de la cabeza del nematodo en la zona de células parénquimas vasculares cercanas al periciclo.

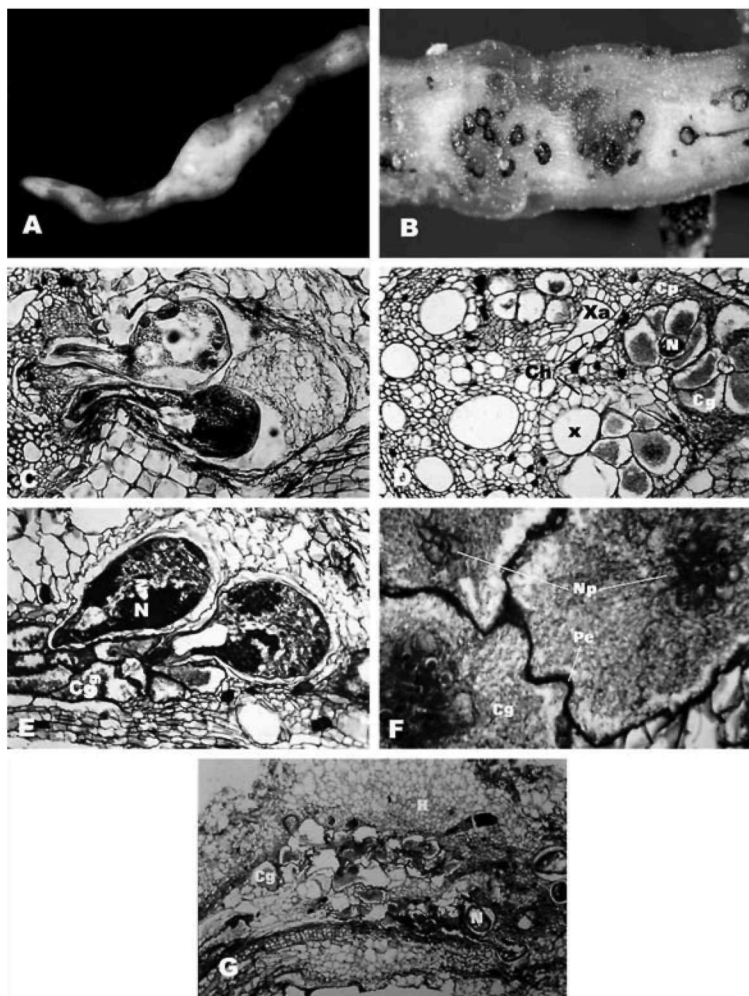


FIGURA 4. Raíces enteras y seccionadas de plátano mostrando el daño causado por *M. incognita*. A—Raíz entera mostrando agalla. B—Raíz entera seccionada longitudinalmente mostrando hembras adultas incrustadas en la corteza y en algunos casos rodeadas de tejido necrótico. C—G—Cortes al micrótopo de raíces. C—Corte transversal mostrando dos hembras adultas con la parte anterior incrustada en el eje central y rodeadas, junto a la masa de huevos, por un engrosamiento de tejido necrótico. D—Corte transversal mostrando múltiples sincitios de células gigantes (Cg) rodeadas por hiperplasia de células (Cp), xilema atrofiado (xa) y xilema (X), células radiales hipertrofiadas (Ch). E—Corte longitudinal mostrando dos hembras adultas (N) y células gigantes (Cg). F—Corte transversal mostrando células gigantes (Cg) con núcleos periformes agrupados con nucleolos conspicuos y pared celular engrosada (Pe). G—Corte longitudinal mostrando múltiples células gigantes (Cg), distintos estadios del nematodo (N) e hiperplasia (H) en parénquimas corticales próximos al ápice de la raíz (C y G 35x; D y E 56x; F 950x).

Longitudinalmente, las células se extendieron paralelas al eje central (Figura 4E). El número de células gigantes fluctuó entre cinco y siete células con citoplasma de apariencia densa y granular (Figura 4D-F). En sincitios asociados a hembras adultas no grávidas se observaron células gigantes con pocos núcleos y nucleolos conspicuos y otras con varios núcleos pequeños distribuidos a través de las células. Dentro de otros sincitios se observaron células con múltiples núcleos hipertrofiados en forma de pera congregados con su parte angosta convergiendo en el centro (Figura 4F). A partir de las observaciones hechas por Treub en 1885, sobre la presencia de células multinucleadas, se han realizado múltiples estudios sobre los mecanismos involucrados en la formación de las células gigantes (Christie, 1936; Huang, 1985; Román, 1961). Algunos estudios sugieren que la formación de las células gigantes ocurre mediante agrandamiento de la célula, del núcleo y del nucleolo, seguido por múltiples divisiones del núcleo, sin citocinesis. Otros estudios establecen que su formación surge de la fusión de células contiguas mediante disolución de sus paredes y coalescencia del contenido citoplásmico. Igualmente, se ha reportado el acontecimiento simultáneo de ambos mecanismos. En nuestro estudio no se observó la disolución de paredes celulares ni la coalescencia de su contenido. De acuerdo a nuestras observaciones, parece ser que en las raíces de plátano el mecanismo en la formación de células gigantes se inicia con el agrandamiento de células y la posterior multiplicación de sus núcleos.

En una ocasión se observó al nematodo nodulador con su cabeza incrustada dentro del cilindro vascular y su parte posterior recostada sobre la corteza, causándole un gran daño mecánico a las parénquimas del cilindro vascular y a las células corticales (Figura 4C). En este aspecto, el nematodo nodulador se diferencia del nematodo reniforme, ya que este último detiene su penetración en la célula endodermal y mantiene su cuerpo fuera del cilindro vascular.

La formación de células gigantes también ocurrió en tejido no diferenciado de la zona de alargamiento celular de raíces en crecimiento (Figura 4G). No se observaron células gigantes en las parénquimas de los brotes de raíces laterales, antes de que éstas emergieran de las raíces primarias. Sin embargo, la presencia de varios nematodos preadultos nos lleva a pensar que podrían formarse células gigantes en estos brotes. Otros investigadores han encontrado células gigantes en las parénquimas de la corteza en cultivos de batata, caña y tabaco (Krusberg y Nielsen, 1958; Román, 1961; Meléndez y Powell, 1967). En el tejido diferenciado de raíces primarias o laterales no se observó la formación de células gigantes fuera del cilindro vascular. Krusberg y Nielsen (1958) y Román (1961) observaron en batata y caña de azúcar, respectivamente, la presencia de estructuras en forma de perilla que se

proyectaban dentro de algunas células gigantes. Estas estructuras, al igual que las cavidades en la corteza reportadas por Román (1961), no se observaron en este estudio (Figura 4F). En secciones longitudinales del ápice de raíces noduladas se observaron células gigantes y especímenes hembras en distintas etapas de desarrollo, destrucción de la cofia y abundante tejido hiperplásico, lo que ocasionó un daño severo al tejido interno y formación de agallas terminales (Figura 4G).

Alrededor de las células gigantes, principalmente hacia el extremo próximo al periciclo, se desarrolló un tejido hiperplásico muy compacto compuesto por un gran número de células pequeñas (Figura 4D). Generalmente, estas células estaban cubiertas por un tejido reticulado que se extendió hasta las células endodérmicas y las células que rodeaban los xilemas cercanos. Otra alteración observada en la zona vascular fue la hipertrofia del anillo de células que rodean los xilemas próximos al sincitio (Figura 4D). También observamos agrandamiento de las células de la endodermis y del periciclo, cercanos a esta área. Como resultado del crecimiento hipertrófico de las células gigantes los conductos del xilema cercanos al sincitio fueron presionados y comprimidos, alterándose sustancialmente su forma cilíndrica original. A su vez los conductos del xilema y las células parenquimáticas cercanas actuaron como barrera contra el desplazamiento del sincitio, por lo cual, las formas de sus células variaron desde redondas y piriformes hasta ovaladas. Durante el estudio no se observaron otras deformidades del xilema. Las células de la corteza también se afectaron adversamente por el nematodo nodulador el cual causó hiperplasia y un aumento considerable en el tamaño de las células parénquimas corticales (Figura 4C, E). Estas células también se afectaron por el crecimiento del nematodo y por el aumento en volumen de sus masas de huevo.

En ocasiones, observamos una cubierta necrótica alrededor de hembras maduras con matriz gelatinosa, en especial aquellas en raíces más gruesas (Figura 4C). Esta cubierta no se observó en hembras adultas sin matriz gelatinosa (Figura 4E). Tal característica nos lleva a pensar que la cubierta necrótica podría estar relacionada con una respuesta química de las células compactadas, por el ensanchamiento de la hembra, ante la presencia de la matriz gelatinosa. Además de la presencia de la matriz gelatinosa, la edad del cultivo y el tiempo de exposición del tejido al nematodo parecen estar vinculados a la presencia y espesor de la misma. Krusberg y Nielsen (1958) observaron en batata una formación de capas de células, alrededor de hembras adultas del nematodo y sus masas de huevo, que ante la presencia de suberina reaccionaron químicamente como tejido de corcho. En ese estudio, el tejido de corcho estuvo relacionado, generalmente, con la presencia de grietas en la superficie de raíces viejas de la última cosecha. En nuestro estudio, la

cubierta necrótica se encontró siempre en el tejido interno de las raíces más gruesas y no estuvo relacionada con grietas en la raíz. Al igual que nosotros en plátano, Fawole (1988) observó en ñame comercial la presencia de un anillo necrótico alrededor de hembras adultas con matriz gelatinosa. En muestras de un retoño de plátano en etapa de producción, donde el grosor de las raíces y el tiempo de exposición al nematodo fue mayor al de este ensayo, aislamos “quistes o cápsulas necróticas” del tejido interno de las raíces con un diámetro aproximado de 1.5 mm y masas de huevo en su interior. En este estudio los “quistes o cápsulas necróticas” no alcanzaron el máximo desarrollo observado a nivel de campo (Figura 4B).

#### LITERATURA CITADA

- Ashby, S. F., 1915. Banana diseases. Bull. Dept. Agric. Jamaica 2:316-317.
- Bird, A. F., 1974. Plant response to root-knot nematode. *Annu. Rev. Phytopathol.* 12: 69-85.
- Blake, C. D., 1961. Root rot of bananas caused by *Radopholus similis* (Cobb) and its control in New South Wales. *Nematologica* 6:295-310.
- Blake, C. D., 1966. The histological changes in banana roots caused by *Radopholus similis* and *Helicotylenchus multicinctus*. *Nematologica* 12:129-137.
- Cohn, E., 1973. Histology of the feeding site of *Rotylenchulus reniformis*. *Nematologica* 19:455-458.
- Christie, J. R., 1936. The development of root-knot nematode galls. *Phytopathology* 26:1-22.
- DuCharme, E. P., 1959. Morphogenesis and histopathology of lesions induced on citrus roots by *Radopholus similis*. *Phytopathology* 49:388-395.
- Endo, B. Y., 1975. Pathogenesis of nematode-infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 13:213-236.
- Fawole, B., 1988. Histopathology of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) infection on white yam (*Dioscorea rotundata*) tubers. *J. Nematol.* 20:23-28.
- Heald, C. M., 1975. Pathogenicity and histopathology of *Rotylenchulus reniformis* infecting cantaloupe. *J. Nematol.* 7:149-152.
- Huang, C. S., 1985. Formation, anatomy and physiology of giant cells induced by root-knot nematodes. pp. 155-164 *In: An advance treatise on Meloidogyne Vol. I, Biology and Control*, J. N. Sasser and C. C. Taylor (eds.), N.C.S. Univ. Graphics.
- Inserra, R. N., R. A. Dunn y N. Vovlas, 1994. Host Response of Ornamental Palms to *Rotylenchulus reniformis*. Suppl. *J. Nematol.* 26(4S):737-743.
- Johansen, D. A., 1940. Plant Microtechnique. McGraw-Hill Book Co., New York, 523 pp.
- Jones, M. G. K. y V. H. Dropkin, 1975. Cellular alterations induced in soybean roots by three endoparasitic nematodes. *Physiol. Plant Pathol.* 5:119-124.
- Krusberg, L. R. y L. W. Nielsen, 1958. Pathogenesis of root-knot nematode to the Porto Rico variety of sweet potato. *Phytopathology* 48:30-39.
- Meléndez, P. L. y N. T. Powell, 1967. Histological aspects of the *Fusarium* wilt-root knot complex in flue-cured tobacco. *Phytopathology* 57:286-292.
- O'Farril, H., 1982. Patogenicidad e histopatología de *Rotylenchulus reniformis* en plátano, gandul y soya. Tesis M.S., Depto. Protección de Cultivos, Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez. 86 pp.
- Oramas, D., 1986. Patogenicidad e interacción de *Radopholus similis*, *Pratylenchus coffeae*, *Rotylenchulus reniformis* y *Meloidogyne incognita* en el plátano, *Musa acuminata*.

- nata* × *M. balbisiana*, AAB. Tesis M.S., Depto. Protección Cultivos, Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayaguez. 119 pp.
- Oramas, D. y J. Román, 1982. Plant parasitic nematodes associated with plantains (*Musa acuminata* × *M. balbisiana*, AAB in Puerto Rico. *J. Agric. Univ. P.R.* 66:52-59.
- Pinochet, J., 1978. Histopathology of the root lesion nematode, *Pratylenchus coffeae*, on plantains, *Musa* AAB. *Nematologica* 24:331-340.
- Razak, A. R. y A. A. F. Evans, 1976. An intracellular tube associated with feeding by *Rotylenchulus reniformis* on cowpea root. *Nematologica* 22:182-189.
- Rebois, R. V., P. A. Madden y B. J. Eldridge, 1975. Some ultrastructural changes induced in resistant and susceptible soybean roots following infection by *Rotylenchulus reniformis*. *J. Nematol.* 7:122-139.
- Riopel, J. L. y T. A. Steeves, 1964. Studies on the roots of *Musa acuminata* cv. Gross Michel, The anatomy and development of main roots. *Ann. Bot.* 28:475-490.
- Robinson, A. F. y C. C. Orr, 1980. Histopathology of *Rotylenchulus reniformis* on sunflower. *J. Nematol.* 12:84-85.
- Román, J., 1961. Pathogenicity of five isolates of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) to sugarcane roots. *J. Agric. Univ. P.R.* 45:55-84.
- Román, J., 1978. Fitonematología Tropical. Universidad de Puerto Rico, Est. Exp. Agric. 256 pp.
- Sass, J. E., 1951. Botanical Microtechnique. Iowa State College Press, Ames. 228 pp.
- Sosa-Moss, C., K. R. Barker y M. E. Daykin, 1983. Histopathology of selected cultivars of tobacco infected with *Meloidogyne* species. *J. Nematol.* 15:392-397.
- Vovlas, N. y H. M. R. K. Ekanayake, 1985. Histological alterations induced by *Rotylenchulus reniformis* alone and simultaneously with *Meloidogyne incognita* on banana roots. *Nematropica* 15:9-17.