Agronomía Costarricense 14(1): 45-54.1990.

MICROSCOPIA ELECTRONICA DE RASTREO DE VARIAS POBLACIONES DE *Meloidogyne javanica* (NEMATA: HETERODERIDAE)[1/*]

Róger López **
Luis Salazar **

ABSTRACT

Scanning electron microscopy of several populations of *Meloidogyne javanica* **(Nemata: Heteroderidae).** The morphology of females, males, and second-stage juveniles (J2) of several populations of the javanese root-knot nematode, *Meloidogyne javanica,* from different localities of Costa Rica, was studied with the scanning electron microscope. In females the labial disc is rounded, with the prestoma surrounded by six inner labial sensilla on its center, and it may be fused with the medial lips or separated from them by a shallow striation; the medial lips and the labial disc form a dumbbell-shaped cephalic cap. The prominent lateral lips are triangular or trapezoidal. The perineal patterns have two lateral lines that separate the dorsal and ventral striae, a high and trapezoidal or low and rounded dorsal arch, and smooth or wavy, relatively coarse striae. In normal and intersex males the cephalic region is usually smooth and has a single annule, but some specimens have one or two incomplete annulations and several short striae on different levels of the cephalic region. The rounded labial disc is fused with the medial lips and has straight or slightly arched lateral edges; it has the slitlike stoma on its center, sunken inside the oval prestoma, which is surrounded by six inner labial sensilla. The medial lips and the cephalic sensilla are absent. The lateral fields consist of three bands enclosed by four incisures; the outer bands are partially areolated. In J2 the cephalic region is usually smooth and has a single annule, but in some specimens there is one incomplete striation, which divides it into two annules, and several short striae at different levels. The labial disc may be rectangular or rounded; it has the oval prestoma surrounded by six inner labial sensilla on its center and, along with the medial lips, forms a dumbbell-shaped head cap. The small lateral lips may be arched, triangular or rectangular.

INTRODUCCION

Meloidogyne javanica (Treub, 1885) Chitwood, 1949 es una de las especies de este importante género de nematodos fitoparásitos que ha sido encontrada en Costa Rica (López, 1980; López y Salazar, 1988; Salazar, 1980). Este parásito tiene una gran gama de hospedantes y a menudo causa serios problemas debido a su reconocida agresividad (Taylor y Sasser, 1978). Tal y como ha sido señalado previamente (López y Salazar, 1989), el microscopio electrónico de rastreo (MER) es una excelente herramienta para el estudio de la morfología de estos parásitos y ha permitido encontrar características diagnósticas

1/ Recibido para su publicación el 7 de febrero de 1990.
* Parte del proyecto 312-86-110 de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.
** Laboratorio de Nematología, Escuela de Fitotecnia, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

que facilitan su identificación. La identificación de especies dentro de este género es necesaria para la aplicación adecuada de tácticas de manejo como la rotación de cultivos, la siembra de cultivares resistentes, ciertas prácticas culturales y el uso de agentes biológicos (Taylor y Sasser, 1978). Dadas las anteriores consideraciones, se llevó a cabo un estudio con la ayuda del MER para caracterizar detalladamente la morfología de hembras, machos y segundos estados juveniles (J2) de varias poblaciones de *M. javanica,* colectadas en diferentes localidades de Costa Rica, con el fin de facilitar su identificación específica.

MATERIALES Y METODOS

Seis poblaciones de *M. javanica* fueron colectadas en diferentes huéspedes y localidades de Costa Rica (Cuadro 1) y mantenidas en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) bajo condiciones de invernadero; también fueron estudiados los J2 de una población encontrada en banano en Matina, provincia de Limón.

Para procesar las hembras, raíces con agallas fueron fijadas en glutaraldehído al 4% en solución amortiguadora de fosfatos 0,1 M, pH 7,1, a 5°C durante al menos una semana; las hembras fueron luego disectadas de las raíces y sumergidas en glutaraldehído al 4% en solución de fosfatos a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C) durante otra semana. Los machos fueron disectados de las raíces mientras que los J2 fueron obtenidos de masas de huevos que eclosionaron en agua potable a temperatura ambiente; ambos estados del ciclo de vida fueron sumergidos en unas pocas gotas (3-6) de agua destilada en un platillo siracusa pequeño, enfriados a 5°C durante una hora y luego fijados secuencialmente con una solución de glutaraldehído al 4% hasta obtener una solución final al 2%, según el método descrito por Eisenback y Hirschmann (1979). Los nematodos permanecieron en esta solución fría durante 24-48 h, al cabo de las cuales fueron sacados del refrigerador y dejados a temperatura ambiente por 72 h. Una vez transcurrida esta fase, las hembras, los machos y los J2 fueron transferidos a una pequeña cámara plástica que tenía una malla fina en el fondo (aberturas de 15 µm, aproximadamente) y lavados tres veces con una solución amortiguadora de fosfatos 0,1M, pH 7,1, en un período de 15 min; los nematodos fueron luego posfijados en tetraóxido de osmio al 2% (v/v) en solución amortiguadora de fosfatos a 5°C. Los especímenes fueron mantenidos en esta solución durante 18 h y lavados posteriormente 3-4 veces, en un período de 15 min, con solución amortiguadora de fosfatos. Inmediatamente después se procedió a deshidratarlos en una serie graduada de etanol a temperatura ambiente (10-15-20-25-30-35-40-45-50-65-75-85-95-100-100-100% de etanol, v/v) y luego en una serie etanólica de acetato de amilo (30-50-70-95-100%) con intervalos de 5 min entre cada paso. Una vez que los nematodos estaban en acetato de amilo puro se colocó una tapa de malla fina sobre la cámara plástica que los contenía. Los nematodos fueron secados en un secador de punto crítico Hitachi HCP-2 con cinco cambios de CO_2 de 5 min y tres cambios de 10 min de duración cada uno. Los especímenes ya secos fueron montados en forma inclinada sobre fragmentos de cabello humano que descansaban horizontalmente sobre la superficie engomada de una platina de aluminio, cubiertos con oro durante 5 min en un cobertor iónico Giko IB-3 y observados en un MER Hitachi S-570 a 15 Kv de voltaje acelerador. Entre 15-30 especímenes de cada estado del ciclo de vida fueron observados en cada población, excepto en la de Comadre de Cahuita, que no tenía machos, y en la de Matina, en que sólo fueron observados los J2. Para la descripción de la morfología fue seguida la terminología propuesta por varios autores (Eisenback y Hirschmann, 1979; 1980; Eisenback *et al.*, 1980).

Cuadro 1. Localidades y hospedantes en que fueron colectadas varias poblaciones de *Meloidogyne javanica* estudiadas con el microscopio electrónico de rastreo.

Localidad		Hospedante
Cantón	Provincia	
Alfaro Ruiz	Alajuela	*Impatiens* sp.
Alajuela	Alajuela	clavel
Talamanca	Limón	ñame
Pérez Zeledón	San José	tabaco
Moravia	San José	tomate
Grecia	Alajuela	*Impatiens* sp.
Matina	Limón	banano

RESULTADOS

En la Figura 1 se ilustra la morfología de la porción frontal del cuerpo de las hembras. El prestoma aparece en el centro del disco labial y es redondeado (Figura 1e) o levemente ovalado en el plano dorsal-ventral (Figura 1d). El estoma tiene la forma de una rendija localizada dentro del prestoma (Figuras 1d y 1f). Seis sensilas labiales internas, en forma de diminutos poros redondeados, están localizados alrededor del prestoma y abren dentro de éste (Figura 1d). El disco labial es redondeado, está levemente elevado en su porción central y puede estar fusionado con los labios medios (Figuras 1a, 1e y 1f) o separado de ellos por una estría (Figuras 1b, 1c y 1d). En su porción ventral aparecen frecuentemente dos pequeñas protuberancias (Figuras 1a, 1d y 1f). Las aberturas anfidiales tienen forma de rendijas cortas, orientadas dorso-ventralmente, y están colocadas debajo de los bordes laterales del disco labial, separándolo de los labios laterales (Figuras 1d y 1f). Los labios medios son más anchos que el disco labial y en conjunto con éste forman el casco cefálico con forma de corbatín; sus bordes pueden ser redondeados (Figuras 1a, 1c y 1d) o levemente puntiagudos (Figuras 1e y 1f). Los labios laterales son prominentes, de forma triangular o trapezoidal y están en un nivel levemente inferior al del disco labial. La región cefálica está compuesta por uno o dos anillos, a veces surcados por cortas incisuras longitudinales.

En la Figura 2 se ilustra la morfología del diseño perineal de las hembras. Su principal característica es la presencia de dos líneas laterales que dividen las estrías dorsales de las ventrales; estas líneas se presentan en ambos sectores laterales

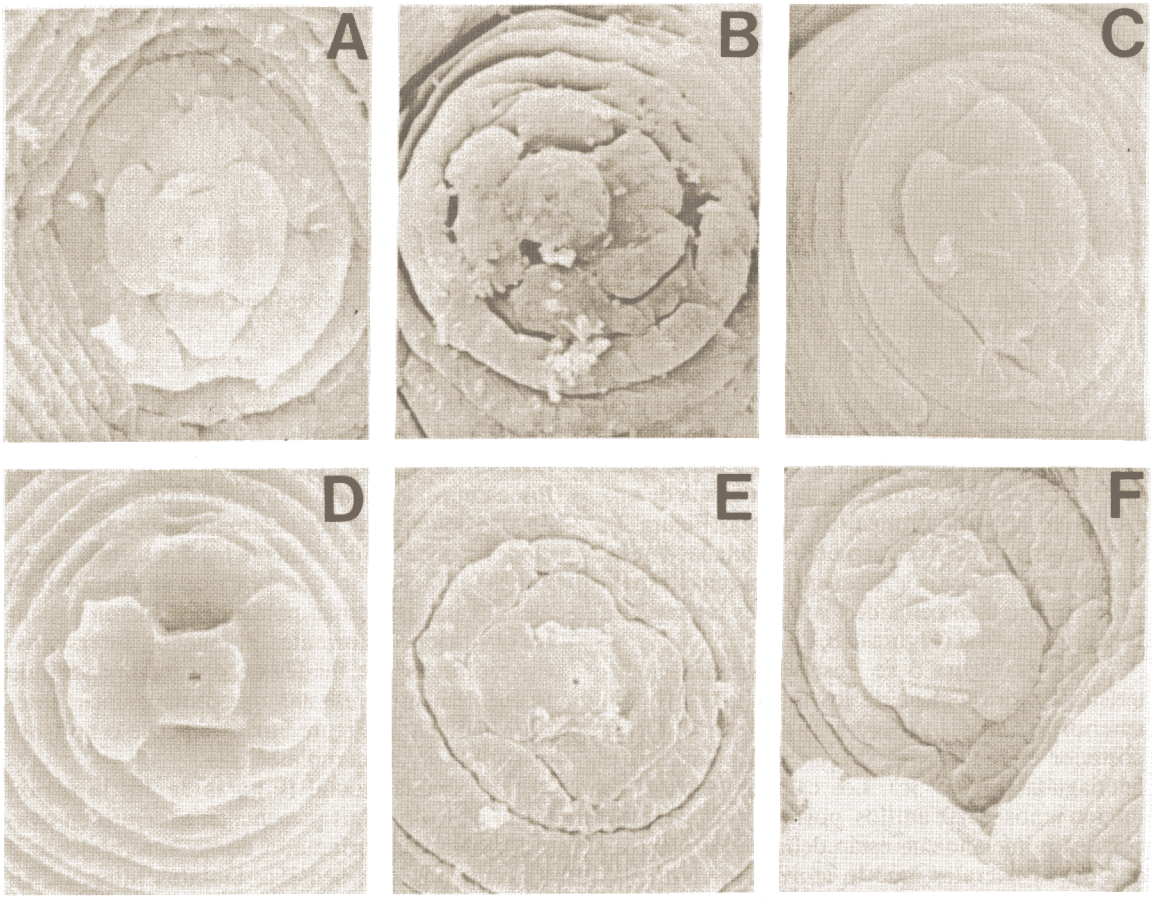

Fig. 1. Fotomicrografías de la porción frontal de hembras de *Meloidogyne javanica* provenientes de A: Alfaro Ruiz; B: Alajuela; C, D: Talamanca; E: Moravia y F: Grecia.

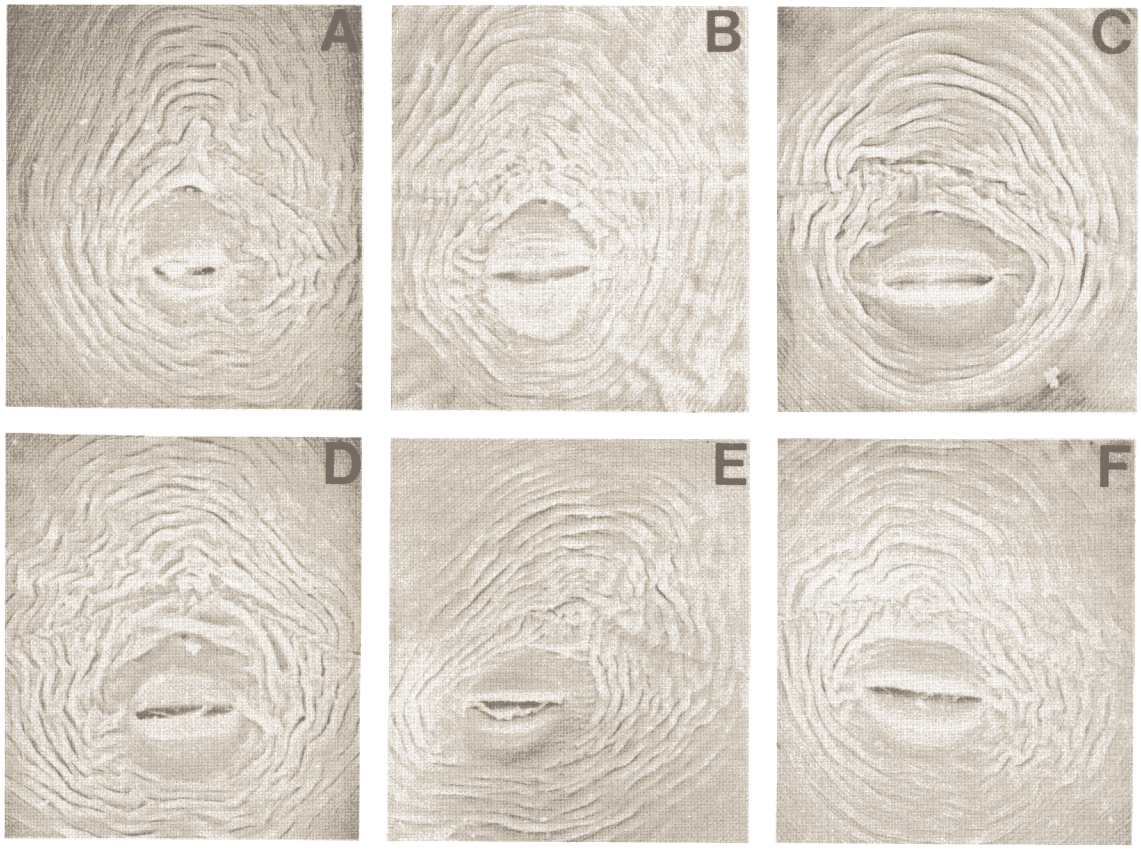

Fig. 2. Fotomicrografías de diseños perineales de *Meloidogyne javanica* provenientes de A: Alfaro Ruiz; B: Alajuela; C, D: Talamanca; E: Moravia y F: Grecia.

pero se atenuan o desaparecen en la parte terminal de la cola. El arco dorsal puede ser alto y trapezoidal (Figura 2a) o relativamente bajo y redondeado (Figura 2c) y tiene estrías que toman forma de una espiral en la parte terminal de la cola (Figura 2). Las estrías son lisas o levemente onduladas y relativamente gruesas; con frecuencia algunas estrías cortas se originan cerca de los bordes laterales de la abertura vulval (FIguras 2b, 2d y 2f).

En la Figura 3 se ilustran algunas características morfológicas de los machos. La región anterior es aguzada (Figura 3a) mientras que la posterior es redondeada (Figura 3b) o levemente puntiaguda (Figura 3c). Los campos laterales se inician unos 8-10 anillos posterior a la región cefálica e inicialmente están delimitados por sólo dos líneas laterales, que lo atraviesan completamente, produciendo la areolación de los mismos. Estos campos continuan hasta la región caudal, donde el cuerpo se tuerce, y tienen la apariencia de un cordón superpuesto sobre sus costados (Figuras 3b y 3c). En la porción media del cuerpo los campos laterales están constituidos por tres bandas delimitadas por cuatro incisuras; las anulaciones atraviesan únicamente las dos bandas externas (Figura 3d), lo que produce una areolación incompleta. En varias poblaciones fueron encontrados machos normales y machos intersexos; estos últimos son fáciles de distinguir dado que frecuentemente presentan una protuberancia anterior a la cloaca (Figura 3c), que puede o no tener una vulva y vagina rudimentaria.

En vista frontal (Figuras 3e-3h) la región labial de los machos presenta en el centro un ovalado prestoma, orientado dorso-ventralmente y rodeado por seis sensilas labiales internas, en forma de diminutos poros redondeados que abren dentro del mismo. El disco labial es redondeado,

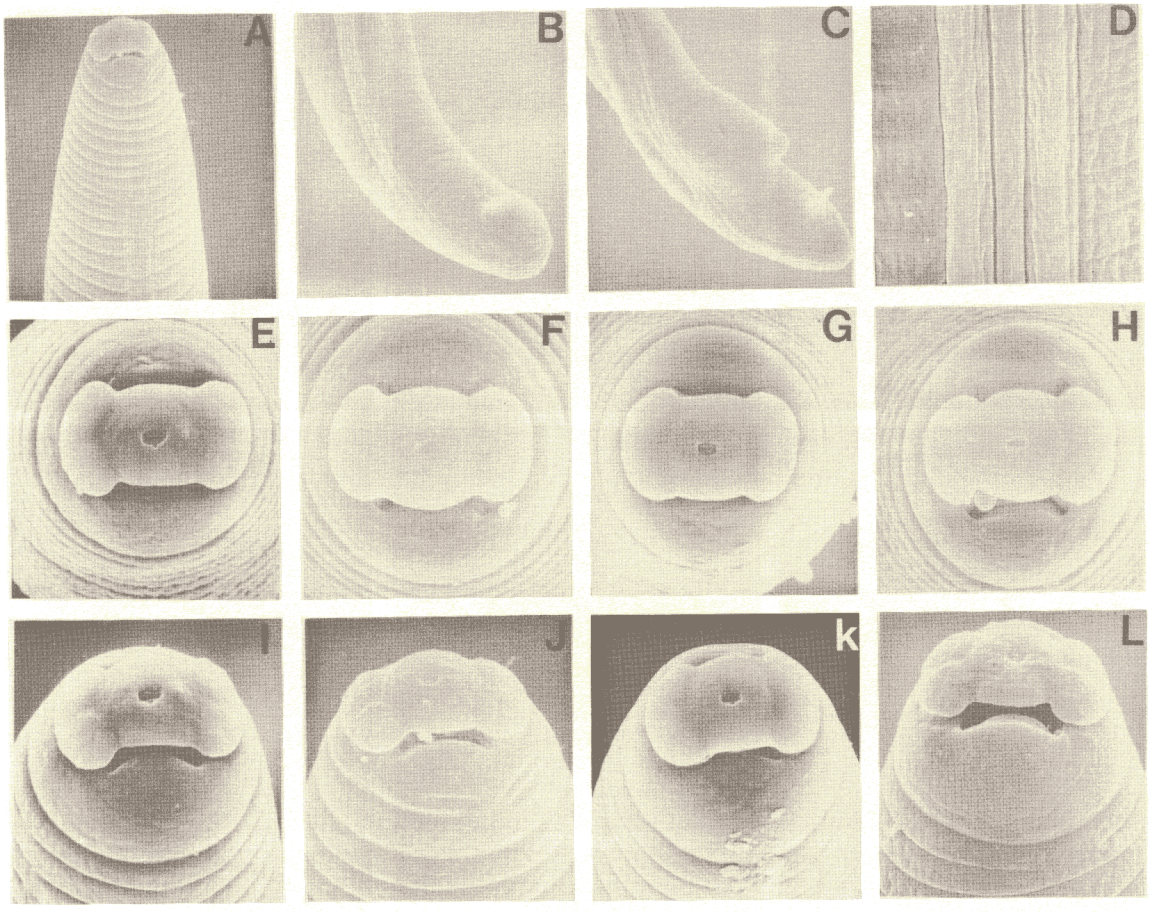

Fig. 3. Fotomicrografías de machos de *Meloidogyne javanica* provenientes de A-D, F, H, J, L: Pérez Zeledón; E, G, I, K: Alajuela. A, B, D-F, I, J: machos normales C, G, H, H, L: machos intersexos. A: porción anterior; B, C: cola; D: campo lateral; E-H porción frontal; I-L: región cefálica (vista lateral).

está levemente elevado en su región central, tiene bordes laterales casi rectos (Figuras 3e y 3g) o levemente arqueados (Figuras 3f y 3h) y está fusionando con los labios medios; éstos son levemente más anchos que el disco labial, tienen los bordes redondeados y, en conjunto con el disco, forman el casco labial (Figuras 3e-3h). Las aberturas anfidiales tienen forma de rendija, con los extremos curveados hacia la región cefálica (Figura 3f-3h). Los labios laterales y las sensilas cefálicas están ausentes. La región cefálica generalmente es lisa y está formada por un solo anillo (Figuras 3e-3i, 3k y 3l); sin embargo, fue posible observar unos pocos especímenes que tenían una o dos anulaciones incompletas y varias estrías cortas en diferentes niveles de la región cefálica (Figura 3j). Todas las anteriores características fueron observadas tanto en machos normales (Figuras 3e, 3f, 3i y 3j) como en machos intersexos (Figuras 3g, 3h, 3k y 3l), de igual o de diferente origen geográfico.

En la Figura 4 se ilustran algunos aspectos de la morfología de los J2. La región cefálica típicamente es lisa (Figuras 4a, 4d-4f, 4h y 4i) y está formada por un solo anillo; sin embargo, en varias poblaciones fueron observados algunos pocos especímenes en los que la región cefálica tenía una estría incompleta que la dividía en dos anillos, además de varias estrías cortas, colocadas en diferentes niveles de la región cefálica (Figuras 4b y 4g); más frecuentemente fueron observados especímenes en los que había una estría corta localizada en una o en ambas porciones laterales de la región cefálica (Figuras 4e y 4h). En la región media del cuerpo los campos laterales constan de

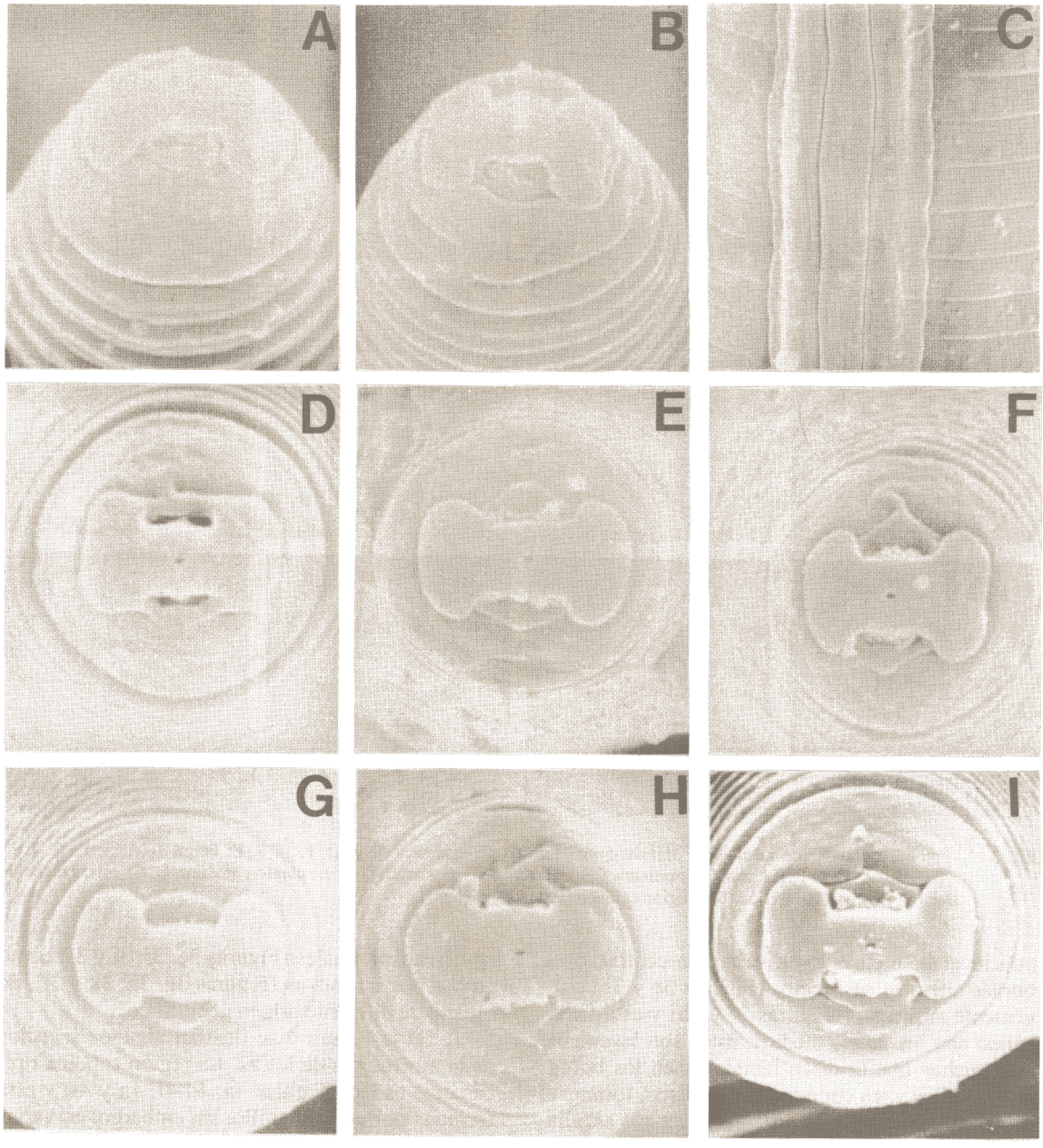

Fig. 4. Fotomicrografías de segundos estados juveniles de *Meloidogyne javanica* provenientes de A, D: Alfaro Ruiz; B, F, G, : Talamanca; C: Pérez Zeledón; E: Alajuela; H: Grecia; I: Matina. A, B: región cefálica (vista lateral); C: campo lateral; D-I: porción frontal.

tres bandas, las dos externas con bordes levemente arqueados y más anchas que la banda central. Las estrías transversales apenas atraviesan un poco los bordes de las bandas externas, lo que produce una areolación incompleta y muy tenue de los campos laterales; estas bandas están delimitadas por cuatro líneas laterales. En la región labial el prestoma es ovalado y está localizado en el centro del disco labial (Figuras 4a, 4b, 4d-4i), orientado en el sentido dorso-ventral. Alrededor del prestoma se

localizan seis sensilas labiales internas en forma de pequeños poros redondeados, los que son difíciles de discernir. El disco labial puede ser rectangular (Figuras 4d-4f) o redondeado (Figuras 4g y 4h) y está levemente elevado sobre los labios medios; éstos tienen bordes angulares (Figura 4d) o levemente redondeados (Figuras 4e-4i), son más anchos que el disco labial y su unión con los bordes laterales del disco labial puede formar un ángulo obtuso (Figura 4e) o recto (Figuras 4d y 4g). Dos sensilas cefálicas, en forma de pequeñas depresiones redondeadas, aparecen en cada labio medio, cerca de sus bordes (Figuras 4b, 4d, 4g y 4h). Los labios laterales son pequeños y están situados en un nivel inferior al de los labios medios y el disco labial (Figuras 4a, 4b, 4d-4i); su forma es variable, ya que pueden ser arqueados (Figuras 4a, 4b, 4e y 4g), triangulares (Figuras 4e-4g) o rectangulares (Figura 4d); es posible que los labios laterales en un mismo especímen tengán igual (Figuras 4f y 4h) o diferente forma (Figuras 4d, 4e y 4g). Generalmente los labios laterales sobresalen de los márgenes de los labios medios en la región cefálica. Las aberturas anfidiales están localizadas debajo de los bordes laterales del disco labial y tienen forma de una rendija rectangular (Figuras 4a, 4b y 4d).

DISCUSION

En términos generales, la morfología de las poblaciones de *M. javanica* estudiadas coincide, con unas pocas excepciones, con lo informado previamente por otros autores. Así, en lo concerniente a las hembras, las características de la región frontal fueron similares a lo anotado por Eisenback *et al.* (1980) y tuvieron poca variabilidad dentro de las poblaciones estudiadas; la única diferencia apreciable con relación a lo encontrado por estos autores es que los labios laterales no siempre son triangulares. En cuanto al diseño perineal, la variabilidad de la forma del arco dorsal ya había sido observada previamente en Costa Rica (López y Salazar, 1988); las demás peculiaridades coinciden con lo anotado por numerosos autores (Chitwood, 1949; Jepson, 1987; López y Salazar, 1988; Salazar, 1980; Taylor y Sasser, 1978).

En cuanto a los machos, los hallazgos de esta investigación coinciden con mucho de lo anotado por Eisenback y Hirschmann (1980) y Eisenback *et al.* (1981); es de presumir que estos autores usaron machos normales en sus ilustraciones, aunque no lo manifiestan claramente. Sin embargo, la morfología de los machos intersexos en sus regiones cefálica y labial es idéntica a la de los normales (Figura 3), por lo que esta situación pareciera carecer de relevancia. Jepson (1987) ilustra la región labial de un macho de *M. javanica* que difiere de los presentados por Eisenback y Hirschmann (1980) y Eisenback *et al.* (1981) y de lo encontrado en esta investigación, porque los labios medios presentan una pequeña indentación que los divide en su parte central; en lo demás su ilustración coincide bastante con lo anotado previamente por estos autores. Hay un aspecto, sin embargo, que difiere de lo encontrado previamente por otros autores, y que concierne a la areolación incompleta de los campos laterales; según Salazar (1980) y lo ilustrado por Chitwood (1949), los machos de *M. javanica* carecen de areolación. Es probable que el uso del microscopio de luz, con mucho menor resolución y poder de magnificación que el MER, y la tenue naturaleza de las anulaciones que atraviesan las bandas externas de los campos laterales, sean las razones por las que estos autores no hayan podido observar la areolación incompleta. Es interesante anotar que, si bien se ha informado que los machos intersexos son frecuentes en algunas poblaciones (Chitwood, 1949; Eisenback *et al.*, 1981; López y Salazar, 1988; Salazar, 1980), mientras que otras sólo producen machos normales (Eisenback *et al.*, 1981), pareciera que la población costarricense colectada en Comadre de Cahuita es única, en el sentido de que, tras varias generaciones en tomate, ha sido incapaz de producir machos, ya sean normales o intersexos.

En lo concerniente a los J2, las observaciones hechas en esta investigación coinciden bastante con las de Eisenback y Hirschmann (1979) pero difieren de lo ilustrado por Jepson (1987); en este último caso las ilustraciones presentan especímenes con dos estrías incompletas en la región cefálica, las que los asemejan a especímenes típicos de *M. incognita* (Eisenback y Hirschmann, 1979; López y Salazar, datos sin publicar). Es posible que esta autora haya confundido las ilustracciones o la identidad de los J2 usados para tomar estas fotomicrografías, o que haya usado especímenes que son atípicos en este aspecto. Hay también ciertas discrepancias con lo anotado por Eisenback y Hirschmann (1979) con respecto a que los labios laterales de los J2 de *M. javanica* son triangulares;

en esta investigación fueron observados, además, labios arqueados y rectangulares, lo que podría ser interpretado como una muestra de polimorfismo en esta especie. Una situación prácticamente idéntica a la anterior ha sido encontrada en Costa Rica con relación a los J2 de *M. exigua* Goeldi, 1887, el nematodo nodulador del cafeto (López y Salazar, 1989), por lo que la posibilidad de identificar a *M. javanica* con sólo estudiar la morfología de los J2 con el MER pareciera imposible de alcanzar.

RESUMEN

Se realizó un estudio de la morfología de hembras, machos y segundos estados juveniles (J2) de varias poblaciones costarricenses de *Meloidogyne javanica* con la ayuda del microscopio electrónico de rastreo. En las hembras el disco labial es redondeado, con el prestoma rodeado por seis sensilas labiales internas localizado en el centro, y puede estar fusionado con los labios medios o separado de ellos por una estría poco profunda. Los labios medios y el disco labial forman un casco labial con forma de corbatín. Los prominentes labios laterales son triangulares o trapezoidales. Los diseños perineales tienen dos líneas laterales que separan las estrías dorsales de las ventrales, un arco dorsal alto y trapezoidal o bajo y redondeado, así como estrías lisas u onduladas, relativamente gruesas. En machos normales y en machos intersexos la región cefálica usualmente es lisa y tiene un solo anillo, pero especímenes con una o dos anulaciones incompletas y varias estrías cortas en diferentes niveles de la región cefálica fueron observados. El redondeado disco labial está fusionado con los labios medios, tiene bordes laterales rectos o levemente arqueados; el estoma, en forma de rendija hundida dentro del ovalado prestoma y rodeado por seis sensilas labiales internas, está localizado en el centro del disco labial. Los labios medios y las sensilas cefálicas están ausentes. Los campos laterales tienen tres bandas, delimitadas por cuatro incisuras longitudinales; las bandas externas están parcialmente areoladas. En los J2 la región cefálica usualmente es lisa, con un solo anillo, aunque en algunos especímenes había una estría incompleta que la divide en dos anillos y varias estrías cortas, localizadas en diferentes niveles. El disco labial puede ser rectangular o redondeado, tiene un ovalado prestoma rodeado por seis sensilas labiales internas en el centro y, junto con los labios medios, forma un casco cefálico con forma de corbatín. Los pequeños labios laterales pueden ser arqueados, triangulares o rectangulares.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean agradecer la ayuda técnica del Sr. Justo Azofeifa, la Sra. Suria Sánchez y el personal de la Unidad de Microscopía Electrónica de la UCR, así como la financiación de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.

LITERATURA CITADA

CHITWOOD, B.G. 1949. Root-knot nematodes. Part I. A revision of the genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887. Proceedings of the Helminthological Society of Washington 16:90-104.

EISENBACK, J.D.; HIRSCHMANN, H. 1979. Morphological comparison of second-stage juveniles of *Meloidogyne* species (root-knot nematodes) by scanning electron microscopy. Scanning Electron Microscopy III:223-230.

EISENBACK, J.D.; HIRSCHMANN, H. 1980. Morphological comparison of *Meloidogyne* males by scanning electron microscopy. Journal of Nematology 12(1):23-32.

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.

EISENBACK, J.D.; HIRSCHMANN, H.; SASSER, J.N.; TRIANTAPHYLLOU, A.C. 1981. A guide to the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species), with a pictorial key. Raleigh, North Carolina, Department of Plant Pathology and Genetics, North Carolina State University and the United States Agency for International Development. 48 p.

JEPSON, S.B. 1987. Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). Aberystwyth, U.K. Commonwealth Agricultural Bureau International, U.K. Cambrian News. 265 p.

LOPEZ, R. 1980. Determinación de los nematodos fitoparásitos asociados al plátano (*Musa acuminata* X *M* .

balbisiana, AAB) en Río Frío. Agronomía Costarricense 4(2):143-147.

LOPEZ, R.; SALAZAR, L. 1988. Nuevos huéspedes de *Meloidogyne javanica* (Nemata: Heteroderidae) en Costa Rica. Agronomía Costarricense 12(2):241-244.

LOPEZ, R.; SALAZAR, L. 1989. Microscopía electrónica de rastreo de varias poblaciones del nematodo nodulador del cafeto, *Meloidogyne exigua* (Nemata: Heteroderidae). Turrialba 39(3): 299-304.

SALAZAR, L. 1980. Variaciones morfométricas y respuesta de nueve hospedantes diferenciales a tres poblaciones de *Meloidogyne javanica* de Costa Rica. Turrialba 30(3):344-351.

TAYLOR, A.L.; SASSER, J.N. 1978. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). Raleigh, North Carolina, Department of Plant Pathology, North Carolina State University and United States Agency for International Development. 111 p.