

## ANATOMÍA DE RAÍCES DE PIMIENTO Y TOMATE ATACADAS POR *NACOBBUS ABERRANS*

E. LORENZO<sup>1</sup>, M. E. DOUCET<sup>2</sup>, M. DEL C. TORDABLE<sup>1</sup> y N. POLONI<sup>1</sup>

**Summary:** Anatomy of pepper and tomato roots attacked by *Nacobbus aberrans*. The anatomy of pepper and tomato roots of plants from Oliva (Córdoba, Argentina) attacked by a population of *N. aberrans* was studied. The formation of syncytia that alters root anatomy in both species due to the development of nematode, was observed. The histological alterations show a high susceptibility of the plants studied to *N. aberrans*.

**Key words:** *Nacobbus aberrans*, pepper, tomato, nematode, syncytia.

**Resumen:** Se estudia la anatomía de raíces de pimiento y tomate fuertemente atacadas por una población de *N. aberrans* procedente de la localidad de Oliva, provincia de Córdoba. Se observa la formación de sincitos que alteran la anatomía en ambas raíces y cuyo desarrollo está en relación con el nematodo. Las alteraciones histológicas encontradas ponen en evidencia una alta susceptibilidad de los vegetales estudiados respecto de *N. aberrans*.

**Palabras clave:** *Nacobbus aberrans*, pimiento, tomate, nematodo, sincitos.

### INTRODUCCIÓN

Los nematodos, los organismos multicelulares más abundantes sobre la tierra, se encuentran en todos los hábitats y ecosistemas de la biosfera. Muchas especies son importantes patógenos de plantas y animales, mientras que otras son beneficiosas para la agricultura y el medio ambiente (Baker, 1998).

Los daños ocasionados a las plantas por nematodos del suelo a menudo son subestimados porque no dan lugar a síntomas específicos en la parte aérea del vegetal atacado. Crecimiento retardado, enanismo y amarillamiento pueden ser ocasionados por estos organismos como así también ser el resultado de otros factores. Los nematodos fitófagos, que a menudo restringen severamente el crecimiento y la producción de los vegetales sobre los que se alimentan, han recibido mucho más atención que los pertenecientes a otras categorías tróficas (bacteriófagos, fungívoros, omnívoros entomopatógenos y predadores). Los primeros, además de los daños que ocasionan por sí mismos, facilitan el ingreso de otros organismos patógenos tales como bacterias y hongos. El impacto perjudicial de los

nematodos en la agricultura es difícil de determinar; sin embargo, las pérdidas anuales se han estimado en 78 billones de dólares a escala mundial (Baker *et al.*, 1994).

Varios géneros fitófagos han logrado desarrollar estrechas relaciones con sus hospedadores a través del establecimiento, dentro de los tejidos vegetales, de sitios de alimentación especializados (Jones, 1981). Estos sitios son inducidos por secreciones provenientes del esófago del nematodo que modifican y regulan la función, el metabolismo y fenotipo celular. Las células son modificadas para que la planta le transfiera sustancias alimenticias y son indispensables para asegurar el éxito de la asociación hospedador-nematodo. Los sitios de alimentación se transforman en fuente permanente de nutrientes para las especies endoparásitas sedentarias y pueden ser de distintos tipos: *síncito* (las células vecinas se fusionan como resultado de la ruptura y degradación de las paredes celulares), *células gigantes* (células multinucleadas hipertróficas donde se suceden múltiples mitosis en ausencia de citocinesis) y *células "nurse"* (células que no manifiestan agrandamiento comparadas con las células normales).

Entre los nematodos que establecen estrechas relaciones con sus hospedadores se destaca el nematodo fitófago endoparásito *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944, que posee una amplia distribución en Argentina (Costilla,

<sup>1</sup> Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales.\* UNRC. 5800 - Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

<sup>2</sup> Laboratorio de Nematología. Centro de Zoología Aplicada. UNC. Casilla de Correo 122. 5000. Córdoba.

1985; Doucet, 1989, 1999; Doucet & Di Rienzo, 1991). Puede asociarse con malezas (Costilla, op. cit.; Doucet, op. cit.; Doucet, 1992) y con vegetales de importancia agrícola (Costilla, 1989; Doucet *et al.*, 1992). En este último caso, el nematodo ocasiona serios daños, principalmente a cultivos hortícolas (Costilla, op.cit.; Doucet *et al.*, 1997).

Las hembras representantes del género inducen la formación de síncitos dentro de engrosamientos de la raíz llamados "agallas". La recolección de raíces de plantas de *Capsicum annuum* L. "pimiento" y *Lycopersicon esculentum* Mill. "tomate", muy atacadas por *N. aberrans*, permitió realizar un detallado análisis de la anatomía de las mismas y determinar el grado de asociación con el parásito.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las raíces provenían de la localidad de Oliva (Córdoba); para los estudios histológicos se seleccionaron porciones de raíces sanas y otras atacadas que mostraban agallas. Esas porciones fueron lavadas, cortadas en partes que no excedieran 1 cm de longitud y fijadas inmediatamente en FAA. En el fijador se dejaron entre 72 a 96 hs. Posteriormente se deshidrataron a través de una serie de alcoholes etílicos de concentraciones progresivas partiendo del de 70°; luego fueron transferidas a mezclas de alcohol-xilol y por último xilol-parafina (mejorada con plástico). La inclusión se efectuó con el mismo tipo de parafina y se realizaron cortes seriados, transversales y longitudinales, de 8 a 10 µm de espesor, con micrótomos rotativos. Los cortes obtenidos fueron coloreados con la triple coloración "hematoxilina-safranina-verde permanente" y se montaron en DPX (Johansen, 1940; O' Brien & Mc Cully, 1981).

Los preparados histológicos se encuentran depositados en la histoteca de la Cátedra de Morfología Vegetal. Las fotomicrografías fueron tomadas con un microscopio Axiophot Carl Zeiss.

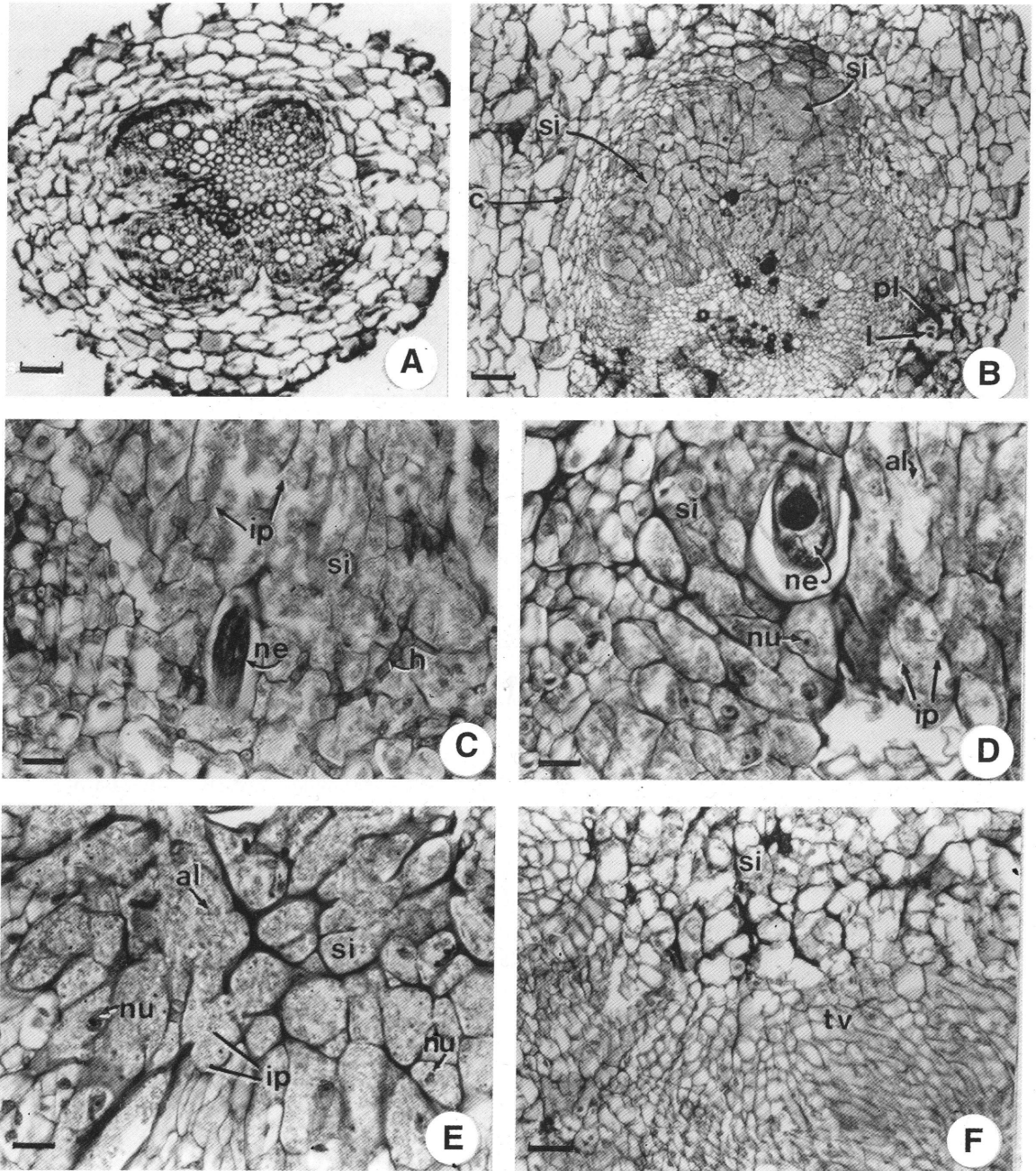
## RESULTADOS

El ingreso de larvas y/o hembras inmaduras del nematodo y su posterior desarrollo en hembras maduras en el interior de las raíces de los vegetales estudiados, dio como resultado la formación de agallas fácilmente observables.

### *Raíces de pimiento*

El análisis histológico de las porciones de raíces con agallas evidenció que la presencia de las hembras del nematodo indujo el desarrollo de síncitos en el cilindro central; éstos se extendían acrópeta y basípetamente a lo largo de la raíz y algunos, en su expansión radial, alcanzaron la corteza (Fig. 1B). Tanto en el cilindro central como en la corteza había un marcado contraste entre el aspecto de las células del síncito y las adyacentes. Esto era debido a que las células que los iban constituyendo adquirían mayor tamaño y densidad citoplasmática en relación con las no afectadas. El grado de expansión de las células del cilindro central fue mayor que el de las corticales, considerando las células originales. Los síncitos ocupaban principalmente la zona correspondiente al xilema secundario y en algunos sectores provocaron la interrupción del cambium vascular incorporando células del meristema, del floema secundario y de la corteza en su formación. Al alcanzar los síncitos muy buen desarrollo, ocasionaron una notable reducción del tejido vascular como así también desplazamiento y alteraciones en su disposición (Fig. 1B, F). Como consecuencia del alto grado de infestación que tenían las raíces, en el cilindro central de una misma agalla se diferenciaron varios síncitos; en estas ocasiones el sistema vascular quedó extremadamente disminuido.

En la corteza, totalmente parenquimática, se localizaron larvas rodeadas por células modificadas que no llegaron a constituir un síncito. Dichas células se caracterizaban por la presencia de un citoplasma bastante denso, disminución del vacúolo central e hipertrofia de núcleo y nucléolo. Un carácter diferencial sobresaliente de estas células lo constituía el engrosamiento y lignificación de sus paredes (Fig. 1B). Entre las células modificadas había conexiones intercelulares (puntuaciones), no así entre ellas y las corticales que las circundaban. Dado que era alto el número de larvas presentes en la corteza también lo eran los grupos de células parenquimáticas lignificadas, lo que modificó notablemente esta zona de la raíz. Tanto en relación con los síncitos como con la presencia de las larvas no se detectaron fenómenos de hiperplasia, de modo que las agallas de las raíces eran resultado del desarrollo de los síncitos y de la presencia de hembras, muchas de las cuales quedaban totalmente dentro del órgano atacado.



**Fig. 1.** Fotomicrografías de raíces de *C. annuum* en secciones transversales. **A:** raíz testigo sano. **B-F:** raíces infestadas. **B:** raíz con síncitos funcionales en el cilindro central y larvas en la corteza. **C:** detalle de un síncito en etapa inicial. **D:** síncito en etapa diferenciada con núcleos hipertroficados y abundante almidón. **E:** detalle de un síncito con núcleos en involución. **F:** síncito en etapa de regresión y alteraciones en la disposición del tejido vascular. Abreviaturas: al, almidón; c, corteza; h, hifa; ip, interrupción de pared; l, larva; ne, nematodo; pl, pared lignificada; si, síncito; tv, tejidos vasculares. Aumentos: la escala vale 100  $\mu\text{m}$  para A-B; 25  $\mu\text{m}$  para C-E y 50  $\mu\text{m}$  para F.

Los sincitos mostraron una serie de modificaciones desde su formación hasta que dejaron de ser funcionales. Fue posible definir, de acuerdo a su citología, tres etapas en su desarrollo: inicial, diferenciada y en regresión.

### *Sincitos*

#### *a. Etapa inicial*

Representada por sincitos jóvenes, sus numerosas células presentaban formas y tamaños variables, con el citoplasma algo denso y el vacúolo central reducido o reemplazado por varias vacúolos pequeños. Las paredes celulares eran delgadas con abundantes rupturas que permitían la confluencia de los citoplasmas y el traslado de los distintos orgánulos celulares. Los núcleos, generalmente uno por célula, se asemejaban en forma y tamaño a los de las células del parénquima cortical. Fue muy frecuente encontrar en estos sincitos hifas tabicadas (Deuteromycetes) que adquirirían un notable desarrollo (Fig. 1C).

En esta etapa del sincito fue detectada la presencia de hembras sedentarias que aún no habían alcanzado su máximo desarrollo.

#### *b. Etapa diferenciada*

En este estadio el citoplasma continuó incrementando su densidad siendo de aspecto granuloso y muy poco vacuolizado. Fue muy característica la presencia de abundantes granos de almidón de forma redonda y tamaños diversos, muchos de los cuales estaban parcialmente hidrolizados. Los núcleos eran hipertróficos, de aproximadamente 15  $\mu\text{m}$  de diámetro y contorno redondeado o ameboidal con nucléolo muy evidente (Fig. 1D); en algunos de estos sincitos se notó una progresiva involución de los núcleos (Fig. 1E). En cuanto a las paredes celulares, unas pocas se mantenían delgadas ya que la mayoría las habían engrosado hasta unos 5-7  $\mu\text{m}$ ; a pesar de ello, todas continuaban siendo celulósicas. Con relación a las rupturas eran semejantes a las de la etapa anterior (Fig. 1E). En éstos sincitos hay una demarcación más notable entre la apariencia de las células que los constituyen y las adyacentes (Fig. 1B, E); por otra parte, estaban relacionados con hembras adultas completamente desarrolladas.

#### *c. Etapa en regresión*

En ciertas agallas se localizaron sincitos en

donde muchas de las células tenían citoplasma escaso, un marcado aumento de la vacuolización, muy pocos núcleos y algunos granos de almidón. Además, entre las células vivas aparecía un importante número de células muertas. Tanto en unas como en otras, las paredes se mantuvieron celulósicas y desigualmente engrosadas (Fig. 1F).

En las muestras analizadas, había formación de numerosas raíces laterales.

En relación con esta etapa no se identificaron ejemplares vivos del nematodo; en cambio se observaron masas de huevos contenidas en una matriz mucilaginosas.

### *Raíces de tomate*

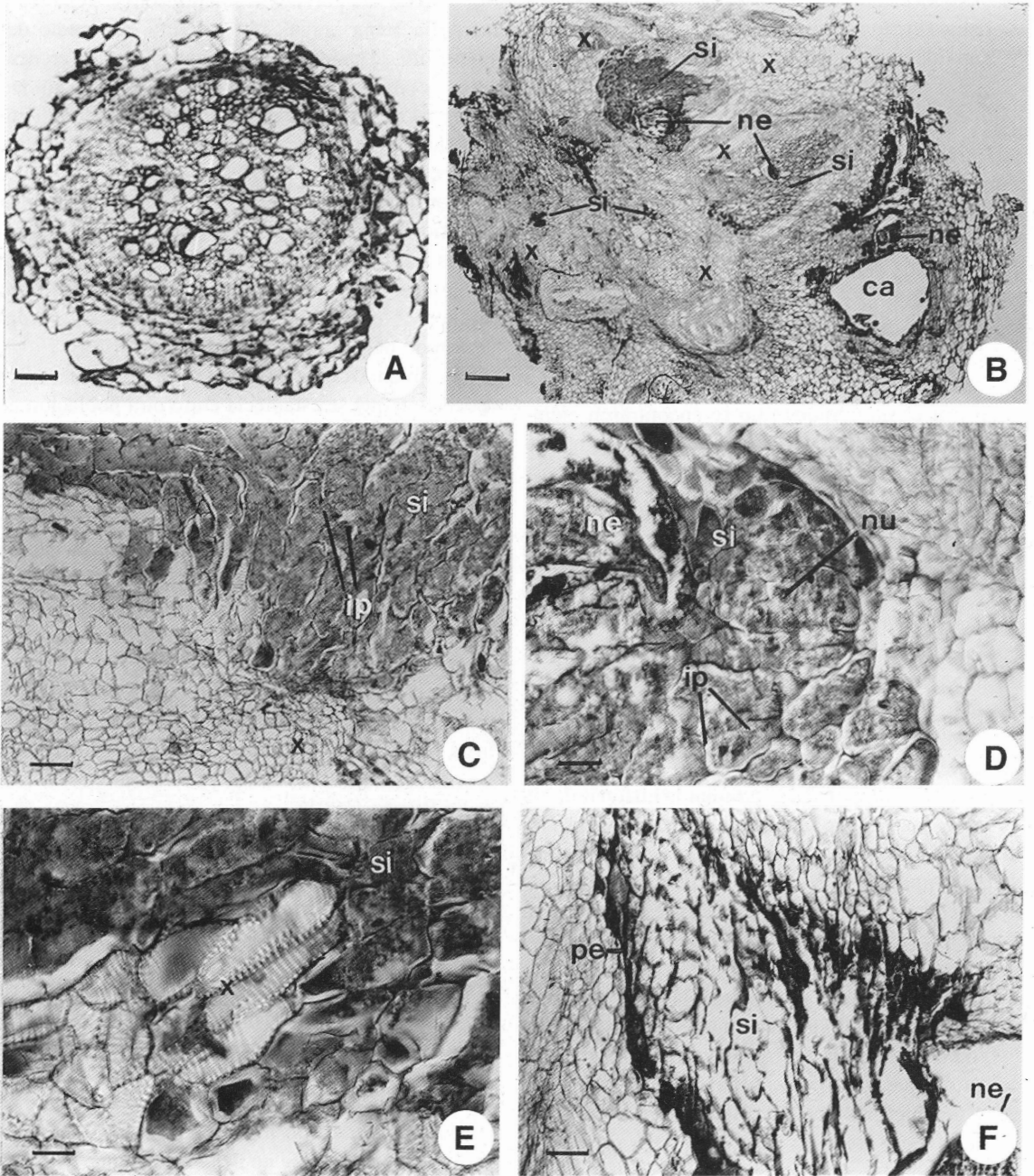
Las estructuras sinciciales inducidas por el nematodo se desarrollaron tanto en el cilindro central como en la corteza y eran numerosas en una misma agalla. Esto determinó que la anatomía de la raíz resultara muy alterada y no se pudieran delimitar corteza y cilindro vascular. Los sincitos se extendían acrópeta y basípetamente a lo largo de la raíz y en su expansión radial, alcanzaron formas variables y contornos irregulares (Fig. 2B). Los tejidos vasculares quedaron separados, desplazados y reducidos por el crecimiento de los sincitos. Además gran cantidad de elementos conductores del xilema tenían disposición irregular y características anómalas (Fig. 2B, C, E). La presencia de larvas en la zona más externa de la corteza produjo la misma reacción que se describió para las raíces de pimienta. No hubo procesos de hiperplasia relacionados con la presencia de los nematodos o con los sitios de alimentación, y las agallas, más grandes que en el pimienta, resultaron también en este caso del desarrollo de varios sincitos y de la presencia de hembras de *N. aberrans*.

En el material que se analizó fue posible distinguir dos etapas en la diferenciación de los sincitos: funcional y no funcional.

### *Sincitos*

#### *a. Etapa funcional*

Las células se caracterizaban por ser de tamaños variables, con predominio de las formas rectangulares. El citoplasma era muy denso con vacúolos pequeños, un núcleo por célula, de contorno irregular, y nucléolos pocos evidentes. Las paredes celulares estaban ligeramente engrosadas y tenían frecuentes rupturas (Fig. 2C, D). Las células integrantes del sincito diferían notablemente de las no sinciciales, ya que es-



**Fig. 2.** Fotomicrografías de raíces de *L. esculentum* en secciones transversales. **A:** raíz testigo sano. **B:** raíz con varios sincitos funcionales; hacia abajo y a la derecha se observa una cavidad donde quedaba alojada la hembra. **C-E:** detalles de sincitos funcionales. **F:** sincitio no funcional. Abreviaturas: ca, cavidad; ip, interrupción de pared; ne, nematodo; nu, núcleo; pe, pared engrosada; si, sincitio; x, xilema. Aumentos: la escala vale 100  $\mu\text{m}$  para **A**; 400  $\mu\text{m}$  para **B**; 50  $\mu\text{m}$  para **C**, **D**, **F** y 25  $\mu\text{m}$  para **E**.

tas últimas mantenían su típica apariencia vacuolada y las paredes celulares completas.

Estos síncitos estaban relacionados con hembras en etapa de ovipostura.

#### *b. Etapa no funcional*

Caracterizados por un gran número de células muertas, solo algunas de las células de la periferia del síncito tenían restos de citoplasma y núcleos. Las paredes celulares, en especial las que limitaban con los elementos del xilema, estaban notablemente engrosadas (Fig. 2F). Se detectaron además, elementos de vasos ocluidos que podrían ser consecuencia de la presencia de hongos en todos los tejidos de la raíz. Al igual que en la etapa de síncito en regresión de las raíces de pimiento, no se encontraron ejemplares de nematodos vivos asociados al complejo celular.

## DISCUSIÓN

Tanto en las raíces de pimiento como de tomate, *N. aberrans* induce a la formación de alteraciones histológicas definidas representadas por síncitos. Las características citológicas de los síncitos concuerdan con las que se describen para los representantes del género (Jones, 1981).

Doucet *et al.* (1992), al estudiar la histopatología inducida por una población de *N. aberrans* proveniente de Tucumán en raíces de *C. annuum* variedad "trompa de elefante", encuentran síncitos muy bien desarrollados. Definen cuatro estadios en su evolución basados en la instalación del nematodo y su posterior desarrollo. El primer estadio, tiene en general una citología semejante a la de la etapa inicial descrita para pimiento en este trabajo; sin embargo se diferencian en las rupturas de las paredes celulares, que están presentes en el material de Oliva. Coinciden los dos materiales el estar asociado con la misma etapa de desarrollo de *N. aberrans*. El segundo y tercer estadios serían coincidentes con lo que hemos definido como etapa diferenciada, y, si bien todos están con relación a hembras totalmente desarrolladas, entre ellos se establecen diferencias bien marcadas a nivel citológico. En efecto, en pimiento de Tucumán resalta la situación vinculada con la ruptura de las paredes celulares, que son tan numerosas que traen como consecuencia la pérdida de la individualidad celular dentro del

síncito. En contraste, en el pimiento de Oliva, las rupturas de las paredes celulares son semejantes a las de la etapa inicial, por lo tanto el aspecto del síncito no se modifica demasiado; otra diferencia surge del desarrollo en éste último de gran cantidad de almidón. Este carácter es típico de todo síncito inducido por los representantes del género *Nacobbus* (Jones, *op. cit.*).

Con relación al cuarto estadio y a la etapa en regresión de ambos materiales son bastantes coincidentes. En los dos se localizan tanto células en estado de desorganización como células muertas y no pueden relacionarse con ejemplares vivos del nematodo pero sí con sus oviposturas.

También Doucet *et al.* (1997) describieron la asociación que se establecía entre otra población de *N. aberrans*, procedente de la provincia de Santa Fe y *L. esculentum*. Esa asociación originó en las raíces la formación de síncitos en los cuales fue posible establecer las mismas etapas descritas para pimiento (Doucet *et al.*, 1992). Sin embargo no concuerdan con lo observado en tomate de Oliva, en especial en la etapa funcional. Las diferencias son las mismas que se puntualizan entre pimiento de Tucumán y el de Oliva.

Estos antecedentes permiten establecer una vez más, distintos comportamientos por parte de miembros de esta especie en relación con diversos hospedadores, acorde con la ya señalado por Doucet & Di Rienzo (1991).

## CONCLUSIONES

La gran cantidad de nematodos alojados en los sistemas radicales de cada planta y las alteraciones histológicas inducidas por *N. aberrans* ponen de manifiesto que ambas especies son muy susceptibles.

Los síncitos formados por la acción del patógeno ocasionan cambios en la anatomía de las raíces, en particular en la disposición y estructura de los tejidos vasculares los que no llegan a ser interrumpidos.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Río Cuarto (Res. N° 241/99), Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria, Secretaría de Ciencia y Técnica

de la Universidad Nacional de Córdoba (SECYT, Res. 162/99), Consejo de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Provincia de Córdoba (CONICOR, PIP Res. 1610/98) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, PIP Res. 2851) por el apoyo financiero que hizo posible el desarrollo de este trabajo.

## BIBLIOGRAFÍA

- BAKER, K. R., R. S. HUSSEY & L.R. KRUSBERG. 1994. Plant and soil nematodes: Societal impact and focus for the future. *J. Nematol.* 26: 127-137.
- BAKER, K. R. 1998. Introduction and synopsis of advancements in nematology. In: K. R. BARKER, G. A. PEDERSEN & G. L. WINDHAM (eds.), *Plant and nematode interactions*, pp. 1-20. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA.
- COSTILLA, M. A. 1985. El falso nematode del nudo *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 y su relación con el cultivo de papa en el noroeste argentino. *Revista Indust. Agríc.* 62: 79-97.
- COSTILLA, M. A. 1989. Comportamiento e importancia de tres poblaciones del falso nematode del nudo *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944, como plaga de tomate y pimiento en tres localidades del noroeste argentino. *Nematropica* 20: 2-3.
- DOUCET, M. E. 1989. The genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 in Argentina. 1. Study of a population of *N. aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 on *Chenopodium album* L. from Río Cuarto, Province of Córdoba. *Rev. Nématol.* 12: 17-26.
- DOUCET, M. E. 1992. Asociaciones entre nematodos fitófagos y malezas en la República Argentina. *Agriscientia* 9: 103-112.
- DOUCET, M. E. 1999. *Nematodos del suelo asociados con vegetales en la República Argentina*. Serie de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria N° 24.
- DOUCET, M. E. & J. A. DI RIENZO. 1991. El género *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 en Argentina. 3. Caracterización morfológica y morfométrica de poblaciones de *N. aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944. *Nematropica* 21: 19-35.
- DOUCET, M. E., E. L. de PONCE de LEÓN & M. A. COSTILLA. 1992. El género *Nacobbus* Thorne & Allen 1944 en Argentina. 5. Histopatología en *Capsicum annum* L. inducida por *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944. *RLA* 23: 69-76.
- DOUCET, M. E., E. L. de PONCE de LEÓN, M. C. TORDABLE & N. POLONI. 1997. *Nacobbus aberrans* y su asociación con vegetales en Argentina. *Nematol. mediterr.* 25: 279-285.
- JOHANSEN, D. A. 1940. *Plant microtechnique*. Mc Graw-Hill Book Co., New York.
- JONES, M. G. K. 1981. The development and function of plant cell modified by endoparasitic nematodes. In: ZUCKERMAN, B. M. (ed.), *Plant Parasitic Nematodes* Vol. 3, pp. 255-279. Academic Press, New York-London.
- O'BRIEN, T. P. & M. E. McCULLY. 1981. *The study of plant structure: principles and selected methods*. Termarcaphi PTY Ltd., Melbourne, Australia.

Recibido el 04 de Octubre de 2000, aceptado el 11 de Diciembre de 2000.