

OOGENESIS Y REPRODUCCION DE UNA POBLACION DE *RADOPHOLUS SIMILIS* DE PUERTO RICO¹

X. Rivas y J. Román

Estación Experimental Agrícola, Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayaguez, Río Piedras, Puerto Rico 00928.

Aceptado:

24.I.1985

Accepted:

RESUMEN

Rivas, X. y J. Román. 1985. Oogénesis y reproducción de una población de *Radopholus similis* de Puerto Rico. Nematropica 15:19-25.

El proceso de oogénesis y modo de reproducción de una población de *Radopholus similis* atacando plátano en Puerto Rico fue estudiado en el laboratorio. Se encontró que en la zona de germinación de las oogonias del ovario los cromosomas, aunque difíciles de observar, se dividen por mitosis y el complemento cromosómico era $2n = 10$. Los oocitos no pasaron de la metafase I a menos que fuesen penetrados por un espermatozoide. Inmediatamente se formó el primer cuerpo polar donde se observó un número de cromosomas igual a $n = 5$. La formación de un segundo cuerpo polar terminó la etapa de maduración. En discos de zanahoria inoculados con una y dos larvas de *R. similis* respectivamente se encontró que, 60 días después de la inoculación, sólo hubo reproducción en el último tratamiento demostrándose así la ocurrencia de anfimixis, con ausencia de apomixis.

Palabras claves adicionales: Nematoda, nematodo barrenador, plátano, número de cromosomas, anfimixis.

ABSTRACT

Rivas, X. and J. Román. 1985. Oogenesis and reproduction of a *Radopholus similis* population from Puerto Rico. Nematropica 15:19-25.

Oogenesis and mode of reproduction of a population of *Radopholus similis* attacking plantains in Puerto Rico was studied in the laboratory. In the germinal zone of the ovary, the chromosomes, although very indistinct, divided by mitosis, and the chromosome complement was $2n = 10$. Oocytes did not advance beyond metaphase I unless penetrated by a spermatozoon. Then, the first polar body was formed where the chromosome number was $n = 5$. Maturation of the oocyte terminated with the formation of the second polar body. Inoculations of carrot discs with one or two larvae of *R. similis* respectively showed that, 60 days after inoculation, the reproduction was found only in the latter treatment, demonstrating that amphimixis had taken place, and apomixis did not occur.

Additional key words: Nematoda, burrowing nematode, plantains, chromosome number, amphimixis.

INTRODUCCION

El nematodo barrenador, *Radopholus similis* (Cobb) Thorne, es una plaga de gran importancia económica en los trópicos y subtropicos del

mundo. La especie está comprendida por dos razas fisiológicas de acuerdo a su comportamiento en el bananero o en cítricas (3). No obstante, Loos y Loos (10) señalaron la posible existencia de biotipos o variantes patogénicos en la raza del bananero. Más tarde Edwards y Wehunt (4), Pinochet (11), Tarté et al. (14) y Tarté y Pinochet (13) presentaron datos confirmando lo antes mencionado. Los estudios realizados en Puerto Rico tienden a demostrar que en esta isla la situación respecto al nematodo barrenador es diferente a la de Centro y Sur América, Florida (E.E.U.U.) y Hawaii.

Con el propósito de esclarecer esta situación, se realizaron estudios al respecto en una población de *R. similis* de Puerto Rico. Aquí se presentan los datos sobre los aspectos de oogénesis y reproducción.

MATERIALES Y METODOS

La población de nematodos utilizada en estos estudios fue obtenida de raíces de plátano (*Musa*, AAB) en los terrenos de la Subestación Experimental Agrícola de Corozal, Puerto Rico. En el laboratorio las raíces coleccionadas fueron lavadas, cortadas en pedazos de aproximadamente 1 cm de largo y trituradas en una licuadora. Las raíces así tratadas fueron procesadas según el método de Christie y Perry (2) para la extracción de nematodos. Especímenes de *R. similis*, de ambos sexos y en diferentes etapas de desarrollo, fueron separados manualmente con una aguja fina de disección de la muestra procesada y transferidos a una placa de Petri conteniendo agua. Estos nematodos fueron luego inoculados a 12 plantas de plátano, de aproximadamente 60 cm de altura, sembradas en envases de 5 gal conteniendo suelo esterilizado a vapor. Estas plantas fueron propagadas de semillas que habían sido cuidadosamente escogidas, mondadas y tratadas con agua caliente a una temperatura de 55 C por 5 min para eliminar cualquier infestación de nematodos. Cada planta fue inoculada con aproximadamente 300 nematodos. Sesenta días después de la inoculación, y cada vez que se necesitaban nematodos para estudio, se recogían muestras de raíces de las plantas y se procesaban según el método antes mencionado.

Para los estudios de oogénesis, hembras grávidas fueron teñidas *in toto* con orceina al 1% en ácido propiónico siguiendo el método de Hirschmann (5) y estudiadas bajo el microscopio compuesto.

Para los estudios de reproducción se utilizaron zanahorias sanas que fueron lavadas en agua, sumergidas en alcohol al 70%, flameadas y cortadas en discos de aproximadamente 5 mm de grueso con un cuchillo esterilizado con calor. A cada disco se le hizo una cavidad pequeña en la zona cortical donde se depositó una gota de agua destilada esterilizada y luego, con una aguja fina de disección, se añadieron nematodos del

segundo y tercer estadio larval. Doscientos noventa discos de zanahoria fueron inoculados de esta forma (145 con 1 larva y 145 con 2 larvas). Después de inoculados, los discos fueron transferidos individualmente a frascos de cristal (90 x 25 mm) previamente esterilizados, tapados con papel de aluminio y colocados en una incubadora a 27 C por 60 días estando entonces listos para hacer las observaciones.

RESULTADOS Y DISCUSION

Oogénesis. El sistema reproductor de la hembra era similar al descrito por Van Weerd (18), Thorne (16) y Taylor (15). Consistía de dos ovarios, uno dirigido anteriormente y otro posteriormente, oviducto, espermateca, útero, vagina y vulva. El ovario se observó subdividido en una zona de germinación o de multiplicación de oogonias y otra de crecimiento o desarrollo de los oocitos.

En la zona de multiplicación las oogonias de las hembras inmaduras pasaron por una serie de divisiones mitóticas. En estas divisiones, los cromosomas eran difíciles de contar. No obstante, en algunas ocasiones se pudo observar un número total de 10 cromosomas ($2n = 10$).

Al terminar la zona de multiplicación los núcleos de las oogonias se observaron más densos y definidos. Luego los oocitos pasaron a la zona de crecimiento donde se observaron en forma cuboidal o amorfos con un citoplasma granulado y el núcleo definido. Los cromosomas en esta zona no se pudieron definir. Los oocitos aumentaron en tamaño conforme a su proximidad con la espermateca.

Cuando el oocito pasó por la espermateca un solo espermatozoide lo penetró. Inmediatamente se produjo la primera división de maduración y el primer cuerpo polar. En este cuerpo polar se observaron (Fig. 1) los cromosomas contándose un total de 5 ($n = 5$). Seguidamente ocurrió la segunda división de maduración y se produjo el segundo cuerpo polar. Finalmente, debieron formarse los pronúcleos del huevo y el espermatozoide, pero en estos estudios no se observaron. Sin embargo, en otros estudios conducidos por los autores (sin publicar) se observaron los pronúcleos y su unión en una población de *R. similis* aislada de raíces de plátano de Carolina, Puerto Rico.

El modelo de oogénesis observado en esta población de *R. similis* de plátano de Puerto Rico difiere del publicado por Huettel y Dickson (7) para las razas de cítricas y bananos de Florida, E.E.U.U. No obstante, están acorde con los de Triantaphyllou y Hirschmann (17) respecto a otras especies de nematodo que necesitan del macho para reproducirse. En estos casos los oocitos no avanzan más allá de la metafase I a menos que un espermatozoide lo penetre y para este tiempo ya el oocito habrá adquirido el tamaño de un huevo. Estos resultados también son similares

a los descritos por Román y Triantaphyllou (12) para las especies bisexuales de *Pratylenchus* Filipjev.

El número de cromosomas observado ($n=5$) es diferente al encontrado por Huettel y Dickson (7) para la raza de bananos de Florida donde se observó un complemento cromosómico de $n=4$. Este mismo número de cromosomas fue observado por Huettel (comunicación personal) en poblaciones de *R. similis* de bananos procedentes de México, Honduras, Guatemala, Costa Rica, Panamá y Ecuador. También Huettel et al. (8) encontraron una situación idéntica en una población de bananos de Hawaii.

El complemento cromosómico ($n=5$) de esta población de Puerto Rico es igual al observado por Huettel y Dickson (7) y por Huettel et al. (8) para las razas de cítricas de Florida y Hawaii, respectivamente.

Reproducción. Los resultados obtenidos de los estudios de reproducción se presentan en el Cuadro 1. En este cuadro se puede notar que de 145 muestras de discos de zanahoria inoculados con una larva, 112 estaban libres de hongos y/o bacterias y por lo tanto, aptas para examen. Sólo en 3 de dichas 112 muestras se recuperó 1 hembra, asumiéndose que éstas eran las hembras de las larvas inoculadas. Loos (9) tampoco encontró progenie en inoculaciones de una larva con una población de bananos.

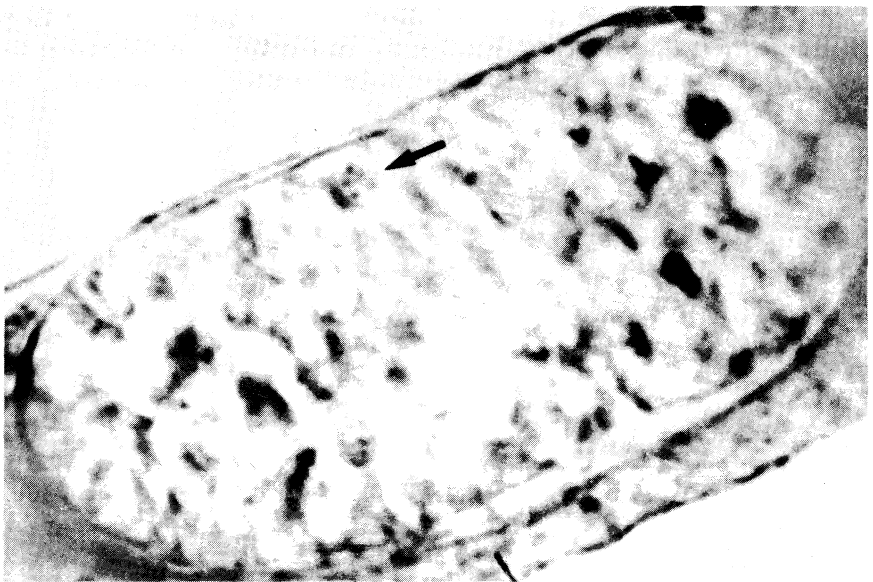


Fig. 1. Oocito con el primer cuerpo polar (flecha) demostrando 5 cromosomas.

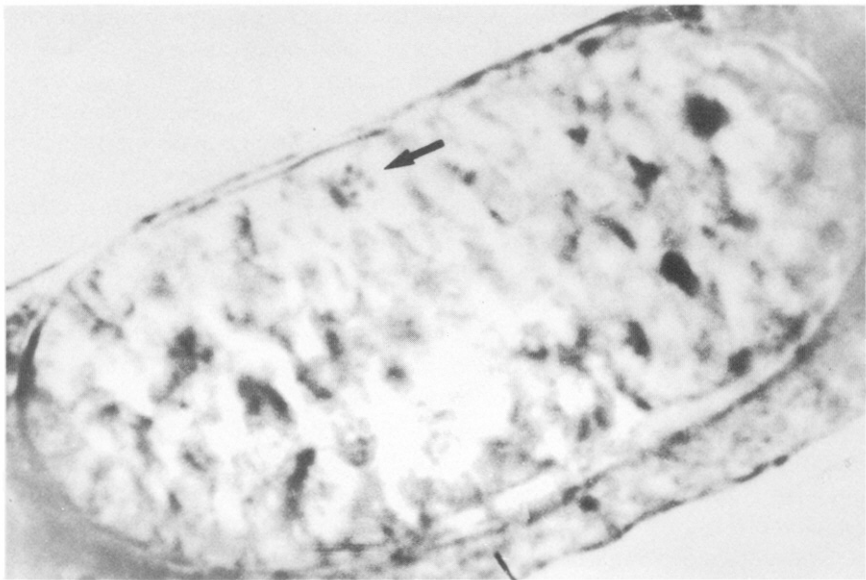


Fig. 1. Oocito con el primer cuerpo polar (flecha) demostrando 5 cromosomas.

Cuadro 1. Número de *R. similis* recuperados de discos de zanahorias a los 60 días de inoculados con una o dos larvas del segundo o tercer estadio.

Muestras de discos de zanahoria	Larvas inoculadas	
	Una	Dos
Total muestras inoculadas	145	145
Muestras aptas para examen	112	107
Muestras con larvas	0	66
Muestras con hembras	3	84
Muestras con machos	0	48

De 145 muestras inoculadas con dos larvas, 107 estaban aptas para estudio. De estas 66 contenían larvas, 84 hembras y 48 machos. Se puede, por lo tanto concluir, que a los 60 días de la inoculación la reproducción fue por anfimixis.

De otra parte, Brooks y Perry (1), trabajando con inoculaciones de un sólo huevo de *R. similis* de la raza de las cítricas de Florida, lograron conseguir hasta tres generaciones sin machos; es decir, una reproducción partenogenética. Huettel y Dickson (6) en inoculaciones de una larva de las razas de cítricas y bananos de Florida encontraron que luego de 80 días de la inoculación la progenie en ambos casos consistía sólo de hembras, o sea, una reproducción partenogenética. A los 180 días de la inoculación la progenie de hembras cambió a una de machos y hembras, o sea, reproducción anfimíctica. Estos autores sugieren que existe un requerimiento de tiempo para que se produzcan estos cambios. Aunque no se puede descartar la existencia de esta posibilidad en nuestra población, ya que los resultados aquí expuestos tuvieron una duración de sólo 60 días, hay que señalar que esta población es diferente en muchos aspectos a la del bananero de Florida y por lo tanto podrían diferir también en el modo de reproducción.

Otras características de la población de *R. similis* del plátano estudiada en Puerto Rico que tienden a indicar que el nematodo se reproduce por anfimixis son: la presencia de machos y hembras en proporción de 50:50, las hembras casi siempre poseen una espermateca llena de espermatozoides, el número de cromosomas en la oogénesis comienza con $2n=10$, se reduce a $n=5$ y vuelve a reestablecerse la condición $2n=10$ al unirse los núcleos del huevo y la esperma, y finalmente, la ausencia de poliploidía.

LITERATURA CITADA

1. BROOKS, T. L., and V. G. PERRY. 1962. Apparent parthenogenetic reproduction of the burrowing nematode, *Radopholus similis* (Cobb) Thorne. Soil Crop Sci. Soc. Fla. Proc. 22:160-162.
2. CHRISTIE, J. R., and V. G. PERRY. 1951. Removing nematodes from soil. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 18:106-108.
3. DUCHARME, E. P., and W. BIRCHFIELD. 1956. Physiological races of the burrowing nematode. Phytopathology 46:615-616.
4. EDWARDS, D. I., and E. J. WEHUNT. 1971. Host range of *Radopholus similis* from areas of Central America with indications of additional races. Plant Dis. Repr. 55:415-418.
5. HIRSCHMANN, H. 1962. The life cycle of *Ditylenchus triformis* (Nematoda: Tylenchidae) with emphasis on post-embryonic development. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 29:39-42.
6. HUETTEL, R. N., and D. W. DICKSON. 1981. Parthenogenesis in the two races of *Radopholus similis* from Florida. J. Nematol. 13:13-15.
7. HUETTEL R. N., and D. W. DICKSON. 1981. Karyology and oogenesis of *Radopholus similis* (Cobb) Thorne. J. Nematol. 13:16-20.
8. HUETTEL, R. N., D. W. DICKSON, D. T. KAPLAN, and W. J. APT. 1982. Identification of the citrus and banana races of *Radopholus similis* from Hawaii. J. Nematol. 14:446.
9. LOOS, C. A. 1962. Studies on the life history and habits of the burrowing nematode, *Radopholus similis*, the cause of black head on bananas. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 29:43-52.
10. LOOS, C. A., and S. B. LOOS. 1960. The black-head disease of bananas (*Musa acuminata*). Proc. Helminthol. Soc. Wash. 27:189-193.
11. PINOCHET, J. 1979. Comparison of four isolates of *Radopholus similis* from Central America on Valerie bananas. Nematropica 9:40-43.
12. ROMAN, J., and A. C. TRIANTAPHYLLOU. 1969. Gametogenesis and reproduction of seven species of *Pratylenchus*. J. Nematol. 1:357-362.
13. TARTE, R. y J. PINOCHET. 1981. Problemas nematológicos del banano; contribuciones recientes a su conocimiento y combate. UPEB, Panamá, 32 p.
14. TARTE, R., C. GABRIELLI, J. A. AGUILAR, and M. SOLANO. 1980. Differences in frequency of morphological variants and in host preferences among populations of the banana race of *Radopholus similis*. Nematropica 10:73-74.
15. TAYLOR, A. C. 1969. The Fiji banana-root nematode, *Radopholus similis*. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 36:157-163.

16. THORNE, G. 1949. On the classification of the Tylenchida, new order (Nematoda:phasmidia). Proc. Helminthol. Soc. Wash. 16:37-73.
17. TRIANTAPHYLLOU, A. C., and H. HIRSCHMANN. 1964. Reproduction in plant and soil nematodes. Ann. Rev. Phytopathol. 2:57-80.
18. VAN WEERDT, L. G. 1960. Studies on the biology of *Radopholus similis* (Cobb 1893) Thorne 1949. Part III. Embryology and post-embryonic development. Nematologica 5:43-51.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean expresar su agradecimiento a los Drs. N. Virkki, Citogeneticista de esta universidad, y a A. C. Triantaphyllou, Citogeneticista, Departamento de Genética, Universidad del Estado de Carolina del Norte, Raleigh, N. C., por su ayuda y sugerencias durante el desarrollo de la investigación y preparación del manuscrito.

Recibido para publicar:

17.IX.1984

Received for publication:

¹Parte de una tesis sometida por el autor principal en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de Maestro en Ciencias en Biología, Universidad de Puerto Rico, Recinto de Río Piedras.