

**ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO EN TUBÉRCULOS DE DOS VARIEDADES DE PAPA ANDINA (*SOLANUM TUBEROSUM* SUBSP. *ANDIGENUM*) INFECTADAS POR ESPECIES DEL GÉNERO *MELOIDOGYNE***

M. del C. Tordable<sup>1\*</sup>, P. Lax<sup>2</sup> y M. E. Doucet<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Morfología Vegetal, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Estafeta Postal N° 9, 5800, Río Cuarto, Córdoba, Argentina; <sup>2</sup>Centro de Zoología Aplicada, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Casilla de Correo 122, 5000, Córdoba, Argentina; Correo electrónico: mtordable@exa.unrc.edu.ar.

---

ABSTRACT

Tordable, M. del C., P. Lax and M. E. Doucet. 2008. Histopathological analysis of tubers of two varieties of Andean potato (*Solanum tuberosum* subsp. *andigenum*) infected by species of the genus *Meloidogyne*. *Nematropica* 38:95-103.

Histological alterations induced by *Meloidogyne javanica* alone and in combination with *M. incognita* were studied in tubers of Andean potato (*Solanum tuberosum* subsp. *andigenum*) ‘Collareja’ and ‘Tuni’ from Argentina, respectively. No galls were observed on the surface of the infected tubers. Nematodes colonized the cortical parenchyma causing the formation of brown spots associated with mature females with their egg masses. Nematodes induced hyperplasia of the parenchyma. Some cells showed hypertrophy and modified their cytological characteristics to generate the giant cells. Although the tuber qualitative damage and histological alterations were similar in both varieties, it was possible to observe a hypersensitive reaction in ‘Collareja’ tubers. This reaction consisted of formation of thick walls, reinforced and impermeabilized by suberin deposits in the cells surrounding the nematode female, eggs masses and juveniles. This reaction may have prevented the subsequent reinfection by the nematode second-stage juveniles. The cytology of the giant cells, as well as the abundance of juveniles and females located in the tubers of the ‘Tuni’ variety, suggests a more susceptible host response.

*Key words:* Andean potato, Argentina, ‘Collareja’, histopathology, host-response, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, tubers, ‘Tuni’.

---

RESUMEN

Tordable, M. del C., P. Lax y M. E. Doucet. 2008. Análisis histopatológico en tubérculos de dos variedades de papa andina (*Solanum tuberosum* subsp. *andigenum*) infectadas por especies del género *Meloidogyne*. *Nematropica* 38:95-103.

Se caracterizaron alteraciones histológicas inducidas sólo por *Meloidogyne javanica* y en combinación con *M. incognita* en tubérculos de papa andina (*Solanum tuberosum* subsp. *andigenum*) variedad ‘Collareja’ y ‘Tuni’, respectivamente, provenientes de Argentina. No se observaron agallas en la superficie de los tubérculos infectados. Los nematodos colonizaron el parénquima cortical ocasionando la formación de puntos de color marrón en los que se hallaron hembras maduras con sus masas de huevos. Los nematodos indujeron modificaciones que comenzaban con hiperplasia celular. Algunas células mostraron hipertrofia, modificándose sus características citológicas para constituir células gigantes. Si bien los daños cualitativos y las alteraciones histológicas fueron similares en las dos variedades, se observaron ciertas diferencias. En ‘Collareja’ se detectó una reacción de hipersensibilidad que consistía en células con paredes gruesas, reforzadas e impermeabilizadas por suberina que rodeaban a hembras, masas de huevos y juveniles. Esta reacción podría restringir la consecuente reinfección del tubérculo por parte de los juveniles de segundo estadio. En ‘Tuni’, la citología de las cé-

lulas gigantes, así como la abundancia de juveniles y hembras instaladas en los tubérculos, indicarían que esta variedad sería la más susceptible.

*Palabras clave:* Argentina, 'Collareja', histopatología, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, papa andina, respuesta del hospedante, tubérculos, 'Tuni'.

---

Determinadas especies del género *Meloidogyne* son responsables de ocasionar significativas pérdidas en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.), tanto en climas cálidos como fríos (Brodie *et al.*, 1993). No sólo atacan al sistema radical de la planta interfiriendo severamente en su rendimiento sino que infectan también el tubérculo continuando su ciclo de vida en el interior. En algunas ocasiones, las papas infectadas pueden mostrar externamente síntomas visibles bajo forma de agallas o protuberancias de diferente tamaño (Chaves y Torres, 2001). Como consecuencia de esta infección, la calidad del tubérculo disminuye, afectando su valor comercial y favoreciendo la diseminación del parásito a nuevas áreas en caso de ser utilizado como papa-semilla (Vovlas *et al.*, 2005).

En Argentina han sido detectadas papas provenientes de distintas zonas productoras de semilla contaminadas por *Meloidogyne* spp. (Chaves y Torres, 2001). En el noroeste del país, representantes del género se encontraron en suelos destinados al cultivo (Mondino *et al.*, 2006), como así también instalados en tubérculos de distintas variedades de papa andina (*Solanum tuberosum* L. subsp. *andigenum*) (Lax *et al.*, 2006).

En los tejidos del tubérculo, al igual que en las raíces, esos nematodos inducen alteraciones histológicas variadas entre las que se destaca la formación de su sitio de alimentación (células gigantes). Se han realizado estudios sobre el particular en los cultivares de Spunta, Cara y Russet Burbank infectados naturalmente por *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood (Doucet y Ponce de León, 1995), *M. javanica* (Treub

Chitwood (Vovlas *et al.*, 2005) y *M. chitwoodi* Golden *et al.* (Finley, 1981), respectivamente. Hasta el momento, no existe información sobre la reacción de tubérculos de papa andina atacados por nematodos de este género.

Se analizaron papas andinas naturalmente infectadas de la variedad 'Collareja' provenientes de lotes de las localidades de Humahuaca (Departamento Humahuaca) y Yavi (Departamento Yavi) y 'Tuni' procedente de Alfarcito (Departamento Tilcara), Provincia de Jujuy, Argentina. Los tubérculos de 'Collareja' estaban infectados por *M. javanica*, mientras que los de 'Tuni' se hallaron atacados simultáneamente por *M. javanica* y *M. incognita*. Las papas se pelaron cortando trozos de peridermis y del parénquima cortical de reserva, incluyendo el anillo vascular, hasta unos 5 mm de profundidad aproximadamente. Aquellas porciones de parénquima que mostraban algún indicio de la presencia de los nematodos (puntos necróticos de color marrón) fueron recortadas en pequeñas partes y fijadas en FAA. Posteriormente se deshidrataron en una serie ascendente de alcoholes etílicos-xilol y se incluyeron en histowax. Secciones seriadas, transversales y longitudinales, de 8 a 10  $\mu$ m de espesor fueron obtenidas con un micrótopo de rotación. Para colorear las muestras se usó la triple coloración hematoxilina-safranina-verde rápido y el montaje definitivo se realizó con Depex (Johansen, 1940; O'Brien y McCully, 1981). La identificación de lignina y suberina se realizó mediante pruebas histoquímicas utilizando cortes obtenidos con el micrótopo y posteriormente desparafinados. El reconocimiento de ambos compues-

tos se logró tratando los cortes con floroglucina clorhídrica al 1% (D'Ambrogio de Argüeso, 1986; Harris y Oparka, 1994) y observándolos en campo claro. Para diferenciar los dos tipos de compuestos, esos mismos preparados se analizaron con luz ultravioleta (Baayen *et al.*, 1996). Las observaciones de fluorescencia se efectuaron con un microscopio Axiophot Carl Zeiss equipado con una lámpara de vapor de mercurio HBO 100 W. Las fotomicrografías se obtuvieron con un equipo de captura y digitalización de imagen AxioVision 4.3, con cámara AxioCam HRc.

Externamente los tubérculos de las variedades estudiadas no aparecieron deformados ni mostraron agallas como consecuencia de la infección por parte de *Meloidogyne* spp. (Figs. 1A, 2A). Sin embargo, bajo la peridermis se observaron, inmersos en parénquima normal sano (Fig. 3A, B), puntos de color marrón que revelaban la presencia de hembras maduras del nematodo con sus respectivas masas de huevos (Fig. 1B). El análisis histopatológico de esas zonas del parénquima cortical y del anillo vascular reveló que el nematodo indujo en el tejido parenquimático modificaciones que comenzaban con una manifiesta hiperplasia. Las nuevas células medían aproximadamente 25  $\mu\text{m}$  (según su eje mayor) y estaban desprovistas de almidón. Algunas de estas células hiperplásicas, próximas a la región anterior del nematodo, eran hipertróficas con sus características citológicas modificadas, dando como resultado células gigantes. Otras, adquirirían disposición radial y quedaban rodeando el cuerpo del nematodo como así también las masas de huevos.

#### *Variedad 'Collareja'*

En esta variedad, e independientemente de la localidad de donde provenían, se observaron hembras de *M. javanica*

(algunas con sus masas de huevos) en distintos niveles de profundidad del parénquima cortical y vascular. Estaban rodeadas por varios estratos (más de cinco) de células hiperplásicas de forma tubular que se ubicaban ordenadas con sus ejes mayores (llegando a medir 20  $\mu\text{m}$  aproximadamente) paralelos al lugar ocupado por el nematodo (Fig. 1C). Las células de los estratos más internos de este tejido hiperplásico, adyacentes al cuerpo del nematodo, eran de mayor tamaño y perdían gradualmente su forma tubular. Tenían sus paredes algo engrosadas (5  $\mu\text{m}$  aproximadamente) y químicamente se hallaban modificadas con depósitos de suberina, especialmente aquellas células que resultaban rotas por la presión ejercida debido al aumento del volumen del cuerpo del nematodo (Fig. 1D). Estos estratos celulares también se hallaron rodeando a los huevos y juveniles (Fig. 1E) y no se observaron en relación a la región anterior del parásito, como así tampoco a los sitios de alimentación. Las células gigantes (entre 3 y 5) podían quedar rodeadas por estratos celulares hiperplásicos sin modificar, es decir, células de menor tamaño que las de reserva, desprovistas de almidón (Fig. 1F, G) o directamente inmersas en el tejido parenquimático. Éstas se ubicaban muy próximas a los tejidos vasculares (Fig. 1H) y también se observaron formadas con relación a la presencia de yemas. En estos casos, parte del tejido meristemático se modificaba para constituir las yemas y ellas establecían relaciones con los escasos elementos del xilema ya diferenciados a ese nivel. Las células gigantes eran hipertróficas (aproximadamente 80  $\mu\text{m}$  considerando su eje mayor). Su citoplasma era denso con aspecto granular y contenía numerosos núcleos en racimo, los cuales eran de forma esférica e hipertróficos, llegando a medir 15  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las paredes celulares eran gruesas (10  $\mu\text{m}$  de espesor),

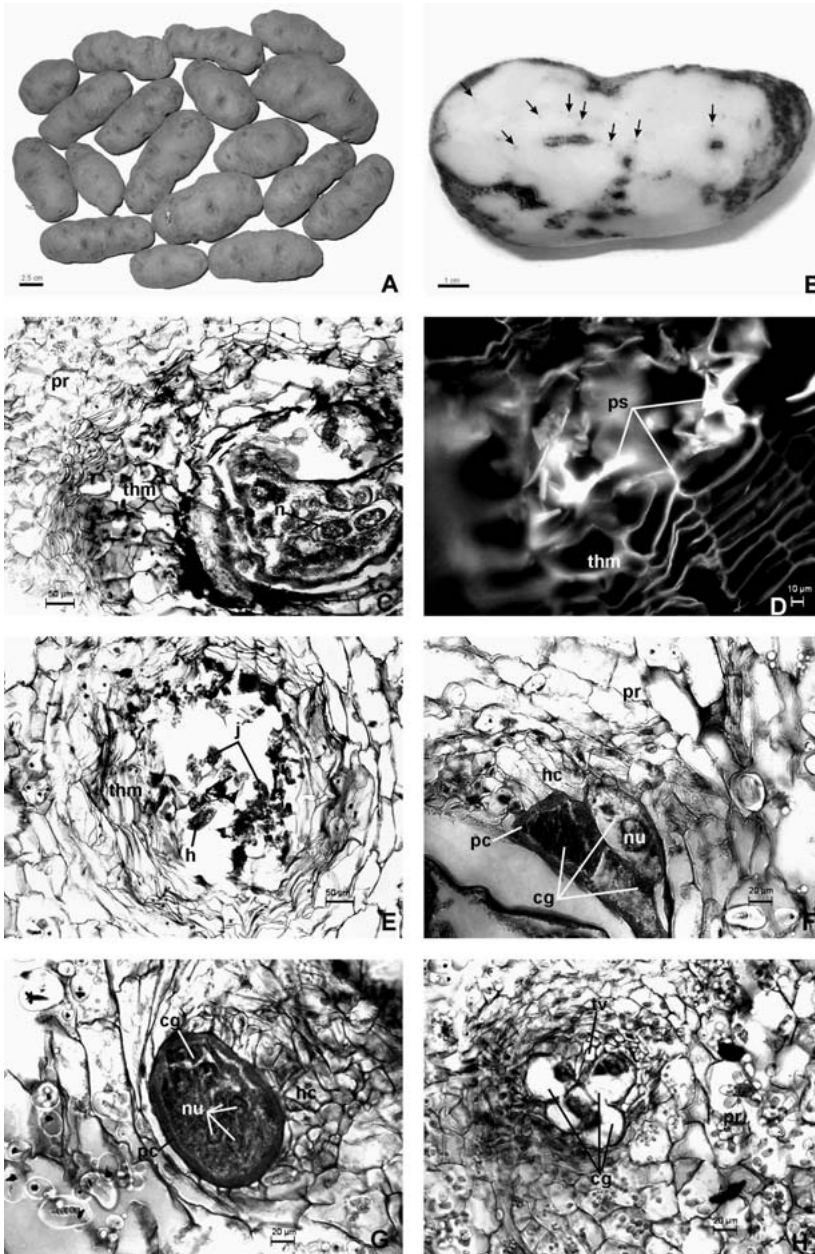


Fig. 1. Asociación de *Meloidogyne javanica* con tubérculos de papa andina, variedad 'Collareja'. A: vista de la superficie externa de los tubérculos. B: vista de un corte de tubérculo que muestra la ubicación de masas de huevos y hembras (puntos de color marrón señalados con flechas). C: hembra rodeada por tejido hiperplásico modificado. D: detalle de un sector del tejido, mostrando fluorescencia de las paredes celulares suberificadas. E: huevos y juveniles del nematodo rodeadas por tejido hiperplásico modificado. F, G: células gigantes con citoplasma denso. H: células gigantes con citoplasma vacuolizado y adyacentes a los tejidos vasculares. Abreviaturas. cg: célula gigante; h: huevos; hc: hiperplasia celular; j: juveniles; n: nematodo; nu: núcleo; pc: pared celular; ps: pared suberificada; pr: parénquima de reserva; thm: tejido hiperplásico modificado; tv: tejidos vasculares.

de textura rugosa y de naturaleza celulósica (Fig. 1F, G). En citoplasmas más diferenciados se observó aumento en la vacuolización (Fig. 1H).

#### *Variedad 'Tuni'*

Se observaron juveniles y hembras maduras, algunas con su masa de huevos (Fig. 2B), instaladas a distintas profundidades del parénquima cortical y vascular, en algunos casos inmediatamente por debajo de la peridermis. El cuerpo del nematodo se encontraba directamente inmerso en el tejido parenquimático de reserva y parte de las células que lo rodeaban estaban aplastadas y/o rotas como consecuencia de la presión mecánica ocasionada sobre el tejido debido al incremento del volumen del cuerpo de las hembras (Fig. 2B, C). Los sitios de alimentación del parásito aparecían constituidos por tres a cinco células gigantes. Éstas podían estar directamente en contacto con el tejido de reserva (Fig. 2D) y los tejidos vasculares o rodeadas por algunos estratos (tres o cuatro) de células hiperplásicas de forma alargada, tubular y de menor tamaño que las parenquimáticas. Éstas se disponían en forma radial al sitio de alimentación. Tenían citoplasma desprovisto de almidón y las paredes celulares eran delgadas y de naturaleza celulósica (Fig. 2E). Las células gigantes se desarrollaban muy próximas a los tejidos vasculares; en algunos sectores aparecían adyacentes a elementos conductores del xilema (Fig. 2F, G). Todas presentaban una notable hipertrofia (llegando a medir aproximadamente 120  $\mu\text{m}$  considerando su eje mayor) y tenían citoplasmas en diferente estadio de maduración. Por un lado, se observaron citoplasmas densos, escasamente vacuolizados y de aspecto granular (Fig. 2F), mientras que otros mostraron un aumento en la vacuolización y abundante cantidad de amiloplastos de pequeño tamaño (compa-

rados con los del parénquima del tubérculo) (Fig. 2G, H). En ambos casos las células tenían numerosos núcleos dispuestos en racimo, de forma esférica o alargada e hipertróficos (aproximadamente 30  $\mu\text{m}$  de diámetro). Las paredes celulares eran gruesas, llegando a medir aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  de espesor, adquirían una textura rugosa y un contorno interno muy irregular (Fig. 2H), especialmente en aquellos sectores en donde se relacionaban con los vasos del xilema. A pesar del aumento en espesor, la naturaleza química de estas paredes seguía siendo celulósica.

Los tubérculos de papa andina de las variedades 'Collareja' y 'Tuni' no evidenciaron agallas ni apariencia verrugosa como consecuencia del ataque de *M. javanica* y de la combinación de esta especie con *M. incognita*. Ello no coincide con observaciones realizadas en papa cv. Cara naturalmente infectada por *M. javanica* (Vovlas *et al.*, 2005) en las cuales la superficie externa del tubérculo mostró protuberancias debidas a la presencia de hembras maduras con sus respectivas masas de huevos. Una situación equivalente a la anterior fue señalada en el cv. Spunta (Doucet y Ponce de León, 1995), cv. Floresta y el clon Bananita (Montero *et al.*, 2007) atacados por *M. incognita*.

Las alteraciones inducidas por el nematodo en tubérculos de papa andina coinciden en general con lo descrito anteriormente en tubérculos de otras variedades de papa (Doucet y Ponce de León, 1995; Vovlas *et al.*, 2005). Sin embargo, en el presente trabajo se observó que las células gigantes se originaban a partir de células nuevas, hiperplásicas que experimentaron hipertrofia y cambios citológicos y no de tejidos preexistentes en el tubérculo, tales como el protoxilema (Vovlas *et al.*, 2005) o células del parénquima cortical (Doucet y Ponce de León, 1995). En ambos casos no se evidenció hiperplasia previa.

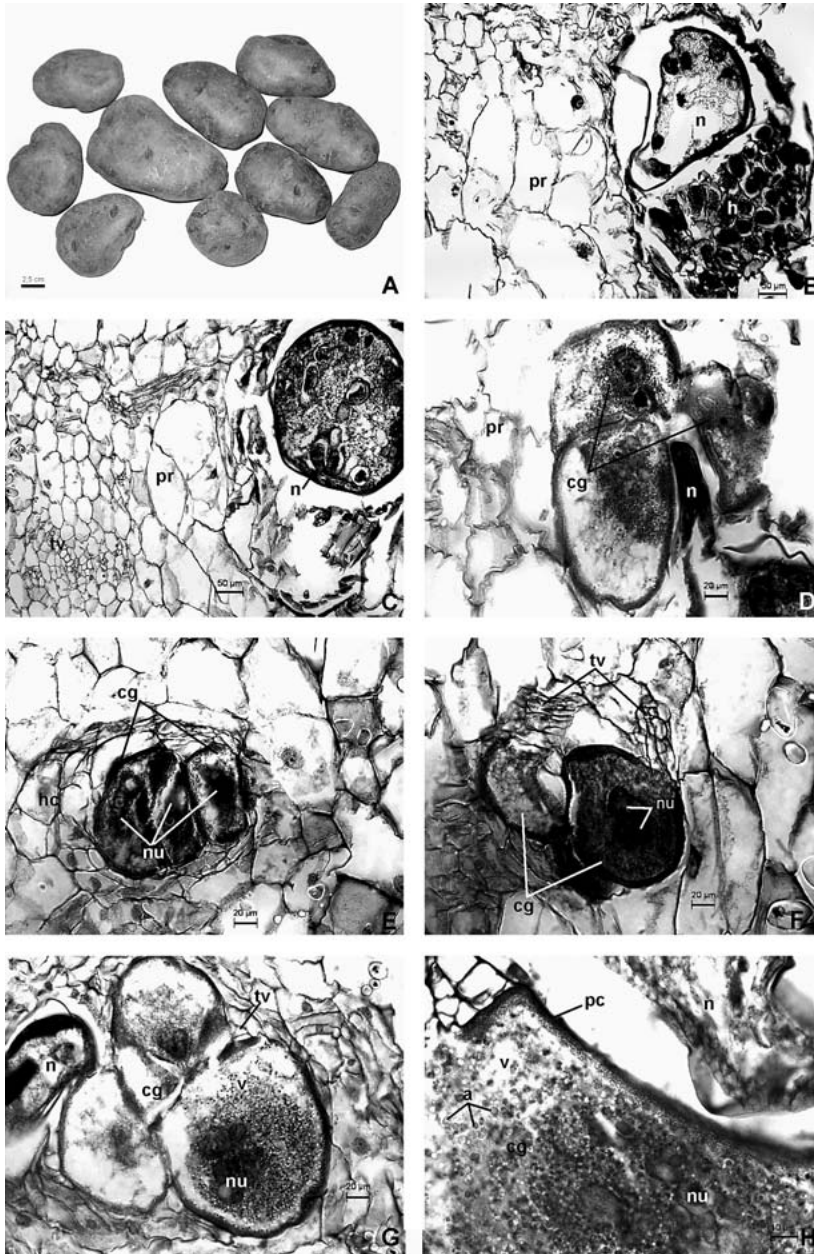


Fig. 2. Asociación de *Meloidogyne javanica* y *M. incognita* con tubérculos de papa andina, variedad 'Tuni'. A: vista de la superficie externa de los tubérculos. B: hembra con masa de huevos inmersa en el parénquima de reserva con algunas células aplastadas o rotas. C: *idem* anterior, sin masa de huevos. D: células gigantes inmersas en el parénquima de reserva. E: células gigantes rodeadas por tejido hiperplásico. F: células gigantes adyacentes a los tejidos vasculares con citoplasma denso. G: células gigantes adyacentes a los tejidos vasculares con citoplasma vacuolizado. H: detalle de un sector de una célula gigante con pared gruesa, rugosa y amiloplastos en el citoplasma. Abreviaturas: a: almidón; cg: célula gigante; h: huevos; hc: hiperplasia celular; n: nematodo; nu: núcleo; pc: pared celular; pr: parénquima de reserva; tv: tejidos vasculares; v: vacuola.

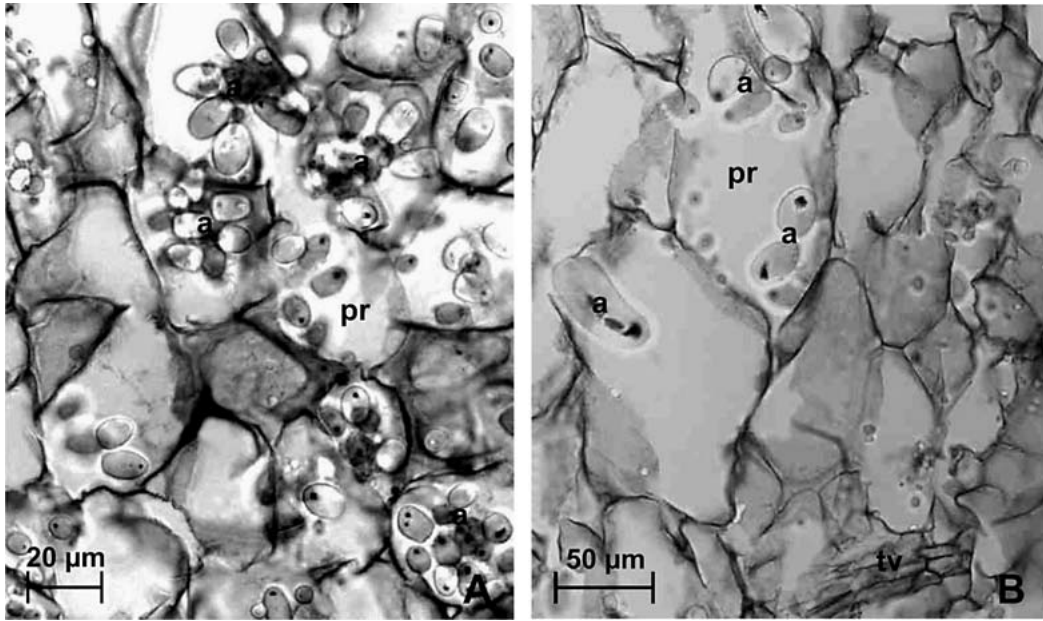


Fig. 3. Corte de parénquima de reserva (sin infectar) de tubérculos de papa andina. A: variedad 'Collareja'. B: variedad 'Tuni'. Abreviaturas: a: almidón; pr: parénquima de reserva; tv: tejidos vasculares.

Si bien las alteraciones histológicas inducidas por *Meloidogyne* spp. en las dos variedades evaluadas fueron similares, la reacción de cada una de ellas fue diferente. Los tubérculos de 'Tuni' se caracterizaron por presentar: i) mayor cantidad de hembras instaladas en su interior y abundantes juveniles en distintos sectores del parénquima cortical de reserva, ii) células gigantes más hipertróficas, con núcleos de mayor tamaño, citoplasma con acumulación de abundante cantidad de almidón y paredes sin depósitos de lignina ni suberina. Ese conjunto de características indicaría que esta variedad sería más susceptible al parásito. En 'Collareja' se destacó la presencia de células con paredes gruesas y suberificadas que se encontraban rodeando tanto a hembras, masas de huevos como a estadios juveniles del nematodo.

La pared celular de los vegetales puede constituir una barrera física contra el ataque de patógenos. Ante la agresión de un

organismo se incrementa la formación de lignina y suberina destinadas a reforzarla, restringiendo la penetración del patógeno y previniendo posibles daños ocasionados por toxinas o enzimas hidrolíticas (Ride y Barber, 1987). Casos similares a lo observado en este trabajo en 'Collareja' han sido mencionados en tubérculos de *Dioscorea* spp. infectados por *M. incognita* en los cuales las hembras y sus masas de huevos se hallaron rodeadas por una peridermis (Jenkins y Bird, 1962) o por un anillo de tejido necrótico, tal como se observó en *D. rotundata* (Fawole, 1988). En tubérculos del cultivar de papa Russet Burbank se detectó lignificación en las paredes de las células corticales que estaban en contacto con la masa de huevos de *M. chitwoodi* (Finley, 1981). Esas reacciones de los tejidos del tubérculo atacado interferirían con la reproducción del nematodo (Jenkins y Bird, 1962). Aquellos juveniles infectivos que emerjan de las masas de huevos no

serían capaces de atravesar esos estratos (Finley, 1981). De esta manera, se vería restringido su desplazamiento limitando la reinfección dentro del mismo. Por otro lado, ha sido mencionado que esas capas celulares contribuirían a la supervivencia del nematodo frente a condiciones adversas (Finley, 1981).

Si bien una de las variedades resultó ser más susceptible, en ambos casos pudo observarse daños cualitativos similares en el parénquima de reserva (puntos de color marrón). Encontrar tubérculos infectados sin una sintomatología externa observable a simple vista, constituye un riesgo si se utilizan como papa-semilla. Eso es agravado por las ferias agrícolas desarrolladas en la zona andina, en las que los agricultores comercializan su producción con la de campesinos de otras comunidades. De esta manera favorecen la dispersión de esos nematodos así como la de diversas especies perjudiciales. Dada la gran diversidad que caracteriza a este cultivo en la región, resulta de particular importancia evaluar cómo reaccionan otras variedades frente a la agresión de especies de *Meloidogyne* no sólo a nivel radical sino también en tubérculos.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Secretaría de Ciencia y Técnica (Universidad Nacional de Río Cuarto y Universidad Nacional de Córdoba) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el apoyo financiero. Agradecen igualmente al Dr. Renato Inserra (Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Nematology Section, Gainesville, Florida, USA) por sus valiosas apreciaciones acerca del manuscrito.

#### LITERATURA CITADA

- Baayen, R. P., G. B. Oullette, y D. Rioux. 1996. Compartmentalization of decay in carnations resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi. *Phytopathology* 86(10): 1018-1031.
- Brodie, B. B., K. Evans y J. Franco. 1993. Nematode parasites of potatoes. *En: K. Evans, D. L. Trudgill, y J. M. Webster (eds.). Plant parasitic nematodes in temperate agriculture.* CAB International, Wallingford, UK. pp. 87-132.
- Chaves, E. y M. S. Torres. 2001. Nematodos parásitos de la papa en regiones productoras de papa semilla en la Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía* 21(3): 245-259.
- D'Ambrogio de Argüeso, A. 1986. Manual de técnicas en histología vegetal. Hemisferio Sur S. A. Buenos Aires, Argentina. 83 pp.
- Doucet, M. E. y E. L. de Ponce de León. 1995. *Meloidogyne* spp. (Nemata): una seria amenaza para la papa (*Solanum tuberosum* L.). *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 26(1):45-51.
- Fawole, B. 1988. Histopathology of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) infection on white yam (*Dioscorea rotundata*) tubers. *Journal of Nematology* 20(1):23-28.
- Finley, A. M. 1981. Histopathology of *Meloidogyne chitwoodi* (Golden *et al.*) on russet burbank potato. *Journal of Nematology* 13(4):486-491.
- Harris, N. y K. J. Oparka. 1994. Plant cell biology. A practical approach. Oxford University Press, Inc., New York. 319 pp.
- Jenkins, W. R. y G. W. Bird. 1962. Nematodes associated with wild yam, *Dioscorea* spp., with special reference to the pathogenicity of *Meloidogyne incognita*. *Plant Disease Reporter* 46:858-860.
- Johansen, D. A. 1940. *Plant Microtechnique.* McGraw-Hill Book Co., Inc., New York. 523 pp.
- Lax, P., M. E. Doucet, C. Gallardo, S. Muruaga de L'Argentier y H. Vilté. 2006. Plant-parasitic nematodes detected in Andean tubers from Argentina and Bolivia. *Nematologia Brasileira* 30(2):195-201.
- Mondino, E. A., E. J. Chaves y A. M. Clausen. 2006. Distribution of nematodes in potato fields soil in Andean Valleys of Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía, UBA* 26(2):141-148.
- Montero, Z., C. García, L. Salazar, R. Valverde y L. Gómez-Alpizar. 2007. Detección de *Meloidogyne incognita* en tubérculos de papa en Costa Rica. *Agronomía costarricense* 31(1):77-84.
- O'Brien, T. P. y M. E. McCully. 1981. The study of plant structure: principles and selected methods. *Termaarphi PTY Ltd., Melbourne, Australia.* 339 pp.
- Ride, J. P. y M. S. Barber. 1987. The effects of various treatments on induced lignification and resistance of wheat to fungi. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 31:349-360.



Vovlas, N., D. Mifsud, B. B. Landa y P. Castillo. 2005.  
Pathogenicity of the root-knot nematode *Meloid-*

*ogyne javanica* on potato. Plant Pathology 54:657-  
664.

---

*Received:*

2/XVII/2007

*Accepted for publication:*

5/VII/2008

*Recibido:*

*Aceptado para publicación:*