

REFERENCES

1. Bird, G.W., J.R. Rich, and S.U. Gover. 1974. *Phytopathology* 64:48-51.
2. Gerdemann, J.W. 1968. *Ann. Rev. Phytopathol.* 6:397-418.
3. Gerdemann, J.W. 1970. *In: Root Diseases and Soilborne Pathogens*. T.A. Toussoun, R.V. Begar and P.E. Nelson, eds. U. of Calif. Press, Berkeley, 125-129.
4. Gerdemann, J.W., and J.M. Trappe. 1974. *Mycologia Memoir* No. 5. New York Botanical Garden, N.Y. 76 p.
5. Nesheim, O. Norman and M.B. Linn. 1969. *Phytopathology* 59:297-300.
6. Phillips, J.M. and D.S. Hayman. 1970. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55:158-163.
7. Pflieger, F.L. and E.L. Stewart. 1976. *Proc. Am. Phytopathol. Soc.* 1976. 3: (In Press).
8. Stelle, R.G D. and J.H. Torrie. 1960. *Principles and Procedures of Statistics*. McGraw-Hill Book Co., New York, N.Y. 481 pp.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the technical contributions of Steve L. Brown, and Susan E. Corcoran and the financial support of the Alabama Peanut Producers Association.

DESCRIPCION DE UN NUEVO METODO DE COLORACION Y DESTENIMIENTO PARA LA VISUALIZACION EFECTIVA DE ORGANOS INTERNOS DE LOS NEMATODOS [A NEW METHOD FOR THE DIFFERENTIAL STAINING OF INTERNAL ORGANS OF NEMATODES]. R. Rodríguez-Kábana y Peggy S. King, Department of Botany and Microbiology, Auburn University, Auburn, Alabama, U.S.A. 36830.

RESUMEN

Se estudió el uso del tinte azul de toluidina al 0.05% (p/v) y un regulador de fosfato (0.05M, pH 4.6) para efectuar la coloración de especímenes *in toto* de *Hoplolaimus galeatus* y de *Helicotylenchus dihystera*. La inmersión de los nemátodos en el tinte por 7 hrs a 60C dió muy buena coloración. Subsiguientemente, cuando los especímenes se sometieron a un lavado en una solución reguladora de fosfato (0.01 M, pH 4.6) por 5 hrs a 55-60C se obtuvo una buena resolución de la región esofágica y del aparato reproductor tanto en las hembras como en los machos. Resultados igualmente satisfactorios se obtuvieron a temperaturas más bajas cuando se aumentó la duración del proceso.

INTRODUCCION

La enseñanza de la taxonomía en nematología se dificulta debido a la clasificación de especímenes en base a caracteres morfológicos que muchas veces son difíciles de visualizar por el principiante. Las dificultades aumentan cuando solamente se dispone de microscopios ordinarios de poder resolutivo inadecuado. Sin embargo, la literatura (1, 2, 9) sugiere técnicas de coloración para solucionar estos problemas. Por ejemplo, recientemente hemos sugerido la utilización de técnicas histoquímicas para visualizar detalles morfológicos de la cutícula de nemátodos sin necesidad de usar equipos costosos (6). Este artículo describe un método de teñir los ácidos nucleicos (3, 5) para la mejor visualización de los sistemas reproductivo, digestivo y órganos internos de los nemátodos.

MATERIALES Y METODOS

1. *Preparación de espécimen*es. Los nemátodos fueron extraídos por el método de flotación y cernidura (7, 8) directamente de un suelo limo-arenoso cultivado con algodón. Posteriormente, los espécimenes se lavaron en agua desmineralizada y seguidamente se les sometió a un tratamiento con formalina diluida al 0.5% (v/v) para obtener una muerte lenta y sin convulsiones que pudieran modificar la apariencia normal de los mismos. Para efectuar la fijación de tejidos (4) los espécimenes se transfirieron a un platillo de Siracusa (5 cm diam) que contenía 10 ml de una solución de paraformaldehído por un período mínimo de 8-10 hrs. Luego de fijados se lavaron en agua desmineralizada por unos 2-5 min manteniendo el agua ligeramente agitada durante el lavado.

2. *Solución colorante*. El colorante se preparó mezclando volúmenes iguales de una solución acuosa al 1% (p/v) de azul de toluidina y una solución reguladora 0.01 M de fosfato ($\text{PO}_4 \text{H}_2 \text{Na-PO}_4 \text{HNa}_2$) con un pH de 4.6.

3. *Determinación de la temperatura óptima para la coloración*. Estudios preliminares con las dos especies antes mencionadas indicaron que a una temperatura ambiental de 25-30C la coloración de espécimenes ocurre muy lentamente, necesitando períodos de más de 48 hrs para obtener una coloración adecuada. Por esta razón se efectuó un ensayo para determinar la temperatura ideal para el teñido total de los nemátodos en un período de 7 hrs. Los espécimenes ya fijados se pasaron a platillos de Siracusa (2 cm diam) que contenían 1 ml de la solución colorante. Luego, los platillos se colocaron en cajas de Petri con agua para evitar la desecación por evaporación. Cada caja conteniendo tres platillos con siete espécimenes por platillo se incubaron a temperaturas de 30, 35, 40, 45, 50, 55, y 60C por 7 hrs. Posteriormente las cajas y su contenido se movieron a una temperatura constante de 20C donde se mantuvieron hasta hacer las observaciones. Previamente a la observación el contenido de cada platillo se transfirió a otro de 5 cm de diámetro lavándose el contenido del primero en el segundo con agua desmineralizada. Este paso resultó en la dilución de la solución colorante de manera que se pudieran observar los espécimenes directamente. El grado de coloración general de cada espécimen se determinó por observación directa con un microscopio de disección ordinario usando una escala de valores de 0 a 5, donde 0 representaba una carencia total de color y 5 una coloración completa. Las observaciones sobre el grado de coloración del esófago, gónadas, intestino, y región caudal también se hicieron utilizando la misma escala, pero con la ayuda de un microscopio ordinario y con los espécimenes montados en un portaobjetos.

4. *Determinación de la temperatura y tiempo de exposición óptimos para la diferenciación*. Luego de teñidos los espécimenes se pasaron a platillos (2 cm diam) que contenían 2 ml del regulador de fosfato (0.01 M, pH 4.6) con el propósito de efectuar la diferenciación de los órganos mediante la difusión del exceso del colorante. La metodología utilizada en la determinación de la temperatura y tiempo de exposición óptimos fué similar a la descrita para el proceso de coloración. Las observaciones sobre el grado de desteñimiento para cada temperatura se hicieron a las 5, 16, y 24 hrs después de iniciado el proceso.

RESULTADOS Y DISCUSION

El grado de coloración de espécimenes con azul de toluidina depende no sólo del tipo de tejido sino también del pH de la solución reguladora usada en la preparación del colorante. El pH de la solución utilizada en nuestros estudios, 4.6, facilita la coloración

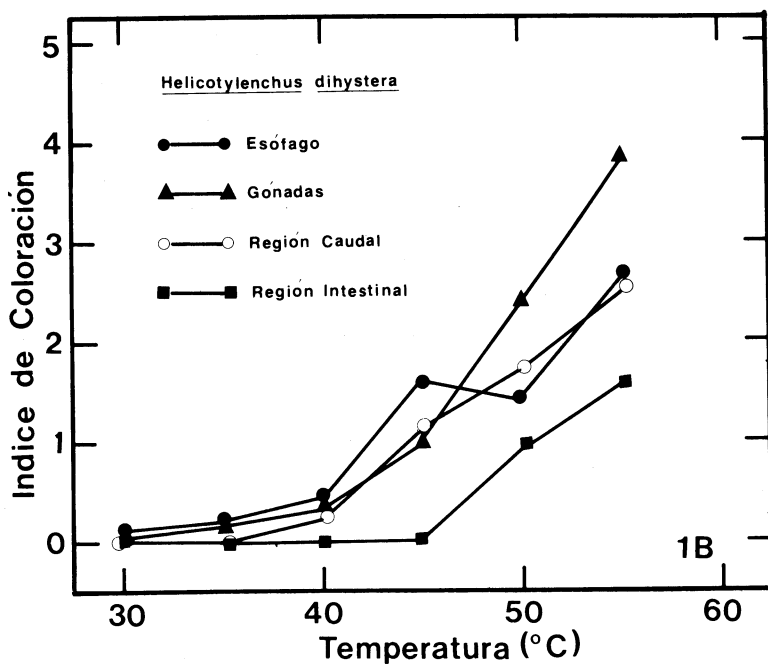
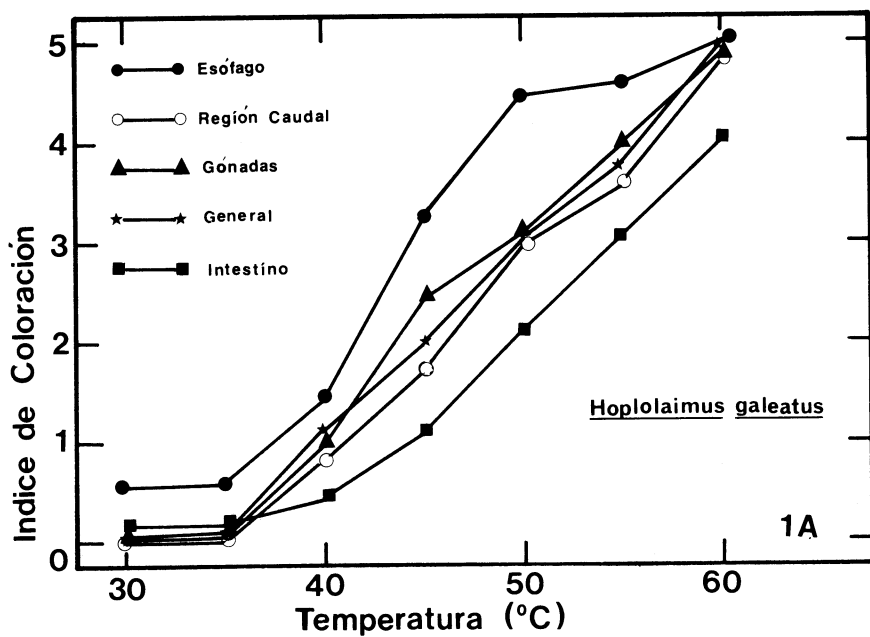
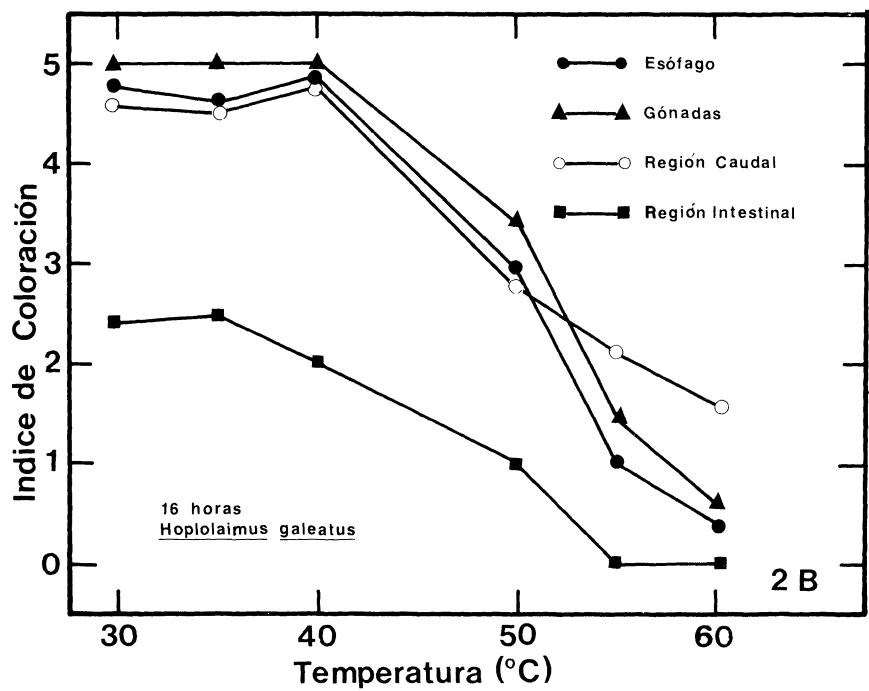
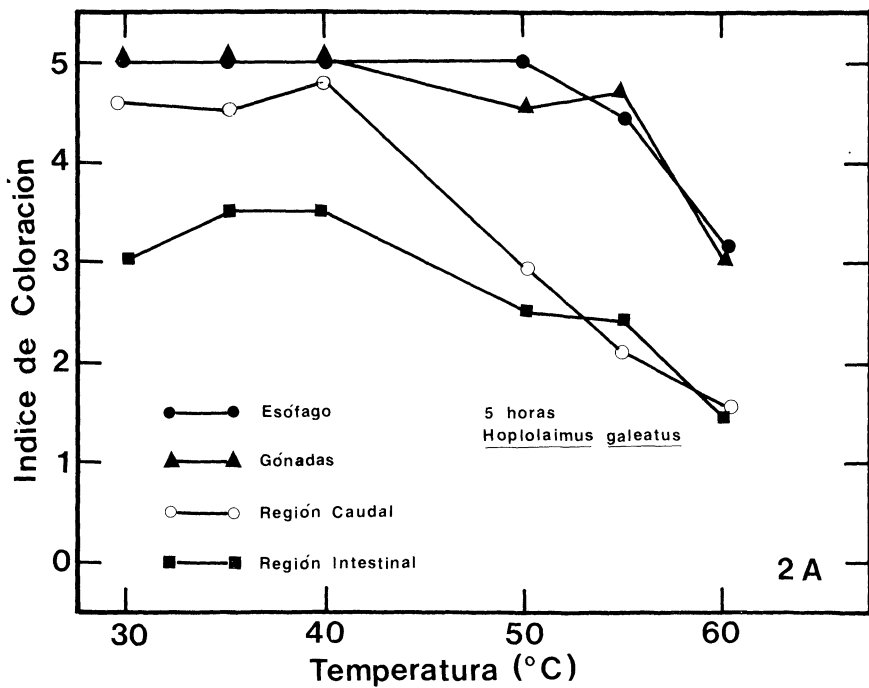


Figura 1. Efecto de la temperatura en el grado de coloración general, órganos y otras partes de *Hoplolaimus galeatus* (a) y de *Helicotylenchus dihystra* (B).



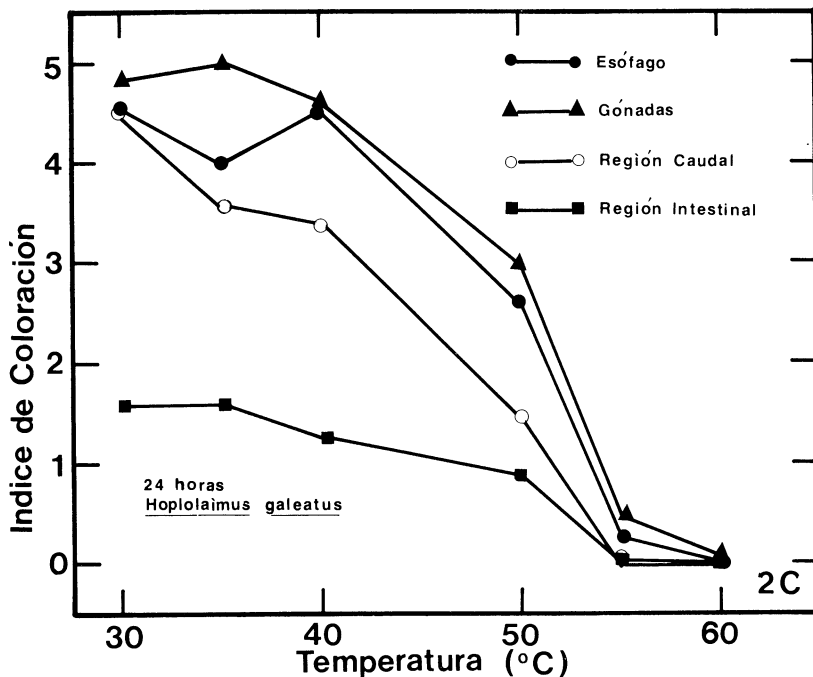


Figura 2. Relación entre la duración del lavado y la temperatura sobre el grado de diferenciación de diferentes partes de especímenes teñidos de *Hoploaimus galeatus*.

de tejidos y células con alto contenido de ácidos nucleicos (3, 4). Los resultados obtenidos con *H. galeatus* (Fig. 1A) y *H. dihystra* (Fig. 1B) señalan la necesidad de efectuar la coloración a temperaturas entre 55 y 60°C para obtener una coloración adecuada dentro de un período de 6-7 hrs sin tener que utilizar temperaturas más altas que pudieran causar cambios estructurales significativos en la morfología de los especímenes. Sin embargo, el proceso de lavado o diferenciación en el regulador de fosfato es el paso más importante de la técnica antes descrita. Este proceso permite la eliminación por difusión del exceso de colorante en tejidos con poca afinidad por el azul de toluidina, resaltando aquellos que tienen un alto contenido de ácidos nucleicos, como son las gónadas. Los resultados obtenidos en la diferenciación de órganos internos en *H. galeatus* (Fig. 2 A-C; 3 A-D) sirven para ilustrar este principio. Las regiones de menor retención son las caudales e intestinales, mientras que las gónadas y el esófago muestran un alto grado de retención. Una resolución efectiva depende de obtener un alto valor en lo que llamamos el índice de diferenciación y que definimos, para propósito de este estudio, como la relación entre grados de coloración:

$$\text{Índice de coloración} = (\text{Gónadas} + \text{Esófago}) / 1 + \text{Intestino.}$$

Los resultados nos indican que el índice aumenta por lo general con la temperatura y el tiempo de exposición. Así tenemos, que una exposición por 5 hrs a 55°C es adecuada para obtener una buena resolución en *H. galeatus* (Fig. 2A). También, se pueden obtener resultados semejantes a temperaturas más bajas. Por ejemplo, incrementando

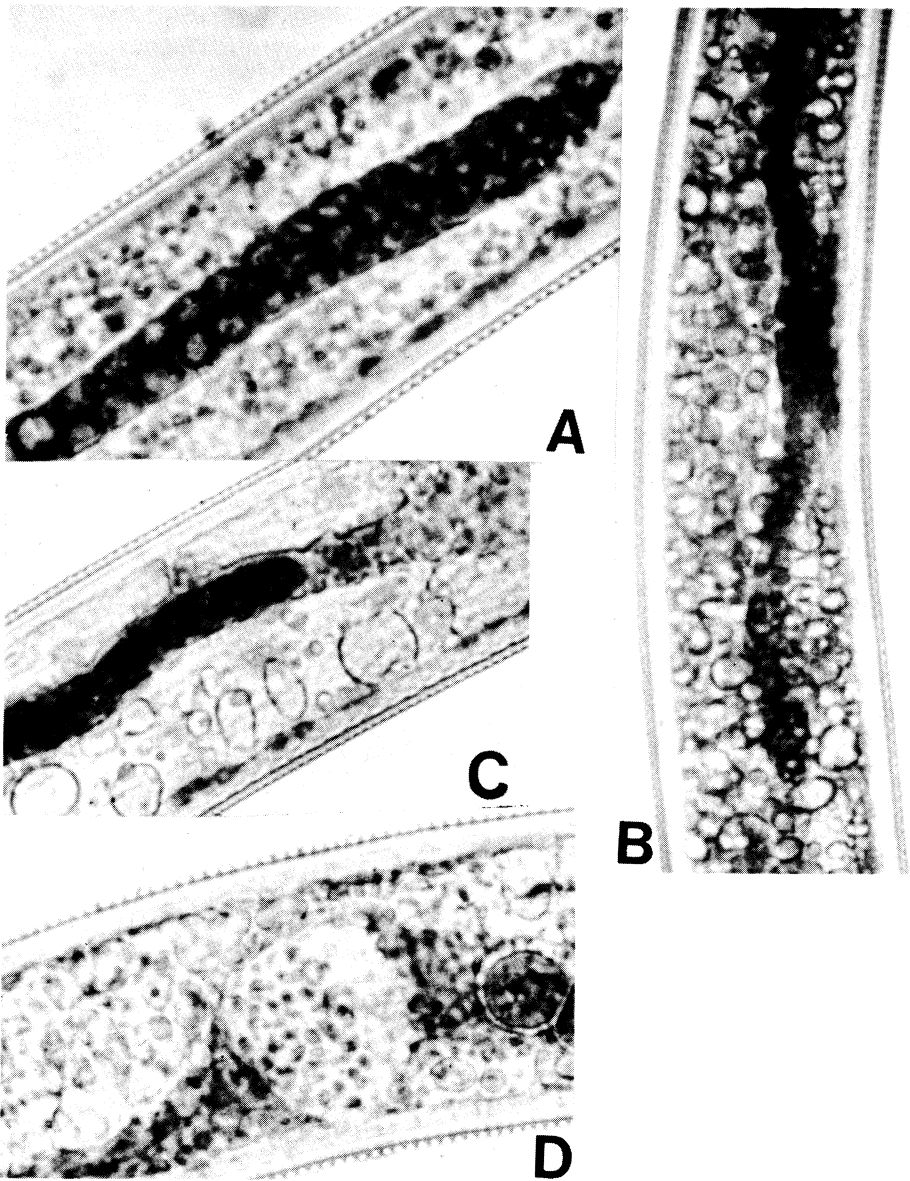


Figura 3. Resultados obtenidos con la técnica de tñido con azul de toluidina en la coloración de *Hoplolaimus galeatus*. A. Células generatrices del aparato reproductivo del macho (430X). B. Células primordiales del aparato reproductivo de una larva hembra (430X). C. Detalle de la parte anterior de la vesícula seminal y células generatrices de un macho (430X). D. Parte de un ovario con espermateca (430X).

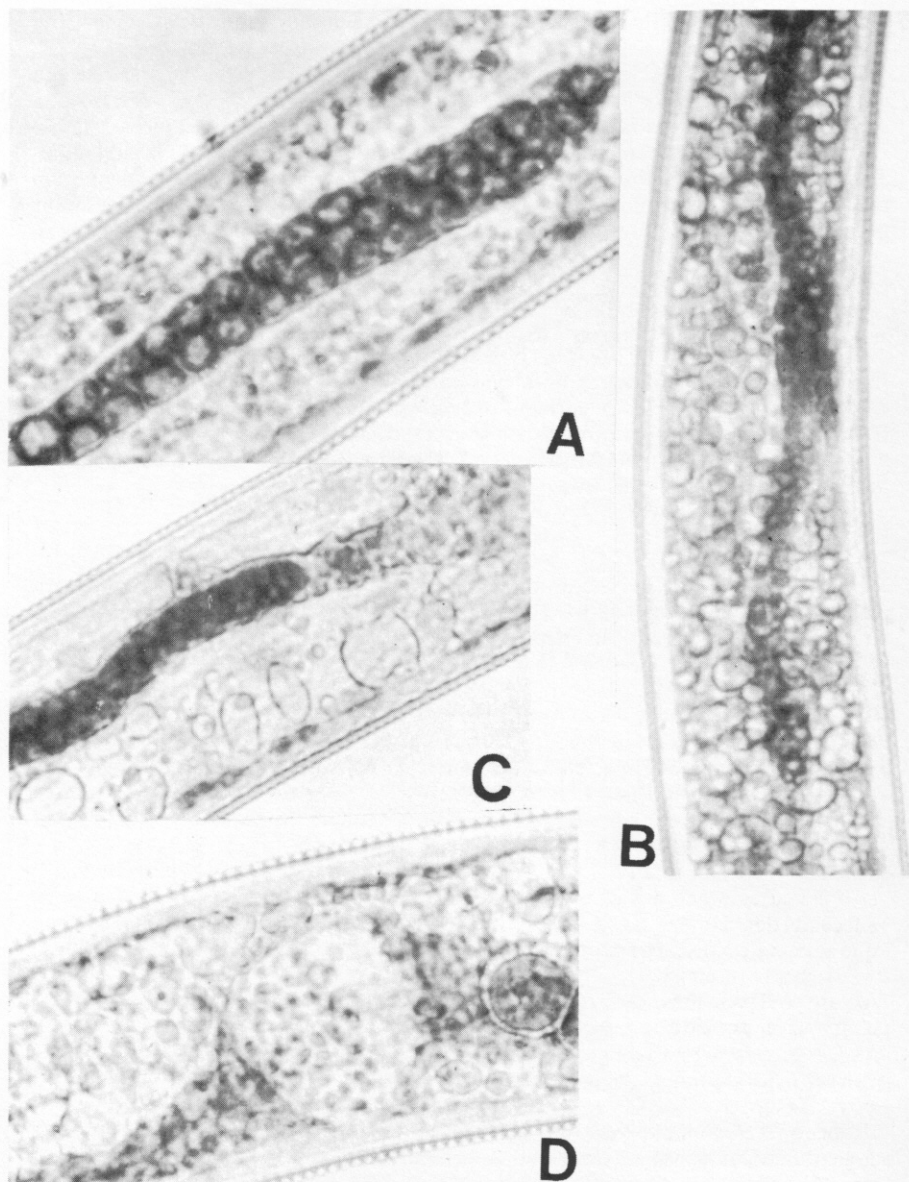


Figura 3. Resultados obtenidos con la técnica de teñido con azul de toluidina en la coloración de *Hoplolaimus galeatus*. A. Células generatrices del aparato reproductivo del macho (430X). B. Células primordiales del aparato reproductivo de una larva hembra (430X). C. Detalle de la parte anterior de la vesícula seminal y células generatrices de un macho (430X). D. Parte de un ovario con espermateca (430X).

el tiempo de exposición a 16 y 24 horas se puede obtener un alto grado de diferenciación a 40C (Fig. 2B-C).

En conclusión los resultados indican que el método de teñir descrito permite una coloración efectiva de los órganos reproductores de *H. galeatus* y *H. dihystra*, lo que a su vez permite una visualización más efectiva sin necesidad de microscopios costosos. Hemos ensayado esta técnica en *Pelodera chitwoodi* y otras especies de la subfamilia Tylenchinae, encontrando grandes variaciones en los periodos de exposición que son necesarios para obtener una coloración y diferenciación adecuada. Por lo general, los periodos de exposición fueron de menor duración que en los nemátodos utilizados en este estudio.

ABSTRACT

The use of a .05% (w/v) toluidine blue solution in 0.05M, pH 4.60 phosphate buffer for *in toto* staining of nematodes was studied with *Hoplolaimus galeatus* and *Helicotylenchus dihystra*. Treatment of fixed specimens in the solution for 7 hrs at 60C resulted in general staining. When stained specimens were immersed for 5 hrs at 50-60C in phosphate buffer (0.01M, pH - 4.6) good differentiations of the esophagous and reproductive structures was obtained.

REFERENCIAS

1. Bedding, R.A. 1968. Nematologica 13:643; 2. Cairns, E.J. 1960. Methods in nematology: a review. pp. 33-84. En: J.N. Sasser y W.R. Jenkins (eds): Nematology. Univ. North Car. Press, Chappel Hill, 480 pp; 3. Lison, L. 1960. Histochemie et Cytochimie Animales. Gauthier-Villars, Paris. 842 pp; 4. Lynn, J.A., J.H. Martin, y G.J. Race. 1966. Am. J. Clin. Path. 45:704-713; 5. Pearse, A.G.E. 1968. Histochemistry Theoretical and Applied, Vol. 1. Little Brown y Cia., Boston, 759 pp.; 6. Rodríguez-Kábana, R., y Peggy S. King. 1976. Nematropica 6:34-40; 7. Rodríguez-Kábana, R., y Peggy S. King. 1975. J. Nematology 7:54-59; 8. Rodríguez-Kábana, R., y Peggy S. King. 1972. Plant Dis. Repr. 56:1096; 9. Southey, J.F. 1970. Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. Ministry of Agric., Fish., and Food Tech. Tech. Bull. No. 2, 148 pp.

RESEARCH NOTES — NOTAS DE INVESTIGACION

HETERODERA GRAMINIS, FIRST RECORD FOR TRINIDAD, WEST INDIES [*HETERODERA GRAMINIS*, PRIMER REGISTRO EN TRINIDAD, INDIAS OCCIDENTALES]. Kenneth M. Farrell, Nematology Department, Rothamsted Experimental Station, Harpenden, Herts., England.*

Reports of *Heterodera species* from the West Indies are limited. *Scotto La Massése* (1) mentioned unidentified second-stage juveniles from soil around pigeon pea (*Cajanus cajan* Mill.) in Marie Galante. Singh reported an unidentified *Heterodera* in Trinidad (2), probably *H. sacchari* Luc & Merny, from soil in sugarcane museum plot at the University of the West Indies Field Station (3). It was identified from second-stage juveniles only.

Cysts containing viable eggs were recovered from bamboo grass (*Paspalum fasciculatum* Willd.) in another museum plot at the University of the West Indies Field Station. The cysts and second-stage juveniles resemble those of *H. graminis*, except in