

## LITERATURE CITED

1. Allen, M. W. 1955. Univ. Calif. Publ. Zool. 61:129-166;
2. Filipjev, I. N. 1936. Proc. Helm. Soc. Wash. 3:80-82;
3. Goodey, T. 1932. J. Helminthol. 10:75-180;
4. Seinhorst, J. W. 1959. Nematologica 4:67-69;
5. Siddiqi, M. R. 1970. Proc. Helm. Soc. Wash. 37:68-77;
6. Steiner, G. 1914. Arch. Hydrobiol. 9:259-276;
7. Tarjan, A. C. 1964. Proc. Helm. Soc. Wash. 31:270-280;
8. Tarjan, A. C. 1973. Proc. Helm. Soc. Wash. 40:123-144;
9. Wallace, H. R. & D. N. Greet. 1964. Parasitology 54:129-144.

TECNICAS DE COLORACION CON HALOGENOS PARA MOSTRAR DETALLES CUTICULARES DE NEMATODOS [HALOGEN STAINING TECHNIQUES FOR DEMONSTRATING CUTICULAR DETAILS IN NEMATODES]. R. Rodríguez-Kábana, y Peggy S. King, Department of Botany and Microbiology, Auburn University, Auburn, Alabama, E.E.U.U., 36830.

## RESUMEN

Este trabajo presenta resultados de un estudio sobre la adaptación de técnicas de coloración con haluros de plata para visualizar detalles cuticulares de nemátodos con el microscopio de luz. Los nemátodos utilizados en el estudio fueron matados lentamente en una solución diluida de formalina (0.01 - 0.10 % v/v). Después de relajados los especímenes se fijaron con formalina (10% v/v) o paraformaldehído, y se lavaron con agua demineralizada. En la técnica de iodización, los nemátodos fijados se sumergieron en 1 ml de una solución de iodo 0.01 N en un platillo cóncavo de Syracuse de 2 cm de diámetro. La duración del periodo de inmersión fué de 1 min para *Hoplolaimus galeatus*, 5 min para *Belonolaimus gracilis*, *Pelodera chitwoodi*, y *Tylenchorhynchus claytoni*, y 10 min para *Helicotylenchus dihystra*. Después de la iodización, los especímenes fueron transferidos a otro platillo con agua demineralizada y se lavaron por 2-30 seg. *B. gracilis* requirió 7-10 min de inmersión en agua para tener resultados satisfactorios. Después de lavados, los nemátodos fueron sumergidos en 0.2 N  $\text{NO}_3\text{Ag}$  por 3-4 min y después montados en agua para la observación microscópica. Para la mayoría de los nemátodos la técnica de la iodización permitió buena visualización de los campos laterales, estrias y estructuras cefálicas. Sin embargo, para *H. galeatus* el uso del método de bromización fué superior a la técnica de iodización. El método de bromización consistió en sumergir nemátodos fijados en una solución de  $\text{Br}_2\text{-BrK}$  (1 ml  $\text{Br}_2$  en 390 ml de 2 % (w/v) BrK) por 1 min, seguido de lavado en agua por 30 seg y tratamiento con 0.2 N  $\text{NO}_3\text{Ag}$  por 3-4 min.

## INTRODUCCION

La clasificación taxonómica de nemátodos es difícil para el principiante debido a las dificultades que presentan la observación de caracteres morfológicos esenciales para esta clasificación. La observación se complica cuando sólo se dispone de microscopios ordinarios que no poseen el poder resolutivo necesario para determinar detalles tan finos. En el pasado, ya se han sugerido técnicas de coloración para permitir un resalte de caracteres (3, 10). Así tenemos que Bedding (2) nos propuso el uso de soluciones acuosas de  $\text{NO}_3\text{Ag}$  para estos fines. También, Cairns

(3) en su exhaustiva contribución sobre métodos nematológicos hizo referencia a otras técnicas similares. En este trabajo presentamos una descripción y resultados obtenidos con dos métodos de tinción para resaltar detalles de la cutícula de nemátodos. El primer método se basa en el uso de tintura de yodo y el segundo en un reactivo a base de bromo. Ambos métodos utilizan la precipitación con  $\text{NO}_3\text{Ag}$  de los haluros de plata correspondientes seguido de la liberación de Ag y formación de sus óxidos negros.

## MATERIALES Y METODOS

**1. Colección y preparación de especímenes.** Los nemátodos para estos estudios fueron extraídos directamente de suelos infestados siguiendo una modificación de la técnica de flotación y cernimiento (8, 9). Los especímenes obtenidos de esta manera se transfirieron a un platillo plano de Syracuse (diam = 5 cm) que contenía 10 ml de una solución acuosa de formalina (0.01-1 % v/v). El propósito de esta solución fué el de obtener una muerte lenta de los animales sin convulsiones que pudieran modificar su apariencia normal. Una vez muertos y relajados, los especímenes se pasaron directamente a otro platillo similar con 10 ml de una solución 10% (v/v) de formalina o una de paraformaldehído (5) para efectuar la fijación de los tejidos. Este paso tomó generalmente como mínimo unas 8-10 hrs. Una vez fijados los nemátodos se lavaron en agua demineralizada tomándose unos 2-5 min en este proceso y cuidando mantener el agua ligeramente agitada durante el lavado.

**2. Halogenación.** El reactivo de yodo consistió en una solución 0.01 N de yodo. La solución se preparó añadiendo 1.25 g de  $\text{I}_2$  a otra que contenía 2.5 g de  $\text{IK}$  en 100 ml de agua demineralizada.

El reactivo de bromo se preparó disolviendo 7.80 g de  $\text{BrK}$  en 390 ml de agua demineralizada a la que se añadió 1 ml de  $\text{Br}_2$ .

En los procesos de iodización o de bromización los especímenes fijados se transfirieron a un platillo cóncavo de Syracuse de 2 cm de diam que contenía 1 ml del reactivo correspondiente. La duración de la inmersión dependió de la especie de nemátodo. Después de ser halogenados los nemátodos fueron lavados en agua demineralizada por unos 2-30 seg usándose también un platillo cóncavo de Syracuse con 1 ml de agua. Después de lavados los especímenes fueron transferidos a otro platillo con 1 ml de una solución 0.2 N de  $\text{NO}_3\text{Ag}$  donde se mantuvieron por 3-4 min. Los especímenes así tratados se consideraron listos para la observación microscópica que se hizo de la manera convencional montándolos en una gota de agua. Todas las observaciones se hicieron con un microscopio Bausch and Lomb Modelo TBV-8. Las fotografías se tomaron con una cámara Nikon de 35 mm acoplada al microscopio y con una película Pan-X (ASA 32) de la Kodak Co.

## RESULTADOS Y COMENTARIOS

Las técnicas descritas representan una adaptación de los métodos utilizados en histoquímica para mostrar la presencia de lípidos no saturados (4, 7). La de iodización es un procedimiento modificado del propuesto por Barrolier y Suchowsky (1) para la revelación de enlaces dobles en esos lípidos. El yodo de acuerdo con esos autores debiera combinarse con esos enlaces y luego precipitarse en presencia de  $\text{Ag}^+$ . Aunque no estamos de acuerdo con la explicación de esos autores, en nuestro caso si consideramos que el yodo se deposita en la cutícula de los nemátodos, quizás por enlaces covalentes y que luego se libera y forma el haluro de plata. Probablemente este fenómeno ocurre en los nemátodos debido no solo a la presencia de lípidos no saturados sino también por la de carbohidratos,

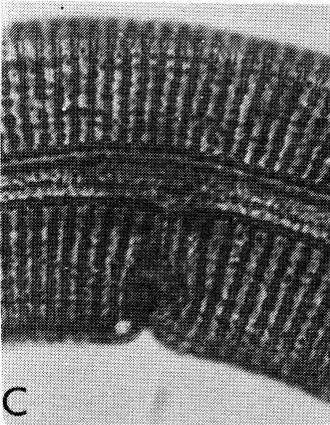
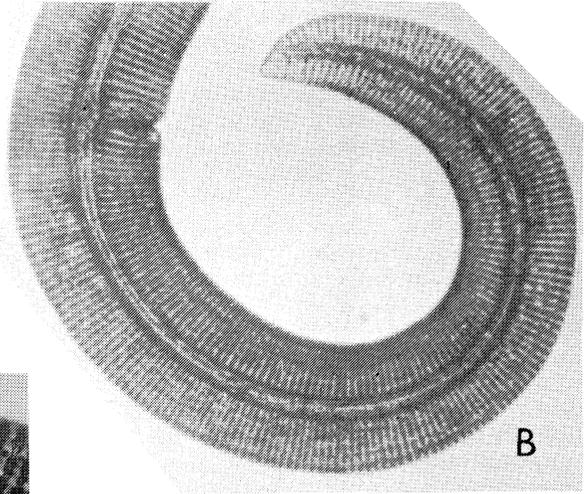
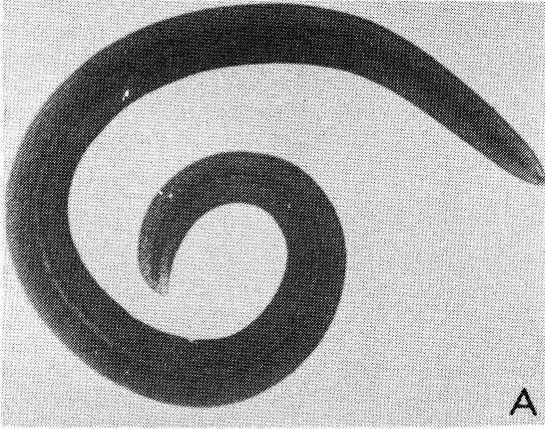


Figura 1. Efectos del método de iodización en el *Helicotylenchus dihystra*: A. espécimen entero (200 X); B. detalle de las regiones mediana y caudal (430 X); C. vulva (930 X).

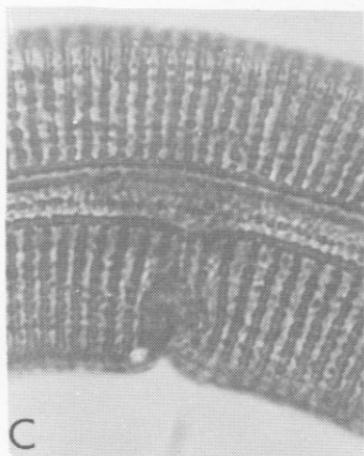
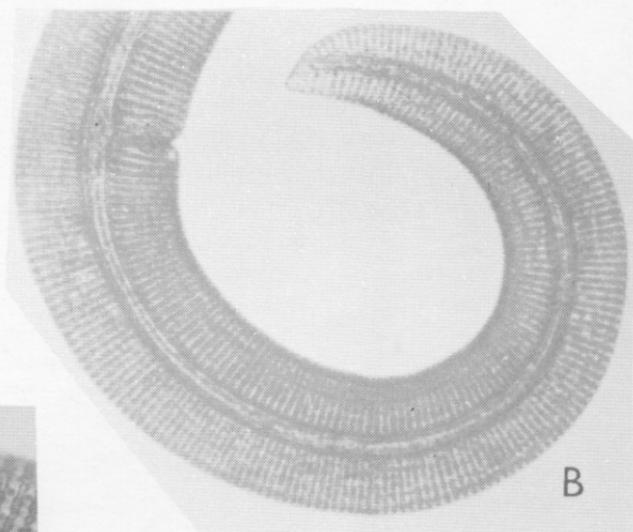
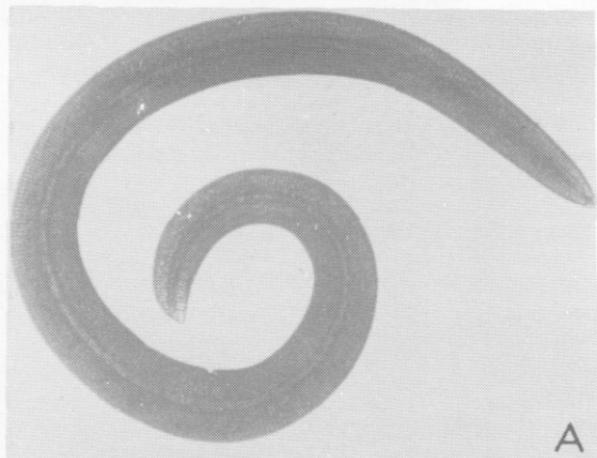


Figura 1. Efectos del método de iodización en el *Helicotylenchus dihystra*: A. espécimen entero (200 X); B. detalle de las regiones mediana y caudal (430 X); C. vulva (930 X).

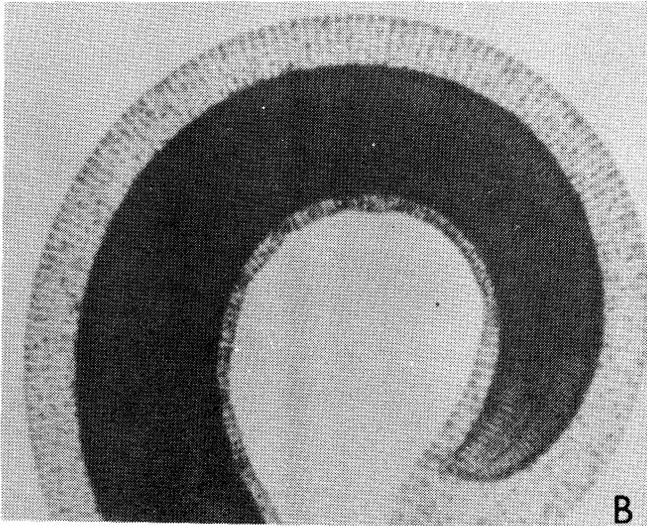
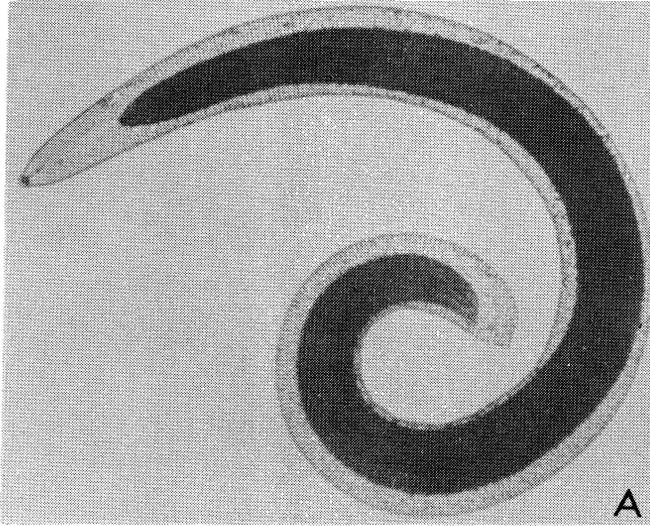


Figura 2. Efectos del procedimiento de iodización en una larva del *Helicotylenchus dihystra* en estado de muda: A. cuerpo entero (200 X); B. detalle de la región caudal (430 X).

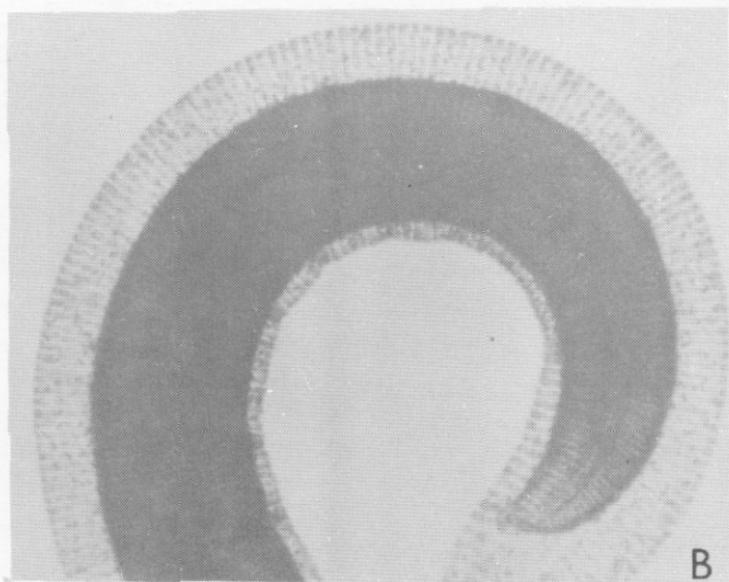
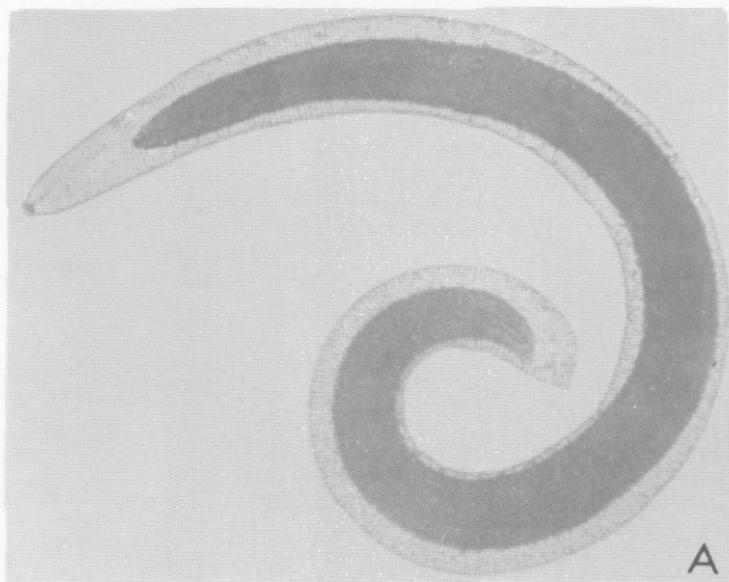


Figura 2. Efectos del procedimiento de iodización en una larva del *Helicotylenchus dihystra* en estado de muda: A. cuerpo entero (200 X); B. detalle de la región caudal (430 X).

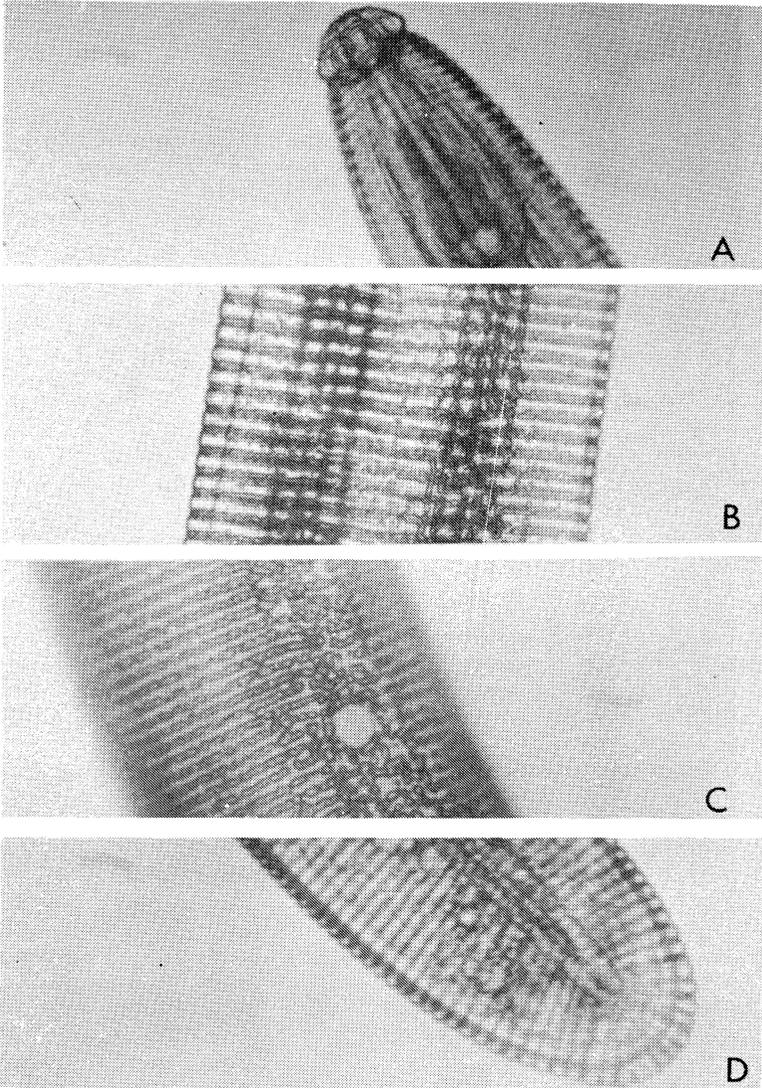


Figura 3. Visualización del *Hoplolaimus galeatus* por medio del método de brominación: A. región cefálica y corona (430 X); B. líneas y campos laterales (600 X); C. fásmido (600 X); D. región caudal (600 X).

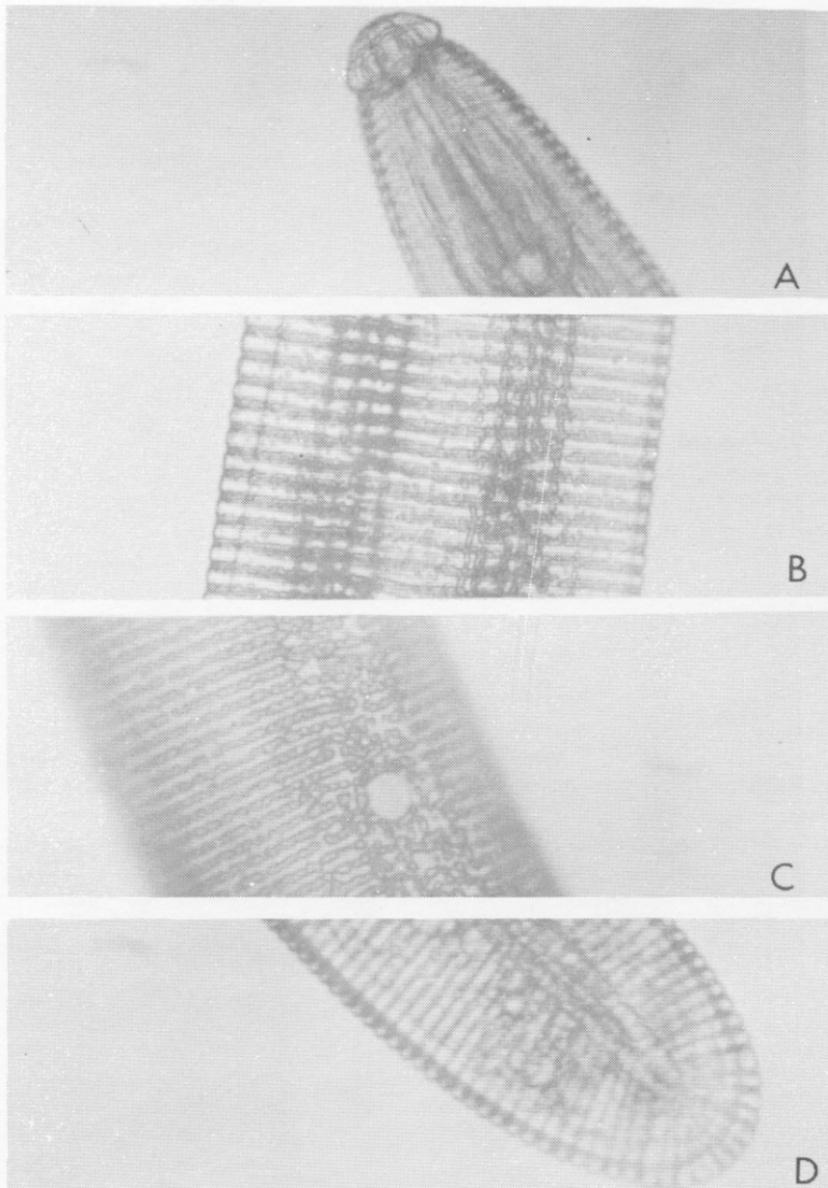


Figura 3. Visualización del *Hoplolaimus galeatus* por medio del método de bromización: A. región cefálica y corona (430 X); B. líneas y campos laterales (600 X); C. fásmido (600 X); D. región caudal (600 X).

glucoproteínas y otros materiales con los cuales las soluciones también reaccionan. Sea como fuese, los nemátodos adquieren rápidamente un color oscuro llegando a ennegrecerse totalmente si se les deja por mucho tiempo. Los especímenes también adquieren una cierta rigidez que a veces dificulta su traspaso al agua de lavado. La duración óptima del período de inmersión en la solución I- $\text{IK}$  varía mucho entre especies y es necesario determinarlo bajo observación continua para cada especie. El Cuadro 1 presenta el número de minutos que encontramos adecuado para las especies con las que adquirimos más experiencia.

El procedimiento de preparación y fijación de especímenes no tiene que ser seguido inmediatamente de los otros pasos descritos. Siempre es conveniente para fines didácticos, tener especímenes listos para la halogenación. En estos casos recomendamos mantener los especímenes ya fijados en una solución de 1-2% (v/v) de formalina que se pueden lavar en el momento de uso antes de halogenarlos. También si se desea guardar por unos días los especímenes ya coloreados es posible hacerlo si se les mantienen en la solución de  $\text{NO}_3\text{Ag}$ .

El procedimiento de iodización nos dió buena diferenciación de estriaciones, y líneas laterales de la cutícula como demuestran las Figuras 1A y 1B para el *H. dihystra*; también obtuvimos buena visualización de detalles de las regiones caudales y las aledañas a la vulva de este nemátodo (Fig. 1C). Las Figuras 2A y 2B muestran el efecto del procedimiento en una forma larval del *H. dihystra* dentro de una cutícula vieja de este nemátodo.

El proceso de iodización no dió resultados muy satisfactorios con especies del género *Hoplolaimus*. Sin embargo, cuando se reemplazó la inmersión en la tintura de yodo por una de 1 min en la solución  $\text{Br}_2$ - $\text{BrK}$  obtuvimos excelentes resultados. Las Figuras 3A-D presentan detalles de la cutícula del *H. galeatus* obtenidas con el proceso de bromización. El procedimiento del bromo es una adaptación del de Norton *et al.* (6) también como el de yodo, para demostrar enlaces dobles de lípidos no saturados. En nuestro caso sin embargo, creemos que

Cuadro 1. Relación entre el tiempo necesario para obtener una coloración satisfactoria con el método  $\text{I}_2$ - $\text{NO}_3\text{Ag}$  y las diversas especies de nemátodos.

| Especie                          | Duración (min) de inmersión en tintura de yodo |
|----------------------------------|--|
| <i>Belonolaimus gracilis</i>     | 5  |
| <i>Helicotylenchus dihystra</i>  | 10   |
| <i>Pelodera chitwoodi</i>        | 5  |
| <i>Hoplolaimus galeatus</i>      | 1  |
| <i>Tylenchorhynchus claytoni</i> | 5  |

también la explicación que dimos para el procedimiento de iodización sirve para la reacción del  $\text{Br}_2$  en la cutícula. En ambos casos la deposición de haluros de plata y la consiguiente liberación de plata elemental y formación de sus óxidos nos dan un "sombreo" o situación de "claro-oscuro" en la cutícula.

La etapa más crítica de estos procedimientos es el lavado o "diferenciación" después del tratamiento con las soluciones de halógeno. Si el lavado no es de duración suficiente la cantidad de  $\text{I}_2$  (o de  $\text{Br}_2$ ) que retiene el espécimen es tal que al pasarse a la solución de  $\text{NO}_3\text{Ag}$  se oscurece en tal grado que hace imposible la observación. Si por contrario, el lavado es muy prolongado no queda halógeno suficiente para obtener un "sombreo" adecuado. La determinación de la duración del lavado es muy particular de cada especie y aún de cada espécimen. El período óptimo se puede determinar por observación con un microscopio de disección (estereoscopio) de la clarificación paulatina del nemátodo hasta que se llegue a un grado adecuado de retención de halógeno.

En conclusión las técnicas descritas son sencillas y permiten un afinamiento del poder resolutivo de microscopios ordinarios sin necesidad de tener que recurrir a aparatos más costosos para la determinación de caracteres críticos para la clasificación taxonómica de nemátodos.

#### ABSTRACT

Halogen-silver staining techniques were used to clarify cuticular details in nematode specimens for light microscopy. Nematodes were killed in formaldehyde solutions (0.01-0.1 %, v/v) then fixed in paraformaldehyde or strong (10 % v/v) formaldehyde solution and then rinsed in demineralized water. This was followed by immersion in 1 ml of 0.01 N iodine solution. Times of immersion were 1 min for *Hoplolaimus galeatus*; 5 min for *Belonolaimus gracilis*, *Pelodera chitwoodi*, and *Tylenchorhynchus claytoni*; and 10 min for *Helicotylenchus dihystera*. After iodination, specimens were rinsed with demineralized water for 2-30 sec. After rinsing, nematodes were immersed in 0.2 N  $\text{AgNO}_3$  for 3-4 min; specimens were then mounted in water and observed. The iodination technique enhanced observation of lateral fields, striae, and cephalic structures for most nematodes. However, for *H. galeatus* use of a bromination method was superior to the iodine technique. The bromination method consisted of immersion of nematodes in  $\text{Br}_2$ -KBr solution (1 ml  $\text{Br}_2$  in 390 ml 2% (w/v) KBr) for 1 min, followed by rinsing in water for 30 sec, and treatment with 0.2 N  $\text{AgNO}_3$  for 3-4 min.

#### REFERENCIAS CITADAS

1. Barrolier, J., and G. Suchowsky. 1958. Acta Histochem. 5:294;
2. Bedding, R. A. 1968. Nematologica 13:643;
3. 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.;
4. Lison, L. 1960. Histochemie et Cytochimie Animales. Gauthier-Villars, Paris. 842 pp.;
5. Lynn, J. A., J. H. Martin, and G. J. Race. 1966. Am. J. Clin. Path. 45:704-713;
6. Noxton, W. T., S. R. Korey, and M. Brotz. 1962. J. Histochem. Cytochem. 10:83;
7. Pearse, A. G. E. 1968. Histochemistry Theoretical and Applied, Vol. 1. Little Brown y Cia., Boston, 759 pp.;
8. Rodríguez-Kábana, R., y Peggy S. King. 1975. J. Nematology 7:54-59;
9. Rodríguez-Kábana, R., and Peggy S. King. 1972. Plant Dis. Repr. 56:1096;
10. 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.