



UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA AGRICOLA

9

**GRUPOS DE ANASTOMOSIS DE
Rhizoctonia solani Kühn EN PAPA Y OTROS
CULTIVOS**



DIRECCION ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

T E S I S

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TITULO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
PROTECCION VEGETAL**

P R E S E N T A

RUBEN ELIAS MEDINA

CHAPINGO, MEX.

JULIO 1997.



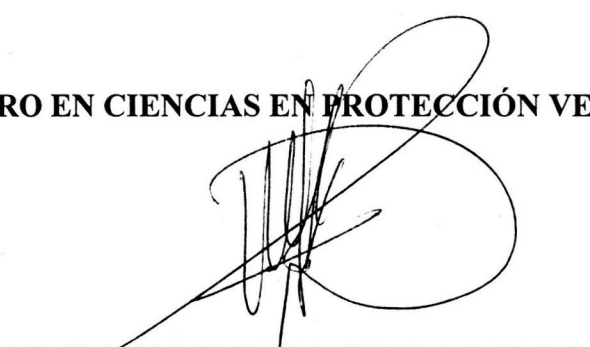
851361

GRUPOS DE ANASTOMOSIS DE *Rhizoctonia solani* Kühn EN PAPA Y OTROS CULTIVOS

Tesis realizada por Rubén Elias Medina bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

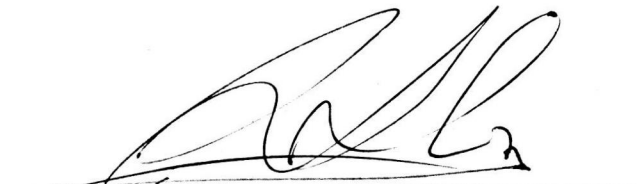
MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR:



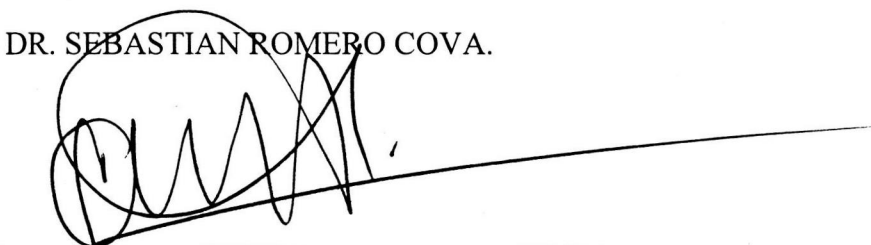
M. C. FRANCISCO PONCE GONZÁLEZ.

ASESOR:



DR. SEBASTIAN ROMERO COVA.

ASESOR:



M. C. CECILIO MENDOZA ZAMORA

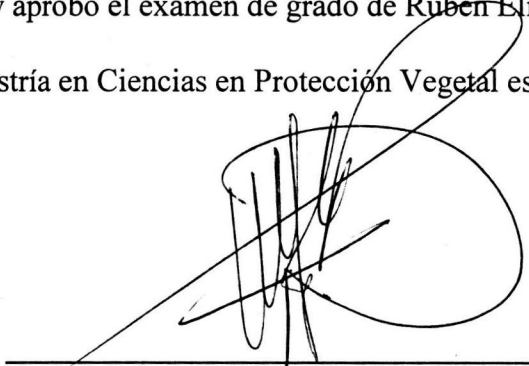
Chapingo, México. Mayo de 1997.

31491

GRUPOS DE ANASTOMOSIS DE *Rhizoctonia solani* Kühn EN PAPA Y OTROS CULTIVOS.

El jurado que revisó y aprobó el examen de grado de Rubén Elías Medina autor de la presente tesis de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal estuvo constituido por:

PRESIDENTE:



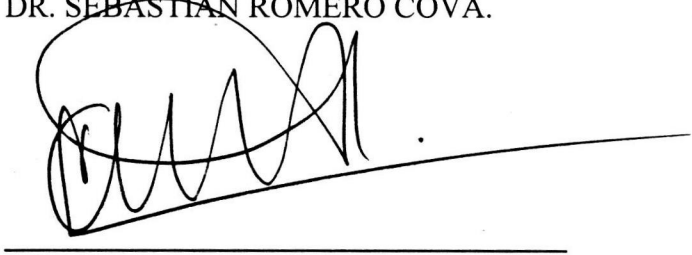
M. C. FRANCISCO PONCE GONZÁLEZ.

ASESOR:



DR. SEBASTIAN ROMERO COVA.

ASESOR:



M. C. CECILIO MENDOZA ZAMORA

Chapingo, México. Junio de 1997.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo y al Departamento de Parasitología Agrícola, por brindarme las facilidades para realizar mis estudios de postgrado.

Al M. C. Francisco, Ponce González por su dedicación, asesoría y dirección del presente trabajo.

Al Dr. Sebastián, Romero Cova y M. C. Cecilio, Mendoza Zamora, por su asesoría y sugerencias brindadas, para la realización del presente trabajo.

Al Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, ubicado en la ciudad de Irapuato, Guanajuato, por proporcionar lo aislamientos de referencia de los grupos de anastomosis y en especial a los investigadores Dr. Víctor, Olalde Portugal y M. C. Gil, Virgen Calleros, por su asesoría y por todas la atenciones que para conmigo tuvieron.

A los profesores de la Maestría en Protección Vegetal por sus valiosas enseñanzas.

A todas las personas que contribuyeron a la realización del presente trabajo en especial al Ing. Alfonso Molina Pérez.

DEDICATORIA

A MIS PADRES

José Soledad Elias Vargas

Estéfana Medina Frías

A MIS HERMANOS:

Javier

Rogelio

José

Salvador

Josefina

Serafín

A MI ESPOSA:

Ana Rosa

A MI HIJO:

Horacio Yahir

CONTENIDO

	PAG.
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMEN.....	xi
SUMMARY	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
A. El cultivo.....	5
B. El patógeno.....	6
1. Aspectos taxonómicos	9
1.1 Técnicas utilizadas en la clasificación de <i>R. solani</i>	10
1.1.1 Reacción de anastomosis hifal	11
1.1.1.1 Confrontación de aislamientos	12
1.1.1.2 Categorización de las reacciones de anastomosis hifal	15
1.1.1.3 Medición de las reacciones de anastomosis hifal	18
1.1.2. Otras técnicas utilizadas en la identificación de las técnicas de anastomosis hifal.....	19
1.1.2.1 Medio Stewart	19
1.1.2.2 Técnicas bioquímicas	20
1.2 Grupos de anastomosis de <i>R. solani</i>	26
1.2.1 AG1	28
1.2.1.1 AG 1-IA.....	29
1.2.1.2 AG 1-IB.....	29

1.2.1.3 AG 1-IC.....	30
1.2.2. AG 2	30
1.2.2.1. AG 2-1.....	31
1.2.2.2. AG 2-2 IIIB	31
1.2.2.3. AG 2-2 IV.....	32
1.2.3. AG 3	32
1.2.4. AG 4	33
1.2.4.1 AG 4-HG I.....	33
1.2.4.2 AG 4-HG II	34
1.2.5. AG 5	34
1.2.6. AG 6	35
1.2.6.1. AG 6-HG I.....	35
1.2.6.2. AG 6-HG V	35
1.2.7. AG 7	36
1.2.8. AG 8	36
1.2.9. AG 9	36
1.2.9.1 AG 9TP	37
1.2.9.2 AG 9TX.....	37
1.2.10. AG 10	37
1.2.11. AG 11	38
1.2.12. AG BI	38
1.3 Grupos puente y la relación entre grupos puente	39
1.4 Aislamientos que no presentan anastomosis entre ellos mismos.....	39
2. Grupos de anastomosis de <i>R. solani</i> que atacan papa.....	40
3. Sensibilidad de los grupos de anastomosis a los fungicidas.....	45

III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
1. Muestreo del material	50
2. Aislamiento del patógeno	51
3. Aislamientos de punta de hifa	51
4. Determinación de la condición nuclear	52
5. Determinación del grupo de anastomosis.....	52
6. Sensibilidad a fungicidas.....	55
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
1. Determinación de la condición nuclear	58
2. Determinación del grupo de anastomosis	59
3. Sensibilidad a fungicidas	65
4. Sensibilidad a pencycuron	65
5. Sensibilidad a fluazinam.....	69
V. CONCLUSIONES.....	76
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	77
VII. APÉNDICE.....	82

LISTA DE CUADROS

	PAG
Cuadro 1. Categorías de las reacciones de anastomosis hifal en <i>Rhizoctonia solani</i> (Carling, 1992)	18
Cuadro 2. Categorías de las reacciones de anastomosis en <i>Rhizoctonia solani</i> (Carling, 1996)	54
Cuadro 3. Concentraciones efectivas de pencycuron para <i>R. solani</i> AG 3, aislado de papa.....	66
Cuadro 4. Concentraciones efectivas de pencycuron para <i>R. solani</i> AG 4, aislado de chile	67
Cuadro 5. Concentraciones efectivas de pencycuron para <i>R. solani</i> AG 4, aislado de frijol	67
Cuadro 6. Concentraciones efectivas de pencycuron para <i>Rhizoctonia</i> sp. binucleado, aislado de haba.....	68
Cuadro 7. Concentraciones efectivas de fluazinam para <i>R. solani</i> AG 3, aislado de papa.....	70
Cuadro 8. Concentraciones efectivas de fluazinam para <i>R. solani</i> AG 4, aislado de chile	70
Cuadro 9. Concentraciones efectivas de fluazinam para <i>R. solani</i> AG 4, aislado de frijol	71
Cuadro 10. Concentraciones efectivas de fluazinam para <i>Rhizoctonia</i> sp. binucleado, aislado de haba.....	71

LISTA DE FIGURAS

	PAG
Figura 1. Células multinucleadas de <i>Rhizoctonia</i> (Aumento 40X).....	64
Figura 2. Células binucleadas de <i>Rhizoctonia</i> (Aumento 40X)	64
Figura 3. Categoría C3. Fusión sin muerte de células (Aumento 25X)	64
Figura 4. Categoría C2. Fusión con muerte de células (Aumento 25X)	64
Figura 5. Categoría C1. Punto de contacto (Aumento 25X)	64
Figura 6. Categoría C0. No hay interacción	64
Figura 7. Respuesta de los aislamientos AG 3, AG 4 y <i>Rhizoctonia</i> sp. binucleado al pencycuron.	74
Figura 8. Respuesta de los aislamientos AG 3, AG 4 y <i>Rhizoctonia</i> sp. binucleado al fluazinam.....	75

RESUMEN

Se colectaron aislamientos de *Rhizoctonia* de papa, frijol y haba de diferentes municipios de Estado de México y un aislamiento de chile de San Luis Potosí. Se determinó el número de núcleos por célula de cada aislamiento y se identificaron los grupos de anastomosis en base al concepto de anastomosis. Los aislamientos de papa, frijol y chile mostraron células multinucleadas y se identificó a la especie *Rhizoctonia solani*. Los 37 aislamientos colectados de papa fueron miembros del grupo de anastomosis AG 3; mientras que, los aislamientos de chile y frijol fueron AG 4. El aislamiento de haba presentó células binucleadas y fue identificado como *Rhizoctonia* sp. binucleado. Se evaluó la sensibilidad en laboratorio a los fungicida fluazinam y pencycuron, de un aislamiento de papa y los aislamientos de chile, frijol y haba. Estos aislamientos presentaron diferencias en su respuesta a los fungicidas evaluados. El aislamiento AG 3 fue el más sensible al pencycuron comparado con los demás aislamientos; los aislamientos de chile y frijol presentaron sensibilidad intermedia y el aislamiento de haba fue el menos sensible a este producto. En su respuesta al fluazinam el aislamiento de chile fue el más sensible, los aislamientos de papa y haba fueron medianamente sensibles y el aislamiento de frijol mostró sensibilidad baja. El aislamiento de papa fue más sensible al pencycuron que al fluazinam, los valores obtenidos de CE_{90} fueron 0.4354 y 41.704 $\mu\text{g/ml}$ de PDA, respectivamente. El aislamiento de chile fue ligeramente más sensible al fluazinam que al pencycuron con valores de la CE_{90} de 5.579 y 6.621 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. El aislamiento de frijol presentó mayor sensibilidad al pencycuron que al fluazinam su CE_{90} fue de 564.142 y 3458,86 $\mu\text{g/ml}$, para estos productos. El aislamiento de haba fue significativamente más sensible al fluazinam que al pencycuron pues su CE_{90} fue de 693.101 y 12591.7 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

SUMMARY

Isolates of *Rhizoctonia* of potato, bean and broad bean from different municipalities of Mexico State and an isolate of pepper from San Luis Potosi State were collected. The number of nucleus by cell of each isolate was determinate and the anastomosis groups were identified, in accordance with the concept of anastomosis. The isolates of potato, bean and pepper showed multinucleated cells and were identified as *Rhizoctonia solani*. The 37 isolates collected of potato were members of the anastomosis group AG 3; while the isolates of pepper and bean were AG 4. The isolate of broad bean showed binucleated cells, and was identified as *Rhizoctonia* sp. binucleated. The sensibility in laboratory of an isolate of potato and the isolates of pepper, bean and broad bean to the fungicides fluazinam and pencycuron was evaluated. These isolates showed differences in its response to the fungicides evaluated. The isolate AG 3 was more sensitive to pencycuron compared with the other isolates. The isolates of pepper and bean showed intermediate sensibility and the broad bean isolate was the less sensitive to these products. In response to fluazinam, the isolate of pepper was the more sensitive; the isolates of potato and broad bean were fairly sensitive and the isolate of pepper showed low sensibility. The isolate of potato was more sensitive to pencycuron than to fluazinam, the values obtained of CE_{90} were 0.4354 and 41.74 $\mu\text{g/ml}$ of PDA, respectively. The isolate of pepper was slightly more sensitive to fluazinam than to pencycuron with CE_{90} values of 5.579 and 6.6211 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The isolate of bean showed higher sensibility to pencycuron than to the fluazinam, its CE_{90} were 564.142 and 3458.86 $\mu\text{g/ml}$ for these products. The isolate of broad bean was significantly more sensitive to fluazinam than to pencycuron, since its CE_{90} was 693.101 and 12591.7 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

I. INTRODUCCIÓN

La papa se considera dentro de los productos hortícolas más importantes en la alimentación humana; representa el 37.7% de la producción mundial de hortalizas, que se estima en 700 millones de toneladas, ubicándola en primer lugar. En México, este cultivo ocupa el quinto lugar en cuanto a superficie sembrada, lo superan solamente el maíz, frijol, arroz y trigo; entre las hortalizas sólo los cultivos jitomate y chile verde ocupan una mayor superficie, y en producción sólo es superado por el jitomate. Actualmente, se siembran alrededor de 80 mil ha., de las cuales aproximadamente el 65% se encuentran establecidas en la región de las Sierras y Valles Altos, en donde destacan por su producción los Estados de Puebla, México, Tlaxcala y Veracruz (Anónimo, 1994).

Dentro de la problemática que presenta el cultivo de papa en México, el aspecto fitosanitario es el de mayor importancia y la forma de propagación (vegetativa), juega un papel muy importante, al ser el principal mecanismo de diseminación de enfermedades, como es el caso de algunos virus, bacterias y hongos. La enfermedad conocida con el nombre de costra negra, cuyo agente causal es el hongo *Rhizoctonia solani*, es especialmente favorecida por esta característica y actualmente en México, se considera la principal enfermedad ocasionada por hongos del suelo que atacan al cultivo de papa, por reducir los rendimientos y sobre todo la calidad de la producción. Además, las medidas de control no han logrado disminuir de manera exitosa las incidencias del patógeno.

El género *Rhizoctonia*, es un grupo grande, diverso y complejo de hongos, y es por esto que la clasificación de las especies ha generado gran controversia; sin embargo, la característica de número de núcleos de las hifas se ha constituido como el criterio taxonómico más importante para la separación de estas. Este fue propuesto por Parmeter *et al.* en 1967, quienes dividieron las especies en multinucleadas las cuales tiene su fase perfecta en *Thanatephorus cucumeris* y especies binucleadas con fase perfecta en el género *Ceratobasidium*.

En el “complejo *Rhizoctonia*” la especie más importante es *Rhizoctonia solani*, descubierta y descrita por Kühn en 1858 en Alemania. El hongo se caracteriza por presentar células multinucleadas, septas de tipo dolíporo, micelio de crecimiento rápido, con ramificaciones en ángulo recto o agudo próximas a la septa distal, constricción en la unión de las ramificaciones cerca del sitio de origen, hifas hialinas cuando jóvenes y marrón oscuras al envejecer y de diámetro mayor a las 5 micras (Cedeño, 1987).

La especie *R. solani* incluye aislamientos o cepas que varían considerablemente en cuanto a su patogenicidad, morfología de los esclerocios, apariencia en medio de cultivo y características fisiológicas, entre otras, situación que ha generado problemas en su clasificación. Debido a esto, se ha intentado agrupar de una manera lógica a cada uno de los aislamientos, y para ello se han utilizado dos técnicas: 1) la basada en las diferencias en patogenicidad, apariencia en medio de cultivo, características morfológicas, fisiológicas y de ecología; y 2) la basada en la reacción de anastomosis hifal (fusión de hifas) en medio de cultivo (Cedeño, 1987; Ogoshi, 1987).

El concepto de anastomosis fue propuesto por Matsumoto en 1932 y desde su introducción ha sido el avance más importante en el entendimiento y comprensión de la diversidad genética de *R. solani*. La anastomosis se define como la fusión de hifas con intercambio de núcleos entre hifas de un mismo grupo, aunque, puede existir fusión entre hifas de aislamientos diferente, pero esto no es muy frecuente (Vilgalys y Cubeta, 1994; Anderson, 1986). A los aislamientos clasificados de esta forma se les conoce como grupos de anastomosis (AG por sus siglas en inglés).

En la identificación de los aislamientos por anastomosis, es necesario confrontar los aislamientos de campo con aislamientos de referencia ya determinados y posteriormente evaluar e interpretar las reacciones citológicas que se observan en la zona de confrontación. Esta zona incluye el área donde las hifas de los dos aislamientos entran en contacto. Los aislamientos se colocan a una distancia de 3 a 4 cm. uno del otro y las mediciones se realizan entre las 48 y 72 hr. Existen tres métodos más comúnmente utilizados para determinar el grupo de anastomosis y en algunos de ellos permite conocer al mismo tiempo, el número de núcleos por célula: 1) papel celofán cubierto con una

capa de agua agar al 2% en cajas de petri, 2) portaobjetos cubiertos con una capa delgada de agua agar colocados en cajas de petri con una capa de agua agar al 2 % y 3) portaobjetos estériles con una capa de agua agar al 2% colocados en una cámara húmeda (Parmeter *et al.* 1969; Herr y Roberts, 1980; Castro *et al.* 1983; Kronland y Stanghellini, 1988).

Las sustancias más utilizadas en la tinción de núcleos, así como en la medición de las reacciones de anastomosis son: azul de tryfano y safranina O. Las técnicas de tinción en donde se utilizan estas sustancias son rápidas, aunque, tienen el inconveniente de que las preparaciones duran muy poco tiempo. Existen otras sustancias; sin embargo, las técnicas requieren mucho tiempo y en algunas ocasiones son muy complicadas (Herr, 1979; Kronland y Stanghellini, 1988).

La determinación del grupo de anastomosis se hace en base a las reacciones citológicas observadas en la zona de confrontación. Carling *et al.* (1988) y MacNish (1993), describen cuatro categorías (C0, C1, C2 y C3), que hasta la fecha son las más utilizadas en la identificación de grupos de anastomosis. Estas categorías describen con mayor precisión los diferentes tipos de reacciones y permiten hacer una mejor identificación de los aislamientos.

Se han descrito 11 grupos de anastomosis, los cuales varían ampliamente en su patogenicidad, rango de hospedantes, requerimientos de temperatura y sensibilidad a los fungicidas (Sneh *et al.* 1991; Carling y Sumner, 1992). Aunque, se ha determinado que el grupo AG 3 es el que ocasiona los daños más importantes en papa; sin embargo, existen reportes en donde se han encontrado, aunque en menor proporción, a los grupos AG 2-1, AG 4 y AG 5 (Carling y Leiner 1990a y 1990b; Alonso *et al.* 1994; Rocha *et al.* 1995; Virgen *et al.* 1996). Se ha observado, además, que estos grupos en particular, presentan diferentes niveles de sensibilidad a los diferentes fungicidas utilizados para su control (Kataria *et al.* 1990; Kataria *et al.* 1991; Olaya *et al.* 1994). Debido a esto se hace necesario determinar los grupos de anastomosis presentes en los cultivos, así como su sensibilidad a los fungicidas, factores determinantes en la implementación de programas de manejo de la enfermedad, consecuentemente el presente trabajo tuvo los siguientes.

OBJETIVOS.

1. Determinar los grupos de anastomosis de *R. solani* aislado de papa y otros cultivos.
2. Determinar por medio de bioensayos en laboratorio, la sensibilidad de estos grupos a los fungicidas fluazinam y pencycuron.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

A. EL CULTIVO

La papa se considera originaria de América del Sur (Perú, Ecuador y Bolivia). En Perú ya la cultivaban los incas desde hace 2 000 años y los españoles la llevaron a Europa en 1537. En Irlanda en el lapso de 1600-1845, constituyó la principal fuente de alimento y fueron ellos quienes la trajeron a América en 1719. Algunas de las especies de *Solanum*, entre ellas *Solanum demisum* son originarias de México (Valadez, 1996).

La papa está considerada como uno de los alimentos más importantes del mundo. Se ubica en el cuarto lugar en importancia mundial debido al contenido de proteínas obtenidas por unidad de superficie. En 1990 el consumo *per capita* en México fue de 15 kg. (Anónimo, 1994).

La producción de papa en el mundo representa el 37.7 % del total de la producción de hortalizas que se estima en 700 millones de toneladas, lo cual la ubica en primer lugar en este aspecto. En México, ocupa el quinto lugar en importancia superada solamente por los cultivos maíz, frijol, arroz y trigo; entre las hortalizas sólo los cultivos de jitomate y chile verde ocupan una mayor superficie, y en cuanto a producción sólo es superada por el jitomate. La superficie cosechada durante el período 1991-1993 fluctúa entre 70 y 75 mil hectáreas con un rendimiento promedio a nivel nacional de 18 ton/ha. Actualmente, se siembran alrededor de 80 mil ha., de las que se obtiene una producción aproximada de 1 millón 200 mil toneladas. Esta superficie comprende la zona de los Valles, que se caracteriza por la utilización de tecnología de punta y que abarca alrededor de 18 000 ha. La segunda región la constituyen las Sierras y Valles Altos, donde se practica una agricultura menos tecnificada y de subsistencia y que abarca 52 000 ha aproximadamente del total de la superficie sembrada con este cultivo en México. En esta zona los principales Estados productores son: Puebla, México, Tlaxcala y Veracruz (Anónimo, 1994).

En 1993 el Estado de México se ubicó en tercer lugar en cuanto a superficie cosechada y en cuanto a producción, con 8 522 ha y 130 374 ton, respectivamente. Las principales regiones productoras dentro del estado se encuentran en la parte sur de éste y abarca los municipios de Temascaltepec, Valle de Bravo y Amanalco, cuya producción se realiza en el ciclo otoño-invierno; San Felipe del Progreso, Zinacantepec y Tenango del Valle, en los cuales se produce en el ciclo primavera-verano (Anónimo, 1994).

El cultivo de papa se desarrolla preferentemente en climas fríos y templados, sin exceso de humedad que obstaculice la maduración de los tubérculos. En general, la temperatura óptima oscila entre 7 y 18 °C. Se adapta a terrenos diversos, con preferencia a los de textura mediana, los migajones arenosos y suelos orgánicos fuertes son ideales, en suelos minerales la adición de materia orgánica descompuesta es generalmente recomendable. El pH puede ser ligeramente ácido y variar entre un valor de 5.0 y 5.4 (Valadez, 1996).

Dentro de la problemática que presenta el cultivo de papa en México, el aspecto fitosanitario es el de mayor importancia y en donde la forma de propagación (vegetativa) juega un papel muy importante, al ser la principal fuente de inóculo de enfermedades, como es el caso de algunas causadas por virus, hongos y bacterias. La enfermedad conocida con el nombre de “Costra Negra”, cuyo agente causal es el hongo *Rhizoctonia solani* Kühn, es favorecida por esta característica y en la actualidad tal patógeno representa un gran problema para los productores de papa en todas las regiones productoras de este cultivo en México.

B. EL PATÓGENO.

Rhizoctonia solani fue descubierto y descrito por Kühn en Alemania en 1858 y después fue reconocido como un parásito importante en papa en Europa. En 1901 Dugar y Stewart lo reportaron por primera vez en América atacando papa (Rich, 1983). Actualmente, se encuentra presente en todo el mundo atacando plantas tanto cultivadas

como no cultivadas. Las pérdidas atribuidas a esta enfermedad en rendimiento en papa se ubican entre el 10 y 15%.

En México se considera a *Rhizoctonia solani* como la principal enfermedad ocasionada por hongos del suelo que atacan al cultivo de papa, debido a que reduce considerablemente los rendimientos y sobre todo la calidad de la producción. Además, presenta un efecto directo sobre los terrenos que se encuentran infestados con este patógeno. Esto trae como consecuencia que se busquen nuevos sitios de cultivo, que para el caso de la zona de los Valles Altos son lugares más altos que en ocasiones traen como consecuencia el surgimiento de nuevos problemas o que se agraven los ya existente, sobre todo en el aspecto fitosanitario.

El hongo se presenta con mayor severidad en terrenos donde se cultiva papa en ciclos continuos ya que puede sobrevivir durante tiempo indeterminado en residuos de cosecha en forma de micelio, o bien, en forma de esclerocios en el suelo o en los tubérculos para semilla, siendo esta última la más importante, de ahí que se recomiende el uso de semilla certificada o bien tratada con algún producto químico.

Carling *et al.* (1989) realizaron un estudio para evaluar el efecto del inóculo de *R. solani* AG 3 presente en los tubérculos para semilla y encontraron que afecta en un 19.2% los rendimientos totales y en un 35.1% la cantidad de tubérculos de primera calidad (US#1). Además, mencionan que dicho inóculo reduce la emergencia del 23.9% de las plantas y daña los tallos subterráneos en el 90% de las plantas en donde se observan lesiones circundantes.

La humedad y temperatura son factores ambientales determinantes en el desarrollo de la enfermedad. Las temperaturas óptimas para su desarrollo están entre los 15 y 18 °C, aunque puede causar daño desde los 9 y hasta los 24 °C; sin embargo, a estas temperaturas los daños ya no son de importancia económica. Por otra parte, se menciona que requiere una humedad superior al 95% para su establecimiento, por lo tanto los

suelos con un drenaje deficiente favorecen su desarrollo. Además, una vez establecida ya no es determinante para su desarrollo (Carling y Leiner, 1990a; Schutz, 1973, citado por Parmeter, 1970).

Una vez que se presentan las condiciones ambientales favorables de humedad y temperatura, los esclerocios “germinan” e invaden los brotes que van emergiendo, produciendo un ahogamiento preemergente debido a la destrucción del meristemo apical y en caso de que las plantas logren emerger entonces el hongo ataca la base del tallo, donde tiene lugar una pudrición húmeda que provoca una obstrucción en la circulación de nutrientes que en un ataque severo provoca la muerte de la planta. En tallos maduros se presenta en la parte basal una costra superficial canchosa de color rojizo (Romero, 1993; Mendoza, 1991).

Hofman y Jongebloed (1988) estudiaron el proceso de infección de *R. solani* en papa, en donde encontraron que las hifas inicialmente crecen en forma longitudinal a lo largo del brote y tienden a seguir las células epidérmicas y en ciertos sitios, principalmente a la mitad de la longitud de la parte subterránea del brote, se forman ramas primarias, las cuales consisten de células rectas más cortas que la hifa principal. A partir de las hifas primarias, se desarrollan hifas secundarias las cuales consisten de células cortas e hinchadas, que a menudo se ramifican varias veces para formar los cojines de infección, y una vez formados el mecanismo de entrada puede ser mecánico o enzimático, siendo este último el más probable. La colonización de los tejidos se restringe inicialmente a una o dos capas por debajo de los cojines de infección y posteriormente éstas profundizan más allá de 12 capas afectando el floema y xilema lo que trae como consecuencia la muerte de la planta.

El daño a brotes (ahogamiento temprano) y estrangulamiento de los tallos trae como consecuencia una gran diversidad de síntomas en la parte aérea de la planta, incluyendo retardo en el desarrollo, producción de tallos secundarios manifestándose en una producción desigual y retardo en la producción, necrosis cortical del tejido leñoso,

pigmentación púrpura de las hojas debido a una acumulación de antocianinas, formación de tubérculos aéreos, enrollamiento de las hojas y a menudo se manifiesta una clorosis la cual es más notable en las partes superiores de la planta (Hooker, 1980; Carling, 1984).

En condiciones desfavorables el hongo forma estructuras de resistencia conocidas como esclerocios sobre la superficie del tubérculo a manera de terrones pequeños de donde proviene el nombre de Costra Negra. Estas estructuras son achatadas y superficiales o grandes e irregulares. Generalmente la epidermis del tubérculo por debajo del esclerocio no presenta ninguna anormalidad; sin embargo, le da mala apariencia haciéndolo de poca aceptación en el mercado. Cabe señalar que dichas estructuras no se desprenden fácilmente. En el tubérculo se pueden presentar además, de los esclerocios, grietas, malformaciones, concavidades y necrosis en el extremo de la unión con el estolón (Hooker, 1980).

En México, en las zonas de las Sierras y Valles altos, en donde se siembra papa, es común observar el estado perfecto o basidial de *R. solani*, identificado como *Thanatephorus cucumeris* Donk. En la base del tallo y por encima de la superficie del suelo se observa el micelio blanco dando la apariencia de mancha de cal y es de ahí de donde salen los basidios. La fase perfecta se observa principalmente en las partes sombreadas y con alta humedad. El micelio se desprende fácilmente con la mano. Se ha observado que el micelio no penetra a los tejidos del hospedante, por lo que no causa un daño directo; sin embargo, este sirve como un mecanismo para que exista la variabilidad genética presente en *Rhizoctonia solani*.

1. Aspectos taxonómicos

La primera descripción válida del género *Rhizoctonia* aparece publicada en el *Systema Mycologicum* publicado por Elías Friés en 1823. Este reporte es universalmente aceptado como el inicio de la taxonomía del género y la caracterización se fundamentó

en la ausencia de estructuras reproductivas y la producción de esclerocios de forma y tamaño variables (Cedeño, 1987).

El género *Rhizoctonia* (deCandole, 1915) es un grupo grande, diverso y complejo de hongos. Desde su descripción ha existido una gran controversia sobre la clasificación de las especies, a causa de la diversidad de características morfológicas que presentan. Estas diferencias hacen que en *Rhizoctonia* exista una agrupación compleja y heterogénea, la cual ha provocado confusión entre los taxónomos (Carling y Sumner, 1992).

Duggar (1915), citado por Cedeño (1987) intentó solventar esta situación de confusión reconociendo únicamente dos especies principales *R. crocorum* y *R. solani*, y clasificó a los restantes con categorías de sinónimos. Estas dos especies fueron caracterizadas por la posesión de un micelio con ramificaciones que se orientan en ángulo agudo o recto y que presentan una constricción en el sitio de origen y la septa, en las proximidades de su unión con las hifa principal.

En la búsqueda por encontrar solución a las controversias presentadas, Parmeter *et al.* (1967), luego de analizar numerosas cepas de *Rhizoctonia solani* y otras especies del género *Rhizoctonia*, las separaron en binucleadas y multinucleadas e indicaron que las cepas multinucleadas dan origen a *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk, y las binucleadas desarrollan una fase sexual perteneciente al género *Ceratobasidium*. Desde entonces, la característica nuclear de las células hifales se ha constituido como el criterio taxonómico más importante para la separación de especies.

1.1. Técnicas utilizadas en la clasificación de *R. solani*

En el “complejo *Rhizoctonia*”, la especie más importante es *Rhizoctonia solani*, descrita por Julius Kühn en 1858, en Alemania. Es una especie multinucleada y presenta septas de tipo dolíporo que desarrolla un estado sexual con las características de *T.*

cucumeris. Las características más específicas de la especie son: células multinucleadas en hifas vegetativas jóvenes o en crecimiento activo, un prominente aparato en el poro septal (septa dolipora), micelio de crecimiento rápido con ramificaciones en ángulo recto o agudo próximas a la septa distal, constricción en la unión de las ramificaciones cerca de su sitio de origen, hifas hialinas cuando jóvenes y marrón oscuras al envejecer, células monilioides de forma y tamaño variables y sin diferenciación en médula y corteza, hifas de diámetro mayor a las 5 micras (Cedeño, 1987).

La especie *R. solani* presenta aislamientos o cepas que varían considerablemente en cuanto a su patogenicidad, morfología de los esclerocios, apariencia en medio de cultivo y características fisiológicas, entre otras, situación que ha generado problemas en su clasificación. Debido a esto, se ha intentado agrupar de una manera lógica a cada uno de estos aislamientos para lo cual se han utilizado dos técnicas: 1) aquellas basadas en las diferencias en patogenicidad, apariencia en medio de cultivo, características morfológicas, fisiológicas y de ecología; y 2) las que se basan en la reacción de anastomosis hifal (fusión de hifas) en medio de cultivo (Cedeño, 1987, Ogoshi, 1987).

1.1.1 Reacción de anastomosis hifal

El concepto de anastomosis fue propuesto por Matsumoto en 1932 y desde su introducción este concepto ha sido el avance más importante en el entendimiento y comprensión de la diversidad genética de *R. solani*. Es por esto que hasta ahora es el criterio más utilizado para agrupar a *R. solani* (Vilgalys y Cubeta, 1994). Sin embargo, persisten dudas acerca del significado y utilidad de este tipo de clasificación, debido a que algunos aislamientos que son muy similares en comportamiento y apariencia en ocasiones no se fusionan con los aislamientos de referencia, e incluso la agrupación por reacción de anastomosis no siempre corresponde a la agrupación por patogenicidad, morfología u otras características fisiológicas. Es por esto que Parmeter y Whitney señalan que la característica de anastomosis no proporciona información adecuada para la agrupación de aislamientos de *R. solani* (Carling, 1996).

La reacción de anastomosis, característica de *R. solani* y de otros hongos, es un método útil para clasificar a *R. solani* en grupos más homogéneos y por tanto más comprensibles llamados grupos de anastomosis (AG). La anastomosis se define como la fusión de hifas con intercambio de núcleos, entre hifas de un mismo grupo; aunque puede existir fusión entre grupos diferentes; pero esto no es muy frecuente (Anderson, 1986).

Una vez que ha ocurrido la anastomosis, la cual puede observarse al microscopio compuesto, se forma una hifa heterocariótica, bajo ciertas condiciones, a partir de las células que se fusionan. Sin embargo, en la mayoría de las reacciones de anastomosis de cinco a seis células localizadas a cualquier lado de las células fusionadas quedan incluidas en una vacuola y mueren, y toman la apariencia de una zona clara en el punto de la unión de las dos colonias. Esta “reacción destructiva” entre los dos aislamientos de un mismo grupo de anastomosis es la expresión de que existe una incompatibilidad somática o vegetativa y se ha demostrado que los responsables de esta incompatibilidad son cuatro alelos diferentes. Dicha incompatibilidad somática limita la exogamia (mezcla de cepas) a unos pocos apareamientos compatibles y contribuye a la estabilidad de los heterocariontes. La existencia de los grupos de anastomosis en *R. solani* representa el aislamiento genético de las poblaciones en cada grupo. (Agrios, 1996; Anderson, 1982).

1.1.1.1 Confrontación de aislamientos

En la identificación de aislamientos por anastomosis, es necesario confrontar los aislamientos de campo con grupos de referencia ya determinados y posteriormente evaluar e interpretar las reacciones citológicas que se observan en la “zona de confrontación”. Esta zona incluye el área donde las hifas de los dos aislamientos entran en contacto. Los aislamientos se colocan a una distancia de 3 a 4 cm uno del otro y las mediciones se realizan de las 48 a las 72 hr (Carlig, 1996).

Existen tres métodos muy comunes para observar la anastomosis y condición nuclear de aislamientos de *R. solani*. Parmeter *et al.* (1969) cultivan los aislamientos en cajas de petri con agua-agar al 2% o sobre papel celofán con agua-agar al 2%. Luego cortan las secciones externas del agar o celofán en donde las hifas se sobreponen, las montan en un portaobjetos y luego las tiñen. Herr y Roberts (1980) hacen crecer los aislamientos en portaobjetos con una capa de agua-agar 2% y los coloca en una caja de petri a la cual se le agrega una capa delgada de agua-agar al 2% para mantener la humedad. Castro *et al.* (1983) hacen crecer los aislamientos sobre papel celofán sumergido en papa dextrosa-agar suave, antes de sobreponerlos en agua-agar para promover el crecimiento. Kronland y Stanghellini (1988) utilizan portaobjetos estériles cubiertos con una capa delgada de agua-agar al 2% y los colocan en cámara húmeda para evitar que se deshidraten. Tales autores mencionan que este método permite observar la condición nuclear y la reacción de anastomosis al mismo tiempo. Las ventajas de esta técnica sobre las anteriores es su simplicidad y rapidez, no requiere de papel celofán esterilizado ni cortarlo después y se tiene mayor comodidad al observar el origen de las hifas.

Herr (1979) considera que el crecimiento en cajas de petri provistas de una película delgada de PDA (7 ml) es más simple y práctico y además proporciona mejores resultados. Sus evaluaciones comparativas demostraron que los crecimientos en portaobjetos y papel celofán son inadecuados debido a que el material se pierde con mucha frecuencia antes de terminar el proceso de tinción, particularmente durante el proceso de hidrólisis; igualmente sostiene que las hifas producidas mediante esos procedimientos se secan y se distorsionan rápidamente durante la exposición al aire. Las hifas secas no recobran la turgencia y se colorean intensamente impidiendo la observación de núcleos.

Los colorantes comúnmente utilizados en tinciones nucleares y observación de la reacción de anastomosis en *R. solani* son: azul de anilina, azul de tryfano, safranina O, Hcl-Giemsa, orceina, DAPI y naranja de acridina (Sneh *et al.* 1991).

La técnica HCl-Giemsa, en la cual se hidroliza la cromatina de los núcleos facilitando su reacción con el Giemsa proporciona excelentes resultados, debido a que tiñe aún las hifas de la punta o hifas corredoras; sin embargo, el método requiere de procesos de fijación e hidrólisis complicados que significan consumo de tiempo y dinero, comparado con el azul de tryfano que requiere 5 a 30 min. Los núcleos se distinguen con claridad y muestran una tonalidad azul oscura; aunque, no tiñe los nucleolos. Este método puede ser utilizado en tinciones permanentes las cuales se usarán por mucho tiempo (Herr, 1979).

Kronland y Stanghellini (1988) utilizaron safranina O y mencionan que con esta sustancia los núcleos se tiñen en 2 min, por lo que es rápida, ya que los demás métodos consumen mucho tiempo o requieren del uso de microscopía fluorescente. La combinación de safranina O con KOH reacciona con los nucleolos tiñéndolos de rojo oscuro, pero no colorea los núcleos.

Las tinciones con azul de anilina y azul de tryfano se consideran rápidas y sencillas, pero se les atribuye la característica de no colorear los núcleos de algunas cepas. Aparentemente con estos colorantes los núcleos y parentesomas aparecen de color azul intenso contrastando con el citoplasma intensamente azulado (Herr, 1979).

El naranja de acridina es un colorante al que se le atribuye una gran afinidad con los ácidos nucleicos. Tiñe de verde el ADN y de rojo el ARN. Su uso es limitado por la necesidad de utilizar microscopio de fluorescencia.

Las tinciones rápidas son de gran utilidad para la separación preliminar de los aislamientos en binucleados y multinucleados así como para observar la reacción de anastomosis, con la ventaja de que exigen menos dedicación; sin embargo, se debe tener en cuenta que las preparaciones pierden calidad rápidamente aún cuando se almacenen bajo refrigeración (Herr, 1979).

Debido a que las hifas de *R. solani* son difíciles de humedecer, es necesario aplicar una solución humectante acidificada (1 ml de Tween 20, 1 ml de ácido láctico al 85% y 100 ml de agua destilada) para facilitar la penetración del colorante y mejorar la tinción de las hifas y núcleos (Herr, 1979).

1.1.1.2 Categorización de las reacciones de anastomosis hifal.

El proceso de fusión de hifas (anastomosis) se caracteriza por la secreción de una o mas sustancias de atracción, atracción de las hifas de contacto, suspensión o interrupción del crecimiento, formación de una proyección similar a una rama, disolución de las paredes celulares y la conexión del citoplasma. Se cree que la atracción es el primer paso del reconocimiento y esta puede ser causada por sustancias secretadas por una hifa del mismo AG y se supone que dichas sustancias son diferentes en cada AG; de ahí que, un aislamiento sólo puede fusionarse o reconocerse con miembros de un mismo grupo de anastomosis (Ogoshi, 1987).

Se han creado diferentes categorías para caracterizar las reacciones de anastomosis observadas dentro de la zona de confrontación; pero desafortunadamente a cada una de ellas le faltan detalles citológicos específicos requeridos para entender correctamente que criterios serán usados para definir cada categoría. Matsumoto *et al.*, (1932) (Citado por Carling, 1996) marcan o etiquetan las reacciones que ellos observan, de más estrechamente a menos estrechamente relacionadas, como fusión perfecta, fusión imperfecta, fusión de contacto y no reacción. La fusión perfecta no fue definida, sino que sólo fue descrita como la reacción observada cuando las hifas del mismo micelio padre son confrontadas (anastomosis entre él mismo). Desafortunadamente, no todas las reacciones entre un mismo aislamiento son similares, la excepción obvia, son los aislamientos que no se anastomosean entre ellos mismos, sino con otro aislamiento del mismo grupo pero de diferente cepa. La fusión imperfecta, es la reacción más específicamente definida por Matsumoto *et al.* (1932); es una reacción que incluye la disolución completa de la membrana, no hay mezcla citoplásmica y no hay muerte de

células. La fusión por contacto involucra los contactos que se presentan entre las dos hifas participantes, pero no hay fusión.

Matsumoto *et al.* (1932) no mencionan la muerte de las células como una parte de las reacciones hifales que ellos observaron y la razón para ello puede ser el corto periodo para la valoración de la reacción. Sin embargo, ésta omisión ilustra que la categorización de las reacciones de anastomosis hifal pueden hacerse sin usar la muerte de células como un criterio.

Flentje y Stretton (1964) citado por Carling (1996) categorizan las mismas reacciones usando diferente terminología. Ellos no citan el documento de Matsumoto *et al.* (1932) y los términos perfecta, imperfecta y contacto no son mencionados. En cambio, ellos las definen como reacción S a las que ocurren entre un mismo aislamiento, reacción de muerte K, fusión de paredes WF y no reacción. La reacción S no involucra muerte de células y si bien la fusión de paredes y membranas estuvieron implicadas, ellos no proporcionan descripciones detalladas de los cambios citológicos observados. Sin embargo, señalan que las reacciones S fueron observadas entre pares confrontados de padres diferentes, aunque no necesariamente del mismo campo de cultivo, de este modo indican que existe una relación muy estrecha aunque no necesariamente idéntica en el campo. En la reacción K ocurre la anastomosis citoplásmica, seguida por la muerte de las células anastomoseadas, además de otras células adyacentes. En algunos reportes más recientes la reacción K algunas veces es igualada a la reacción imperfecta de Matsumoto *et al.* (1932) pero por definición esto no es posible debido a que la muerte de células no estaba reportada en la reacción imperfecta. En la reacción WF (Flentje y Stretton, 1964) ocurre la anastomosis de paredes pero no anastomosis citoplásmica. En este mismo trabajo, Flentje proporcionó estas condiciones pinchando muy meticulosamente, para molestar las células conectadas. Ellos encontraron que, sí ellos pinchaban una célula de la reacción WF, la otra no podía difundirse dando origen a la ausencia de conexión citoplásmica.

Parmeter *et al.* (1969) en sus descripciones de las reacciones de anastomosis usan la terminología de Matsumoto *et al.* (1932) y aunque citan el trabajo de Flentje y Stretton (1964), no hacen referencia a su terminología. El uso que Parmeter *et al.* (1969) hacen de la terminología de Matsumoto *et al.* (1932) crea confusión, debido a que indican que ocurre muerte de células en la fusión perfecta e imperfecta; mientras que por definiciones originales la muerte de células no se menciona. Además, Parmeter *et al.* (1969) presentan su propia descripción citológica breve de las tres clases de aislamientos apareados de AG 2. Estas tres clases de reacción fueron 0, 1, 2, 3, donde 0= no anastomosis, 1= contacto hifal pero no fusión, ni muerte de células, 2= fusión de paredes celulares y a menudo la fusión citoplásmica es seguida por la muerte de las células y 3= fusión sin muerte de células.

En un intento por superar las diferencias y deficiencias en definiciones entre los tres sistemas descritos anteriormente, Carling *et al.* (1988) y MacNish, (1993) construyeron un sistema de cuatro categorías (C3-C0) para describir las reacciones de anastomosis, tomando en cuenta información de cada uno de los tres sistemas anteriores y adicionando detalles complementarios en las definiciones cuando es necesario. La categoría C3 representa relaciones muy estrechas e indica que es el mismo AG, la misma población compatible vegetativamente (PCV) y posiblemente el mismo individuo. La categoría C2 representa aislamientos relacionados que están en el mismo AG, pero en diferente PCV. La C1 representa una relación más distante tal como la que se puede presentar entre AGs altamente heterogéneos, incluyendo los AGs 2, 8 o BI; o entre AG donde existe relación de puente. La C0 indica diferente AG y la ausencia de relación vegetativa intima. En el Cuadro 1, se ilustran claramente estos cuatro tipos de reacciones.

Cuadro 1. Categorías de las reacciones de anastomosis hifal en *Rhizoctonia solani* (Carling, 1996).¹

CATEGORÍA	RELACIÓN	DESCRIPCIÓN DE LA INTERACCIÓN
C3	Relación de cerca Mismo grupo de anastomosis Misma población compatible vegetativamente (PCV) Mismo aislamiento	Fusión de paredes; fusión de membranas; puntos de fusión frecuentemente no obvios; diámetro de la anastomosis igual o cercanamente igual al diámetro de las hifas; células de la anastomosis y células adyacentes pueden morir, pero generalmente no.
C2	Relacionado Mismo grupo de anastomosis Diferente población compatible vegetativamente Diferente aislamiento	Conexión de paredes obvia; contacto de membranas incierto o indefinido; situación de los sitios de reacción obvios; diámetro del punto de anastomosis menor que el diámetro de las hifas; las células de la anastomosis siempre mueren.
C1	Relacionado distantemente Diferente o mismo grupo de anastomosis	Contacto entre hifas; conexión de paredes aparente, pero no hay evidencia de penetración membrana a membrana en el contacto; ocasionalmente una o ambas células de la anastomosis y de las células adyacentes mueren.
C0	No relacionados Diferente grupo de anastomosis	No hay interacción.

1: Categorización basada en reacciones y cambios citológicos que ocurren en el punto de anastomosis entre dos hifas. Estas reacciones y cambios citológicos son observados en el microscopio de luz. (Carling, 1996).

NOTA: Más del 15% de fusión de hifas o bien observación de categorías 2 y 3 indica que son del mismo grupo.

1.1.1.3 Medición de las reacciones de anastomosis hifal

En términos prácticos un aislamiento es del mismo grupo de anastomosis que el grupo de referencia, sí al observar cinco campos al microscopio en el objetivo de 25X se tienen en promedio 5 puntos de fusión con categoría C3 y C2. Además, existe el término

“Frecuencia de Fusión”, expresión que nos permite diferenciar a los grupos que presentan anastomosis con otros grupos diferentes pero en porcentajes más bajos. La frecuencia de fusión es determinada por la siguiente

Fórmula:

$$\%FF = (A \times 100) / B.$$

DONDE:

A: La suma de los puntos de fusión en 15 campos del microscopio.

B: La suma de los puntos de contacto en 15 campos del microscopio.

El cruzamiento de cualquier lado de los puntos de adhesión hifal son incluidos en el término “puntos de contacto”. A una frecuencia de fusión de 50% es llamada frecuencia alta, de 30-50% moderada y menor de 30% es una frecuencia baja (Sneh *et al.*, 1991).

1.1.2. Otras técnicas utilizadas en la identificación de los grupos de anastomosis

1.1.2.1. Medio Stewart

Stewart (1982) desarrolló un método práctico para la identificación de los aislamientos pertenecientes al AG 3, que se basa en el color que presentan las colonia sobre este medio; sin embargo, se ha observado que este no produce características consistentes en todos los ensayos por lo cual solamente se recomienda cuando se desea conocer la presencia de este grupo en colecciones de cepas muy grandes (Bandy *et al.*, 1988).

Castro *et al.* (1983) comparó el medio Stewart y el de papa dextrosa agar para la descripción rápida del grupo AG 3. En el trabajo incluyeron los grupos AG 1, AG 2, AG 3, AG 4 y cuatro aislamientos del género *Rhizoctonia*. Después de la inoculación en este

medio, el micelio de todos los aislamientos AG 3 fue de color castaño o pardo; mientras que, el de los otros fue blanco. En PDA la apariencia de los aislamientos fue menos característica. Por lo tanto, ellos concluyen que este medio puede ser una herramienta útil y rápida para diferenciar los aislamientos de *R. solani* del grupo AG 3. Aunque puede haber algunas excepciones al diferenciar los aislamientos AG 3 utilizando este medio, su principal ventaja es que requiere una labor mínima y puede ser muy útil en estudios de *R. solani* en papa.

1.1.2.1. Técnicas bioquímicas.

En los últimos años los investigadores se han dado a la tarea de buscar herramientas que permitan entender con mayor claridad las variaciones genéticas relacionadas con el comportamiento de los organismos. La utilización de marcadores genéticos y el uso de moléculas de ADN son las técnicas más utilizadas y que han dado elementos necesarios para caracterizar con mayor precisión la evolución de las poblaciones de patógenos. En el estudio de grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* se ha utilizado el análisis de isozimas, RFLPs y RAPDs, principalmente.

Las isozimas han contribuido significativamente a los estudios de genética poblacional de muchos organismos por varias décadas, pero solamente en la última década éstas han sido usadas extensivamente en estudios de genética poblacional de hongos fitopatógenos. Las isozimas detectan variación en la secuencia de aminoácidos de moléculas de proteínas que tienen la misma función catalítica, de esta forma detectan variación entre las secuencias de ADN que codifican para proteínas. Una ventaja del uso de isozimas es que son caracteres codominantes, por lo que se pueden distinguir los individuos homocigotos de los heterocigotos. Otra ventaja es que generalmente pueden ser consideradas como neutrales selectivamente, son relativamente económicas y fáciles de ensayar. Su principal desventaja es que son finitas en número; muchos hongos fitopatógenos carecen de variación suficiente para que las isozimas sean útiles para estudios de poblaciones. De este modo los fitopatólogos han recurrido a los marcadores

que ensayan variación en las secuencias de ADN directamente (McDonald y McDermott, 1993).

Liu *et al.* (1990) evaluaron 11 sistemas de enzimas utilizando electroforesis, para estudiar la diversidad genética entre 14 aislamientos de *R. solani* grupo de anastomosis AG 2. Todas las enzimas evaluadas dieron patrones (zimogramas) diferentes en todos los aislamientos estudiados. Los métodos usados para cuantificar los datos proporcionan bases para deducir que existe un árbol genético similar de relación entre los aislamientos. Ellos diferenciaron tres grupos fuertemente relacionados, designados A, B y C, usando las características morfológicas, fisiológicas e hibridación con ADN/ADN. En el grupo A se encuentran los aislamientos del grupo de anastomosis AG 2-1; en el grupo B, los pertenecientes AG 2-2 IIIB y en el grupo C a AG 2-2. El grupo A estuvo menos asociado con los grupos B y C con un coeficiente de asociación de 0.18, comparado con 0.27 que presentaron entre sí los dos últimos grupos. La mayoría de los aislamientos del grupo C fueron obtenidos de remolacha azucarera, mientras que los del grupo B se aislaron de un amplio rango de hospedantes y los del grupo C fueron de orígenes desconocidos.

MacNish *et al.* (1993) caracterizaron usando enzimas pépticas (zimogramas) y anastomosis, aislamientos de *R. solani* AG 8 de "bare patches", de dos localidades del oeste de Australia. Ellos mencionan que todos los aislamientos colectados del mismo "patch", al mismo tiempo y en tiempos diferentes (10 meses de diferencia entre colectas), fueron miembros del mismo grupo de zimograma. Las técnicas de anastomosis demostraron que los aislamientos del mismo "patch" son miembros del mismo "clon", lo cual se manifiesta por la reacción de anastomosis clonal. Las reacciones de anastomosis indican también que los aislamientos del mismo grupo de zimograma, pero de diferente "patch" y colectadas en el mismo cultivo y en el mismo campo pueden o no ser del mismo "clon". En general, los "patches" con el mismo grupo de zimograma y relacionados fuertemente uno con otro es probable que sean del mismo "clon" que aquellos separados por distancias grandes. De esta forma, la técnica de zimogramas demuestra que existen grupos distintos dentro de *R. solani* AG 8 y la técnica de

anastomosis demuestra que éstos pueden ser clones diferentes dentro de cada grupo. En general, el éxito de coleccionar aislamientos de “patches” causados por el mismo grupo de zimograma y que sean miembros del mismo clon, disminuye conforme se incrementa la distancia entre los “patches”. Sin embargo, se ha detectado una relación clonal entre aislamientos coleccionados del mismo grupo de zimograma coleccionados de “patches” separados por cientos de kilómetros, en Australia y en un caso en Oregon. Se presume que la dispersión de los clones de *R. solani* se da principalmente por medios físicos, como el transporte de suelo infestado, en materia orgánica, maquinaria y otros equipos.

Los estudios con RFLPs (DNA Restriction Fragment Length Polimorphism) detectan variación en las secuencias del ADN entre secciones homólogas de cromosomas. Los RFLPs están basados en la hibridación con sondas de ADN a fragmentos de ADN que han sido digeridos con endonucleasas de restricción específicas y medidas o cuantificadas en geles de agarosa. Debido a que los RFLPs pueden detectar variaciones en regiones del ADN no codificadoras y codificadoras, son mucho más variables que las isozimas y tienen la ventaja de ser en promedio neutrales selectivamente y codominantes. La principal desventaja de los RFLPs es que requieren equipo más especializado y los ensayos son más caros que los realizados con isozimas. En este caso, los locus de RFLPs se refieren a secuencias del ADN en un cromosoma que tienen secuencias homólogas a la sonda de ADN. Los alelos en los loci de RFLPs son los fragmentos de restricción de ADN de varios tamaños causado por las inserciones, deleciones o enzimas de restricción, cambio en el sitio de reconocimiento a lo largo de la sección del cromosoma donde hibridiza la sonda (McDonald y McDermott, 1993).

Se estudiaron 38 aislamientos pertenecientes a 10 grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* de diferentes orígenes geográficos utilizando la técnica RFLPs. Los ADN de células intactas fueron digeridos separadamente con las enzimas de restricción *EcoRI*, *Bgl II*, *Hind III* y *Pst I*, luego se les aplicó una sonda de ADN clonado de *Armillaria ostoyae* en hibridaciones de “southern”. Los grupos de anastomosis 1, 2, 3 y 6 y los subgrupos 1-1 y 2-1 tienen uno o más patrones únicos que no se encuentran en

otros grupos. Se observó variación de RFLPs intragrupal en todos los AGs con el más alto nivel de variación entre los aislamientos pertenecientes a AG 2 y sus subgrupos AG 2-1 y AG 2-2. Los RFLPs en ADN nuclear también fueron examinados por hibridación a sondas nucleares al azar, generadas del ADN nuclear de un aislamiento de AG 3. La *Hind* III o *Pst* I digirieron los ADN nucleares de los aislamientos PSU-10-07 fueron clonados en el plásmido vector pBR322. Se encontraron cinco clones recombinantes al azar indicando que son grupos específicos. La especificidad de los patrones de hibridación sugiere que estas sondas consisten de secuencias de ADN con una o pocas copias por genoma. Basándose en la evidencia presentada, estas sondas pueden ser usadas en los estudios con el AG 3. El presente trabajo indica que; algunos polimorfismos de restricción de ADN de ciertos grupos de anastomosis no son únicos sino que son compartidos con otros AGs, tal es el caso del AG 4, AG 7 y AG 5; AG 8, AG 9 y AG BI en manchas obtenidas con *Eco*RI y AG 6 y AG BI en manchas obtenidas con *Hind* III. El AG 1 parece estar compuesto de un grupo homogéneo, que se muestra por un patrón de RFLP simple después de la digestión con *Eco*RI. Los aislamientos AG 4 se caracterizan por presentar dos patrones de restricción distintos. Por otra parte de estos resultados indican que algunos AGs tienen RFLPs comunes y que el AG 1 y sus subgrupos tienen RFLPs idénticos. El grupo AG 4 ha sido subdividido en HG-I y HG-II, en este estudio sus patrones de RFLPs obtenidos usando las tres enzimas de restricción no apoyan segregación. El fenotipo de los aislamientos AG 4 fue similar en los aislamientos de Estados Unidos pero diferentes a los aislamientos japoneses, indicando una posible divergencia entre poblaciones separadas geográficamente. En cuanto al AG 3 los resultados obtenidos muestran que existe variación intergrupala. Existen en este método variaciones que pueden ser debidas al tipo de enzima, digestión incompleta, metilación parcial, por lo que se debe tener precaución al leer los patrones de RFLPs. El alto grado de variación intergrupala en RFLPs que se observaron puede ser el resultado de divergencias dentro de los grupos de anastomosis (Jabaji-Hare, *et al.* 1990).

Vilgalys y González (1990) mencionan que los RFLPs en el ADN ribosomal de *R. solani* muestran variación molecular considerable entre y dentro de los grupos de

anastomosis determinados anteriormente en base a la prueba de anastomosis, morfología y patogenicidad. Ellos examinaron ADN genómicos de 87 aislamientos para conocer los RFLP. Se usaron las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* y se analizaron por "Southern Blotting", utilizando una sonda de ADN ribosomal originada del grupo de anastomosis AG 4. Cada uno de los 15 grupos interaespecíficos de *R. solani* se caracteriza por presentar uno o más patrones de RFLP únicos. Los niveles de variación de RFLP intragrupal, estuvieron dentro de los rangos de variación de RFLP de los diferentes grupos de anastomosis (AGs) y sus subgrupos. Los aislamientos de los grupos de anastomosis 3, 4, 7, 8 y BI poseen un RFLP único, invariable y simple, para cada grupo intraespecífico, por lo que mencionan que estos grupos son homogéneos. Los aislamientos AG 1-IB, AG 1-IC, AG 2-2 y AG 9, se caracterizan por presentar un nivel bajo de variación en RFLP. En contraste, se observó un alto nivel de diversidad en RFLP entre los aislamientos dentro de los grupos AG 1-IA, AG 2-1, AG 5 y AG 6. No se observó relación entre los niveles dentro de los grupos intraespecíficos y la variación de otros factores biológicos (rango de hospedantes, variación morfológica, etc.). En base a los resultados, de su investigación proponen que los patrones de variación de los RFLP observados se deben más probablemente a las divergencias genéticas entre y dentro de los grupos intraespecíficos.

La amplificación del ADN polimórfico (RAPDs, Randomly Amplified Polymorphic ADN), es una técnica usada más recientemente en el estudio de los grupos de anastomosis de *R. solani*. Esta técnica está basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Con la PCR es posible generar cantidades grandes de ADN entre los sitios iniciadores específicos, a partir de cantidades pequeñas. La técnica RAPDs utiliza la PCR para amplificar regiones aleatorias del genoma. La secuencia de cada iniciador es generada aleatoriamente y tiene un tamaño de 10 nucleótidos con porcentajes de G + C de 50-80%. Esta técnica es visualizada por electroforesis en gel y medida por la comparación de la longitud de los fragmentos entre los aislamientos. Los polimorfismos se crean cuando hay una mutación en los sitios iniciales o cuando existen inserciones o deleciones entre los sitios iniciales. Cada locus tiene solamente dos alelos posibles, por

consiguiente los caracteres tendrán una herencia dominante. Los RAPDs pueden ser usados para detectar a nivel de ADN la variabilidad a diferentes niveles, como un simple cambio de una base, hasta delecciones o inserciones completas. Los RAPDs tienen algunas desventajas, los reactivos y equipo son caros, la característica de ser dominante no permite diferenciar entre homocigotos y heterocigotos (McDonald y McDermott, 1993).

Yang *et al.* (1995) usaron la técnica RAPD-PCR para caracterizar aislamientos de *R. solani*, que causan la enfermedad de "bare patch" en cereales y cultivos para pastura, en dos localidades del oeste de Australia, Newdegate y Esperance. Todos los aislamientos fueron identificados por reacciones de anastomosis como AG 8 (grupo de anastomosis AG 8) y con zimogramas pécnicos 1-1 y 2. Los zimogramas pécnicos se confirmaron con la técnica RAPD-PCR, en la que obtuvieron también dos bandas, por lo que se supone que los aislamientos son genéticamente diferentes. En trabajos anteriores se señala que mediante el uso de técnicas bioquímicas es posible detectar variaciones genéticas en aislamientos que pertenecen a un mismo grupo de anastomosis y que varían en su patogenicidad, lugar de colecta entre otros, dichas variaciones se detectan al obtener zimogramas diferentes. Sin embargo, en este estudio no hubo diferencias en los patrones de bandas obtenidos con la técnica RAPD-PCR, entre aislamientos altamente virulentos y débilmente virulentos, en la localidad de Newdegate, ni en aislamientos colectados de diferentes plantas, esto a pesar de que se sabe que los aislamientos presentan diferencias en su patogenicidad, por lo que ellos recomiendan usar un número mayor de primers para obtener estas diferencias usando esta técnica. Por otra parte, los aislamientos de Newdegate fueron idénticos a los aislamientos de Esperance, así como a los de varias localidades del sur de Australia. Esto indica que los aislamientos están muy estrechamente relacionados.

Lilja *et al.* (1996) analizaron por pruebas de patogenicidad y variación genética aislamientos uninucleados de *Rhizoctonia* sp. con estado perfecto en *Ceratobasidium*. Los aislamientos se obtuvieron de raíces de plantas de coníferas que estaban en

semilleros, donde el patógeno produce la enfermedad conocida como muerte negra de la raíz. Todos los aislamientos redujeron considerablemente el sistema radicular en plántulas de picea noruega y pino escocés, causando la muerte y achaparramiento de éstas. En el trabajo se aislaron cepas uninucleadas y multinucleadas. Las cepas uninucleadas se anastomosaron fácilmente con los aislamientos de referencia y se observó la reacción de muerte de células adyacentes. En el análisis por RAPD-PCR, los aislamientos uninucleados dieron patrones de bandas diferentes a los obtenidos con los aislamientos de referencia, debido esto quizá a que provenían de orígenes geográficos diferentes. Además, los aislamientos uninucleados dieron patrones de bandas muy similares entre ellos, mientras que los binucleados presentaron patrones diferentes, de lo que se deduce que el grupo uninucleado es muy homogéneo genéticamente, mientras que el grupo binucleado es muy heterogéneo.

1.2. Grupos de anastomosis en *Rhizoctonia solani*.

Existen varios términos propuestos para diferenciar a los grupos de anastomosis *Rhizoctonia solani* y a los subgrupos que presentan algunos de ellos. Estos términos han sido propuestos por investigadores especialistas en la especie. Sin embargo, es necesario mencionar que los términos se crean con la finalidad de entender mejor dicha variabilidad y no para hacer su estudio más complejo.

Carling (1996) propone usar el término “grupo de reacción hifal” porque él considera que es más apropiado que el de grupos de anastomosis, debido a que el concepto de anastomosis (unión de un hueco u órgano tubular a otro), no es apropiado para algunos tipos de reacción, sobre todo en las categorías C0, C1 y C2, en las cuales todavía no se ha observado la anastomosis. Aunque, Ogoshi (1987) menciona que en la categoría C2 sí existe intercambio de núcleos.

Ogoshi (1987) propone el término “Grupos Interespecíficos”, como un nombre para los subgrupos de los grupos de anastomosis de *R. solani*. El término fue aceptado

por los investigadores, que empezaron a utilizarlo en trabajos posteriores; sin embargo, surgieron dudas y confusiones en su uso y en la actualidad el término está discontinuado.

MacNish y Carling (1995) proponen que la frase “Poblaciones compatibles Vegetativamente” (PCV) sea aceptada para describir colecciones de aislamientos dentro de un AG que producen la reacción de anastomosis C3 dentro de ellos mismos, en lugar del término clon propuesto por Ogoshi (1987) debido a que las PCV describen de forma precisa y correcta una relación definida en base a la reacción vegetativa (reacción de anastomosis C3), sin exigir la igualdad que implica el uso de la palabra clon. Se espera que el término sea de utilidad para aquellos investigadores que se dedican a la clasificación de grupos subespecíficos de *R. solani*.

La importancia del concepto de grupos de anastomosis en la investigación, es que cada AG puede ser considerado como una unidad evolucionaria, en el sentido de que cada uno está aislado genéticamente. Desde un punto de vista práctico, este concepto es de crucial importancia en los estudios sobre obtención de resistencia, predicción de epidemias y control, en donde se debe identificar el grupo al que pertenece, ya que se ha demostrado que cada grupo presenta características específicas de requerimiento de temperatura, rango de hospedantes, sensibilidad a fungicidas, entre otros.

Los resultados obtenidos mediante las pruebas de anastomosis entre 138 aislamientos de *Thanatephorus cucumeris* (*R. solani*), indican que la mayoría cae dentro de los grupos previamente descritos. La anastomosis ocurrió entre aislamientos de un mismo grupo, pero no entre aislamientos de grupos diferentes. Así, los grupos parecen estar genéticamente aislados y son incapaces de intercambiar núcleos con grupos diferentes. La anastomosis entre los aislamientos de campo dentro de un mismo grupo resultó en la muerte de células adyacentes y fusionadas, sugiriendo que la muerte de las células puede limitar el intercambio de núcleos incluso entre aislamientos capaces de fusionarse. Debido a que los grupos descritos tienden a diferir en rango de hospedantes,

infección y hábitat patogénico ellos recomiendan precaución al extender los resultados de una investigación de un grupo a otro (Parmeter *et al.* 1969).

En los aislamientos identificados por estos investigadores parece ser que existe cierta tendencia hacia la especificidad de hospedantes. Así, los miembros de AG 1 y AG 4 tienen un amplio rango de hospedantes y se pueden considerar como polífagos. Los miembros del grupo AG 2, tienden a ser específicos de crucíferas. Los aislamientos AG 3 son principalmente de papa (Agrios, 1996).

El modo de patogenicidad parece ser bastante variable dentro de los grupos. La actividad patogénica dentro de los grupos incluye pudrición de semillas, damping-off, pudrición de raíces y tizones en tallos y hojas, con la excepción del AG 3 el cual parece estar asociado con la infección de estolones y tubérculos (Agrios, 1996).

Se han caracterizado 11 grupos de anastomosis basados en la reacción de anastomosis hifal. Las relaciones genéticas son apoyadas por los estudios de homología en las secuencias de bases del ADN dentro y entre grupos. A continuación se presenta una síntesis de las características específicas de cada grupo, recopiladas de las revisiones publicadas por Carling y Sumner (1992) y Sneh *et al.* (1991).

1.2.1. AG 1

Este grupo es de amplia distribución. Los aislamientos son autotróficos para tiamina y capaces de presentar fusión hifal con miembros del AG 1. El AG 1 es subdividido en tres grupos (AG 1-IA, AG 1-IB y AG 1-IC) de acuerdo a la forma de los esclerocios, características en medio de cultivo, morfología de la colonia, homología en las secuencias de bases del ADN y patogenicidad; pero no de acuerdo a la fusión hifal. El AG 1-IA es también llamado tipo *sasakii* o tipo 2; el AG 1-IB, es llamado tipo 1 o tipo microesclerotia.

1.2.1.2 AG 1-IA

Los aislamientos son caracterizados por los esclerocios relativamente esféricos, largos (1 a 3 mm de diámetro); homología de secuencia de bases del ADN alta (98-100%) con miembros de AG 1-IA. y baja homología (50-56%) con miembros de AG 1-IB. El aislamiento para la prueba de anastomosis es ATCC 76121, "accession" CS-Ka, aislado de arroz, de Hokkaido, Japón. Los aislamientos muestran una rápida velocidad de crecimiento (aprox. 30 mm por día a 28-30 °C). Es un patógeno de partes aéreas de muchos cultivos y malezas. Los aislamientos causan marchitez de la vaina del arroz, mancha morena en céspedes, enfermedad esclerocial en maíz, tizón de la hoja del maíz, sorgo, frijol y soya, hoja bandeada en sorgo y maíz, tizón de verano de trébol, tizón sureño de plántulas de alcanfor y parche café en céspedes. Además, el hongo ha sido aislado de *Stevia rebaudiana*.

Anamorfo descrito dentro de este subgrupo: *Sclerotium irregulare*.

Teleomorfo: *Thanatephorus cucumeris* (sin. *Corticium sasakii*, *Hypochnus sasakii*, *Pellicularia sasakii*).

1.2.1.2 AG 1-IB

Los aislamientos se caracterizan por presentar esclerocios de forma irregular y pequeños; una homología en las secuencias de bases del ADN alta (96%) con miembros del AG 1-IB (tipo tizón reticular) y homología baja (50-56%) con aislamientos del AG 1-IA. El aislamiento para la prueba de anastomosis es el ATCC 76127, "accession" B-19, aislado de remolacha azucarera de Hokkaido, Japón. Es un patógeno de partes aéreas. Causa el tizón en muchos hospedantes. Tizón de la hoja del arroz, frijol, soya y otros cultivos; tizón membranoso de plántulas de alerce y plantas ornamentales leguminosas; tizón de la hoja de hortensia; pudrición de la berza y pudrición basal de la lechuga. Además, el hongo ha sido aislado de frijol "snap" y maíz.

Anamorfo descrito dentro de este subgrupo: *R. microesclerotia*.

Teleomorfo: *T. cucumeris*.

1.2.1.3 AG 1-IC

Los aislamientos tienen esclerocios pequeños (0.2-0.8 mm de diámetro), de forma redondeada; las homologías de ADN con AG 1-IA y AG 1-IB no se han determinado. El tipo AG 1-IC representa el AG 1 tipo 3 de Sherwood. El aislamiento para la prueba de anastomosis es el ATCC 76123, "accession" BV-7, aislado de remolacha azucarera de Hokkaido, Japón. Es un patógeno del suelo y causa damping-off en muchos hospedantes. Los aislamientos patogénicos son medianamente virulentos y prevalecen bajo condiciones climáticas relativamente frías. Causa Damping-off en soya, trigo, zanahoria, lino y pinos.

Teleomorfo: *T. cucumeris*.

1.2.2. AG 2

Los aislamientos son capaces de anastomosarse con miembros de AG 2, AG BI y en baja frecuencia con miembros del AG 8.

Este grupo es subdividido de acuerdo a la frecuencia de anastomosis, características en medio de cultivo, patogenicidad y requerimientos nutricionales en tres grupos: AG 2-1 (también llamado grupo de siembras de invierno), AG 2-2 IIIB (también llamado tipo "Rush") y AG2-2 IV (frecuentemente llamado tipo pudrición de raíces). Tal vez el método más definitivo de separación de AG 2-1 de AG 2-2 (IIB y IV) es el requerimiento de tiamina, debido a que el AG 2-2 requiere tiamina y el AG 2-1 no requiere. La reacción de anastomosis no es una característica importante para separar estos grupos.

1.2.2.1 AG 2-1

La fusión de hifas ocurre en alta frecuencia (> 50%) con miembros del AG 2-1, y en baja frecuencia (<30%) con miembros del AG 2-2. Los aislamientos son autotróficos para tiamina y muestran una alta homología de secuencia de bases del ADN (100%) con miembros de AG 2-1, y baja homología con miembros de AG 2-2 IIIB (37.6-40.1%) y con miembros de AG 2-2 IV (43-49%). El aislamiento de prueba de anastomosis es ATCC 76168, "accession" PS-4, aislado de guisante de Tokushima, Japón. Este grupo está comprendido entre los grupos de crecimiento lento (aprox. 13 mm/día a 25 °C). ES un patógeno de cultivos de invierno, forma esclerocios rojizos en círculos. Los aislamientos patogénicos causan damping-off de crucíferas; pudrición de la corona y el cogollo de la fresa; tizón de la hoja del tulipán y pudrición de la raíz del rábano japonés. Los hongos de este grupo han sido aislados de plántulas de remolacha azucarera, plántulas de trigo, papa, chícharo de vaca y lechuga.

Teleomorfo: *T. cucumeris*.

1.2.2.1 AG 2-2 IIIB

Los aislamientos son capaces de presentar fusión hifal en frecuencia alta con miembros del AG 2-2 y baja frecuencia con miembros del AG 2-1. Los aislamientos son auxotróficos para tiamina. Los cultivos pueden crecer a 35 °C. Los aislamientos muestran alta homología de secuencia de bases del ADN (98%) con miembros del AG 2-2 IIIB, más baja homología (69-71%) con miembros de AG 2-2 IV y muy baja homología (38-40%) con miembros del AG 2-1. El aislamiento para probar anastomosis es el ATCC 76124, "accession" C-96, aislado de "mat rush" de Fukuoka, Japón. Este es un grupo de temperaturas altas (aprox. 30 °C) definido como el tipo "Rush". Los aislamientos patogénicos causan tizón de la vaina del arroz. tizón de la vaina del "mat rush", gengibre y gladiolos; costra negra de "burdock" comestible; parche castaño de

céspedes; damping-off de remolacha azucarera, plántulas de árboles y crisantemo; pudrición de raíz de “Konjak” y “yam” chino.

Teleomorfo: *T. cucumeris*.

1.2.2.3. AG 2-2 IV

La fusión hifal ocurre en frecuencias altas con miembros de AG 2-2 y en baja frecuencia baja con miembros de AG 2-1. Los aislamientos son auxotróficos para tiamina y los cultivos no pueden crecer a 35 °C. Los aislamientos muestran una homología en las secuencias de bases del ADN alta (100%) con miembros de AG 2-2 IV, más baja homología (69-71%) con miembros de AG 2-2 IIIB y muy baja homología (43-49%) con miembros de AG 2-1. El aislamiento para la prueba de anastomosis es ATCC 16125, “accession” RI-64, aislado de remolacha azucarera de Ibaraki, Japón. Los aislamientos patogénicos de este grupo causan pudrición de raíces y tizón de la hoja de remolacha azucarera (el tizón de la hoja es iniciado por las basidiosporas), pudrición de raíces de una variedad de hospedantes y parche largo de céspedes.

Teleomorfo: *T. cucumeris*.

1.2.3. AG 3

El AG 3 es un grupo homogéneo en el cual no se conocen subgrupos. Los aislamientos del AG 3 crecen más despacio (aprox. 12 mm/día a 25 °C) y generalmente son más tolerantes a temperatura frías que los aislamientos de otros AGs de *R. solani*. Se conoce como el tipo papa. Los aislamientos son autotróficos para tiamina y capaces de fusionarse con miembros de AG 3 y AG BI y en frecuencia baja con AG 8. Los aislamientos muestran homología en la secuencia de bases del ADN alta (100%) con miembros de AG 3. El aislamiento de referencia para la anastomosis es ATCC 76167, “accession” ST-11-6, aislado de papa de Japón. Este es un patógeno del suelo. Los

aislamientos patogénicos causan “costra negra” en tubérculos de papa, y pudrición de tallos y raíces de la misma, tizón de la hoja en tomate, mancha de la hoja en tabaco, mancha castaña del girasol iniciada por la basidiosporas. Además, el hongo ha sido aislado de plántulas de remolacha azucarera.

Anamorfo descrito dentro de este grupo: *R. solani* var. *typica*.

Teleomorfo: *T. cucumeris*.

1.2.4. AG 4

Los aislamientos son autotróficos para tiamina y capaces de presentar fusión de hifas con miembros de AG 4. También llamado tipo *praticola*. El AG 4 es subdividido en dos grupos HG-I y HG-II de acuerdo a la forma de los esclerocios y homología en la secuencia de bases del ADN.

Anamorfos descritos: *R. praticola*, *R. solani* var *cichorii-endiviae*.

Teleomorfo: *T. praticola* (sin.: *Ceratobasidium praticola*, *Corticium praticola*, *Pellicularia praticola*)

1.1.4.1 AG 4-HG-I

El grupo AG 4 HG-I produce esclerocios café o costano oscuros en PDA, presenta homología en la secuencia de bases del ADN alta (89-93%) con miembros del AG 4-HG-I y baja homología (31-48%) con miembros de AG 4 HG-II. El aislamiento para probar la anastomosis es ATCC 76126, “accession” AH-1, aislado de chícharo de Chiba, Japón.

1.2.4.2. AG 4-HG-II

Los aislamientos AG 4-HG-II se caracterizan por la producción de esclerocios café blanquiscos a grisáceos en PDA. Presenta homología en la secuencia de bases del ADN alta (89-100%) con miembros del AG 4-HG-II y baja homología (31-48%) con miembros del AG 4-HG-I. El aislamiento prueba para anastomosis es ATCC 76127, "accession" Rh-165, aislado de remolacha azucarera de Hokkaido, Japón.

Los aislamientos del grupo AG 4, han sido definidos como el tipo "praticola". De acuerdo a algunos taxónomos, el tipo "praticola" representa una especie distinta *R. praticola* Saksena and Vartaja, teleomorfo: *T. praticola* (Kotila) Flentje. El aislamiento AG 4 ha sido comúnmente aislado de suelo o plantas infectadas, en países calientes. Los aislamientos causan pudrición del fruto del tomate, pudrición de la raíz del Chicharo, pudrición del pie de la espinaca; canchros en tallos de papa; y pudrición de raíz de una amplia variedad de hospedantes, incluyendo plántulas de "slash" y "lobolly" de pino, cebolla, "stevia", guisante, papa y "snap bean". Los aislamientos no patogénicos parece ser que protegen plántulas de rábano, zanahoria, algodón, papa y trigo del damping-off.

1.2.5. AG 5

Los aislamientos son auxotróficos para tiamina y capaces de presentar fusión de hifas con miembros de AG 5. Los aislamientos muestran homología en la secuencia de bases del ADN alta (94-98%) con miembros del AG 5. El aislamiento prueba para anastomosis es ATCC 76128, "accession" GM-10, aislado de soya de Nagano, Japón. Es un patógeno del suelo, puede inducir pudrición de raíz y tallos de papa, pero generalmente es menos virulento que el AG 3. Ocasiona pudrición de raíz del frijol, soya y "andsuki bean". Algunos aislamientos de este grupo forman una asociación micorrízica con orquídeas. El hongo ha sido aislado de remolacha azucarera, papa, soya y frijol lima. El AG 5 se encuentra presente en Europa, Asia y Norte América.

Teleomorfo: *T. cucumeris*.

1.2.6. AG 6

Los aislamientos son autotróficos para tiamina y presentan fusión de hifas con miembros de AG 6 y en baja frecuencia con AG 8 y AG BI de *R. solani* y AG-F de *Rhizoctonia* binucleadas. El grupo se subdivide de acuerdo a la homología en la secuencia de bases del ADN en dos grupos AG 6 HG-I y AG 6 GV.

1.2.6.1. AG 6 HG-1

El aislamiento AG 6 HG-I presenta una homología en la secuencia de bases del ADN alta (92-98%) con miembros de AG 6 HG-I y homología baja (48-63%) con miembros de AG 6 GV. El aislamiento de referencia para realizar la prueba de anastomosis es ATCC 76129, "accession" OH7-1-1, aislado de suelo de Hokkaido, Japón.

1.2.6.2. AG 6 GV

Los aislamientos de AG 6 GV muestran homología en la secuencia de bases del ADN baja (55-66%) con miembros de AG 6 GV y homología baja (48-63) con miembros de AG 6 HG-I. El aislamiento de referencia para la prueba de anastomosis es ATCC 76130, "accession" NKN-2-1, aislado de suelo de Hokkaido, Japón. Los hongos de este grupo se consideran no patogénicos. Algunos de los aislamientos de este grupo forman asociaciones micorrícicas con orquídeas. Se sabe que solo se presenta en Japón.

Teleomorfo: *T. cucumeris*.

1.2.7. AG 7

Los aislamientos son autotróficos para tiamina y capaces de presentar fusión de hifas solamente con miembros de AG 7. Los aislamientos exhiben homología en la secuencia de bases del ADN alta (99%) con miembros del AG 7. El aislamiento de referencia para la reacción de anastomosis es ATCC 76131, "accession" HO-1556, aislado de suelo de Kagawa, Japón. Es un grupo no bien conocido, se presenta fuera de Japón. El AG 7 es un grupo del suelo que puede causar daños menores a algunos cultivos de hortalizas.

Teleomorfo: *T. cucumeris*.

1.2.8. AG 8

Los aislamientos presentan fusión de hifas con una frecuencia alta (> 50%) con miembros del AG 8, y en baja frecuencia con miembros de AG 6, AG 3 y AG BI. El aislamiento de referencia para la prueba de anastomosis es ATCC 76106, "accession" W-565, aislado de trigo de Washington, U.S.A. Es un patógeno del suelo que induce "bare patch" en cereales. Los estudios de hábitat de crecimiento indican que este puede causar una pudrición de raíces en papa. Se presenta en Australia, Noroeste del Pacífico de los Estados Unidos y el U. K.

Teleomorfo: *T. cucumeris*.

1.2.9. AG 9

Los aislamientos son capaces de presentar fusión de hifas solamente con miembros del AG 9. El aislamiento de referencia para la prueba de anastomosis es ATCC 62804, "accession", aislado de suelo, cerca de Palmer, Alaska, U.S.A. El AG 9 es

subdividido de acuerdo a los requerimientos de tiamina y homología en la secuencia de bases del ADN, en dos grupos AG 9TP y AG 9TX.

1.2.9.1. AG 9TP

Los aislamientos AG 9TP son autotróficos para tiamina y muestran homología en la secuencia de bases del ADN alta (> 94%) con miembros de AG 9TP y más baja homología (78-87%) con miembros de AG 9TX.

1.2.9.2. AG 9TX

Los aislamientos de AG 9TX son auxotróficos para tiamina y muestran una homología en la secuencia de bases del ADN alta (> 94%) con miembros de AG 9TX y una homología más baja (78-87%) con miembros de AG 9TP.

En general los aislamientos del grupo AG 9, son patógenos poco agresivos y se encuentran en el suelo. Los aislamientos patogénicos infectan crucíferas, papa y otras hortalizas. Se encuentra en Alaska y Oregon, Estados Unidos.

Teleomorfo: *T. cucumeris*.

1.2.10. AG 10

Los aislamientos de este grupo no han sido bien estudiados ; sin embargo, se sabe que son capaces de fusionarse solamente con miembros de AG 10. El aislamiento para realizar la prueba de anastomosis es ATCC 776107, "accession" W-395, aislado de cebada de Washington, U.S.A. Se presenta en el noroeste del pacífico asociado con cultivos de grano pequeño. Es un patógeno que habita en el suelo y parece que es principalmente saprófito; sin embargo, su patogenicidad no esta bien documentada.

Teleomorfo: *T. cucumeris*.

1.2.11. AG 11

Los aislamientos del grupo de anastomosis AG 11, fueron colectados del Oeste de Australia y Arkansas. Son capaces de presentar fusión de hifas con miembros de AG 11 y presentan una reacción de puntos de contacto (categoría C1) con miembros de los grupos AG 2, AG 8 y AG BI, lo que indica que existe una relación puente entre estos aislamientos. Algunos aislamientos fructifican en agua agar al 1.5%, en jugo V8 agar 2% y en cajas cubiertas con suelo donde produce las estructuras típicas de *Thanatephorus cucumeris*. El micelio en papa dextrosa agar es de color blanco a bronceado claro cuando las hifas son jóvenes, pero llega a ser bronceado o pardo claro cuando éstas envejecen. En el medio de cultivo es común observar anillos oscuros y blancos formados por el micelio. Los esclerocios maduros son de color bronceado a pardo claro y están dispersos sobre la superficie del agar. Los representantes del AG 11 son auxotróficos para tiamina. Se reporta causando daños en lupino, soya y otras plantas en el campo, y en invernadero y cámaras de crecimiento daña otros cultivos como, algodón, rábano, trigo y papa (Carling *et al.* 1994).

1.2.12. AG-BI

Este grupo es llamado “grupo puente” y se encuentra en Japón. Los aislamientos son auxotróficos para tiamina y muestran homología en la secuencia de bases del ADN alta (91-97%) con representativos del AG IB. Los aislamientos presentan fusión de hifas con miembros de AG BI y también con miembros de AG 2, AG 3, AG 6 y AG 8. El aislamiento de referencia para la anastomosis es ATCC 76132, “accession” TS-2-4, aislado de suelo de Hokkaido, Japón. Los miembros de este grupo se consideran no patogénicos.

1.3 Grupos puente y la relación entre grupos puente

En las revisiones actuales sobre los grupos de anastomosis se observa una característica de especial importancia entre ellos. En algunos aislamientos ocurre la fusión de hifas con aislamientos de grupos diferentes, y a los aislamientos que presentan esta propiedad se les conoce como “grupos puente”. Los aislamientos puente son entonces aislamientos que pueden producir una reacción de anastomosis (generalmente reacción C1), con aislamientos de más de un AG. Un ejemplo claro es el que presenta el grupo AG BI el cual puede anastomosarse con miembros de los grupos AG 2, AG 3, AG 6 y AG 8. Esta característica cambia el concepto de que los aislamientos están separados genéticamente y muestra que la separación no siempre es definitiva. Esto puede explicar en parte la razón por la que los grupos de anastomosis no han sido clasificados como especie (Carling, 1996).

1.4. Aislamientos que no forman anastomosis entre ellos mismos

En los estudios de identificación de grupos de anastomosis de *R. solani* es común encontrar en los resultados que se presentan aislamientos que no se anastomosan con ningún grupo de referencia y en algunas ocasiones ni con ellos mismos, a pesar de pertenecer a un mismo grupo y de ser aislados de un mismo campo y de un mismo cultivo. En el grupo AG 2-2 aislado de remolacha azucarera Hyakumachi y Ui (1987), (Citados por Carlig, 1996), encontraron que los aislamientos que no forman anastomosis tienen velocidades de crecimiento similares en medio de cultivo que aquellos que si forman anastomosis; además, los primeros producen micelio aéreo abundante, no crecen en suelos cultivados y pueden o no producir esclerocios. En trabajos realizados en tabaco también se presenta esta característica con el grupo AG 3 (Carling, 1996). Hasta ahora se sabe que los AGs 1, 3, 4 y 5 presentan esta propiedad; sin embargo se piensa que todos los grupos presentan dicha característica. La posible explicación a este comportamiento parece ser que a estos aislamientos les falta el factor que se requiere para que ocurra la anastomosis. El fenómeno no ha sido bien estudiado hasta el momento; sin embargo, el

conocimiento de éste puede ser de gran utilidad en estudios dirigidos hacia el entendimiento de los sistemas genéticos que controlan la anastomosis en *R. solani*.

2. Grupos de anastomosis de *R. solani* que atacan papa

Bolkan y Ribeiro (1985) en un estudio realizado en Brasil colectaron muestras de diferentes hospedantes y se observó que el grupo AG 4 se encontró en la mayoría de ellos. En papa se encontró al AG 3 en 10 aislamientos de tubérculos y el AG 4 en 2 aislamientos de tallos, 8 aislamientos no se anastomosaron con ninguno de los aislamientos de referencia ni con ellos mismos. El AG 3 no fue patogénico en las especies ensayadas ("Kidney bean", "red papper", rábano, remolacha azucarera y col); mientras que, el AG 4 fue patogénico en todas ellas. El AG 2 y AG 3 muestran una gran especificidad en hospedantes, mientras que los AG 1 y AG 4 atacan a un mayor número de especies.

Carling y Leiner (1986) colectaron aislamientos de lesiones, himenio y esclerocios de plantas de papa de seis localidades de Alaska y encontraron a los aislamientos AG 2-1, AG 3, AG-NO y aislamientos binucleados, en 20.1 73.7, 3.6 y 2.7%, respectivamente. El grupos AG 3 se presentó en mayor proporción en todas las localidades y en todas las partes colectadas. El grupo AG 2-1, se encontró en mayor proporción en partes de himenio y lesiones y menor en esclerocios. El AG 3 estuvo asociado principalmente con esclerocios y menos asociado con himenio y lesiones. Los aislamientos AG-NO y binucleados se encontraron en lesiones e himenio pero no en esclerocios. Las lesiones producidas por los aislamientos pertenecientes al AG 3 fueron mayores que las ocasionadas por los otros aislamientos y los aislamientos de AG 3 obtenidos de estas partes fueron de moderadamente a altamente patogénicas, mientras que los otros fueron de medianamente virulentos a avirulentos.

De 50 aislamientos de papa colectados por Bandy *et al.* (1984) nueve fueron identificados como AG 5. Los nueve aislamientos se fusionaron fácilmente con

miembros de los aislamientos AG 5. En pruebas de patogenicidad bajo condiciones de invernadero, 8 de los 9 aislamientos produjeron lesiones cafés hundidas en tallos de papa cv. Kathadin, el noveno parece que no es patogénico. Además, en este estudio se determinaron aislamientos AG 1, de los cuales 5 fueron tipo *sasakii* y 1 del tipo microesclerotia. Se encontraron 8 AG 2 los cuales se fusionaron más fácilmente con miembros del AG 2-1 que con AG 2-2. También se colectaron aislamientos del grupo AG 3, 13 AG 4 y uno no determinado. Se observaron diferencias en velocidad de crecimiento a 18 °C y 24 °C,. El grupo AG 1 crece más rápidamente, le siguen el AG 4, AG 3, y AG 5.

Bandy *et al.* (1988) aislaron 307 cepas de *R. solani* asociadas con canchros de tallos, estolones y costra negra en papa y fueron identificados en base al concepto de grupos de anastomosis. Los resultados confirmaron que el grupo AG 3 es el mayor causante de la enfermedad conocida como "Rizoctoniasis" en papa. El 100% de los aislamientos obtenidos de esclerocios de tubérculos para semilla y el 82.1% de los obtenidos de tallos y estolones fueron miembros del AG 3. El segundo grupo en importancia fue el AG 5 con 13.4%, presente en lesiones de tallos y estolones. El grupo de anastomosis AG 1 asociado con papa en otras regiones no fue aislado en este estudio. Además, se seleccionaron 150 aislamientos de AG 3 para identificarlos usando el medio Stewart, y se encontró que solo 130 de ellos produce el color café característico para su identificación y los 20 restantes producen un color blanco sobre dicho medio, por lo que cuestionan los resultados obtenidos mediante esta prueba. Estos resultados, indican que el medio puede ser útil para seleccionar un número grande de aislamientos y conocer la presencia del AG 3, pero éste no es confiable como único método para ensayos cuantitativos, debido a que el 10% de los aislamientos producen micelio blanco en lugar del color café o castaño que se requiere para su identificación. En las pruebas de patogenicidad, 19 de 20 aislamientos de tubérculos AG 3 probados se comportaron como patogénicos a brotes de papa y uno fue casi avirulento. El aislamiento hipovirulento y siete más de los virulentos produjeron micelio blanco en medio Stewart, indicando con esto que no existe correlación entre la patogenicidad y el color de la reacción.

En una prueba de invernadero se evaluó la virulencia de 174 aislamientos de *R. solani* AG 3 sobre tallos de papa. Los aislamientos obtenidos de lesiones en estolones, esclerocios sobre los tubérculos e himenio sobre los tallos aéreos fueron los más virulentos, aquellos procedentes de tallos abajo de la tierra fueron intermedios y los aislamientos de una basidiospora los menos virulentos, tal vez este comportamiento se deba a que los más virulentos son heterocarióticos.

El síntoma de “Rizoctoniasis” fue evaluado en tres zonas: en suelo arenoso bajo riego, en Becker, Minnesota, en suelo altamente margoso, en Grand Forks, North Dakota y en suelo turboso, en Anoka, Minnesota. La enfermedad fue más severa en el suelo arenoso bajo riego, intermedia en suelo altamente margoso y menos severa en suelo turboso. En estas pruebas los esclerocios sobre los tubérculos fueron más virulentos que el inóculo presente en el suelo. Además, las variedades con mayor incidencia de *R. solani* fueron las de ciclo más corto (Hill y Anderson, 1989).

Alonso *et al.* (1994) muestrearon un total de 69 lotes y colectaron 181 aislamientos. Ellos encontraron 8 aislamientos binucleados y 163 multinucleados. Para el caso de los aislamientos multinucleados se identificó a la especie *R. solani*. Respecto a los grupos de anastomosis se identificaron 5 aislamientos pertenecientes al AG 2, 112 AG 3, 5 AG 4, 3 AG 5 y un aislamiento que no presentó anastomosis con ninguno de los grupos de referencia (AG-NC).

Carling y Leiner (1990a) en suelos cultivados con cebada, “blue grass” y zanahoria y de suelos de barbecho, encontraron que cerca del 95% de los aislamientos de partes de la planta y tubérculos fueron determinados como miembros del grupo AG 3, mientras que solamente el 52% de los aislamientos de suelo fue AG 3; probablemente se debe a que en las plantas se ha seleccionado el aislamiento debido a su especificidad por este hospedero y en el caso del suelo no existe tal selección. Además, se aislaron a los grupos AG 2-1 y AG 9, un binucleado y un aislamiento similar al tipo *R. oryzae*. En las pruebas de patogenicidad los aislamientos AG 3 mostraron ser más patogénicos en

brotos de papa. Los aislamientos AG 3 obtenidos de campo que habían sido cultivados continuamente con papa, fueron más virulentos que aquellos cultivados en rotación. Asimismo, los aislamientos de himenio fueron más virulentos que los aislamientos de lesiones. En trabajos anteriores se ha mencionado que el tamaño de los esclerocios es determinante en el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, ellos creen que se deba a una mayor retención de vigor obtenida en el medio de cultivo.

Carling y Leiner (1990b) confirman la especificidad del AG 3 en papa al encontrar que este grupo mató significativamente más brotes que cualquier otro grupo, lo cual nuevamente constata que este grupo es el patógeno más agresivo a papa entre los grupos de *R. solani* y especies relacionadas. Además, mencionan que el AG 5 es de moderadamente a ligeramente virulento en papa y los mayores daños ocurren a 15.5 y 21.1 °C. Los grupos reportados anteriormente en asociación con plantas y tubérculos de papa (AG 1, AG 2-1, AG 2-2 y AG 9) causan daño mínimo en papa. En el experimento se incluyeron tres aislamientos del grupo AG 4 obtenidos por Gudmestad (1989) quien los reportó como parásitos de raíces; sin embargo, encontraron que éstos fueron de medianamente virulentos en brotes y esencialmente no patogénicos en raíces y el mayor daño se registró a las más altas temperaturas. Además, se determinó la temperatura a la cual los diferentes aislamientos ocasionan el mayor daño y encontraron que el AG 3 daña en exceso brotes a 10, 15.5 y 21.1 °C, pero causa significativamente más daño a 10 °C, y ocasiona daños en raíces a las tres temperaturas. Los pertenecientes al AG 5 dañan brotes a 15.5 y 21.1 °C, pero causan un daño mínimo en raíces. Los aislamientos AG 8 causan daño ligero a raíces y menor daño a brotes en todas las temperaturas.

De lo anterior se puede decir que el AG 3 es más virulento a temperaturas más frías y que los aislamientos AG 5 y AG 8 pueden ser más importantes a temperaturas más cálidas. Además, reportan al grupo AG 8 como posible patógeno de papa el cual no se había reportado hasta el momento.

De 64 aislamientos de *R. solani*, colectados de plantas de papa en el centro y sur de Alberta, se determinaron 49 aislamientos pertenecientes al AG 3, 7 al AG 4, 7 al AG 5 y un aislamiento que no presentó anastomosis con alguno de los aislamientos de referencia usados (AG 2-1, AG 3, AG 4, AG 5 y AG 9). Este es el primer reporte de la asociación de los grupos AG 4 y AG 5 con la enfermedad de "Rizoctoniasis" en Alberta, Canada. La velocidad de crecimiento radial *in vitro* fue significativamente más baja que la de los aislamientos AG 4 y AG 5, mientras que la de los dos últimos grupos fue muy similar. Los miembros del AG 3, AG 4 y AG 5 fueron aislados de todas las regiones muestreadas. En pruebas de patogenicidad los aislamientos AG 3 fueron más virulentos que los aislamientos de los otros dos grupos (Bains y Bisht, 1995).

La alta incidencia y virulencia de los aislamientos de AG 3 indica que éste es el mayor causante de la enfermedad en papa en Alberta, mientras que los grupos AG 4 y AG 5 son de menor importancia.

Rocha *et al.* (1995) determinaron mediante la técnica de confrontación de hifas los grupos de anastomosis de *R. solani* en tubérculos-semilla de papa, provenientes de Chihuahua, Coahuila, Jalisco, Estado de México y Michoacán. En los tubérculos de Chihuahua se identificaron 12 aislamientos AG 3, este mismo grupo fue aislado en las muestras de Coahuila y Jalisco; en los muestreos del Estado de México se aislaron a los grupos AG 2 y AG 3 y tres no se pudieron identificar; en el caso de Michoacán 5 aislamientos correspondieron al AG 3 y uno no se pudo identificar.

Virgen *et al.* (1996) realizaron un estudio en el Estado de Guanajuato para determinar los grupos de anastomosis de *R. solani* presentes en papa. La determinación de los grupos se realizó mediante la confrontación de hifas utilizando los grupos de referencia AG 2, AG 3, AG 4 y AG 5 (reportados en Coahuila y Nuevo León). Se encontró que el 70% de los aislamientos pertenecieron al AG 3 y 30% al AG 4. El AG 3 se encontró en la etapa inicial y final del cultivo, mientras que el AG 4 se aisló en la etapa de floración.

3. Sensibilidad de los grupos de anastomosis a los fungicidas

Se evaluó la eficacia del pencycuron contra aislamientos de *R. solani* y aislamientos binucleados del género *Rhizoctonia* en suelo y en invernadero a 10.0, 1.0 y 0.1 $\mu\text{g/g}$ de suelo. El suelo se infestó separadamente con los aislamientos de *R. solani* AG 2-1, AG 2-2 y AG 4 y con los aislamientos binucleados CAG 2, CAG 3, CAG 4 y CAG 5, aislados de suelo y plantas de Georgia. De todos los aislamientos probados solamente el AG 2-1 fue resistente al pencycuron el cual causa pudrición de hipocótilo y raíz en "snap bean". La pudrición de hipocótilos y raíces de "snap bean" causado por los aislamientos AG 2-2, AG 4, un segundo aislamiento AG 2-1 y los aislamientos CAG 5 fueron controlados con pencycuron a 10.0 y 1.0 mg/g de suelo (Sumner, 1987).

Carling *et al.* (1990) encontraron diferencias en la sensibilidad de los diferentes grupos de anastomosis de *R. solani* a los fungicidas iprodiona, hexaconazol, PCNB, benomyl y prochloraz. Estos investigadores mencionan que todos los AGs pueden ser llamados extremadamente sensibles al hexaconazol, debido a que los valores de CE_{50} se ubican por debajo de 1 mg i.a./l y de moderadamente sensibles a los demás fungicidas. A excepción del AG 2-2 todos los demás aislamientos fueron más sensibles al hexaconazol, con valores de CE_{50} entre 0.10 mg de i. a./l a $< 0.01 \text{ mg de i. a./l}$. Los grupos AG 3, AG 4 y AG 5 tienen valores de CE_{50} de 0.08, 0.05 y 0.03 mg de i. a./l , respectivamente. En cuanto a la iprodiona existe un rango muy amplio en los valores de CE_{50} que va desde 1.02 en AG 8 hasta 5.80 en AG 2-2, los aislamientos AG 3, AG 4 y AG 5 tienen valores de 0.97, 1.11 y 2.58 mg de i. a./l , respectivamente. Al PCNB fueron medianamente sensibles todos los aislamientos y al benomyl el AG 3 mostró menos sensibilidad y el AG 4 fue muy sensible.

Kataria y Verna (1990) evaluaron 21 fungicidas contra los grupos de anastomosis AG 2-1 y AG 4 presentes en *Brassica napus* y *B. campestris* en suelo mezclado con estos aislamientos. El benodanil, benomyl, carboxin, cyproconazol, flutolanil, furmecycloz, iprodiona, tiabendazol y toclofos metil mostraron fuerte actividad *in vitro*

contra ambos aislamientos. El fenpropimorf, flusilazol, propiconazol, triadimenol y vinclozolin son moderadamente efectivos, mientras que el fenarimol, imazalil y naurimol fueron inefectivos contra ambos aislamientos. El pencycuron inhibe fuertemente al AG 2-1, pero es inefectivo contra el aislamiento AG 4, la dosis obtenida para este aislamiento fue de $> 500 \mu\text{g/ml}$. El fenpropimof, furmecyclox, iprodiona, y toclofos metil, aplicados en semillas de los dos cultivares a 1 Kg de *i.a./Kg*, proporcionan cerca del 90% de control de damping-off en preemergencia en parcelas infestadas con cualquiera de los dos aislamientos o con ambos. El furmecyclox y la iprodiona a 2-4 Kg de *i. a./Kg* fueron los fungicidas más efectivos contra la pudrición de la raíz en plántulas en postemergencia causado por el aislamiento AG 2-1. El cyproconazol proporciona el 90% de control contra damping-off (AG 2-1) a las más bajas dosis de 0.03 y 0.12 g de *i. a./Kg*. en ambos cultivares, respectivamente, pero da un control pobre de pudrición de raíz en plántulas. Generalmente, se requiere una cantidad más alta de fungicida para tratar la semilla de *B. campestris* que en *B. napus* para tener un nivel equivalente de control. Esto está relacionado con el número de semillas por kilogramo que tiene cada una de ellas.

Kataria *et al.* (1991a) evaluaron 14 fungicidas con diferente modo de acción y encontraron que el cyproconazol y el toclofos metil en pruebas realizadas *in vivo* e *in vitro* inhibieron el crecimiento de cinco especies de *Rhizoctonia* (*R. solani*, *R. cerealis*, *R. sasakii*, *R. zeae* y *R. oryzae*). El triadimenol y carboxim mostraron una variación considerable en actividad contra los diferentes aislamientos y especies, mientras que el prochloraz fue inefectivo en todas ellas. El imazalil y el fenarimol mostraron un control moderado, mientras que el fluazilazol, propiconazol, fenpropimorf y benomyl mostraron fuerte actividad contra *R. zeae* y *R. oryzae*; pero fueron menos efectivos contra *R. sasakii*, *R. solani* y *R. cerealis*. El benodanil e iprodiona controlaron todos los aislamientos de *R. solani* y *R. cerealis*, pero fueron inefectivos contra *R. zeae* y *R. oryzae*. El pencycuron mostró fuerte actividad contra *R. sasakii* y la mayoría de los aislamientos de *R. solani*, actividad moderada contra *R. zeae* y fue inefectivo contra *R.*

oryzae y *R. cerealis*. Las dosis de pencycuron para los grupos AG 3 y AG 4 fueron de 0.2 y > 500 µg/ml, respectivamente.

Kataria *et al.* (1991b) evaluaron *in vitro* los fungicidas carboxin, furmecycloz, thiabendazol, pencycuron, toclofos metil, iprodiona, vinclozolin, cyproconazol, fenpropimorf, fenarimol e imazalil contra los grupos de anastomosis de *R. solani* AG 2-1, AG 2-2, AG 3, AG 4, AG 5, AG 6, AG 7, AG 8 y AG 9.

Entre los fungicidas evaluados el toclofos metil da la inhibición más fuerte de todos los grupos de anastomosis ya que presenta los valores más bajos de CE₉₀. Todos los AGs fueron también fuertemente inhibidos por la iprodiona. El vinclozolin presenta fuerte actividad contra AG 1, AG 4, AG 5 AG6 y AG 7, y actividad moderada contra los otros cinco grupos. Aunque el vinclozolin y la iprodiona pertenecen al grupo de las dicarboxamidas, el vinclozolin muestra más baja actividad que la iprodiona contra todos los grupos. Entre los fungicidas que inhiben la biosíntesis del ergosterol (cyproconazol, fenpropimorf, fenarimol e imazalil), solamente el cyproconazol muestra fuerte actividad contra todos los AGs. El fenpropimor muestra moderada actividad contra AG 4, AG 5 y AG 8, y fuerte actividad contra los otros grupos. El tiabendazol muestra actividad considerable hacia varios AGs, pero los grupos AG 2-1 y AG 2-2 fueron los menos sensibles. Los dos fungicidas del grupo de las dicarboxamidas (Carboxin y furmecycloz), muestran amplia variabilidad en su actividad contra varios AGs, aunque la mayoría fue sensible a estos fungicidas, sin embargo, el furmecycloz presenta más alta actividad que el carboxim. El carboxin muestra actividad moderada y débil hacia AG 2-2 y AG 5, respectivamente.

El pencycuron inhibió muy fuertemente a los grupos AG 2-2, AG 3, AG 6 y AG 9, pero es inefectivo contra AG 1, AG 2-1, AG 4, AG 5, AG 7 y AG 8. El fenarimol presenta fuerte actividad hacia AG 1 y AG 7, pobre actividad en AG 6 y no es efectivo contra los otros AGs. El imazalil solamente inhibe de forma moderada al AG 1 y muestra pobre actividad contra AG 6 y AG 8 y no es efectivo contra los otros ocho

grupos. Además, se realizaron pruebas *in vitro* de estos fungicidas con los grupos AG 2-1 y AG 4, aislados de canola. Los fungicidas carboxin, iprodiona, cyproconazol y tolclofos metil muestran consistentemente actividad contra la mayoría de las cepas de AG 2-1 y AG 4. El pencycuron no fue efectivo contra todos los aislamientos de AG 4, pero muestra fuerte actividad contra la mayoría de los aislamientos de AG 2-1.

Es de esperarse que entre los grupos existan diferencias en su respuesta a los fungicidas debido a que cada grupo presenta patrones diferentes en características serológicas, perfiles de proteínas solubles y composición de bases del ADN, entre otras. Además, la naturaleza química de específica y modo de acción de los fungicidas explica también en parte dicha respuesta.

Ueyama *et al.* (1993) aplicaron pencycuron marcado con C¹⁴ a cuatro aislamientos de *R. solani*, los cuales difieren en la sensibilidad a fungicidas. De los cuatro aislamientos evaluados, dos fueron sensibles (S1=C-423, AG 1, y S2=R-C, AG 4) y los otros dos fueron tolerantes (T1=Rh-131 AG 4 y T2=SH-1, AG 5) a pencycuron. La CL₅₀ para el AG 4 de arroz fue de 0.025 µg/ml y para el AG 4 de remolacha fue de 0.10 µg/ml. El aislamiento S1 (AG 1) metaboliza en 85% el pencycuron en un medio líquido a 0.05 ppm; mientras que, los aislamientos S2 (AG 4), T1 (AG 4) y T2 (AG 5), lo metabolizan más lentamente y solamente de 10 a 20% del pencycuron a las 24 hr después de la incubación. El principal metabolito fue *cis* y *trans*-3-hydroxycyclopentyl pencycuron (P-1 y P-2, respectivamente), los cuales presentan una menor actividad fungicida. Esto sugiere que el pencycuron por si mismo es una sustancia activa última o principal y que la activación metabólica o detoxificación es menos importante para explicar la diferencia entre los AGs en la sensibilidad al fungicida.

Olaya *et al.* (1994) reportan que los aislamientos de *R. solani* AG 2-1, AG 2-2, AG 4 y AG 5 y *Rhizoctonia* binucleados, exhiben sensibilidad variable a los fungicidas benomyl, iprodiona, pencycuron, tolclofos metil y fludioxinil. El tolclofos metil y el fludioxinil fueron muy efectivos a bajas concentraciones en la inhibición del crecimiento

radial en medio de cultivo de todos los aislamientos. En los aislamientos que causan damping-off en rábano (AG 4 y AG 5) se encontró que son altamente resistentes a pencycuron. El porcentaje de inhibición del crecimiento radial con pencycuron para el AG 4 con las dosis de 1.0, 10.0 y 100.0 $\mu\text{g/ml}$ fue de 3.1, 17.3 y 22.4, respectivamente. Se requiere de dos aplicaciones foliares para reducir la incidencia y severidad de la enfermedad causada por los grupos de anastomosis AG 4 y AG 5 de *R. solani* en rábano bajo condiciones de campo. La aplicación de los fungicidas hecha antes de la inoculación con *R. solani*, resultó ser la más efectiva que aquella realizada después de la inoculación.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestreo y colecta del material

El estudio se condujo principalmente en la zona papera representativa del Estado de México, para ello se realizaron muestreos a partir de 1995, en los municipios San Felipe del Progreso, Calimaya, San Miguel Balderas y Zinacantepec, ubicados en la parte norte del Estado. La producción de esta región es destinada principalmente al mercado ya sea como producto fresco o bien para industrializar, aunque en el municipio de Calimaya se siembra papa para semilla, debido a que esta zona se considera libre del nemátodo dorado de la papa.

Con el fin de obtener muestras representativas de cada lugar, se eligieron parcelas al azar para realizar dicho proceso. Cada muestra estuvo compuesta de tallos afectados por la enfermedad, tubérculos con esclerocios. Sin embargo, es necesario señalar que en San Juan de las Huertas se colectaron tallos jóvenes; mientras que en las demás localidades se colectaron tallos maduros casi próximos a cortarse. Cada muestra se colocó en una bolsa de plástico y se etiquetó. Se colectaron un total de 37 muestras, mismas que se procesaron en el laboratorio de Hongos Fitopatógenos del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. Los datos de colecta aparecen en el Cuadro 1 del Apéndice.

Se obtuvieron aislamientos de *R. solani* de plantas de haba y frijol, colectadas en el campo Experimental de la Universidad Autónoma Chapingo y un aislamiento de chile, colectado en San Luis Potosí.

2. Aislamiento del patógeno

Rhizoctonia solani es relativamente fácil de aislar, debido a que no requiere condiciones o medios específicos. El hongo crece muy bien en papa dextrosa-agar (PDA), e incluso en agua-agar al 2%.

Los tallos y tubérculos colectados se lavaron con agua de la llave para eliminar impurezas, se cortaron trozos pequeños en la parte de avance de la infección en tallos y en tubérculos se cortó la zona donde se encontraba el esclerocio; se pusieron en hipoclorito de sodio al 1% durante 1.5 min.; luego se lavaron con agua destilada estéril; se colocaron sobre un papel filtro estéril y posteriormente se depositaron en cajas de petri con medio PDA. Una vez que se observó el crecimiento del hongo, se transfirió a PDA para tenerlo libre de contaminantes.

3. Aislamientos de punta de hifa

En hongos que forman esporas como parte de su reproducción se le conoce como “cultivos monospóricos” a aquellos cultivos obtenidos a partir de una spora, esto se hace con la finalidad de eliminar la variabilidad que pueda existir dentro de un aislamiento de campo. Debido a la ausencia de estructuras de reproducción en *R. solani*, los cultivos que reúnen estas características se obtienen a partir de puntas de hifas y la finalidad en estudios de identificación de grupos de anastomosis es prácticamente la misma y el término que los define es “cultivos de punta de hifa”.

Para obtener los cultivos de punta de hifa, cada aislamiento de campo se transfirió por separado a una caja de petri cubierta con un capa delgada de agua agar al 2%, esto debido a que el hongo crece menos denso que en PDA y por lo tanto facilita la ubicación de la punta de la hifa; las cajas se incubaron durante 48 hr. y, posteriormente, con una aguja delgada estéril se cortó una punta de hifa, se transfirió a agua agar al 2% y una vez que se observó el crecimiento se realizaron dos transferencias en caja de petri

con este mismo medio, para evitar el crecimiento de hongos contaminantes. Posteriormente, se pasó a PDA, renovándose cada cuatro semanas con medio hasta que se realizaron las confrontaciones. Para facilitar la observación de las puntas de hifa se utilizó un microscopio estereoscópico.

4. Determinación de la condición nuclear

Una característica de *R. solani* es que presenta células multinucleadas, es por esto que, antes de determinar el grupo de anastomosis de un aislamiento de campo, es necesario conocer el número de núcleos por célula. El procedimiento fue el siguiente:

En un portaobjetos se colocó una gota de hidróxido de potasio al 3%, una gota de safranina alcalina y sobre éste, se colocó una parte de micelio de la zona de avance del crecimiento en el medio de cultivo, debido a que las hifas jóvenes se tiñen más fácilmente; se colocó un cubreobjetos y se dejó reposar 10 min., transcurrido este tiempo se observó al microscopio compuesto con el objetivo de 40X. Los núcleos se observaron como puntos de color rojo oscuro.

5. Determinación del grupo de anastomosis

La determinación del grupo de anastomosis se realizó en octubre de 1996, en el Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV), unidad Irapuato. Se utilizó el método de papel celofán cubierto de una capa delgada de agua-agar al 2% en cajas de petri de plástico estériles.

Para este fin se cortaron tiras de papel celofán de 1.5 cm. de ancho por 2 cm. de largo y se esterilizaron en una caja de petri, colocando en ésta, capas de tiras del papel celofán separadas por papel absorbente. Cada capa tuvo como máximo 6 tiras de papel celofán y separadas una de otra para evitar que se adhirieran.

En las cajas de petri de plástico se vació una capa delgada de agua-agar al 2% tratando solamente de cubrir el fondo de la misma; se dejó solidificar esta capa y se colocaron tres tiras de papel celofán, orientadas hacia el centro de la caja. Posteriormente se colocó otra capa delgada de agua-agar al 2% y también se dejó solidificar. Es importante que al vaciar la segunda capa de medio las tiras de papel queden bien estiradas y en caso de que el papel se enrolle se puede usar una aguja de disección curva para extenderlo perfectamente.

La elección de los aislamientos de referencia utilizados para determinar el grupo de anastomosis se hizo de acuerdo al hospedante y a las características de crecimiento en medio de cultivo de los aislamientos de campo. En base a esto se eligieron los grupos AG 3, AG 4, AG 5 y AG 7. Estos grupos ya habían sido reportados por Virgen *et al.* (1996), Rocha *et al.* (1995) y Alonso *et al.* (1994), en aislamientos de papa de diferentes regiones de México.

Los aislamientos de campo y los aislamientos de referencia se transfirieron a PDA y se incubaron a temperatura ambiente durante 3 días, después de esto, del margen de crecimiento del aislamiento de campo se tomó un trozo de micelio y se colocó en el centro de la caja de petri. Con la finalidad de que la zona de traslape se presentase sobre la tira de papel celofán, en la misma caja se colocó un trozo del aislamiento de referencia en cada uno de los extremos de los tres papeles de celofán, teniendo así tres repeticiones en cada aislamiento de campo para cada grupo de referencia.. Esto se hizo para los cuatro aislamientos de referencia y en los 37 aislamientos de campo. Las cajas se incubaron a 24 °C, hasta que se observó la zona de traslape, cuidando que ésta no fuese muy densa para mejorar la observación.

En un portaobjetos se colocó una gota de solución humectante; la zona que se encontraba sobre la tira de papel celofán se cortó y se colocó junto con la tira de papel sobre la gota de la solución humectante, colocando siempre el crecimiento de campo en el lado derecho del portaobjetos, de tal manera que al observarse al microscopio daba la

apariencia de ser el lado izquierdo. Sobre la superficie del micelio se agregó primeramente una gota de solución humectante y posteriormente una gota de azul de trifano y después se distribuyeron cuidadosamente; se colocó el cubreobjetos y se secaron los residuos de las soluciones con un papel absorbente.

La preparación se observó al microscopio compuesto con el objetivo de 10X para localizar la zona de traslape y posteriormente se observaron 5 campos diferentes con el objetivo de 25X para medir los tipos de reacción hifal que se presentaba. Una vez que se observó, se colocó en un recipiente con hipoclorito de sodio al 70% para inactivar el azul de trifano.

Los criterios para medir el tipo de reacción hifal observadas entre el aislamiento de campo y el aislamiento de referencia se presentan en el cuadro 2.

Cuadro 2. Categorías de las reacciones de anastomosis hifal en *Rhizoctonia solani* (Carling, 1996)

CATEGORÍA	RELACION	DESCRIPCION DE LA INTERACCION
C3	Relación de cerca. Mismo grupo de anastomosis. Misma población compatible vegetativamente (PCV). Mismo aislamiento.	Fusión de paredes; fusión de membranas; puntos de fusión frecuentemente no obvios; diámetro de la anastomosis igual o cercanamente igual al diámetro de las hifas; células de la anastomosis y células adyacentes pueden morir, pero generalmente no.
C2	Relacionado. Mismo grupo de anastomosis. Diferente población compatible vegetativamente (PCV). Diferente aislamiento.	Conexión de paredes obvia; contacto de membranas incierto o indefinido; situación de los sitios de reacción obvios; diámetro del punto de anastomosis menor que el diámetro de las hifas; las células de la anastomosis siempre mueren.
C1	Relacionado distantemente. Diferente o mismo grupo de anastomosis.	Contacto entre hifas; conexión de paredes, pero no hay evidencia de penetración membrana a membrana en el contacto; ocasionalmente una o ambas células de la anastomosis y de la células adyacentes mueren.
C0	No relacionados. Diferente grupo de anastomosis.	No hay interacción.

Para determinar una anastomosis como positiva se deben observar por lo menos cinco puntos de fusión en cada confrontación. Para asegurarse de que la anastomosis se da entre el micelio de los dos aislamientos comparados y no entre sí mismos, se debe buscar el origen de las hifas con el objetivo de 10X. Una vez que se tiene práctica es fácil determinar los grupos de anastomosis debido a que cada uno presenta diferencias en el diámetro de las hifas, tipo de ramificación, velocidad y tipo de crecimiento, entre otras. Además, la reacción de muerte de células es muy evidente cuando se fusionan un aislamiento de campo y un aislamiento de referencia.

6. Sensibilidad a fungicidas

Los aislamientos obtenidos de chile, frijol, haba y papa, se sometieron a una prueba de laboratorio para determinar su sensibilidad a los fungicidas fluazinam y pencycuron, recomendados para el control de *Rhizoctonia solani*. En los ensayos se utilizaron los productos comerciales Shogun 50 FW que tiene 50% de fluazinam y Monceren 25 PH que posee 25% de pencycuron. Tomando en cuenta el ingrediente activo presente en cada uno de los productos se hicieron diluciones en agua destilada estéril para obtener las dosis a evaluar. Se utilizaron para medir los productos pipetas de 1 y 10 ml y una balanza analítica marca OHAUS.

Los dos fungicidas se evaluaron por separado para cada uno de los grupos encontrados.

Debido a que en los bioensayos se usaron dosis muy bajas y en las que es difícil medir el producto y agregarlo directamente al medio, se hizo una dilución madre a una concentración a la cual el producto pudiera medirse y se tuviera un mínimo de error. La concentración madre que reunió estas características fue la de 10,000 $\mu\text{g/ml}$. y a partir de ésta, en matraces de 125 ml, se hicieron diluciones de 1 000, 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001 $\mu\text{g/ml}$. De estas diluciones se tomaron las cantidades necesarias en cada una de las dosis a evaluar y se agregaron al medio. Para ejemplificar la preparación de una

dosis, se presenta el caso de la dosis de 10 $\mu\text{g/ml}$. En este caso se tomaron 90 ml de PDA estéril y se le adicionaron 10 ml de la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$. Cada vez que se tomaba una cantidad determinada de las diluciones en agua estéril se agitaba el matraz para homogeneizar el producto.

Se utilizó en todos los ensayos el medio de papa dextrosa-agar PDA. Para preparar un litro de medio de cultivo el procedimiento fue el siguiente:

En un matraz de un litro se agregaron 500 ml de agua destilada estéril y 200 g de papa pelada y picada en trozos pequeños; el matraz se colocó en la olla de presión y se licuó a 15 libras de presión durante 10 min. En otro matraz se agregaron 300 ml de agua destilada estéril, 20 g de dextrosa y 15 g de agar; se agitó para disolver los compuestos; a esta mezcla se le agregó el caldo obtenido de las papa y se aforó a un litro.

En matraces de 125 ml se colocaron las cantidades necesarias de PDA para cada una de las dosis y se esterilizaron a 15 libras de presión durante 15 minutos. Una vez que el medio estuvo suficientemente frío se le agregó el fungicida y se vació en cajas de petri. Luego que el medio solidificó se colocaron discos de micelio del borde del crecimiento de un cultivo joven (72 hr. de crecimiento), en el centro de la caja de petri. Los discos se cortaron con un sacabocados estéril de 6 mm de diámetro. Para evitar problemas de crecimiento, se cuidó que el sacabocados estuviera frío al momento de realizar los cortes.

Las cajas de petri se incubaron en una cámara de crecimiento a temperatura ambiente y a las 72 hr se midió el crecimiento radial del micelio. En cada caja se midieron dos ejes en ángulo recto y al promedio de este crecimiento se le restaron los 6 mm del diámetro del disco.

Para obtener los datos de la respuesta al fungicida fue necesario primeramente obtener la ventana biológica, esto es, determinar la dosis más alta que permite crecer casi

el 100% y la más baja que inhibe casi el 100% del crecimiento micelial del hongo con respecto a un testigo sin tratar. Una vez encontradas estas dosis se agregaron dosis intermedias dentro de cada dosis evaluada anteriormente, adicionando un mayor número de dosis en donde se creía que se encontraba la CE_{50} (concentración efectiva que inhibe el 50% del crecimiento radial del hongo con respecto al testigo sin tratar) . Las dosis evaluadas para obtener la CE_{50} se presentan en los cuadros 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 del Apéndice.

Se usó el programa estadístico PROBIT, para obtener las concentraciones efectivas, de cada producto para cada grupo de anastomosis. Este programa se basa en el análisis de regresión para calcular las concentraciones efectivas.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Determinación de la condición nuclear

La importancia de conocer el número de núcleos por célula ya se mencionó anteriormente; no obstante, reiteramos que para evitar que se identifiquen incorrectamente los aislamientos es necesario conocer primeramente esta característica.

Los 37 aislamientos colectados de papa presentaron células multinucleadas (Figura 1), lo que nos llevó a la conclusión de que se trata de la especie *R. solani*. Existen otras dos especies que presentan esta característica (*R. zeae* y *R. oryzae*; Teleomorfo: *Waitea circinata*); sin embargo, estas atacan solamente gramíneas.

Los aislamientos de chile y frijol presentaron células multinucleadas (Figura 1) y en el aislamiento de haba fueron binucleadas (Figura 2).

El método usado en la tinción de núcleos de los aislamientos de papa, es un método rápido, sencillo y los núcleos se distinguen fácilmente. El inconveniente de este método, es que las preparaciones duran poco tiempo. En el trabajo, se observó que no duran más de 72 horas; después de este tiempo el micelio se deshidrató y fue muy difícil recuperarlas. Sin embargo, es recomendable en trabajos en donde se desea conocer solamente el número de núcleos por célula.

Los núcleos teñidos con safranina O se observaron claramente de color rojo oscuro con el objetivo de 40X y el número por célula fue variable, desde 4 hasta 9. En hifas jóvenes los núcleos se tiñeron más fácilmente y se observaron con mayor nitidez.

El hidróxido de sodio al 3% se utiliza para eliminar citoplasma y algunos organelos con el fin de que los núcleos se observen más claramente. En este trabajo se observó también que cuando se aplicaban dos gotas o más de hidróxido de sodio al 3%, algunos núcleos salían de las células, dificultando el conteo.

Kronland y Stangellini (1988) mencionan que se puede realizar la tinción de núcleos en el medio de cultivo al momento de observar las reacciones de anastomosis; sin embargo, nosotros observamos que al teñir los núcleos de esta forma, su búsqueda y la de los límites de las células es más tediosa y se requiere más tiempo, inclusive en las preparaciones en donde se tomó una parte de micelio, nos percatamos que mientras menos medio llevaba el micelio, mejor era la tinción de los núcleos.

2. Determinación del grupo de anastomosis

En las pruebas de anastomosis realizadas se encontró que los 37 aislamientos de *R. solani* colectados de papa, pertenecen al grupo de anastomosis 3 (AG 3), con lo que se confirmó la patogenicidad de este grupo a papa.

Los aislamientos de chile y frijol fueron AG 4. En el aislamiento de haba no fue posible realizar las confrontaciones debido a que no se tenían los aislamientos de referencia.

En la identificación de los grupos de anastomosis, se usó el método de papel celofán cubierto de una capa delgada de agua-agar al 2% en cajas de petri de plástico estériles. El método es práctico, se reduce el riesgo de contaminación, las hifas se tiñen fácilmente, debido a que no se deshidratan y el manejo de las cajas es más fácil. En comparación con el método descrito por Kronland y Stangellini (1988) este método resulta más caro, debido a que las cajas no se pueden utilizar nuevamente y en el caso de que sean cajas de cristal se requiere una gran cantidad. Esto no sucede al usar portaobjetos estériles ya que, estos pueden reutilizarse. Con respecto al azul de trifano es necesario señalar que esta sustancia es cancerígena por lo que se debe de evitar el contacto con ella, además de tomar las medidas necesarias en su manejo.

Los cuatro grupos presentaron diferencias de crecimiento en medio de cultivo. Así, la velocidad de crecimiento de los grupos AG 4 y AG 7 fue mayor que en los grupos AG 3 y AG 5. El diámetro del micelio visualmente fue mayor en el AG 3 que en el AG 4 y AG 5 y, en el AG 7 fue muy delgado. El micelio de los aislamientos AG 4 y AG 7 tuvo un crecimiento afelpado (con crecimiento hacia arriba de la caja) y de color blanco; mientras que, el micelio de los grupos AG 3 y AG 5 fue de color café. Además, el AG 3 forma más esclerocios y de mayor tamaño que los aislamientos AG 4, AG 5 y AG 7. Al momento de realizar la confrontación de hifas se tomó en cuenta la velocidad de crecimiento de los aislamientos para programar de acuerdo a esta el tiempo de lectura de las reacciones.

En la zona de traslape de las confrontaciones se observaron las categorías C0, C1, C2 y C3. con las cuales se determinó el grupo de anastomosis al que pertenecía el aislamiento de campo.

La categoría C3 se observó solamente entre hifas de un mismo aislamiento. El sitio de fusión entre las dos células fue difícil de observar en el objetivo de 25X, por lo que en este tipo de reacción se hizo necesario observar las hifas con el objetivo de 10X en donde se observó claramente el origen de las células. De acuerdo a la terminología usada por Carling (1996), podemos decir que se trata del mismo grupo de anastomosis y de la misma población compatible vegetativamente (Figura 3).

La categoría C2 se notó claramente y de manera consistente en todos las confrontaciones de los aislamientos de campo contra el aislamiento AG 3, por lo que concluimos que se trata del mismo grupo de anastomosis, pero existe entre estos aislamientos una diferencia de compatibilidad vegetativa. En algunos aislamientos se detectaron más de 5 puntos de unión en cada confrontación. Este tipo de reacción se observó únicamente en dos ocasiones, al fusionarse células de un mismo aislamiento de campo. Esto es correcto ya que Carling, (1996), señala que es posible que exista muerte de células al fusionarse dos hifas de un mismo aislamiento, pero ésta se presenta en una

frecuencia muy baja. La safranina O tiñe de azul intenso las hifas de *R. solani* y en este tipo de reacción las hifas muertas se manifestaron de color claro (Figura 4).

La categoría C1 se presentó en todas las confrontaciones de los aislamientos de campo con el grupo AG 3. En los puntos de contacto en algunas ocasiones se detectó una fusión con el objetivo de 25X, sin embargo, con el objetivo de 40X claramente se vio la individualidad de las células (Figura 5).

La categoría C0 se observó al aparear el aislamiento de campo con los grupos de referencia AG 4, AG 5 y AG 7. En ocasiones las hifas de estos aislamientos se juntaron, pero nunca se unieron (Figura 6). En caso de que las hifas se encuentren creciendo en un mismo plano, es fácil observar que una de ellas crece hacia abajo y sobrepasa a la otra. Utilizando este tipo de reacción, además del diámetro de las hifas, velocidad de crecimiento y color del micelio fue relativamente fácil determinar el grupo de anastomosis en la práctica.

Rhizoctonia solani es importante en muchos cultivos y en algunos de ellos causa daños muy severos; afortunadamente ahora se sabe que algunos grupos de anastomosis son muy específicos de un cultivo, como es el caso del AG 3, que ataca principalmente papa, aunque otros como el AG 4 tienen un rango más amplio de hospedantes. El conocer por lo tanto los grupos de anastomosis presentes en un cultivo y en una zona o región determinada nos permite tener conocimientos más amplios para realizar un mejor manejo de la enfermedad, principalmente en la selección de plantas para establecer un programa de rotación de cultivos. Se cree que la especificidad de hospedantes se debe a que cada grupo posee genes específicos para atacar un determinado grupo de plantas; sin embargo, hasta ahora esto no está bien claro. Los conocimientos obtenidos en los trabajos de biología molecular que se están realizando con este hongo, ayudarán a explicar este fenómeno, además de proporcionar bases para obtener plantas resistentes a un grupo determinado.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con los reportados anteriormente en México y en otros países, en donde se señala que el AG 3 es el principal agente causal de la “costra negra” de la papa. En este trabajo no se encontraron los grupos AG 4, AG 5 y AG 7, reportados por Virgen *et al.* (1996), Rocha *et al.* (1995) y Alonso *et al.* (1994) en estudios realizados en papa. El grupo AG 4 ha sido reportado atacando papa en condiciones cálidas principalmente y es tal vez por esto que no se aisló en este estudio ya que las condiciones climáticas en los sitios de muestreo son muy húmedas y frías.

En este trabajo no se aisló a los grupos AG 5 y AG 7. El grupo AG 5 se reporta atacando tallos de papa en diferentes etapas del crecimiento de la planta, aunque parece ser que no ataca raíces y quienes lo han aislado de papa mencionan que se manifiesta de ligera a moderadamente virulento en este cultivo y Carling y Leiner (1990b) mencionan que este grupo puede ser más importante en climas cálidos. Estas pueden ser algunas de las razones por la cuales no se logró aislar este grupo. Además, en México solamente se ha detectado en aislamientos de papa de Coahuila y Nuevo León, lugares con condiciones más bien cálidas. Por otra parte, los principales hospedantes de este grupo son soya y especies del género *Phaseolus* sp., principalmente *Phaseolus vulgaris*, esto nos hace pensar que en estos lugares se siembra frijol constantemente u otras hortalizas como el chile, hospedante también de este grupo y confirmado en este estudio. Las poblaciones de este grupo se han aumentado y como consecuencia al no estar presentes estos hospedantes y presentarse las condiciones adecuadas el patógeno ataca papa. En el caso del Estado de México no es común que se establezcan estos cultivos, en esas áreas agrícolas.

El grupo AG 7 no ha sido reportado como un patógeno asociado con papa en otros países y en México sólo se ha dado un caso, en aislamientos de papa colectados en Toluca, Estado de México por Virgen, quien envió este aislamiento a Carling, y este investigador confirmó las identificaciones realizadas por Virgen; sin embargo, en las pruebas de patogenicidad que él realizó en Canadá, este aislamiento no fue patogénico a

papa (comunicación personal). Este aislamiento sólo ha sido aislado de suelo, por lo que no podemos, hasta ahora, relacionarlo con papa.

Al parecer la etapa fenológica del cultivo en la cual se colecten los aislamientos influye sobre la frecuencia en que se presentan los grupos en papa. Esto lo mencionan Carling y Leiner (1986) quienes encontraron que el AG 2-1 se aisló principalmente de lesiones en tallos, el AG 3, estuvo más asociado con esclerocios y menos asociado con himenio y lesiones en tallos. Bandy *et al.* (1988) coinciden con Carling y Leiner (1996) con respecto al AG 3 y mencionan además que el grupo AG 5 está más asociado a tallos y estolones. Los aislamientos identificados en el presente trabajo, fueron obtenidos de lesiones de estolones, tallos jóvenes y maduros y de esclerocios; sin embargo, no encontramos ninguno de los aislamientos mencionados anteriormente, por lo que pensamos que los grupo reportados en estos trabajo estén menos asociados a papa, como lo señala Hill y Anderson (1989) y creemos que se encuentran más bien asociados con otros cultivos o bien con las malezas presentes en el campo, puesto que también se ha aislado de suelo.

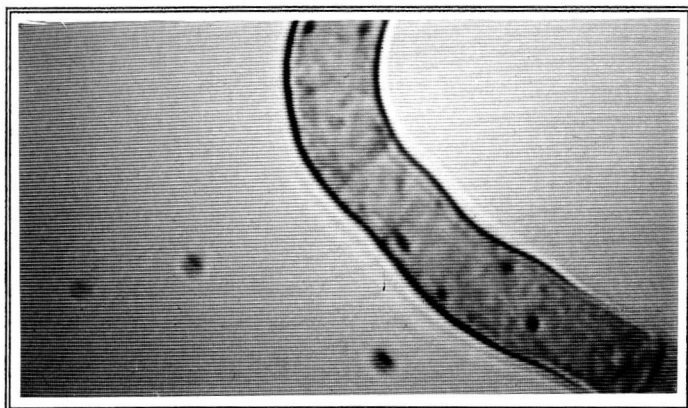


Figura 1.

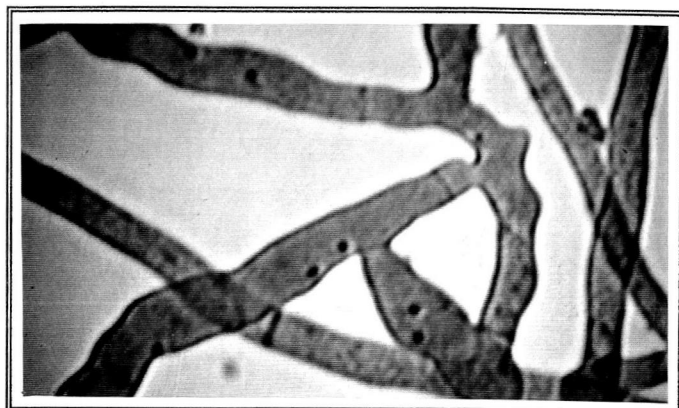


Figura 2.

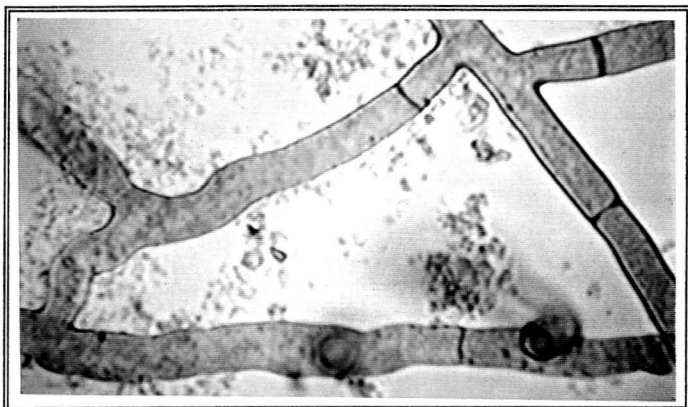


Figura 3.

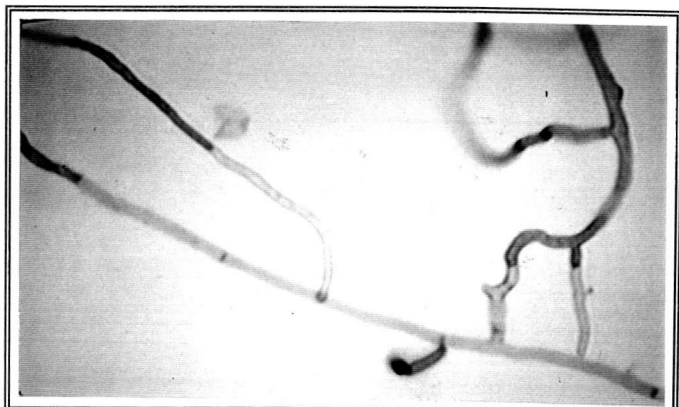


Figura 4.

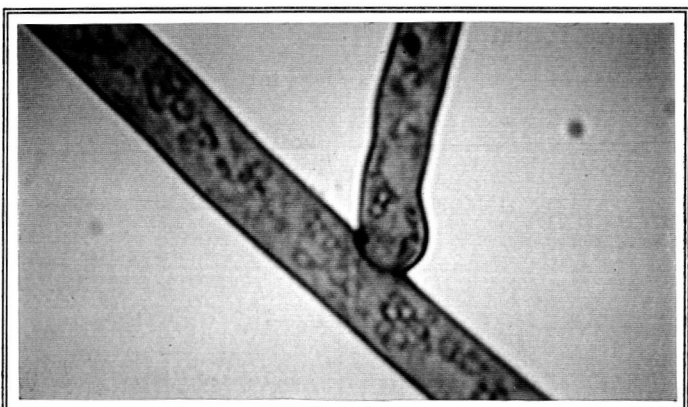


Figura 5.

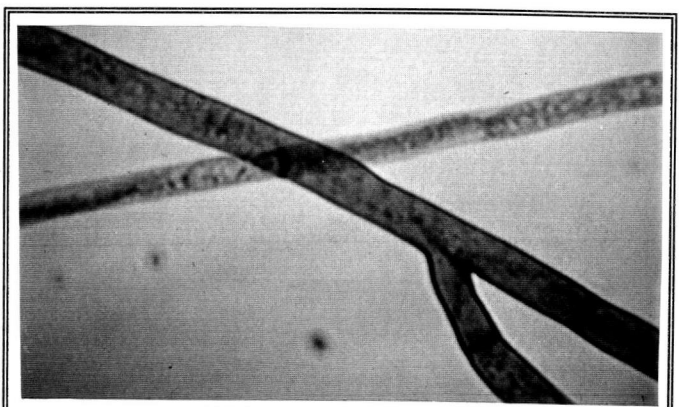


Figura 6.

Figura: 1) Células multinucleadas de *Rhizoctonia* (Aumento 40X); 2) Células binucleadas de *Rhizoctonia* (Aumento 40X); 3) Categoría C3. Fusión sin muerte de células (Aumento 25X); 4) Categoría C2. Fusión con muerte de células (Aumento 25X); 5) Categoría C1. Punto de contacto (Aumento 25X); 6) Categoría C0. No hay interacción (Aumento 25X).

3. Sensibilidad a fungicidas

La utilidad más importante de conocer los grupos de anastomosis de *R. solani*, desde el punto de vista de manejo de la enfermedad, es que cada grupo presenta diferentes niveles de sensibilidad a los fungicidas recomendados para su control. Este comportamiento se confirmó en los ensayos de laboratorio realizados en el presente trabajo, en donde se evaluaron los fungicidas pencycuron y fluazinam contra cuatro aislamientos pertenecientes a los grupos AG 3 (aislado de papa), AG 4 (aislado de chile), AG 4 (aislado de frijol) y un aislamiento de *Rhizoctonia* sp. binucleado (aislado de haba).

3.1 Sensibilidad a pencycuron

En los Cuadros 10 al 17 del Apéndice observamos variación en las dosis que inhiben el mínimo y el máximo porcentaje de crecimiento entre y dentro de cada aislamiento al pencycuron. De esta forma podemos notar en el Cuadro 10 del Apéndice, que el grupo AG 3 fue el más sensible al pencycuron pues requirió 0.0001 $\mu\text{g/ml}$, para inhibir el 5.69% del crecimiento radial y necesitó 5.0 $\mu\text{g/ml}$ para suprimir el crecimiento en un 94.31%.

La respuesta de los aislamientos de chile y frijol identificados como AG 4 para pencycuron varió en su dosis mínima, ya que el aislamiento de chile registró un valor de 0.0001 $\mu\text{g/ml}$ para inhibir el 11.76% y en el aislamiento de frijol la dosis mínima fue de 0.00001 $\mu\text{g/ml}$ con un porcentaje de inhibición del crecimiento de 9.82%. La dosis más alta para estos dos aislamientos fue de 100 $\mu\text{g/ml}$, dosis que inhibió en un 96.64% el crecimiento en el aislamiento de chile y 90.18% en el aislamiento de frijol, Cuadros 11 y 12 del Apéndice. El aislamiento de haba fue el menos sensible a este producto al registrar valores de 0.1 $\mu\text{g/ml}$ en su dosis mínima con 5.43% de inhibición del crecimiento y 2550 $\mu\text{g/ml}$ en su dosis máxima con un 90.21%, Cuadro 13 del Apéndice.

Estos resultados son sorprendentes debido a que este producto no es utilizado en el control de la pudrición del cuello del haba.

Los resultados obtenidos con pencycuron y fluazinam para cada grupo de anastomosis, se sometieron al programa estadístico PROBIT, que se basa en el análisis de regresión lineal para estimar las distintas concentraciones efectivas. Así la CE_{50} nos dio un mejor parámetro del comportamiento de los grupo a los fungicidas.

El Cuadro 3 nos muestra las concentraciones efectivas de pencycuron obtenidas para el grupo de anastomosis AG 3. La CE_{50} para este aislamiento fue de $0.0038 \mu\text{g/ml}$ y la CE_{90} de $0.4354 \mu\text{g/ml}$. Esta última dosis difiere de la obtenida por Kataria *et al.* (1991a) quienes reportan una CE_{90} de $0.2 \mu\text{g/ml}$. Esto indica que el aislamiento de campo utilizado en el presente estudio es menos sensible al reportado por estos autores y esto se debe tal vez a que el diseño del bioensayo nuestro se orientó hacia el cálculo de la CE_{50} y en consecuencia la CE_{50} es sólo una estimación, ya que no pusimos dosis intermedias en esos rangos de inhibición. La posibilidad de resistencia es remota ya que el pencycuron es de muy bajo riesgo de resistencia y en esa región no se utiliza mucho. Además, son regiones diferentes y la variación de los aislamientos puede ser muy amplia, lo que repercute en la respuesta a los fungicidas.

Cuadro 3. Concentraciones efectivas de pencycuron para *R. solani* AG 3, aislado de papa.

CONCENTRACIÓN EFECTIVA	DOSIS (μg de <i>i. a.</i> /ml de PDA)	PENDIENTE
50	0.0038	0.624
90	0.4354	0.624
95	1.665	0.624
98	7.53	0.624

La CE_{50} de pencycuron para el grupo AG 4 aislado de chile fue de $0.008 \mu\text{g/ml}$ y su CE_{90} de $6.621 \mu\text{g/ml}$. Cuadro 4. Al comparar estas dosis con las obtenidas por Kataria *et al.* (1991) encontramos que existe una diferencia considerable ya que ellos

reportan una CE_{90} de 500 $\mu\text{g/ml}$. Estas diferencias se deben probablemente a que este no es el mismo grupo que estos autores trabajaron, puesto que no fue aislado de papa y en consecuencia es más sensible, aunque existen reportes en donde se menciona que los aislamientos del grupo AG 4 son menos sensibles al pencycuron que los pertenecientes al grupo AG 3 (Olaya *et al.* 1994; Kataria y Verna, 1990).

Cuadro 4. Concentraciones efectivas de pencycuron para *R. solani* AG 4, aislado de chile.

CONCENTRACIÓN EFECTIVA	DOSIS ($\mu\text{g de i. a./ml de PDA}$)	PENDIENTE
50	0.008	0.441
90	6.621	0.441
95	44.247	0.441
98	375.047	0.441

La CE_{50} de pencycuron para el caso de frijol fue de 0.065 y su CE_{90} de 564.142 $\mu\text{g/ml}$. Al comparar esta última con la obtenida por Kataria *et al.* (1991) que fue de 500 $\mu\text{g/ml}$, observamos que estas concentraciones son muy similares (Cuadro 5), por lo que es posible que este aislamiento sea el mismo con el que trabajaron estos investigadores.

Cuadro 5. Concentraciones efectivas de pencycuron para *R. solani* AG 4 aislado de frijol.

CONCENTRACIÓN EFECTIVA	DOSIS ($\mu\text{g de i. a./ml de PDA}$)	PENDIENTE
50	0.065	0.326
90	564.142	0.326
95	7373.033	0.326
98	132928.8	0.326

Al analizar los dos aislamientos pertenecientes al mismo grupo de anastomosis pero de cultivos diferentes, es evidente notar que existe una gran diferencia entre ellos, en donde se puede observar que el aislamiento de chile es más sensible al pencycuron. Ueyama *et al.* (1993) encontraron diferencias entre aislamientos del grupo AG 4 obtenidos de hospedantes diferentes. Ellos aislaron el grupo AG 4 de arroz y de remolacha y detectaron que el aislamiento de arroz era el más sensible al pencycuron el

cual presentó un valor de CE_{50} de $0.025 \mu\text{g/ml.}$, mientras que para el aislamiento de remolacha esta dosis fue de $0.10 \mu\text{g/ml.}$ Ellos trataron de relacionar la capacidad de metabolizar el producto por los dos aislamientos; sin embargo, no encontraron una relación entre esta característica y la sensibilidad de los aislamientos al fungicida por lo que concluyen que dicha sensibilidad se debe probablemente a caracteres específicos de cada aislamiento. La variación en sensibilidad que se detectó en nuestros ensayos, creemos que se debe a que los aislamientos pertenecen a subgrupos diferentes dentro del mismo grupo AG 4, ya que sabemos que el producto no ha sido aplicado para el control de esta enfermedad en estos hospedantes; sin embargo, no podemos precisar esto debido a que no se identificaron estos aislamientos hasta este nivel.

La CE_{50} y CE_{90} obtenidas con pencycuron para *Rhizoctonia* sp. binucleado, aislado de haba, fueron de 58.22 y 12591.7 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Este aislamiento fue el menos sensible al pencycuron. Además, estas dosis son muy elevadas y, por lo tanto, incosteables para aplicarlas en el cultivo de haba ya que el cultivo es poco redituable y los gastos en plaguicidas deben ser mínimos. Cuadro 6.

Ponce y Mendoza (1986) señalan que el pencycuron no funcionó contra *R. solani* en haba en distintos sistemas de labranza. La razón de aquella ineficiencia biológica en campo es que este grupo es insensible a pencycuron y en ese tiempo no se sabía; por eso la importancia de los resultados y contribuciones de este estudio.

Cuadro 6. Concentraciones efectivas de pencycuron para *Rhizoctonia* sp. binucleado, aislado de haba.

CONCENTRACIÓN EFECTIVA	DOSIS ($\mu\text{g de i. a./ml de PDA}$)	PENDIENTE
50	58.221	0.549
90	12591.7	0.549
95	57844.53	0.549
98	321603.1	0.549

La sensibilidad de las diferentes especies de *Rhizoctonia* sp. a los fungicidas y en particular al pencycuron ya ha sido estudiada anteriormente. Kataria y Verna (1990)

mencionan que este producto mostró fuerte actividad contra la mayoría de los aislamientos de *R. solani*, *R. sasakii*; actividad moderada en *R. zea* y fue inefectivo contra *R. cerealis*. Aunque ellos no mencionan las causas de estos niveles de sensibilidad, por lo cual creemos que se deban a las diferencia en la composición genética de los aislamientos.

3.2 Sensibilidad a fluazinam

Al analizar los datos obtenidos con fluazinam, sobre el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de los cuatro aislamientos, observamos que el grupo AG 4 aislado de chile fue el más sensible a este producto. La dosis de 0.0001 $\mu\text{g/ml}$, inhibió el 6.93% del crecimiento y la dosis de 500 $\mu\text{g/ml}$. presentó la máxima inhibición con 96.54%, Cuadro 15 del Apéndice. El aislamiento de frijol (AG 4) y el aislamiento de haba presentan porcentajes de inhibición mínimos y máximos similares, Cuadros 16 y 17 del Apéndice. En estos aislamientos la dosis mínima fue de 0.0001 $\mu\text{g/ml}$. en donde se registró un 5.43% en el aislamiento de frijol y 8.23% en el de haba. La dosis máxima para estos dos aislamientos fue de 1000 $\mu\text{g/ml}$. con porcentajes de inhibición de 92.39% y 92.94%, respectivamente. El grupo AG 3 aislado de papa fue el menos sensible a este producto para el que la dosis mínima fue de 0.0001 $\mu\text{g/ml}$ en donde se registró un 10% de inhibición del crecimiento y la dosis máxima fue de 1500 $\mu\text{g/ml}$ con 95.83% de inhibición, Cuadro 14 del Apéndice.

Los efectos del fluazinam sobre *Rhizoctonia solani* no han sido bien estudiados por lo que para el análisis del este producto tomaremos la dosis de la concentración mínima inhibitoria (MIC), reportada en el folleto técnico publicado por la compañía ISK. La MIC, es la concentración mínima que inhibe el 100% del crecimiento del hongo, que en el caso de *Rhizoctonia solani* se reporta que esta dosis es de 100 $\mu\text{g/ml}$ (Anónimo, S/F).

El aislamiento AG 3 comparado con los demás aislamientos mostró un sensibilidad intermedia ya que su CE_{50} fue de 0.0447 y su CE_{95} de 289.98 $\mu\text{g/ml}$; sin

embargo, la dosis de la CE₉₀ es casi tres veces a la recomendada para su control (Cuadro 7).

Cuadro 7. Concentraciones efectivas de fluazinam para *R. solani* AG 3, aislado de papa.

CONCENTRACIÓN EFECTIVA	DOSIS (μg de i. a./ml de PDA)	PENDIENTE
50	0.0447	0.432
90	41.704	0.432
95	289.984	0.432
98	2570.305	0.432

El aislamiento AG 4 aislado de chile fue el más sensible a este producto ya que la CE₅₀ para este aislamiento fue de 0.03 μg /ml; mientras que, la CE₉₀ fue de 5.579 μg /ml. Para este aislamiento se observa que aún la dosis de la CE₉₈ es casi similar a la reportada, por lo que la recomendación para este aislamiento puede ser válida (Cuadro 8).

Cuadro 8. Concentraciones efectivas de fluazinam para *R. solani* AG 4, aislado de chile.

CONCENTRACIÓN EFECTIVA	DOSIS (μg de i. a./ml de PDA)	PENDIENTE
50	0.03	0.566
90	5.579	0.566
95	24.469	0.566
98	129.121	0.566

Por otra parte el aislamiento de frijol fue menos sensible que el aislamiento de chile a fluazinam ya que la CE₅₀ de este fue de 1.67 y la CE₉₅ de 30121.6 μg /ml. Esta dosis, está muy por arriba de las recomendadas para el control de *Rhizoctonia solani*. Este grupo resultó ser el menos sensible al fluazinam, dentro de los grupos ensayados. El cultivo en este caso no es tan determinante en la respuesta ya este producto no se utiliza para controlar la enfermedad en ninguno de los dos cultivos. Esto nos proporciona más bases para suponer que se trata de subgrupos diferentes, los cuales presentan diferencias considerables en su respuesta a los fungicidas (Cuadro 9).

Cuadro 9. Concentraciones efectivas de fluazinam para *R. solani* AG 4, aislado de frijol.

CONCENTRACIÓN EFECTIVA	DOSIS (μg de <i>i. a.</i> /ml de PDA)	PENDIENTE
50	1.677	0.387
90	3458.86	0.387
95	30121.6	0.387
98	343930.6	0.387

El aislamiento de haba mostró una sensibilidad intermedia al fluazinam al registrarse su CE_{50} y CE_{95} en 0.447 y 5564.33 μg /ml, respectivamente. Los valores de la CE_{95} en este caso son muy superiores a la dosis recomendada para su control y en este caso al igual que para pencycuron las dosis son incosteables (Cuadro 10).

Cuadro 10. Concentraciones efectivas de fluazinam para *Rhizoctonia* sp. binucleado, aislado de haba.

CONCENTRACIÓN EFECTIVA	DOSIS (μg de <i>i. a.</i> /ml de PDA)	PENDIENTE
50	0.447	0.402
90	693.101	0.402
95	5564.332	0.402
98	57977.02	0.402

La respuesta del grupo AG 3 aislado de papa los fungicidas evaluados, es interesante ya que tanto el fluazinam como el pencycuron son recomendados en papa para el control de la “costra negra”. Este aislamiento fue más sensible a la acción de pencycuron que a la del fluazinam. Al comparar las dosis de las CE_{50} obtenidas observamos que la del fluazinam es 11 veces mayor a la obtenida con pencycuron, aunque en ensayos de campo se ha observado un mejor control de la enfermedad con fluazinam. Por otra parte, se observaron resultados similares con los grupo AG 4 aislado de chile y de haba, en donde al comparar las dosis de las CE_{50} las diferencias no son muy significativas; no obstante, sí se observan diferencias considerables al comparar las dosis de la CE_{98} obtenidas en este estudio. Esto se debe a que las dosis que inhiben el mayor porcentaje de crecimiento se incrementan considerablemente. El aislamiento de haba

resultó ser más sensible a la acción del fluazinam con una diferencia muy grande entre las dosis obtenidas con pencycuron.

La Figura 7. muestra de manera esquemática el comportamiento de los aislamientos estudiados al pencycuron. En ésta es posible observar que el grupo AG 3 fue el más sensible a este producto. Además, el valor de la pendiente obtenido para este aislamiento (0.624) fue mayor, comparado con el que se registró para los aislamientos de chile (0.441), frijol (0.367) y haba (0.549). Esto indica que el rango de dosis que inhiben el mínimo y máximo crecimiento micelial es más corto en el caso del aislamiento AG 3 de papa. El aislamiento de chile tuvo un valor de la pendiente mayor comparado con el aislamiento de frijol, ambos pertenecientes al grupo AG 4, por lo que además de ser más sensible a este producto, también el rango entre las dosis máxima y mínima inhibitorias es más corto. Si bien el valor de la pendiente del aislamiento de haba fue más alto que el obtenido en los aislamientos de chile y frijol, las dosis mínimas y máximas inhibitorias son mucho mayores. Estos resultados nos permiten señalar que el factor resistencia no está implicado en la respuesta de los aislamientos estudiados al fungicida, sino más bien el grado de sensibilidad que presentan se deba a factores propios de cada uno de ellos. En base a lo anterior podemos decir que el aislamiento de papa fue sensible, los aislamientos de chile y frijol pueden ser clasificados como medianamente sensibles y el aislamiento de haba es insensible al producto.

En la Figura 8. se presenta de igual manera la respuesta al fluazinam, en donde observamos que el aislamiento de papa el cual fue el más sensible al pencycuron en este caso presentó una sensibilidad intermedia. Además, el valor de la pendiente es menor por lo que existe un rango de dosis máximas y mínima inhibitorias es más amplio, comparado con el pencycuron. Por otra parte, es interesante notar que los aislamientos del grupo AG 4 presentaron niveles de sensibilidad diferentes; así, el aislamiento de chile además de ser el más sensible a este producto comparado con los aislamientos de papa, frijol y haba, mostró una diferencia considerable con el aislamiento de frijol, el cual fue el menos sensible al fungicida. Además, en este caso se obtuvieron valores de la

pendiente diferentes para estos aislamientos, siendo de 0.566 para el caso de chile y de 0.402 para el caso de frijol, por lo que el aislamiento de chile presenta una respuesta más rápida al fungicida conforme se incrementa la dosis. Estos resultados nos hacen pensar que si bien se ha señalado en trabajos anteriores que el grupo AG 4 presenta mayor sensibilidad al fluazinam que al pencycuron, ésto puede no ser cierto para todos los aislamientos de este grupo, por lo que creemos que existe diferencias en la respuesta a los fungicidas entre los subgrupos. Por otra parte, el valor de la pendiente registrado para el aislamiento haba fue menor en los dos fungicidas. Por lo que este aislamiento presenta una respuesta menos rápida a estos productos conforme se incrementa la dosis.

La variación en la sensibilidad de los grupos de anastomosis a los fungicidas no esta bien determinada. Sin embargo, es posible que se presenten diferencias en la respuesta de éstos a los fungicidas, ya que existen diferencias muy marcadas entre cada grupo de anastomosis. Las principales características que pueden determinar la diferencia en la sensibilidad a los fungicidas son entre otras: la composición genética de los grupos, la diferencia en rango de hospedantes y la importancia de la enfermedad en cada hospedante, lo cual está relacionado con la frecuencia de las aplicaciones de productos que se utilicen para el manejo de la enfermedad.

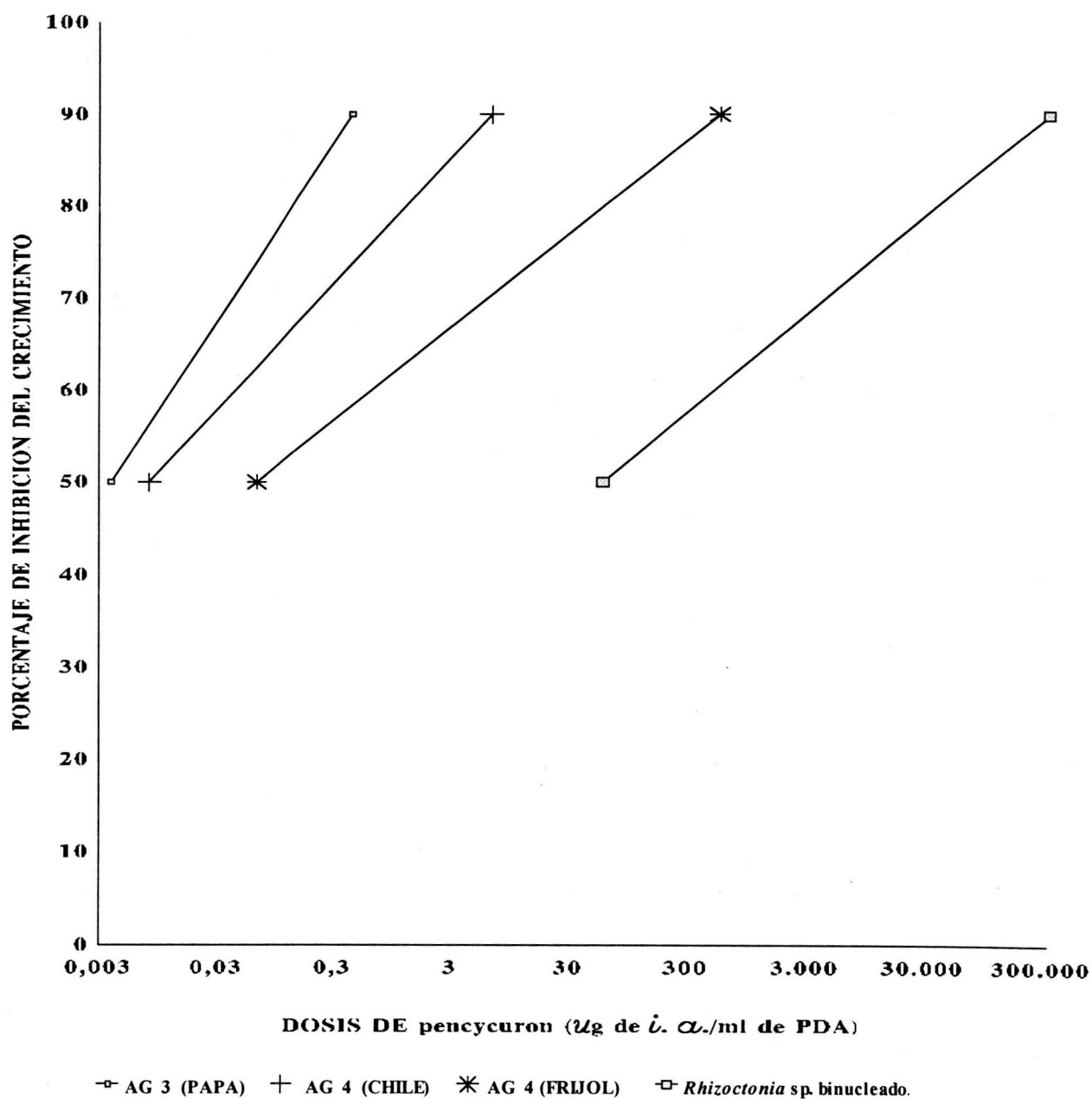


Figura 7. Respuesta de los aislamientos AG 3, AG 4 y *Rhizoctonia* sp. binucleado al penicuron.

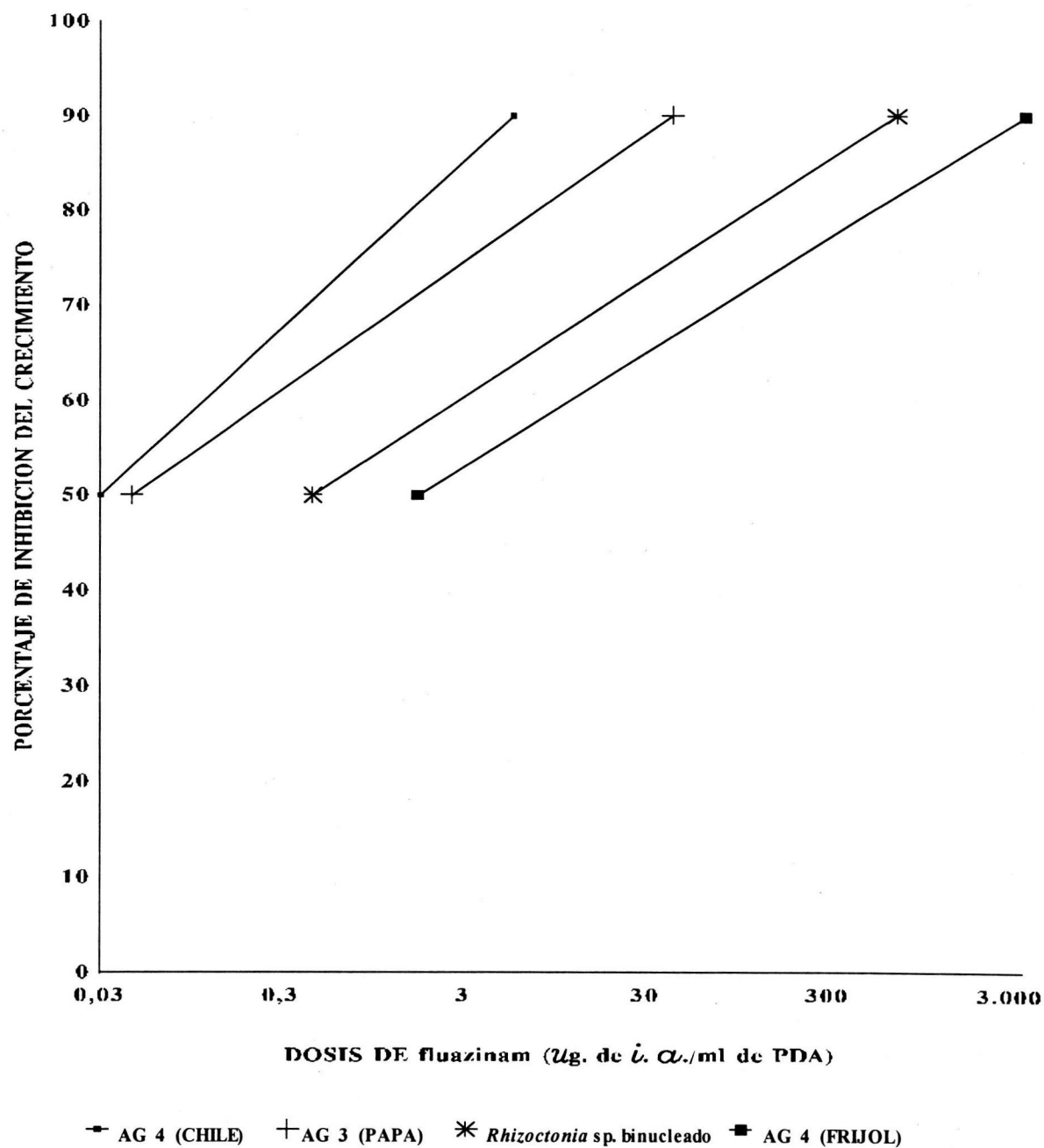


Figura 8. Respuesta de los aislamientos AG 3, AG 4 y *Rhizoctonia sp. binucleado* al fluazinam.

V. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permiten concluir lo siguiente:

Los aislamientos de papa, chile y frijol presentaron hifas multinucleadas y se determinó a la especie *Rhizoctonia solani*. En el aislamiento de haba se observaron células binucleadas y se identificó como *Rhizoctonia* sp. binucleado.

Los aislamientos de papa fueron identificados como grupo de anastomosis 3 (AG 3); mientras que, los aislamientos de chile y frijol pertenecieron al grupo AG 4.

Los aislamientos de papa, chile, frijol y haba presentaron diferencias en medio de cultivo como son velocidad de crecimiento, color del micelio, formación de esclerocios y diámetro de las hifas.

En los ensayos con pencycuron y fluazinam, los aislamientos presentaron diferencias entre y dentro de un mismo fungicida. De esta forma, el aislamiento de papa (AG 3) presentó mayor sensibilidad al pencycuron que al fluazinam. El Aislamiento de chile fue más sensible al fluazinam que al pencycuron. El aislamiento de frijol (AG 4) fue más sensible al pencycuron que al fluazinam y el aislamiento de haba (*Rhizoctonia* sp. binucleado) fue más sensible al fluazinam que al pencycuron.

Por otra parte, el aislamiento de papa fue el más sensible al pencycuron. Los aislamientos de chile y frijol presentaron sensibilidad intermedia, mientras que el aislamiento de haba fue insensible a este producto.

En su respuesta al fluazinam el aislamiento de chile fue el que mostró mayor sensibilidad al producto, los aislamientos de papa y haba mostraron sensibilidad intermedia y el aislamiento de frijol fue el menos sensible a este producto.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Agrios, G. N. 1996. Fitopatología. 2a. edición en español. Limusa. México.
2. Alonso C., Z., Hernández, D., Frías T. C., G., y Sánchez A., A. 1994. Determinación de grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* Kühn en papa en Coahuila y Nuevo León, México.
3. Anderson, N. A. 1982. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. *Annual Review Phytopathology*. 20:329-347.
4. Anónimo, 1994. Sistema producto papa. Datos básicos. SARH. México. p. 64-74.
5. Anónimo, S/F. Shogun. Fungicida Agrícola de amplio espectro. ISK Biosciences.
6. Bains, P. S. and Bisth, V. S. 1995. Anastomosis group identity and virulence of *Rhizoctonia solani* isolates collected from potato plants in Alberta, Canada. *Plant Disease*. 79(3):241-242.
7. Bandy, B. P., Zanzinger, D. H., and Tavantzis, S. M. 1984. Isolation of anastomosis group 5 of *Rhizoctonia solani* from potato field soils in Maine. *Phytopathology*. 74(10): 1220-1224.
8. Bandy, B. P., Leach, S. S., and Tavantzis, S. M. 1988. Anastomosis group 3 is the major cause of Rhizoctonia disease of potato in Maine. *Plant Disease*. 72:596-598.
9. Bolkan, H. A., and Ribeiro, W. C. C. 1985. Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* isolates from Brazil. *Plant Dis*. 69:599-601.
10. Carling, D. E. 1984. Rhizoctonia disease of potato. *Agroborealis*. 7:25-28.
11. Carling, D. E., and Leiner, R. H. 1986. Isolation and characterization of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia solani*-like fungi from aerial stems and subterranean organs of potato plants. *Phytopathology*. 76(7): 725-729.
12. Carling, D. E. Kuninaga, S., and Leiner, R. H. 1988. Relatedness within and among intraspecific groups of *Rhizoctonia solani*, a comparison of grouping by anastomosis and by DNA hibridization. *Phytoparasitica*. 16:209-210.
13. Carling, D. E., Leiner, R. H. and Westphale, P. C. 1989. Symptoms, signs and yield reduction associated with Rhizoctonia disease of potato induced by tuberborne inoculum *Rhizoctonia solani* AG-3. *American Potato Journ*. 66:693-701.

14. Carling, D. E. and Leiner, R. H. 1990a. Effect of temperature on virulence of *Rhizoctonia solani* on potato. *Phytopathology*. 80:930-934.
15. Carling, D. E., and Leiner, R. H. 1990b. Virulence of isolates of *Rhizoctonia solani* AG 3 collected from potato plant organs and soil. *Plant Dis*. 74(11):901-903.
16. Carling, D. E., Helm, D. J., and Leiner, R. H. 1990. In vitro sensitivity of *Rhizoctonia solani* and other multinucleate and binucleate *Rhizoctonia* to selected fungicides. *Plant Dis*. 74(11): 860-863.
17. Carling, D. E. and Sumner, D. R. 1992. *Rhizoctonia* in: Singleton, L. L., Mihail, J. D. and Rush, C. H. 1992. Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. APS Press. St. Paul, Minnesota, U. S. A.
18. Carling, D. E., Rothrock, C. S., MacNish, G. C., Sweetingham, M. W., Brainard, K. A., and Winters, S. W. 1994. Characterization of anastomosis group 11 (AG 11) of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*. 84(12):1387-1393.
19. Carling, D. E. 1996. Grouping in *Rhizoctonia solani* by hiphal anastomosis reaction. In: *Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and control*. 1996. B. Sneh, Sjabaji-jare, s. Neate, and G. Djist. Kluwer Academic Publisher.
20. Castro, C., Davis, J. R., and Wiese, M. V. 1983. Differential medium for identification of *Rhizoctonia solani* AG 3. *Plant Dis*. 67:1069-1071.
21. Cedeño, M. L. R. 1987. Aspectos ultraestructurales de *Rhizoctonia solani* Kuehn. Universidad de los Andes, Merida, Venezuela.
22. Herr, L. J. 1979. Practical nuclear staining procedure of *Rhizoctonia*-like fungi. *Phytopathology*. 69:958-961.
23. Herr, L. J., and Roberts, D. L. 1980. Characterization of *Rhizoctonia* populations obtained from sugarbeet fields with differing soil textures. *Phytopathology*. 70:476-480.
24. Hill, C. B. and Anderson, N. A. 1989. An evaluation of potato disease caused by isolates of *Rhizoctonia solani* AG 3. *Am. Pot. Jour*. 66: 709-721.

25. Hofman, T. W. and Jongebloed, P. H. J. 1988. Infection process of *Rhizoctonia solani* on *solanum tuberosum* and effects of granular nematicides. *Neth. Jour. Phytop.* 94:243-252.
26. Hooker, W. J. 1980. Compendium of potato disease. APS. St. Paul, Minnesota, E.U.
27. Jabaji-Hare, S. H., Meller, Y., Gill, S., and Charest, P. M. 1990. Investigation of genetic relatedness among anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* using cloned DNA probes. *Can. Jour. Pl. Path.* 12:393-404.
28. Kataria, H. R., and Verma, P. R. 1990. Efficacy of fungicidal seed treatments against pre-emergence damping-off and post-emergence seedling root rot of growth chamber grown canola caused by *Rhizoctonia solani* AG 2-1 and AG 4. *Can. Jour. Pl. Path.* 12: 409-416.
29. Kataria, H. R., Hugelshofer, U., and Gisi, U. 1991a. Sensitivity of *Rhizoctonia* species to different fungicides. *Pl. Path.* 40: 203-211.
30. Kataria, H. R., Verma, P. R., and Gisi, U. 1991b. Variability in the sensitivity of *Rhizoctonia solani* anastomosis groups to fungicides. *Jour. Phytopath.* 133:121-133.
31. Kronland, W. C. and Stanghellini, M. E. 1988. Clean slide technique for observation of anastomosis and nuclear condition of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*. 78(6):820-822.
32. Lilja, A., Hietala, A. M., and Karjalainen, R. 1996. Identification of a uninucleate *Rhizoctonia* sp. by pathogenecity, hyphal anastomosis and RAPD analysis. *Pl. Path.* 45:997-1006.
33. Liu, Z., Nickrent, D. L., and Sinclair, J. B. 1990. Genetic relationships among isolates of *Rhizoctonia solani* on anastomosis group 2 based on isozyme analysis. *Can. Jour. Pl. Path.* 12(4): 376-382.
34. MacNish, G. C., Carling, D. E., and Brainard, K. A. 1993. Characterization of *Rhizoctonia solani* AG 8 from bare patches by pectic isozyme (zymogram) and anastomosis techniques. *Phytopathology*. 83: 922-927.
35. MacNish, G. C., and Carling, D. E. 1995. Use of vegetative compatible populations (VCP) to determine field distribution of *Rhizoctonia solani* AG 8. *Phytopathology*. 85:1040.

36. McDonald, B. A., and McDermott, J. M. 1993. Population genetics of plant pathogenic fungi. *Bioscience*. 43(5): 311-319.
37. Mendoza Z., C. 1991. Diagnóstico de enfermedades fungosas. Departamento de Parasitología Agrícola, UACH. México. 105-106.
38. Ogoshi, A. 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Ann. Rev. Phytopath.* 25:125-143.
39. Olaya, G., Abawi, G. S., and Barnard, J. 1994. Response of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* to five fungicides and control of pocket rot of table beets with foliar sprays. *Pl. Dis.* 78(11): 1033-1037.
40. Parmeter, J. R. Jr., Whitney, H. S., Platt, W. D. 1967. Affinities of some *Rhizoctonia* species that resemble mycelium of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology*. 57:218-223.
41. Parmeter, J. R. Jr., Sherwood, R. T., Platt, W. D. 1969. Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology*. 59:1270-1278.
42. Parmeter, J. R. Jr. 1970. *Rhizoctonia solani*, biology and pathology. University of California, Press, Berkeley, U. S. A.
43. Ponce G., F. y Mendoza Z., C. 1986. Labranza de conservación y su relación con la incidencia y control de *Rhizoctonia solani* en haba, en Chapingo, México. XIII Congreso Nacional de Fitopatología. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.
44. Rich, A.E. 1983. Potato disease. Academic Press. New York. 63-69.
45. Rocha R., R., Virgen, G. y Olalde, V. 1995. Grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* en tubérculos-semilla de papa, de diferentes regiones de México. *Revista Forestal Venezolana*. 1(1): 1-2.
46. Romero C., S. 1993. Hongos fitopatogenos. UACH. México. pp. 338-340.
47. Sneh, B., Burpee, L. and Ogoshi, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. APS Press. St. Paul, Minnesota, U.S.A.
48. Sumner, D. R. 1987. Efficacy of pencycuron against isolates representing different anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* and *Rhizoctonia*-like binucleate fungi. *Pl. Dis.* 71(6):515-518.

49. Ueyama, I., Araki, Y., Kurogochi, S., and Yamaguchi, I. 1993. Metabolism of phenylurea fungicide pencycuron, in sensitive and tolerant strains of *Rhizoctonia solani*. *Jour. Pest. Scien.* 18(1):109-117.
50. Valadez L., A. 1996. Producción de hortalizas. Limusa. México. 212-222.
51. Vilgalys, R., and González, D. 1990. Ribosomal DNA restriction fragment length polymorphisms in *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*. 80(2): 151-158.
52. Vilgalys, R. and Cubeta, M. A. 1994. Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia*. *Ann. Rev. Phytopath.* 32:135-155.
53. Virgen, G., Olalde, V., y Rocha, P. R. 1996. Grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* Kühn, en papa en el Estado de Guanajuato, México. *Rev. Mex. Fitopat.* 31(1):48.
54. Yang, H. A., Sivasithamparam, K., Barton, J. E., and O'Brien, A. 1995. Characterization of cereal bare patch isolates of *Rhizoctonia solani* by random amplified polymorphic DNA analysis. *Pl. Pathology*. 44: 811-818.

VII. APÉNDICE

Preparación de soluciones utilizadas en la observación de la condición nuclear y reacción de anastomosis.

Safranina O alcalina.

Safranina O	6 ml. al 0.5%
Hidróxido de potasio	10 ml. al 3%
Glicerina	5 ml.
Agua destilada estéril	79 ml.

La safranina O y el hidróxido de potasio se diluyen para llevarlos a la concentración deseada en agua destilada. Una vez hecho esto se mezclan los compuestos.

Lactofenol.

Acido láctico	10 ml.
Fenol	10 ml.
Agua destilada	10 ml.
Glicerina	20 ml.

Se mezclan todos los compuestos a una temperatura de 60 °C para mejorar la solubilidad.

Azul de trifano- Lactofenol.

Se adicionan 0.05 g. de azul de trifano por cada 100 ml. de lactofenol y se mezclan.

Solución humectante.

Agua destilada	100 ml.
Tween 80	1 ml.
Acido láctico	1 ml.

Mezclar los compuestos.

CUADRO 1. RELACION DE MUESTRAS COLECTADAS EN EL VALLE DE TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO.

NUM. DE MUESTRA	FECHA DE MUESTREO	COMUNIDAD	MUNICIPIO	VARIEDAD	MATERIAL COLECTADO
1	23 - 09 - 95	Jaltepec	San Felipe del Progreso	Alpha	Tubérculos
2	23 - 09 - 95	Jaltepec	San Felipe del Progreso	Alpha	Tubérculos
3	23 - 09 - 95	Jaltepec	San Felipe del Progreso	Alpha	Est. y Tub.
4	23 - 09 - 95	Jaltepec	San Felipe del Progreso	Alpha	Estolones
5	23 - 09 - 95	Jaltepec	San Felipe del Progreso	Alpha	Estolones
6	23 - 09 - 95	La Providencia	San Felipe del Progreso	Alpha	Estolones
7	23 - 09 - 95	La Providencia	San Felipe del Progreso	Alpha	Estolones
8	23 - 09 - 95	La Providencia	San Felipe del Progreso	Alpha	Est. y Tub.
9	23 - 09 - 95	La Providencia	San Felipe del Progreso	Alpha	Tubérculos
10	23 - 09 - 95	La Providencia	San Felipe del Progreso	Alpha	Estolones
11	23 - 09 - 95	La Providencia	San Felipe del Progreso	Alpha	Estolones
12	23 - 09 - 95	La Providencia	San Felipe del Progreso	Alpha	Estolones
13	23 - 09 - 95	La Providencia	San Felipe del Progreso	Alpha	Estolones
14	23 - 09 - 95	La Providencia	San Felipe del Progreso	Alpha	Estolones
15	23 - 09 - 95	La Providencia	San Felipe del Progreso	Alpha	Estolones
16	30 - 09 - 95	Calimaya	Calimaya	Alpha	Tubérculos
17	30 - 09 - 95	Calimaya	Calimaya	Alpha	Tubérculos
18	30 - 09 - 95	Calimaya	Calimaya	Alpha	Tub. y Est.
19	30 - 09 - 95	Calimaya	Calimaya	Alpha	Tub. y Est.
20	30 - 09 - 95	Sn. Miguel Balderas	San Miguel Balderas	Rosita	Tubérculos
21	30 - 09 - 95	Sn. Miguel Balderas	San Miguel Balderas	Rosita	Tubérculos
22	30 - 09 - 95	Sn. Miguel Balderas	San Miguel Balderas	Rosita	Tubérculos
23	30 - 09 - 95	Sn. Miguel Balderas	San Miguel Balderas	Rosita	Tubérculos
24	30 - 09 - 95	Sn. Miguel Balderas	San miguel Balderas	Rosita	Tubérculos
25	30 - 09 - 95	Sn. Miguel Balderas	San Miguel Balderas	Rosita	Tubérculos
26	30 - 09 - 95	Sn. Miguel Balderas	San Miguel Balderas	Rosita	Tubérculos
27	30 - 09 - 95	Sn. Miguel Balderas	San Miguel balderas	Rosita	Tubérculos
28	30 - 09 - 95	Sn. Miguel Balderas	San Miguel balderas	Alpha	Tub. y est.
29	30 - 09 - 95	San Juan de las Huertas	Zinacantepec	Alpha	Tub. y Est.
30	30 - 09 - 95	San Juan de las Huertas	Zinacantepec	Alpha	Estolones
31	30 - 09 - 95	San Juan de las Huertas	Zinacantepec	Alpha	Estolones
32	30 - 09 - 95	San Juan de las Huertas	Zinacantepec	Alpha	Tub. y Est.
33	30 - 09 - 95	San Juan de las Huertas	Zinacantepec	Alpha	Estolones
34	30 - 09 - 95	San Juan de las Huertas	Zinacantepec	Alpha	Tub. y Est.
35	30 - 09 - 95	San Juan de las Huertas	Zinacantepec	Alpha	Estolones
36	30 - 09 - 95	San Juan de las Huertas	Zinacantepec	Rosita	Tub. y Est.
37	30 - 09 - 95	San Juan de las Huertas	Zinacantepec	Rosita	Tub. y Est.

Cuadro 2. Dosis de pencycuron para evaluar la CE_{50} en *Rhizoctonia solani* AG 3, aislado de papa.

NUMERO	FUNGICIDA	DOSIS (μ g de <i>i. a.</i> /ml de PDA)
1	TESTIGO	0.000
2	pencycuron	0.0001
3	pencycuron	0.0005
4	pencycuron	0.001
5	pencycuron	0.005
6	pencycuron	0.01
7	pencycuron	0.05
8	pencycuron	0.1
9	pencycuron	0.5
10	pencycuron	1.0
11	pencycuron	5.0

Cuadro 3. Dosis de pencycuron para evaluar la CE_{50} en *Rhizoctonia solani* AG 4, aislado de Chile.

NUMERO	FUNGICIDA	DOSIS(μ g de <i>i. a.</i> /ml de PDA)
1	TESTIGO	0.000
2	pencycuron	0.0001
3	pencycuron	0.0005
4	pencycuron	0.001
5	pencycuron	0.005
6	pencycuron	0.01
7	pencycuron	0.05
8	pencycuron	0.1
9	pencycuron	0.5
10	pencycuron	1.0
11	pencycuron	5.0
12	pencycuron	10.0
13	pencycuron	50.0
14	pencycuron	100.0

Caudro 4. Dosis de pencycuron para evaluar la CE₅₀ en *Rhizoctonia solani* AG 4, aislado de frijol.

NUMERO	FUNGICIDA	DOSIS (μg de <i>i. a.</i> /ml de PDA)
1	TESTIGO	0.000
2	pencycuron	0.00001
3	pencycuron	0.0001
4	pencycuron	0.001
5	pencycuron	0.01
6	pencycuron	0.05
7	pencycuron	0.1
8	pencycuron	0.5
9	pencycuron	1.0
10	pencycuron	5.0
11	pencycuron	10.0
12	pencycuron	50.0
13	pencycuron	100.0

Cuadro 5. Dosis de pencycuron para evaluar la CE₅₀ en *Rhizoctonia* sp. binucleado, aislado de haba.

NUMERO	FUNGICIDA	DOSIS (μg de <i>i. a.</i> /ml de PDA)
1	TESTIGO	0.000
2	pencycuron	0.1
3	pencycuron	0.5
4	pencycuron	1.0
5	pencycuron	5.0
6	pencycuron	10.0
7	pencycuron	50.0
8	pencycuron	100.0
9	pencycuron	250.0
10	pencycuron	500.0
11	pencycuron	1000.0
12	pencycuron	1250.0
13	pencycuron	1500.0
14	pencycuron	1750.0
15	pencycuron	2000.0
16	pencycuron	2500.0

Cuadro 6. Dosis de fluazinam para evaluar la CE_{50} en *Rhizoctonia solani* AG 3, aislado de papa.

NUMERO	FUNGICIDA	DOSIS (μg de <i>i. a.</i> /ml de PDA)
1	TESTIGO	0.000
2	fluazinam	0.0001
3	fluazinam	0.001
4	fluazinam	0.005
5	fluazinam	0.01
6	fluazinam	0.025
7	fluazinam	0.05
8	fluazinam	0.075
9	fluazinam	0.1
10	fluazinam	0.25
11	fluazinam	0.5
12	fluazinam	1.0
13	fluazinam	5.0
14	fluazinam	10.0
15	fluazinam	50.0
16	fluazinam	100.0
17	fluazinam	500.0
18	fluazinam	1000.0
19	fluazinam	1500.0

Cuadro 7. Dosis de fluazinam para evaluar la CE_{50} en *Rhizoctonia solani* AG 4, aislado de Chile.

NUMERO	FUNGICIDA	DOSIS (μg de <i>i. a.</i> /ml de PDA)
1	TESTIGO	0.000
2	fluazinam	0.0001
3	fluazinam	0.0005
4	fluazinam	0.001
5	fluazinam	0.005
6	fluazinam	0.01
7	fluazinam	0.05
8	fluazinam	0.075
9	fluazinam	0.1
10	fluazinam	0.25
11	fluazinam	0.5
12	fluazinam	1.0
13	fluazinam	5.0
14	fluazinam	10.0
15	fluazinam	50.0
16	fluazinam	100.0
17	fluazinam	500.0

Cuadro 8. Dosis de fluazinam para evaluar la CE_{50} en *Rhizoctonia solani* AG 4, aislado de frijol.

NUMERO	FUNGICIDA	DOSIS (μg de <i>i. a.</i> /ml de PDA)
1	TESTIGO	0.000
2	fluazinam	0.0001
3	fluazinam	0.001
4	fluazinam	0.01
5	fluazinam	0.05
6	fluazinam	0.1
7	fluazinam	1.0
8	fluazinam	5.0
9	fluazinam	10.0
10	fluazinam	50.0
11	fluazinam	100.0
12	fluazinam	250.0
13	fluazinam	500.0
14	fluazinam	750.0
15	fluazinam	1000.0

Cuadro 9. Dosis de fluazinam para evaluar la CE_{50} en *Rhizoctonia* spp. binucleado, aislado de haba.

NUMERO	FUNGICIDA	DOSIS (μg de <i>i. a.</i> /ml de PDA)
1	TESTIGO	0.000
2	fluazinam	0.0001
3	fluazinam	0.001
4	fluazinam	0.01
5	fluazinam	0.05
6	fluazinam	0.1
7	fluazinam	1.0
8	fluazinam	5.0
9	fluazinam	10.0
10	fluazinam	50.0
11	fluazinam	100.0
12	fluazinam	250.0
13	fluazinam	500.0
14	fluazinam	1000.0

Cuadro 10. Crecimiento inhibido de *R. solani* AG 3, aislado de papa, por pencycuron.

NUMERO	FUNGICIDA	DOSIS (μg de <i>i. a.</i> /ml de PDA)	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN
1	TESTIGO	0.000	0.00
2	pencycuron	0.0001	5.69
3	pencycuron	0.0005	30.33
4	pencycuron	0.001	36.96
5	pencycuron	0.005	63.03
6	pencycuron	0.01	69.66
7	pencycuron	0.05	72.04
8	pencycuron	0.1	80.09
9	pencycuron	0.5	90.52
10	pencycuron	1.0	93.36
11	pencycuron	5.0	94.31

Cuadro 11. Crecimiento inhibido de *R. solani* AG 4, aislado de Chile, por pencycuron.

NUMERO	FUNGICIDA	DOSIS (μg de <i>i. a.</i> / ml de PDA)	PORCENTAJE DE INHIBICION
1	TESTIGO	0.000	0.00
2	pencycuron	0.0001	11.76
3	pencycuron	0.0005	25.63
4	pencycuron	0.001	42.44
5	pencycuron	0.005	47.05
6	pencycuron	0.01	57.14
7	pencycuron	0.05	66.38
8	pencycuron	0.1	69.33
9	pencycuron	0.5	80.25
10	pencycuron	1.0	83.19
11	pencycuron	5.0	84.87
12	pencycuron	10.0	88.65
13	pencycuron	50.0	94.96
14	pencycuron	100.0	96.64

Cuadro 12. Crecimiento inhibido de *R. solani* AG 4, aislado de frijol, por pencycuron.

NUMERO	FUNGICIDA	DOSIS (μg de <i>i. a.</i> /ml de PDA)	PORCENTAJE DE INHIBICION
1	TESTIGO	0.000	0.00
2	pencycuron	0.00001	9.82
3	pencycuron	0.0001	19.64
4	pencycuron	0.001	30.36
5	pencycuron	0.01	39.28
6	pencycuron	0.05	48.21
7	pencycuron	0.1	54.46
8	pencycuron	0.5	57.14
9	pencycuron	1.0	63.39
10	pencycuron	5.0	66.96
11	pencycuron	10.0	75.0
12	pencycuron	50.0	84.82
13	pencycuron	100.0	90.18

Cuadro 13. Crecimiento inhibido de *Rhizoctonia* spp. binucleado, aislado de haba, por pencycuron.

NUMERO	FUNGICIDA	DOSIS (μg de <i>i. a.</i> /ml de PDA)	PORCENTAJE DE INHIBICION
1	TESTIGO	0.000	0.00
2	pencycuron	0.1	5.43
3	pencycuron	0.5	10.87
4	pencycuron	1.0	21.74
5	pencycuron	5.0	28.26
6	pencycuron	10.0	35.87
7	pencycuron	50.0	48.91
8	pencycuron	100.0	56.52
9	pencycuron	250.0	58.69
10	pencycuron	500.0	61.95
11	pencycuron	1000.0	67.39
12	pencycuron	1250.0	72.82
13	pencycuron	1500.0	78.26
14	pencycuron	1750.0	81.52
15	pencycuron	2000.0	85.87
16	pencycuron	2500.0	90.21

Cuadro 14. Crecimiento inhibido de *R. solani* AG 3 aislados de papa por fluazinam.

NUMERO	FUNGICIDA	DOSIS (μg de <i>i. a.</i> /ml de PDA)	PORCENTAJE DE INHIBICION
1	TESTIGO	0.000	0.00
2	fluazinam	0.0001	10.0
3	fluazinam	0.001	20.0
4	fluazinam	0.005	25.0
5	fluazinam	0.01	28.33
6	fluazinam	0.025	36.67
7	fluazinam	0.05	49.17
8	fluazinam	0.075	56.67
9	fluazinam	0.1	69.17
10	fluazinam	0.25	76.67
11	fluazinam	0.5	80.0
12	fluazinam	1.0	80.83
13	fluazinam	5.0	86.67
14	fluazinam	10.0	87.5
15	fluazinam	50.0	88.33
16	fluazinam	100.0	89.58
17	fluazinam	500.0	90.33
18	fluazinam	1000.0	91.67
19	fluazinam	1500.0	95.83

Cuadro 15. Crecimiento inhibido de *R. solani* AG 4, aislado de Chile, por fluazinam.

NUMERO	FUNGICIDA	DOSIS (μg de <i>i. a.</i> /ml de PDA)	PORCENTAJE DE INHIBICION
1	TESTIGO	0.000	0.00
2	fluazinam	0.0001	6.93
3	fluazinam	0.0005	9.09
4	fluazinam	0.001	11.25
5	fluazinam	0.005	24.67
6	fluazinam	0.01	41.55
7	fluazinam	0.05	55.41
8	fluazinam	0.075	68.83
9	fluazinam	0.1	73.59
10	fluazinam	0.25	80.08
11	fluazinam	0.5	81.82
12	fluazinam	1.0	85.28
13	fluazinam	5.0	88.74
14	fluazinam	10.0	90.04
15	fluazinam	50.0	91.77
16	fluazinam	100.0	93.07
17	fluazinam	500.0	96.54

Cuadro 16. Crecimiento inhibido de *R. solani* AG 4, aislado de frijol, por fluazinam.

NUMERO	FUNGICIDA	DOSIS (μg de <i>i. a.</i> /ml de PDA)	PORCENTAJE DE INHIBICION
1	TESTIGO	0.000	0.00
2	fluazinam	0.0001	5.43
3	fluazinam	0.001	14.13
4	fluazinam	0.01	23.91
5	fluazinam	0.05	28.26
6	fluazinam	0.1	30.43
7	fluazinam	1.0	43.48
8	fluazinam	5.0	47.82
9	fluazinam	10.0	54.34
10	fluazinam	50.0	67.39
11	fluazinam	100.0	76.08
12	fluazinam	250.0	80.43
13	fluazinam	500.0	84.78
14	fluazinam	750.0	89.13
15	fluazinam	1000.0	92.39

Cuadro 17. Crecimiento inhibido de *Rhizoctonia* spp. binucleado, aislado de haba, por fluazinam.

NUMERO	FUNGICIDA	DOSIS (μg de <i>i. a.</i> /ml de PDA)	PORCENTAJE DE INHIBICION
1	TESTIGO	0.000	0.00
2	fluazinam	0.0001	8.23
3	fluazinam	0.001	16.47
4	fluazinam	0.01	25.88
5	fluazinam	0.05	34.11
6	fluazinam	0.1	41.17
7	fluazinam	1.0	50.58
8	fluazinam	5.0	60.0
9	fluazinam	10.0	69.41
10	fluazinam	50.0	78.82
11	fluazinam	100.0	84.70
12	fluazinam	250.0	88.23
13	fluazinam	500.0	90.59
14	fluazinam	1000.0	92.94

