

IDENTIFICACION DE LOS GRUPOS DE COMPATIBILIDAD DE *Rhizoctonia solani* EN LA COMARCA LAGUNERA.

LIANA CONTRERAS BURCIAGA

TESIS

Presentada como Requisito parcial

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Producción Agronómica.



**Universidad Autónoma Agraria
"Antonio Narro"
Unidad Laguna
Subdirección de Postgrado
Torreón Coah. Octubre de 1999.**

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro
Unidad Laguna
Subdirección de Posgrado

**IDENTIFICACION DE LOS GRUPOS DE COMPATIBILIDAD DE
Rhizoctonia solani EN LA COMARCA LAGUNERA.**

Tesis

Por

Liana Contreras Burciaga

Elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y
aprobada como requisito parcial par optar al grado de:

Maestro en Ciencias en Producción Agronómica

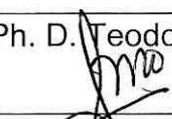
Comité Particular

Asesor principal:



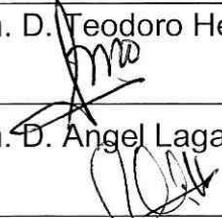
Ph. D. Vicente Hernández Hernández

Asesor:



Ph. D. Teodoro Herrera Pérez

Asesor:



Ph. D. Angel Lagarda Murrieta

Dr. Raúl Villegas Vizcaíno
Jefe del Departamento de Postgrado

Dr. Ramiro López Trujillo
Subdirector de Postgrado

Torreón, Coahuila. Octubre de 1999.

Agradecimientos

Primero que nada quiero agradecer a Dios por permitirme el haber logrado uno más de mis propósitos.

Claro después de a Dios a mis Padres el Sr. Jesús Contreras y Sra. Esperanza Burciaga, ya que sin su apoyo y comprensión no hubiera llegado a esta meta. A mis Hermanos Alberto, Marcela, Claudia, Berenice y Octavio, gracias por su apoyo, carilla y comprensión.

A la UAAAN-UL, por darme la oportunidad de formar parte de la misma, por creer en mi, por todas las facilidades que me fueron otorgadas para la realización de este trabajo, muy especialmente al departamento de Parasitología, gracias Mercedes por toda tu ayuda y consejos.

A mi Director, Ph. D. Vicente Hernández H. Agradezco infinitamente su guía, confianza y apoyo.

Agradezco a todos mis profesores, por sus enseñanzas y apoyo, muy en particular al Ph. D. Pedro Cano, por su confianza y comprensión.

Agradezco a los miembros del jurado y comisión revisora de esta tesis Ph. D. Vicente Hernández H., Ph. D. Angel Lagarda M. y Ph. D. Teodoro Herrera P.

A mis compañeros José Angel, Julio Cesar y Juan Antonio. También a Ester Peña, gracias por su amistad.

Por ultimo quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que de alguna u otra forma contribuyeron para la realización de este trabajo. Mil disculpar por no nombrarlos a todos. Gracia porque de una u otra forma me han enseñado algo.

Dedicatoria

Con todo el Amor y Respeto Dedico esta Tesis a:

La memoria de Mi Mamá La Sra. Esperanza Burciaga de Contreras, que desafortunadamente ya no esta conmigo para disfrutar de este logro en mi carrera y vida personal.

Y Claro También La dedico a Mi Papá el Sr. Jesús Contreras Soto, Gracias Papá por inculcarme que solo trabajando se logra lo que uno quiere y desea.

COMPENDIO

Identificación De Los Grupos De Compatibilidad De *Rhizoctonia solani* En La
Comarca Lagunera.

POR

LIANA CONTRERAS BURCIAGA

MAESTRIA EN CIENCIAS

PRODUCCIÓN AGRONÓMICA

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

TORREÓN, COAHUILA OCTUBRE 1999

Ph. D. Vicente Hernández Hernández -Asesor Principal-

Se colectaron cinco aislamientos de *Rhizoctonia* en alfalfa de la Comarca Lagunera de Coahuila con el fin de identificar los grupos de compatibilidad de *Rhizoctonia solani* y determinar el rango de hospedantes de este patógeno. El estudio se realizó en el laboratorio del Departamento de Parasitología Agrícola de la UAAAN-UL en Torreón, Coah. y en el laboratorio de fitopatología e

invernaderos del Campo Experimental de la Laguna en Matamoros, Coah. durante el período de Noviembre de 1997 a Julio de 1999.

La determinación de grupos de compatibilidad y rango de hospedantes del hongo se llevó a cabo sometiendo plántulas de varios cultivos en macetas con una concentración del 4% de inóculo (con medio arena-harina de maíz). Los cultivos representativos de importancia económica para esta región, que se inocularon fueron: maíz A791 (*Zea mays* L.), sorgo híbrido 8232 (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), algodónero Deltapine 5690 (*Gossypium hirsutum* L.), frijol Lagunero 87 (*Phaseolus vulgaris* L.), melón Hearts O'Gold (*Cucumis melo* L.), sandía Striped Klondyke (*Citrullus lanatus* (Thumb) Mansf) y alfalfa (*Medicago sativa* L.).

Los cultivos sometidos a estos aislamientos, resultaron susceptibles al ataque del hongo en mayor o menor grado. Los resultados confirman lo aseverado por la literatura, donde se dice que este fitopatógeno es de gran importancia, y está ampliamente distribuido en todo el mundo, presente tanto en suelos cultivados como en no cultivados. Además se confirma que el rango de hospedantes es muy amplio y consecuentemente los cultivos regionales de importancia económica son susceptibles.

Considerando el número de núcleos presentes en la célula hifal vegetativa, los cinco aislamientos de *Rhizoctonia* fueron identificados como *Rhizoctonia solani* especie multinucleada.

ABSTRACT

Identification Of Compatibility Groups Of *Rhizoctonia solani* In The Comarca
Lagunera

BY

LIANA CONTRERAS BURCIAGA

MASTER OF SCIENCE

AGRONOMIC PRODUCTION

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

TORREÓN, COAHUILA OCTOBER 1999

Ph. D. Vicente Hernández Hernández -Advisor Main-

Five isolates of *Rhizoctonia* from alfalfa at the Comarca Lagunera of Coahuila, México, were collected with the purpose of identifying the compatibility groups of *Rhizoctonia solani*, and to determine the host range of this pathogen. The study was carried out in the laboratory of the Department of Agricultural Parasitology of the UAAAN-UL in Torreón, Coah. and in the plant pathology

laboratory and the greenhouse of the Campo Experimental de la Laguna in Matamoros, Coah., during November, 1997 to July, 1999.

Compatibility groups and host range were investigated by infesting sandin pots with a concentration of 4% of inoculum (sand – cornmeal). The pots were planted with representative crops of economic importance for this region. The crops planted were: corn A791 (*Zea mays* L.), hybrid sorghum 8232 (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), cotton Deltapine 5690 (*Gossypium hirsutum* L.), bean Lagunero 87 (*Phaseolus vulgaris* L.), melón Hearts O'Gold (*Cucumis melo* L.), watermelon Striped Klondyke (*Citrullus lanatus* (Thumb) Mansf) and alfalfa (*Medicago sativa* L.).

The crops used in the experiment, were all susceptible to the attack by this fungus to different degree. These results confirm previous reports about the importance and worldwide distribution of this plant pathogen, which is found in cultivated and non cultivated soils. It was also confirmed the wide host range of the pathogen; consequently the regional crops of economic importance are susceptible.

Considering the number of nuclei present in the vegetative cell, the isolations of *Rhizoctonia* were identified as multinucleate *R. solani* .

INDICE DE CONTENIDO

	Página
INDICE DE CUADROS.....	ix
INDECE DE FIGURAS.....	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Objetivos.....	5
1.2. Hipótesis.....	6
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
2.1. El Género <i>Rhizoctonia</i>	7
2.2. Especies y Grupos de <i>Rhizoctonia</i>	7
2.3. Clasificación o Identificación de Especies y Grupos.....	9
2.4. Características de Cada Grupo.....	12
2.4.1. Anastomosis y Grupos Intraespecificos de <i>Rhizoctonia</i> <i>solani</i>	12
2.5. Importancia Económica de <i>R. solani</i>	16
2.6. Distribución de Grupos de Anastomosis del Patógeno.....	19
2.7. Rango de Hospedantes.....	21
III MATERIALES Y METODOS.....	23
3.1. Colecta y Aislamiento de <i>Rhizoctonia</i>	24
3.2. Obtención de Aislamientos de <i>Rhizoctonia</i>	25
3.2.1. Aislamiento Puro de <i>Rhizoctonia</i>	26
3.3. Ensayo de Patogenicidad.....	27
3.4. Determinación de Rango de Hospedantes de <i>Rhizoctonia</i>	28
3.4.1. Preparación de Macetas con Inóculo al 4%.....	28

3.4.2. Identificación de Grupos de Compatibilidad de <i>Rhizoctonia</i>	30
3.4.3. Fijación de Material Para La Preparación de Laminillas...	30
3.4.4. Preparaciones Permanentes y Semipermanentes.....	31
3.4.5. Tinción con el Método de Azul de Metileno.....	32
3.5. Prueba de Anastomosis (Fusión De Células Hifales).....	34
IV RESULTADOS.....	35
4.1. Ensayo De Patogenicidad.....	35
4.2. Determinación De Rango De Hospedantes De <i>Rhizoctonia</i>	43
4.3. Identificación De Grupos De Compatibilidad de <i>Rhizoctonia</i>	50
4.4. Prueba De Anastomosis (Fusión De Células Hifales).....	51
V DISCUSIÓN.....	52
5.1. Ensayo De Patogenicidad.....	52
5.2. Determinación De Rango De Hospedantes De <i>Rhizoctonia</i>	53
5.3. Identificación De Grupos.....	54
5.4. Prueba de Anastomosis.....	54
VI CONCLUSIONES.....	59
VII RESUMEN.....	60
VIII LITERATURA CITADA.....	63
IX APENDICE 1.....	67
9.1. Metodología Para La Preparación De APD.....	67
9.2. Metodología Para La Preparación De APDZ.....	67
9.3. Metodología Para La Preparación De Medio Arena-Harina De Maíz, (Preparación De Inóculo).....	68

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Pagina
1. Número de plantas afectadas y grado de ataque ocasionado por el aislamiento 1 de <i>Rhizoctonia</i> en cinco hospedantes (cultivos). UAAAN-UL. Torreón, Coah. 1999.....	38
2. Número de plantas afectadas y grado de ataque ocasionado por el aislamiento 2 de <i>Rhizoctonia</i> en cinco hospedantes (cultivos). UAAAN-UL. Torreón, Coah. 1999.....	39
3. Número de plantas afectadas y grado de ataque ocasionado por el aislamiento 3 de <i>Rhizoctonia</i> en cinco hospedantes (cultivos). UAAAN-UL. Torreón, Coah. 1999.....	40
4. Número de plantas afectadas y grado de ataque ocasionado por el aislamiento 4 de <i>Rhizoctonia</i> en cinco hospedantes (cultivos). UAAAN-UL. Torreón, Coah. 1999.....	41
5. Número de plantas afectadas y grado de ataque ocasionado por el aislamiento 5 de <i>Rhizoctonia</i> en cinco hospedantes (cultivos). UAAAN-UL. Torreón, Coah. 1999.....	42
6. Porcentaje de emergencia de plántulas a los 10 días, número de plantas afectadas y grado de ataque ocasionado por el aislamiento 1 de <i>Rhizoctonia</i> en siete hospedantes (cultivos). UAAAN-UL. Torreón, Coah. 1999.....	45
7. Porcentaje de emergencia de plántulas a los 10 días, número de plantas afectadas y grado de ataque ocasionado por el aislamiento 2 de <i>Rhizoctonia</i> en siete hospedantes (cultivos). UAAAN-UL. Torreón, Coah. 1999.....	46
8. Porcentaje de emergencia de plántulas a los 10 días, número de plantas afectadas y grado de ataque ocasionado por el aislamiento 3 de <i>Rhizoctonia</i> en siete hospedantes (cultivos). UAAAN-UL. Torreón, Coah. 1999.....	47
9. Porcentaje de emergencia de plántulas a los 10 días, número de plantas afectadas y grado de ataque ocasionado por el	

	aislamiento 4 de <i>Rhizoctonia</i> en siete hospedantes (cultivos). UAAAN-UL. Torreón, Coah. 1999.....	48
10.	Porcentaje de emergencia de plántulas a los 10 días, número de plantas afectadas y grado de ataque ocasionado por el aislamiento 5 de <i>Rhizoctonia</i> en siete hospedantes (cultivos). UAAAN-UL. Torreón, Coah. 1999.....	49
11.	Número total de núcleos y promedio por célula hifal.....	50

INDICE DE FIGURAS

Fig.	Pagina
Fig. 1. Inóculo de <i>Rhizoctonia solani</i> . En la caja petri central se observa la formación de esclerocios (centro de la caja parte oscura).....	56
Fig. 2. Plántulas de melón del ensayo de patogenicidad en las cuales se aprecia los síntomas causado por el hongo; éste va desde ligero (las dos centrales) a moderado (primeras dos de izquierda a derecha y plántulas testigo sanas, las dos de la derecha).....	56
Fig. 3. Plántulas de algodón que muestran los síntomas causados por los diferentes aislamientos de <i>R. solani</i> . Todas las plantas muestran daños muy severos donde se aprecian claramente las lesiones características de este patógeno.....	56
Fig. 4. Plantas de frijol que presentan daños severos en su sistema radical causados por la inoculación de los diferentes aislamientos de <i>R. solani</i>	57
Fig. 5. Plantas de sorgo que muestran síntomas (Mancha café oscuro en la base de la raíz principal) de moderados (primera planta izquierda) a severos (plantas restantes), en su sistema de raíces.....	57
Fig. 6. Acción de los diferentes aislamientos de <i>R. solani</i> , sobre el cultivo del melón. Nótese que el testigo (derecha) crece normalmente en comparación con los diferentes aislamientos (del 1 al 5 de derecha a izquierda).....	57
Fig. 7. Respuesta del frijol a la inoculación de <i>Rhizoctonia</i> las macetas testigo (derecha) las plantas crecieron normalmente, el aislamiento 1 y 2 provocó el ahogamiento de semillas (marchitez preemergente), en tanto los aislamientos 3, 4 y 5 solo presentaron lesiones.....	58
Fig. 8. Efecto de los aislamientos de <i>Rhizoctonia</i> sobre sorgo. Se observa que los aislamientos 1, 3 y 4 provocaron muerte preemergente en tanto los aislamientos	

2 y 5 solo presentaron lesiones en las raíces de este.....58

Fig. 9. Respuesta del maíz a los aislamientos de *Rhizoctonia*.
Se observa claramente que el aislamiento 4 es el más agresivo, seguido del 5 y el 2.....58

Fig.10. Microfotografía de *Rhizoctonia solani*, en la cual se observa la característica principal del hongo, que es la formación de esclerocios (las manchas negras) y la ramificación de las hifas en ángulo de 90°.....58

CAPITULO I

INTRODUCCION

La agricultura mundial generalmente es afectada por pérdidas económicas, causadas por factores de muy diversa índole entre los cuales figuran preponderantemente las plagas y las enfermedades. Aun en los países de múltiples recursos científicos, técnicos y con una economía sólida, se habla de pérdidas que, en forma global, fluctúan entre el siete y diez por ciento de la cosecha total (Romero, 1988).

El principal grupo de organismos fitopatógenos es el de los hongos, de los cuales se conocen actualmente más de 8,000 especies capaces de provocar alrededor de 80,000 enfermedades. Por fortuna, muchas de estas especies requieren de condiciones ambientales especiales para su desarrollo, de tal manera que cada año y en cada localidad, más del 80 por ciento de las enfermedades causadas por los hongos ocurren solo esporádicamente y pueden considerarse de relativa importancia (Romero, 1988).

Todos los organismos vegetales desde las algas hasta los árboles pueden ser atacados en alguna etapa de su vida por un determinado tipo de hongo, los daños ocasionados varían desde leves hasta la completa

destrucción y muerte de los tejidos invadidos. Los hongos destacan como las causas principales de una gran variedad de enfermedades de las plantas. Se ha calculado que más de las tres cuartas partes de las pérdidas por enfermedades de las plantas se deben a los hongos (Herrera y Ulloa, 1990).

El número y la variedad de enfermedades ocasionadas en las plantas por los hongos son muchas; no obstante esta gran diversidad, los hongos parásitos que dañan las plantas son de dos tipos básicos según su biología: necrotróficos (matan a las células del hospedante) y biotróficos (no matan a las células del hospedante). Esta separación no es taxonómica de manera que en un mismo grupo se encuentran especies de hongos no relacionados (Herrera y Ulloa, 1990). En la Comarca Lagunera existen otros factores determinantes que también afectan a los cultivos y causan una baja producción agrícola. El daño ocasionado a la planta puede ser por falta de agua, deficiencia en la nutrición, presencia de plagas, competencia con maleza, enfermedades, etc. El resultado final es la reducción de la producción de materia seca y por lo tanto una pérdida económica.

Las enfermedades de los cultivos en la Comarca Lagunera son algunos de los factores limitantes en la producción; las principales enfermedades de los cultivos son causadas por fitopatógenos del suelo, ejemplo de ello son los lunares o claros que se presentan en épocas tempranas (plántulas) de las siembras de alfalfa y otros cultivos. Estos se deben principalmente a la presencia de especies del género *Rhizoctonia*.

Se considera que en la mayoría de los suelos de la región se encuentran presentes especies del género *Rhizoctonia* (Anónimo, 1984). Este hongo es un fitopatógeno de importancia universal, por su gran capacidad destructiva, su amplio rango de hospedantes, su distribución mundial y su gran capacidad de sobrevivencia, ya que puede persistir en el suelo como saprófito y/o en forma de esclerocios (Baker, 1971).

Rhizoctonia solani Kühn, es un habitante del suelo con capacidad patogénica tan extraordinaria que se encuentra en plantas de todo tipo: maleza, ornamentales, árboles forestales y casi cualquier tipo de cultivo hortícola con síntomas de ahogamiento, pudrición de la corona, pudrición de la base del tallo y de la raíz (Anguiz, 1989; Romero, 1988). *R. solani* causa enfermedades en invernadero, así como en campos cultivados en todo el mundo (Yang y Kharbanda, 1996).

El concepto del género *Rhizoctonia* fue establecido en 1815 por Candolle; este fue revisado por Parmeter y Whitney en 1970. Las características básicas del género fueron establecidas por Candolle, quien establece que el hongo produce esclerocios de textura uniforme con hifas entrelazadas procedentes del micelio y en una asociación del micelio con las plantas vivas. *R. solani* Kühn [teleomorfo: *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk] es la especie más estudiada dentro del género, es un deuteromiceto común del suelo. Cepas de este hongo pueden crecer como saprófitas o como componentes de la micorriza de las orquideas y de otras plantas. Hoy en día se

acepta que *R. solani* es un complejo de especies, genéticamente heterogeneo, con grupos aislados genéticamente. Para que el diseño de estrategias de control de las enfermedades producidas por *R. solani* sea efectivo y considere la preservación del medio ambiente es necesario el conocimiento de la estructura genética de las poblaciones naturales de *R. solani*, la función de los genes relacionados con la expresión de la virulencia y los niveles de recombinación genética en condiciones naturales (Sneh *et. al.*, 1991).

Actualmente *R. solani* se divide en 12 grupos. Algunos de estos grupos son específicos de áreas geográficas y otros son patógenos de determinadas especies de plantas. Estos 12 grupos se distinguen en base a la anastomosis de las hifas, un proceso de fusión que empieza por el contacto, seguido de la fusión de la paredes y membranas celulares y origina la fusión de los citoplasmas. Estos 12 grupos de anastomosis (AGs) designados AG1 a AG11 y AGB1 también se dividen en subgrupos hasta un total de 24. Cepas dentro de un AG pueden ser compatibles vegetativamente, mostrando una fusión completa o perfecta o incompatibles vegetativamente. En este caso la anastomosis origina lisis citoplásmica en el área de contacto.

En la Comarca Lagunera las especies de *Rhizoctonia* que se encuentran presentes causan tres tipos de enfermedades:

- a) Pudrición de la semilla
- b) Ahogamiento pre y postemergente
- c) Pudrición de la raíz

Estas especies afectan a los principales cultivos de la región como son: alfalfa, algodón, cártamo, hortalizas, frijol, etc. El presente trabajo está enfocado a conocer los diferentes grupos de anastomosis o compatibilidad de este patógeno y a la determinación de su rango de hospedantes en la Comarca Lagunera.

La identificación de los diferentes grupos de compatibilidad de *R. solani* (grupos intraespecíficos Gle o grupos de anastomosis AGs) y la determinación del rango de hospedantes de este fitopatógeno, permitirá elaborar estrategias de control y prevención de las enfermedades que causa, para obtener el mayor rendimiento económico del cultivo.

1.1. Objetivos

1.- Determinación de los grupos de anastomosis de *R. solani* en la Comarca Lagunera.

2.- Determinación del rango de hospedantes de los posibles grupos de anastomosis de *R. solani*.

1.2. Hipótesis

En la Comarca Lagunera existen varios grupos de compatibilidad o anastomosis de *R. solani* presentes en los suelos.

Los posibles grupos de compatibilidad o anastomosis de *R. solani* presentes en los suelos de la Comarca Lagunera difieren en el rango de hospedantes.

CAPITULO II

REVISION DE LITERATURA

2.1. El Género *Rhizoctonia*

El concepto del género *Rhizoctonia* fue establecido por Candolle en 1815, (citado por Sneh *et al.*, 1991), fue revisado por Parmeter y Whitney, 1970, (citado por Sneh *et al.*, 1991), y las características básicas del género son la producción de esclerocios de textura uniforme y la asociación del micelio con raíces de plantas vivas (Sneh *et al.*, 1991).

2.2. Especies Y Grupos De *Rhizoctonia*

El género *Rhizoctonia* es de los que tienen mayor distribución e importancia fitopatológica; se caracteriza por sus hifas anchas con ramas casi en ángulo recto, adelgazadas y septadas cerca de las intersecciones con el eje principal, formación de esclerocios oscuros (Herrera y Ulloa, 1990; Ogoshi, 1987).

Con base en el concepto de género, las especies de *Rhizoctonia* se diferencian por el color del micelio, número de núcleos por célula vegetativa hifal joven y morfología de teleomorfos (Sneh *et al.*, 1991).

El género comprende unas 60 especies descritas, muchas de las cuales son notables patógenos de plantas en las que ocasionan pudriciones y marchitamiento. No obstante, la mayoría de las especies pueden subsistir como saprobios en el suelo y algunas forman micorrizas con los órganos de las orquídeas. Los estados sexuales de algunas de las especies del género *Rhizoctonia* han sido relacionados con una gran cantidad de miembros de Basidiomycotina y Ascomycotina (Herrera y Ulloa, 1990).

Rhizoctonia solani Kühn (estado asexual), es una de las especies más estudiadas del género. La descripción original de la especie fue hecha por Kühn en 1858 (Sneh *et al.*, 1991). *R. solani* es un fitopatógeno de distribución universal y amplio rango de hospedantes. *R. solani* retarda la emergencia de plántulas, y daña a plantas en cultivos establecidos (Anguiz y Martín, 1989).

R. solani Kühn y otras especies de *Rhizoctonia* se han extendido por el mundo tanto en suelos cultivados como no cultivados. Las especies del género *Rhizoctonia* son fácilmente aislados de plantas enfermas y de suelos. Los diferentes aislamientos varían en patogenicidad, morfología y fisiología. Con base en estas diferencias se pueden describir muchas especies y grupos intraespecíficos (Gle); sin embargo, la identificación de la especie o su Gle es muy difícil, debido a la falta de cultivos auténticos (originales), con un extenso estudio micológico y patológico (Ogoshi, 1987).

Considerando el número de núcleos de la célula hifal vegetativa, muchas de las especies del género *Rhizoctonia* pueden ser asignadas en dos grupos diferentes: especies con mas de dos núcleos por célula son especies multinuceadas; especies con dos núcleos por célula son binucleadas (Burpee y Martín, 1992).

Esta especie puede subdividirse en trece grupos de anastomosis (AG) y en algunos grupos intraespecificos (Gle), basados en sus características bioquímicas, moleculares, patología, morfología y virulencia (Yang y Kharbanda, 1996).

La clasificación de este patógeno es la siguiente:

Reino : Hongos

División: Eumycota

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase: Hyphomycetes

Género: *Rhizoctonia*

Especie: *R. solani*

2.3. Clasificación O Identificación De Especies Y Grupos

Son muchas las investigaciones realizadas en torno a la clasificación e identificación de especie y grupos de anastomosis de *R. solani* en el mundo, e

igualmente son muchas las características que diferencian a los grupos de anastomosis y grupos intraespecíficos de *R. solani* además de sus diferencias morfológicas y patológicas (Ogoshi 1987).

Las especies de *Rhizoctonia* son hongos imperfectos con teleomorfos, asignados a los Basidiomicetos. Las características importantes de este género son: 1) Ausencia de conidios, conexiones en grapa y rizomorfos y 2) esclerocios bien diferenciados en la corteza y médula. Dentro de este género, sus taxa son delineados por el número de núcleos en sus hifas o células vegetativas, por el color y morfología de la hifa (células extensas), célula monoidal (corta) y esclerocios. Grupos al nivel de subespecie son delineados basándose en la capacidad de anastomosis hifal, y por diferencias en su morfología, patogenicidad, fisiología y/o ecología. Muchas especies de *Rhizoctonia* pueden ser asignadas a uno o dos grupos basándose en el número de núcleos de la célula hifal (Burpee y Martin 1992)

Algunos investigadores (Bains y Bisht, 1995) identifican las cepas basándose en las características vegetativas descritas para la especie.

Estudios realizados por Anguiz y Martin (1989), muestran los resultados de la identificación, caracterización y patogenicidad de algunos aislamientos de *R. solani*, colectados de importantes zonas agroecológicas productoras de papas en Perú. Ellos consideraron presencia de células multinucleadas, bifurcación cercana a la septa distal de las células, constricción de la

ramificación cercana al punto de origen, el crecimiento rápido del cultivo, color y apariencia de los micelios.

Se ha desarrollado una gran diversidad de técnicas que permiten identificar y clasificar a detalle cada uno de los diferentes grupos de anastomosis de este fitopatógeno, una de las técnicas más comunes es la tinción de núcleos con: Orceina, Safranina 0, Anilina azul, Azul de Metileno, entre otras (Sneh *et al*, 1991; Yang y Kharbanda, 1996).

Wondels y Nabben (1988), utilizaron la tinción de núcleos para determinar e identificar cepas de *R. solani* obtenidas de plántulas y raíces de remolacha azucarera. Al igual que Runion y Kelley (1993), lo realizaron con cepas obtenidas de plántulas de pino (*Pinus palustris* Mill.).

También se utilizan otras técnicas como lo son la electroforesis, relaciones serológicas y requerimientos vitamínicos para la identificación de los grupos de compatibilidad (Ogoshi, 1987), ejemplo de ello es el trabajo realizado por Reynolds y colaboradores (1983), en el cual utilizaron la técnica de electroforesis con geles de polyacrylamida.

2.4. Características De Cada Grupo

Los aislamientos de *Rhizoctonia solani* son asignados por compatibilidad de grupo (anastomosis) basados en la fusión hifal afín a un grupo determinado ya designado.

2.4.1. Anastomosis Y Grupos Intraespecificos De *R. solani*

Schultz (1936) fue el primero que publicó resultados de identificación de cuatro grupos de anastomosis de *R. solani* en Alemania, posteriormente se encontraron cinco por Richter & Schneider (1953), y cuatro por Parmeter y colaboradores (1969). En Japón han sido identificados ocho grupos, en Australia (1985), dos subgrupos y un nuevo grupo (AG-8). Existe evidencia de que hay al menos nueve grupos de anastomosis de *R. solani* en el mundo. Carling y colaboradores (1986), presentaron evidencias de la existencia de un nuevo grupo de anastomosis AG-9 en Alaska (Ogoshi, 1987).

Los aislamientos asignado a un grupo de anastomosis en común pueden variar considerablemente en el rango de hospedero, y muchos aislamientos pueden no ser patogénicos (Ichielevich-Auster y colaboradores 1985^a, citado por Sneh *et. al.*, 1991). En contraste, aislamientos asignados a diferentes grupos pueden mostrar los mismos síntomas en hospederos en común. Por

ejemplo, algunos aislamientos de *R. fragariae* correspondientes al grupo AG-G y algunas grupos AG-I de *Rhizoctonia spp.* binucleados (Ogoshi, 1985, citado por Sneh *et al.*, 1991).

R. solani **AG 1-IA(=AG 1 tipo 2)**. Los aislamientos de este grupo de anastomosis exhiben una rápida tasa de crecimiento (aproximadamente 30 mm/día a una temperatura de entre 28 y 30°C) presentan una temperatura óptima relativamente alta (30°C). Este grupo incluye patógenos de tipo aéreo de una variedad de plantas cultivados y maleza (Stroube, 1954, citado por Sneh *et al.*, 1991): causa la mancha y destrucción de la vaina en el cultivo de arroz (Miyake, 1910; Tsuruta, 1916; Watanabe y Matsuda, 1966; Jones y Belmar 1989; citados por Sneh *et al.*, 1991) y la quemadura de la hoja en maíz, sorgo, frijol y soya (Jones y Belmar 1989; Yang *et al.*, 1988; 1990 citados por Sneh *et al.*, 1991).

AG 3: Este grupo incluye aislamientos que muestran crecimiento lento (aproximadamente 12 mm/día a temperatura de 25°C) y es definido como tipo papa (Watanabe y Matsuda, 1966; citados por Sneh *et al.*, 1991). Los aislamientos patogénicos de este grupo causan la enfermedad conocida como costra negra de la papa (Hooker, 1981; Abe y Tsuboki, 1978; Tu y Chang, 1978; Suresk y Mall, 1982; Chand y Logan, 1983; Otrysko *et al.*, 1985K; Carling *et al.*, 1986; Bandy *et al.*, 1988; Anguiz y Martin 1989; citados por Sneh *et al.*, 1991).

También provoca la destrucción de la hoja en el cultivo de tomate (Date *et al.*, 1981, citado por Sneh *et al.*, 1991).

AG 4: Los aislamientos de este grupo de anastomosis son definidos como tipo partícula (Parmeter y Whitney, 1970, citado por Sneh *et al.*, 1991). De acuerdo con algunos taxónomos, el tipo partícula representa a diferentes especies (Ogoshi, 1985; Parmeter y Whitney, 1970; Saksena, 1961, citados por Sneh *et al.*, 1991). Las cepas de este grupo son fácilmente aisladas del suelo o plantas infectadas en campos de suelo caliente (Ichielevich-Auster *et al.*, 1985, citado por Sneh *et al.*, 1991). Esta cepa provoca la enfermedad llamada pudrición del fruto del tomate (Lewis y Papavizas, 1985; Lewis *et al.*, 1990, citados por Sneh *et al.*, 1991), ruptura del tallo en chícharo (Nakano, 1967, citado por Sneh *et al.*, 1991), además de atacar a otras especies como son: espinaca, papa, plántulas de pino, zanahoria, algodónero (Sneh *et al.*, 1991).

AG 5: Los aislamientos de este grupo son considerados como un patógeno débil que causa la costra negra en papa (Abe y Tsuboki, 1978; citado por Sneh *et al.*, 1991), además de ser patógeno también de: zacates, frijol, soya (Sneh *et al.*, 1991). Algunos aislamientos de este grupo forman asociación micorizal con orquídeas (Uetake *et al.*, 1988, citado por Sneh *et al.*, 1991). Esta cepa puede ser fácilmente aislada de la caña de azúcar, papa, soya y de frijol peruano (Sneh *et al.*, 1991).

AG 6: El hongo de este grupo es considerado no patogénico, Algunos aislamientos de este grupo forman asociación micorrizal con orquídeas (Uetake et al., 1988, citado por Sneh *et. al.*, 1991).

AG 7: Los miembros de este grupo de anastomosis son considerados no patogénicos (Sneh *et. al.*, 1991).

AG 8: Algunos aislamientos patogénicos de este grupo son considerados el agente causal de la enfermedad parche descubierto de los cereales (Neate y Warcup, 1985; Ogoshi *et al.*, 1990; Rovira, *et al.*, 1986; Roberts y Sivasithamparam, 1986; citados por Sneh *et. al.*, 1991).

AG 9: Los aislamientos patogénicos de este grupo infectan a papa y crucíferas, pero no tanto como el AG 3 (Carling et al., 1987; citado por Sneh *et. al.*, 1991).

AG 10: Los hongos de este grupo son probablemente no patogénicos (Sneh *et. al.*, 1991).

AG BI: Los miembros de este grupo de anastomosis son considerados no patogénicos (Sneh *et. al.*, 1991).

AG UNK: Este es un grupo tentativo para algunos aislamientos que provocan enfermedad en la vaina del arroz. Los aislamientos de este grupo no

se anastomosan con algunos representantes de otros grupos ya designados. Estos aislamientos son patogénicos a soya bajo condiciones de invernadero (Jones y Belmar, 1989, citado por Sneh *et. al.*, 1991).

2.5. Importancia Económica De *R. solani*

La pudrición radicular por *Rhizoctonia*, es uno de los nombres con el cual es denominada la enfermedad ocasionada por este patógeno. Los daños causados por este hongo van desde el ataque a semillas en su proceso de germinación, ataca también el sistema radicular de plántulas y plantas adultas, así como a ramas que están en contacto con el suelo (Artículo Internet Pudrición radicular por *Rhizoctonia*.htm, 1998).

R. solani Kühn es un hongo imperfecto habitante natural del suelo. Cepas de este hongo pueden crecer como saprófitas o como componentes de la micorriza de las orquideas y de otras plantas, o ser patógeno de unas 200 especies de plantas, causando enfermedades en la mayoría de los cultivos, incluyendo cereales, hortícolas, ornamentales, frutales y forestales (Artículo Internet Resumen de Investigación R.s..htm, 1998).

La costra negra de la papa es otra de las enfermedades importantes provocada por *R. solani* (Ag-3), ya que la papa ocupa el cuarto lugar a nivel mundial en importancia para la alimentación humana. El patógeno ocasiona lesiones en la base del tallo, en el punto de contacto con el suelo, provocando

estrangulamiento del mismo, induciendo la formación de tubérculos aéreos y costras negras (esclerocios) en los tubérculos enterrados, (Mendoza *et al.*, 1995).

En el trópico húmedo, la mustia hilachosa del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) causada por *R. solani* Kühn. es considerada la enfermedad más destructiva por la defoliación rápida y drástica que causa a las plantas afectadas, lo que ocasiona en la mayoría de los casos la pérdida total de la cosecha (García Salinas, 1994). Esta enfermedad también es conocida como telaraña, chasparria, quemazón y *Rhizoctonia* de las hojas (Galvez *et al.*, citado por García Salinas, 1994).

R. solani ocasiona pudrición de semilla, pudrición de raíz, de corona y de peciolos, ahogamiento pre y pos emergente de plántulas, en diferentes cultivos como: la papa (Anguiz y Martín, 1989), arroz (Lee, 1980; Belmar, 1986), canola, (Yang y Kharbanda 1996), caña de azúcar y remolacha azucarera (Boosalis y Scharen, 1958; Windels y Nabben, 1998; 1988a; Artículo Internet, 1998). En algodón estos daños causan pérdidas en producción de 2.8% anual en los Estados Unidos (Walla y Bird 1914; Hefner 1968; Minton *et al.*, 1982; Minton y Garber 1983; Poswal 1985; y Armentrout *et at.*, 1987),

Cepas de *R. solani* AG-2-2 ocasionan enfermedades en otros cultivos como lo son la soya, a algunas variedades de frijol como lo son: las variedades del pinto y el peruano, en los cultivos de Georgia, Illinois, Minnesota y Dakota

del Norte. Los síntomas ocasionados son iguales que en los anteriores cultivos, pudrición de raíz, ahogamiento pre y post-emergente (Molinero Ruiz, 1998 y Engelkes y Windels 1998).

En pastos *R. solani* ocasiona una enfermedad conocida como mancha o parche café, esta enfermedad causa serios problemas en zonas tropicales con una alta temperatura y humedad alta (Burpee y Martín 1992).

R. solani AG-4, causa pudrición de la corona de la raíz, raíces necróticas, ahogamiento preemergente y espuela (deformación) de hojas en pastos de importancia económica; afecta a millones de hectáreas cultivables en los Estados de Montana, Colorado y Dakota del Norte, en los Estados Unidos, y también daña los pastos de algunas provincias de Canadá, durante la primavera y el verano. Las pérdidas económicas causadas por esta enfermedad se estiman en un rango de 76 millones de dólares anualmente en los Estados Unidos (Caesar *et al*; 1993).

En pepino (*Cucumis sativus* L.), *R. solani* causa pudrición del fruto. Esta es una de las enfermedades más serias y una de los principales restrictivos de la producción en climas cálidos y húmedos en los Estados Unidos. Ataca directamente a la fruta, ya que es ésta la que está en contacto directo con el hongo, provocando la pudrición del fruto; ocasiona pérdidas de aproximadamente 4 a 5 millones de dólares (Lewis y Papavizas 1980).

R. solani es de gran importancia en suelos forestales; la primera asociación del hongo con enfermedades de coníferas fue reportada en 1929 por Wiant, donde ocasiona el ahogamiento de plántulas de pino (Huang 1988; Huang y Kuhlman, 1989).

2.6. Distribución De Grupos de Anastomosis Del Patógeno

R. solani Kühn es una especie fitopatógena de gran importancia, ampliamente distribuida en todo el mundo, tanto en suelos cultivados como en no cultivados; esta especie puede ser fácilmente aislada de los suelos, residuos de plantas en el suelo y de las plantas enfermas (Papavizas, *et. al.*, 1975; Ogoshi, 1987; Yang y Kharbanda 1996).

La distribución geográfica de las diferentes cepas de *R. solani* en Japón fue establecida por los trabajos realizados por Watanabe & Matsuda (1966) y Ogoshi (1975).

La distribución global de los grupos de anastomosis de este fitopatógeno ha sido muy investigada. Actualmente los grupos de anastomosis AG-1, 2, 3 y 4 han sido identificados en todas las áreas del mundo; el grupo de anastomosis AG-5 a sido encontrado solo en Canadá, Alemania, Israel, Japón, Taiwan y los Estados Unidos (Ogoshi, 1987).

El grupo AG-6 solo ha sido detectado en Israel y en el Japón; el grupo AG-7 en Japón; Baird (1995), consigno el grupo de anastomosis 7 (AG-7) para la parte media del oeste de los Estados Unidos; el grupo de anastomosis AG-8 se identifico en Australia; y el grupo AG-BI en Japón. Sin embargo, existe evidencia de que el grupo AG-8 se encuentra también en Escocia y en los Estados Unidos. Puesto que los grupos AG-6, AG-7, AG-8 y AG-BI fueron recientemente identificados, es posible que en un tiempo más sean encontrados en otras partes del mundo. Es importante mencionar que los grupos AG-6 y AG-BI han sido aislados sólo en suelos no cultivados, en tanto los grupos AG-5, AG-7 y AG-8 solo han sido encontrados en suelos cultivados (Ogoshi, 1987).

El grupo de anastomosis AG-9 fue identificado primero en los Estados Unidos en Alaska y Oregon, por (Carling *et. al.*, 1987). También ha sido detectado en Canadá (Yang y Khabanda 1996). Los grupos de anastomosis AG-3 Y AG-4 han sido aislados de cultivos de papa en Perú. El grupo AG-4 también ha sido localizado en estado de Colorado, Montana y Dakota del Norte en los Estados Unidos (Caesar *et. al.*, 1993).

Se dice que el grupo de anastomosis AG1 tiene una distribución silvestre en todo el mundo, ya que ha sido encontrado desde las áreas boreales de Minnesota y Canadá hasta las regiones tropicales. Las regiones áridas son las únicas áreas del planeta en las cuales no se han detectado aislamientos de este grupo (Anderson, 1982).

Está claro que la mayor parte de los grupos de anastomosis están distribuidos en forma nativa, en todo el mundo. Mas aún, la ocurrencia aislada de algún grupo (AG) en especial, en pequeñas áreas o en algún campo agrícola en particular, no se ha encontrado; para que ésto suceda se debe ejercer un fuerte predominio por parte del grupo de anastomosis(AG), sobre el cultivo dado en ciertas áreas o campos (Ogoshi, 1987).

2.7. Rango De Hospedantes

El rango de hospedantes de este patógeno de gran importancia económica es muy amplio debido a que lo mismo ataca a plantas explotadas en forma agronómica, que a ornamentales, coníferas, maleza etc.

Cepas del grupo de anastomosis uno (AG1) han sido reportadas principalmente en Leguminosas y Gramíneas. El grupo de anastomosis AG-1IB ha sido identificado en Leguminosas, en tanto AG-1 IA para Gramíneas (Ogoshi, 1987; Jones y Belmar, 1989). El grupo de anastomosis número dos (AG-2-1), ha sido aislado de Cruciferae, mientras que la variante AG-2-2 se ha encontrado infectando principalmente a Chenopodiaceae (AG-2-2 IV) principalmente caña de azúcar o Gramíneas (AG-2-2 IIIB) (Ogoshi, 1987).

Muchas cepas pertenecientes al grupo de anastomosis tres (AG-3), han sido detectadas en Solanaceas (Barksdale, 1974; Ogoshi, 1987) y en pino

(*Pinus palustris* Mill.) (Runion y Kelley 1993), en tanto el grupo de anastomosis cuatro (AG-4), se ha encontrado en Chenopodiaceae, Leguminosas, Solanaceas y en pastos o zacates utilizados en la alimentación de ganado en Colorado y Dakota del Norte en los Estados Unidos (Caesar, *et. al.*, 1993), el grupo de anastomosis AG-5 ha sido reportado en Leguminosas (McCoy y Kraft, 1984; Ogoshi, 1987).

El rango de hospedantes del grupo AG-9 fue determinado en condiciones de invernadero, e incluye cereales como canola (cv. Westar), cebada (cv. Galt), avena (*Avena sativa* L.), trigo (*Triticum aestivum* L. "North Star"), Leguminosas como alfalfa (*Medicago sativa* L. "Peace"), chícharo (*Pisum sativum* L. "Redley"), zacate bermuda (*Bromus sp.*), Brasicaseas como coliflor (*B. oleracea* L. var. Botrytis L. "Early Snowbrid"), Linaceas como fibra de lino (*Linum usitatissimum* L.), y Solanaceas como tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en el estado de Alberta en Canadá (Yang y Kharbanda, 1996).

En el estado de Texas han sido identificados los grupos de anastomosis AG-1 IA, AG-1IB y AG-UNK, en el cultivo de arroz (*Oryzae sativa* L.), soya (*Glycine max* (L.) Merrill), maíz (*Zea mays* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) y zacate bermuda (*Cynodon dactylon* (L.) Pres.)(Jones, 1989).

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS

El estudio se llevó a cabo, en el campo, así como en el laboratorio del Departamento de Parasitología Agrícola de la UAAAN-UL en Torreón, Coah. y en el laboratorio de fitopatología e invernadero del Campo Experimental de la Laguna en Matamoros, Coah. durante el período de Noviembre de 1997 a Julio de 1999.

La determinación de grupos de compatibilidad y rango de hospedantes de *R. solani* en la Comarca Lagunera se llevó a cabo en cultivos representativos y de importancia económica para esta región, como son: maíz A791 (*Zea mays* L.), sorgo híbrido 8232 (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), algodónero Deltapine 5690 (*Gossypium hirsutum* L.), frijol Lagunero 87 (*Phaseolus vulgaris* L.), melón Hearts O'Gold (*Cucumis melo* L.), sandía Striped Klondyke (*Citrullus lanatus* (Thumb) Mansf) y alfalfa (*Medicago sativa* L.).

La semilla de los cultivos mencionados fue donada por los investigadores del Campo Experimental La Laguna. Centro De Investigación Regional Norte Centro del Instituto Nacional De Investigaciones Forestales y Agropecuarias.

La semilla de algodonero, frijol, maíz y alfalfa estaba tratada con fungicidas. Para eliminar el efecto de este químico, la semilla se sometió a un lavado con agua corriente durante 10 minutos y posteriormente se pasó por agua destilada y se extendió en una superficie de papel canela durante 24 hr. Transcurrido este tiempo nuevamente se sometió a lavado con agua destilada y posteriormente se puso a secar a temperatura ambiente.

3.1. Colecta De Aislamientos De *Rhizoctonia*.

Para la obtención de los aislamientos de *Rhizoctonia* se realizaron colectas de campo en los municipios de Torreón, Matamoros, San Pedro y Francisco I. Madero, Coahuila durante el período de Noviembre de 1997 a Marzo de 1998. Los cinco aislamientos fueron obtenidos del cultivo de alfalfa.

Aislamiento 1 Campo Experimental de la Laguna, (CELALA) Matamoros Coah.

Aislamiento 2 UAAAN-UL, Torreón Coah.

Aislamiento 3 UAAAN-UL, Torreón Coah.

Aislamiento 4 El Porvenir, Francisco I. Madero Coah.

Aislamiento 5 Santa Mónica San Pedro Coah.

En los alfalfares de los sitios mencionados se extrajeron del suelo al azar diez plantas y se examinó la corona de la raíz. Las plantas que mostraban

síntomas de pudrición de la corona y manchas café rojizas en la raíz fueron seleccionadas y se guardaron en bolsas de plástico transparente, colocándolas en una hielera para su transporte al laboratorio.

3.2. Obtención De Aislamientos De *Rhizoctonia*.

En las plantas colectadas se eliminó la parte aérea de la planta; la corona y la raíz se lavaron perfectamente con agua corriente durante 15 a 30 minutos para eliminar partículas de suelo. Se tomaron partes afectadas tanto de la corona, como de la raíz y se eliminó la corteza. Posteriormente de la parte interna se cortaron trozos de 0.5 cm de diámetro que incluyeran tejido sano y enfermo.

Estos trozos de raíz fueron sometidos a un proceso de lavado, para eliminar posibles microorganismos y solo favorecer el crecimiento del hongo; este lavado se realizó con agua destilada esterilizada por 3 min. Luego se pasaron a una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex) al 5% donde se mantuvieron por 2 a 3 min. agitando continuamente, y posteriormente se lavaron tres veces con agua destilada esterilizada para eliminar el hipoclorito de sodio. Posteriormente los trozos de tejido se pasaron a una caja petri esterilizada y se dejan en reposo durante 3 min., después de este tiempo se trasladan con pinzas esterilizadas de un lugar a otro dentro de la caja petri, para eliminar el exceso de agua. Finalmente se colocaron en el medio de cultivo en

cajas de petri con agar papa dextrosa (APD) (Bioxon Becton Dickinson de México, S.A. de C. V.), procurando que quedaran semi enterradas. Las cajas se conservaron en el laboratorio a una temperatura ambiente de aproximadamente 20 a 24 °C.

3.2.1. Aislamiento Puro De *Rhizoctonia*

Aproximadamente 24 hr después de colocar el tejido en el medio de cultivo, cuando se presentó crecimiento de micelio alrededor del fragmento de raíz, se tomo una muestra y se llevó a cabo una resiembra, poniendo esta muestra en el centro de una caja petri con agar papa dextrosa (APD), dejándola crecer a temperatura ambiente durante 24 horas. Del crecimiento micelial presentado se tomo una pequeña muestra y se analizó al microscopio para comprobar si era *Rhizoctonia*, el hongo que estaba creciendo en el medio; comprobado esto, se mantuvo el aislamiento en APD en refrigeración hasta el momento de ser utilizado, resembrando constantemente para que el hongo tuviera siempre medio disponible para crecer y mantenerse activo.

3.3. Ensayo De Patogenicidad

Este ensayo se realizó con el propósito de determinar si el hongo estaba activo y era patogénico, ésto debido al tiempo que estuvieron manteniéndose las cepas en condiciones de laboratorio con substrato sintético. El ensayo se realizó en cinco cultivos representativos y de importancia económica para esta región, como son: melón Hearts O'Gold (*Cucumis melo* L.), maíz A791 (*Zea mays* L.), sorgo híbrido 8232 (*Sorghum bicolor* (L.) Meench), algodónero Deltapine 5690 (*Gossypium hirsutum* L.) y frijol Lagunero 87 (*Phaseolus vulgaris* L.).

El ensayo se realizó de la siguiente manera: en macetas de unicel con capacidad de medio litro, se colocaron 500 g de arena previamente esterilizada (tratada con bromuro de metilo). Se prepararon cinco macetas por cada especie y un testigo por especie. En éstas se pusieron a germinar cinco semillas de las especies antes mencionadas en cada maceta, manteniéndolas en condiciones de invernadero con temperatura de 20 a 24°C.

Siete días después de iniciado el ensayo cuando la primera hoja verdadera estaba ya formada en algodónero, sorgo, maíz y frijol, las plántulas se inocularon con un bocado de 0.8 cm. de diámetro de agar papa dextrosa zanahoria (APDZ) (Apéndice I) el cual contenía al hongo. En melón la inoculación se llevo a cabo dos días después. Se utilizo un cultivo de 5 días de

edad. La inoculación se efectuó removiendo la arena con mucho cuidado para descubrir la raíz principal de la plántula y colocar a un lado de ésta el bocado de agar, tapándolo nuevamente. Las macetas continuaron en condiciones de invernadero hasta los veintiún días de iniciado el ensayo. Después de transcurrido este tiempo se procedió a extraer las plantas y a observar los resultados.

3.4. Determinación De Rango De Hospedantes De *Rhizoctonia*.

La determinación del rango de hospedantes de *Rhizoctonia* se llevó a cabo en siete especies las cuales fueron: frijol Lagunero 87, maíz A791, sorgo híbrido 8232, alfalfa, algodónero Deltapine 5690, melón Heatrs O'Gold y sandía Striped Klondyke. Para la realización de este experimento se utilizaron 126 macetas en total, 18 macetas de unicel por especie, de las cuales tres fueron testigos y las 15 restantes fueron tres repeticiones para cada una de los aislamientos.

3.4.1. Preparación De Macetas Con Inóculo Al 4%

La arena esterilizada (tratada con bromuro de metilo) se humedeció a razón de 20 ml de agua destilada por cada 100 gr de arena, y luego, en las

macetas de unicel con capacidad de medio litro, se colocaron 480 gr de arena esterilizada y 20 gr de inóculo en medio de arena-harina de maíz. Se mezcló perfectamente la arena esterilizada con el inóculo, con el fin de homogeneizar desmenuzando bien el medio de arena-harina de maíz. Ya realizada la mezcla se procedió a poner 500 gr de esta mezcla en cada maceta. En total se prepararon 105 macetas inoculadas (21 macetas para cada cepa) y 21 macetas testigo sin inóculo. En cada maceta se colocaron cinco semillas de los diferentes cultivos. Las macetas se mantuvieron en un invernadero de cinco por cinco m a una temperatura de 20 a 24°C y siempre en condiciones de humedad a capacidad de campo, para favorecer la proliferación y actividad del hongo.

Durante el transcurso de los 21 días del experimento se tomaron datos de germinación, aparición de síntomas en la base del tallo, plantas muertas (PM) en el transcurso del experimento, plantas aparentemente sanas (P*), sobrevivencia. Al concluir el período de tiempo de experimentación se extrajeron las plantas, se examinó su sistema radical y se evaluó el grado de daño causado por el hongo, como semillas ahogadas (A), plantas con síntomas leves (PSL), plantas con síntomas moderados (PSM) y plantas con síntomas severos (PSS). Estas últimas fueron seleccionadas para de ellas obtener nuevamente los cinco aislamientos puros, por medio del procedimiento antes descrito y corroborar que fue el hongo inoculado el causante de los daños a las plantas. Ya obtenidos los aislamientos puros en APD, estos fueron fijados para

la posterior preparación de laminillas semipermanentes y permanentes para la identificación de los grupos de compatibilidad.

3.4.2. Identificación De Grupos De Compatibilidad De *Rhizoctonia*.

La identificación de los grupos de compatibilidad del hongo se llevó a cabo mediante la tinción de núcleos por medio de preparación de 10 laminillas semipermanentes de cada uno de los cinco aislamientos del hongo cada una con más de 10 células.

3.4.3. Fijación De Material Para La Preparación De Laminillas

Los fijadores usados fueron dos: a)Formaldheido(Baker Analyzed)-Alcohol-Acido acético glacial (Productos Químicos Monterrey S.A.) (FAA) y b)Alcohol 96% Acido acético glacial en concentración 3 a 1 (3:1). El material fijado en estas soluciones se conserva indefinidamente manteniéndolo en refrigeración. La fijación del material se llevó a cabo de la siguiente manera: fueron fijados bloques de agar de 0.5 cm² en los cuales estaba creciendo el hongo. Para el fijador FAA los bloques se introdujeron en la solución e inmediatamente se mantuvieron en refrigeración; el material fijado en solución 3:1, se dejó en la solución durante 12 hr. y posteriormente fue lavado con

alcohol al 70% dos veces y se mantuvo en esta solución en refrigeración para posteriormente utilizarlo.

3.4.4. Preparaciones Premanentes Y Semipermanentes.

Para la identificación de los diferentes grupos de compatibilidad o anastomosis de *Rhizoctonia* se utilizaron las siguientes preparaciones:

- a) Preparaciones permanentes aplastadas
- b) Preparaciones semipermanentes aplastadas

La técnica de tinción utilizada para la elaboración de preparaciones semipermanentes y permanentes de células vegetativas de *Rhizoctonia*, fue un método simple monocromático, el Método de Azul de Metileno (Johansen, 1968). Con esta técnica el núcleo toma una coloración azul oscuro y el citoplasma se ve ligeramente azul o permanece sin color. Para definir claramente si las células hifales eran mononucleadas o multinucleadas de acuerdo al nivel de detalle requerido fue necesario probar algunas variantes del método de elaboración de preparaciones permanentes y semipermanentes. De estas variantes se seleccionó sólo aquella que se adaptó a los requerimientos del estudio.

3.4.5. Tinción Con El Método De Azul De Metileno

El material obtenido de las plantas afectadas (con síntomas severos) por el hongo fue fijado en alcohol : ácido acético glacial en proporción 3:1 durante 24 horas en tubos de ensayo. Se lavó dos veces de 3 a 5 minutos con alcohol al 70% y posteriormente se cambió a alcohol 70% ya que en éste el material puede conservarse indefinidamente en refrigeración.

El material conservado en alcohol 70%, fue transferido a alcohol 50% y de este a alcohol 30% por 5 minutos en cada uno. Del alcohol fue transferido a agua destilada y con ésta fueron lavados los bloques de agar con hifas; después de esto se procedió a quitar con papel filtro el exceso de agua entre los bloques y en las paredes de los tubos, para posteriormente añadir el colorante Azul de Metileno al 3 %, cuidando que cubriera perfectamente los bloques de agar y se dejó en un lugar oscuro durante 25 a 30 minutos.

Pasado este lapso de tiempo, se procedió a lavar el exceso de colorante con agua corriente hasta que los bloques dejaran de desprender colorante; se eliminó el exceso de agua con papel filtro y se procedió a deshidratar con alcohol 96°, de 1 a 5 minutos.

Para la elaboración de laminillas semipermanentes se puso una pequeña cantidad de bloque de agar con hifas teñidas en un portaobjetos y se maceró

con una varilla de cristal en alcohol 96°; ya maceradas las células, se les añadió una gota de glicerina al 100% (Fischer Scientific de México), se tapó la muestra con un cubreobjetos, evitando la formación de burbujas y fue sellado por los lados con esmalte de uñas; esta preparación tiene un promedio de vida de aproximadamente 6 meses.

En la preparación de laminillas permanentes, después de la deshidratación con alcohol 96°, se usó una pequeña cantidad de bloque de agar con hifas teñidas sobre un portaobjetos y se maceró con una varilla de cristal en alcohol 96°; las células ya maceradas se taparon con un cubreobjetos y se presionaron ligeramente. Luego se colocaron en el congelador durante 10 minutos para que las células se adhirieran perfectamente a la laminilla; transcurrido el tiempo, se desprendió el cubreobjetos y las células adheridas a la laminilla fueron sometidas a un proceso de deshidratación con las siguientes soluciones, cinco minutos en cada una:

Alcohol 96° I

Alcohol 96° II

Alcohol Absoluto 100%

Xilol – Alcohol Absoluto 1:1

Xilol I

Xilol II

Al finalizar la deshidratación de las células en las soluciones ya mencionadas, se les adicionó una pequeña gota de bálsamo de Canadá (Sigma Chemical Co. St. Louis, U.S.A.) y se cubrieron cuidadosamente con cubreobjetos evitando la formación de burbujas.

3.5. Prueba De Anastomosis (Fusión De Células Hifales).

La determinación de anastomosis se llevó a cabo en el laboratorio. Se prepararon cajas petri estériles, las cuales contenían un portaobjetos. En el portaobjetos se vaciaron aproximadamente 2 ml. de agar ADP(estéril), procurando que cubriera la mayor parte de la superficie del protaobjetos. Sobre el medio de cultivo se colocaron por pares de diferentes aislamientos en posición próxima de 0.5 cm entre ellos dos pequeños bloques de agar de aproximadamente 0.5 por 1.5 cm, para facilitar el contacto de las hifas de los diferentes aislamientos y se dejaron a temperatura ambiente (22 a 27°C) durante 3 hr. Pasado este periodo de tiempo se observo al microscopio (40X) para determinar si hubo fusión de las hifas de un aislamiento con el otro. Esta prueba se realizo tres veces.

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1. Ensayo De Patogenicidad

Los resultados del ensayo de patogenicidad de los cinco aislamientos se presentan en los cuadros 1 a 5, en los cuales se observa el número de plantas inoculadas en cada cultivo con cada uno de los cinco aislamientos, los síntomas que presentaron los diferentes cultivos a cada aislamiento, el número de plantas sobrevivientes y el porcentaje de éstas a los 21 días después de la inoculación.

En este ensayo predominaron los síntomas de ligeros a moderados en melón (Fig. 2) en los aislamientos 1, 2, 3 y 5; el aislamiento 4 provocó síntomas severos y la muerte de plantas. En general en melón la acción del hongo fue clasificada como leve, cuando las semillas ya han germinado y la primera hoja ya está desarrollada. A excepción de las dos plantas muertas por las cepas 1 y 4.

En el caso del cultivo de algodónero (Fig. 3) y frijol (Fig. 4), los síntomas que exhibieron las plantas a los diferentes aislamientos fueron de severos a muerte de las plantas. En algodónero los aislamientos 1, 2 y 4 aparentemente

fueron más agresivos que los aislamientos 3 y 5 ya que al igual que en melón, se presentó una planta muerta en cada una de las macetas. En frijol, a los diez días se presentaron los primeros síntomas de la enfermedad provocada por el hongo, ya que en las plantas se observó claramente la presencia de manchas cafés alrededor del la base del tallo. Para el caso de los cultivos de sorgo (Fig. 5) y maíz los síntomas variaron desde moderados hasta la muerte de plantas, presentando los mismos síntomas que el frijol.

La acción del aislamiento 1 en maíz fue desde plantas con síntomas leves a plantas con síntomas moderados; el aislamiento 2 actuó igual el aislamiento 1, sin embargo el aislamiento 3 fue más agresivo ya que provocó daños más severos que los aislamientos 1 y 2; los aislamientos 4 y 5 tuvieron una acción menos agresiva que el aislamiento 3 ya que en éstas las plantas presentaron daños moderados.

El aislamiento 1 sobre el sorgo fue muy agresivo ya que las plantas presentaron daños severos, en tanto que con el aislamiento 2 los daños fueron menos agresivos (daño moderado); el aislamiento 3 provocó daños de moderados a severos, mientras que los aislamientos 4 y 5 fueron menos agresivos, ya que con éstas los daños fueron de ligeros a moderados.

En frijol, se observó claramente que éste es muy susceptible al hongo, ya que la acción de los aislamientos sobre las plantas de este cultivo fue muy

severa y en algunos casos como ocurrió con los aislamientos 1 y 4 se presentaron 2 y 1 plantas muertas respectivamente. Consecuentemente, se puede decir que los cinco aislamientos son agresivos para frijol y dentro de éstas, la más agresivo es el aislamiento 1.

La presencia de los cinco diferentes aislamientos del hongo en algodonero se manifestó provocando daños de moderados a severos; el aislamiento 4 fue la más agresivo, ya que provocó la muerte de una planta.

El porcentaje de mortandad de los cinco aislamientos varió desde 0 a 60%, dependiendo del cultivo, siendo el más agresivo el aislamiento 1 (con un 60% de sobrevivencia promedio) y el menos agresivo fue el aislamiento 2 (con un 92% de sobrevivencia promedio), para todos los cultivos.

Cuadro 1. Número de plantas afectadas y grado de ataque ocasionado por el aislamiento 1 de *Rhizoctonia* en cinco hospedantes (cultivos). UAAAN-UL. Torreón, Coah. 1999.

Cultivo	Plantas inoculadas	No. de plántulas afectadas por grado de ataque					Plántulas sobrevivientes	
		P*	PSL	PSM	PSS	PM	No.	%
Algodonero	5	0			3	2	3	60
Frijol	5	0			2	3	2	40
Maíz	5	0		3		2	3	60
Melón	5	0	4			1	4	80
Sorgo	5	0			3	2	3	60

Grado de Ataque: P*: → Plantas sanas desarrollándose en las macetas.

PSL: → Plantas con síntomas leves, los cuales consisten en lesiones café rojizas apenas perceptibles en la base del tallo o la raíz.

PSM: → Plantas con síntomas moderados, consistentes en lesiones color café rojizo visibles en la base del tallo y en la raíz.

PSS: → Plantas con síntomas severos consistentes en manchas grandes de color café oscuras en la raíz y en la base del tallo (tejido necrotico), fácilmente apreciadas.

PM: → Plantas muertas.

Cuadro 2. Número de plantas afectadas y grado de ataque ocasionado por el aislamiento 2 de *Rhizoctonia* en cinco hospedantes (cultivos). UAAAN-UL. Torreón, Coah. 1999.

Cultivo	Plantas inoculadas	No. de plántulas afectadas por grado de ataque					Plántulas sobrevivientes	
		P*	PSL	PSM	PSS	PM	No.	%
Algodonero	5	0			5		5	100
Frijol	5	0			5		5	100
Maíz	5	0		4		1	4	80
Melón	5	0	5				5	100
Sorgo	5	0		4		1	4	80

Grado de Ataque: P*: → Plantas sanas desarrollándose en las macetas.

PSL: → Plantas con síntomas leves, los cuales consisten en lesiones café rojizas apenas perceptibles en la base del tallo o la raíz.

PSM: → Plantas con síntomas moderados, consistentes en lesiones color café rojizo visibles en la base del tallo y en la raíz.

PSS: → Plantas con síntomas severos consistentes en manchas grandes de color café oscuras en la raíz y en la base del tallo (tejido necrotico), fácilmente apreciadas.

PM: → Plantas muertas.

Cuadro 3. Número de plantas afectadas y grado de ataque ocasionado por el aislamiento 3 de *Rhizoctonia* en cinco hospedantes (cultivos). UAAAN-UL. Torreón, Coah. 1999.

Cultivo	Plantas inoculadas	No. de plántulas afectadas por grado de ataque					Plántulas sobrevivientes	
		P*	PSL	PSM	PSS	PM	No.	%
Algodonero	5	0			3	2	3	60
Frijol	5	0			5		5	100
Maíz	5	0			4	1	4	80
Melón	5	0	4			1	4	80
Sorgo	5	0			4	1	4	80

Grado de Ataque: P*: → Plantas sanas desarrollándose en las macetas.

PSL: → Plantas con síntomas leves, los cuales consisten en lesiones café rojizas apenas perceptibles en la base del tallo o la raíz.

PSM: → Plantas con síntomas moderados, consistentes en lesiones color café rojizo visibles en la base del tallo y en la raíz.

PSS: → Plantas con síntomas severos consistentes en manchas grandes de color café oscuras en la raíz y en la base del tallo (tejido necrotico), fácilmente apreciadas.

PM: → Plantas muertas.

Cuadro 4. Número de plantas afectadas y grado de ataque ocasionado por el aislamiento 4 de *Rhizoctonia* en cinco hospedantes (cultivos). UAAAN-UL. Torreón, Coah. 1999.

Cultivo	Plantas inoculadas	No. de plántulas afectadas por grado de ataque					Plántulas sobrevivientes	
		P*	PSL	PSM	PSS	PM	No.	%
Algodonero	5	0			4	1	4	80
Frijol	5	0			4	1	4	80
Maíz	5	0		3		2	3	60
Melón	5	0			2	3	2	40
Sorgo	5	0		3		2	3	60

Grado de Ataque: P*: → Plantas sanas desarrollándose en las macetas.

PSL: → Plantas con síntomas leves, los cuales consisten en lesiones café rojizas apenas perceptibles en la base del tallo o la raíz.

PSM: → Plantas con síntomas moderados, consistentes en lesiones color café rojizo visibles en la base del tallo y en la raíz.

PSS: → Plantas con síntomas severos consistentes en manchas grandes de color café oscuras en la raíz y en la base del tallo (tejido necrotico), fácilmente apreciadas.

PM: → Plantas muertas.

Cuadro 5. Número de plantas afectadas y grado de ataque ocasionado por el aislamiento 5 de *Rhizoctonia* en cinco hospedantes (cultivos). UAAAN-UL. Torreón, Coah. 1999.

Cultivo	Plantas inoculadas	No. de plántulas afectadas por grado de ataque					Plántulas sobrevivientes	
		P*	PSL	PSM	PSS	PM	No.	%
Algodonero	5	0		4		1	4	80
Frijol	5	0			5		5	100
Maíz	5	0			3	2	3	60
Melón	5	0	5				5	100
Sorgo	5	0	4			1	4	80

Grado de Ataque: P*: → Plantas sanas desarrollándose en las macetas.

PSL: → Plantas con síntomas leves, los cuales consisten en lesiones café rojizas apenas perceptibles en la base del tallo o la raíz.

PSM: → Plantas con síntomas moderados, consistentes en lesiones color café rojizo visibles en la base del tallo y en la raíz.

PSS: → Plantas con síntomas severos consistentes en manchas grandes de color café oscuras en la raíz y en la base del tallo (tejido necrotico), fácilmente apreciadas.

PM: → Plantas muertas.

4.2. Determinación De Rango De Hospedantes De *Rhizoctonia*.

Los resultados de la determinación de rango de hospedantes del hongo se presentan en los cuadros 6 al 10, en los que se muestra el porcentaje de emergencia o germinación de plántulas de los diferentes cultivos en presencia de los cinco aislamientos del hongo en las macetas con inóculo al 4%, los daños ocasionados por el hongo en las plantas y semillas de los cultivos el número de plantas que sobreviven, el porcentaje de éstas al final del experimento y el porcentaje de plantas sanas o sin presencia de síntomas causados por el hongo.

Los cultivos más susceptibles a la presencia de los cinco aislamientos del hongo fueron melón y sandía, ya que se observó claramente que en ninguna de las macetas inoculadas con el hongo hubo germinación, mientras que en las macetas testigo las plantas crecían normalmente (Fig. 6). Después de éstos los cultivos que le siguen en susceptibilidad son el algodón, frijol (Fig. 7), sorgo (Fig. 8), maíz (Fig. 9) y alfalfa. Estos resultados indican que bajo las condiciones del experimento las gramíneas en general son menos susceptibles al hongo (Figs. 7 y 8).

El aislamiento más agresivo fue el 1 (11.3% de sobrevivencia de plantas), mientras que el aislamiento 5 (37.85% de sobrevivencia de plantas), fue el menos agresivo.

El aislamiento 1 afectó mas severamente la emergencia de todos los cultivos; los porcentajes de sobrevivencia de todos los cultivos oscilaron entre 0 y 46% (Cuadro 6). Los resultados indican que este aislamiento provoca principalmente la pudrición de la semilla y la marchitez preemergente de las plántulas de los diferentes cultivos.

Los aislamientos 2, 3 y 5 resultaron ser los menos agresivos en cuanto a emergencia de la plántula ya que los porcentajes de germinación de las semillas, a los diez días de iniciado el experimento en los diferentes cultivos en forma general son mayores que los porcentajes mostrados para el aislamiento 1(10.4%). De estos tres aislamientos es el aislamiento 2 el que presenta un mayor porcentaje general de emergencia a los 10 días (35.6%), en tanto el aislamiento 3 y 5 tuvieron una emergencia ligeramente menor 22.1 y 32.6 respectivamente.

El aislamiento 2 resultó ser el menos agresivo, lo cual se comprueba al observar los porcentajes de emergencia de los diferentes cultivos y el número de plantas sobrevivientes; el aislamiento 5, también presenta un porcentaje de emergencia elevado, pero es el que en forma general presenta mas plantas con daño severo.

Cuadro 6. Porcentaje de emergencia de plántulas a los 10 días, número de plantas afectadas y grado de ataque ocasionado por el aislamiento 1 de *Rhizoctonia* en siete hospedantes (cultivos). UAAAN-UL. Torreón, Coah. 1999.

Cultivo	% de emergencia	No. de plántulas afectadas por grado de ataque						Plántulas sobrevivientes a los 21 días	
		P*	A*	PSL	PSM	PSS	PM	No.	%
Alfalfa	27	0	12		1	2		3	20
Sandía	0	0	15					0	0
Algodonero	0	0	15					0	0
Frijol	0	0	13			2		2	13
Maíz	46	0	8	4	3			7	46
Melón	0	0	15					0	0
Sorgo	0	0	15					0	0

Grado de Ataque: P*: → Plantas sanas desarrollándose en las macetas.

PSL: → Plantas con síntomas leves, los cuales consisten en lesiones café rojizas apenas perceptibles en la base del tallo o la raíz.

PSM: → Plantas con síntomas moderados, consistentes en lesiones color café rojizo visibles en la base del tallo y en la raíz.

PSS: → Plantas con síntomas severos consistentes en manchas grandes de color café oscuras en la raíz y en la base del tallo (tejido necrotico), fácilmente apreciadas.

PM: → Plantas muertas.

Cuadro 7. Porcentaje de emergencia de plántulas a los 10 días, número de plantas afectadas y grado de ataque ocasionado por el aislamiento 2 de *Rhizoctonia* en siete hospedantes (cultivos). UAAAN-UL. Torreón, Coah. 1999.

Cultivo	% de emergencia	No. de plántulas afectadas por grado de ataque						Plántulas sobrevivientes a los 21 días	
		P*	A*	PSL	PSM	PSS	PM	No.	%
Alfalfa	81	0	1	5	9			14	93.3
Sandía	0	0	15					0	0
Algodonero	7	0	12			1	2	1	6.6
Frijol	34	0	14			1		1	6.6
Maíz	67	0	5		6	3	1	9	60
Melón	0	0	15					0	0
Sorgo	74	0	3		6	6		12	74

Grado de Ataque: P*: → Plantas sanas desarrollándose en las macetas.

PSL: → Plantas con síntomas leves, los cuales consisten en lesiones café rojizas apenas perceptibles en la base del tallo o la raíz.

PSM: → Plantas con síntomas moderados, consistentes en lesiones color café rojizo visibles en la base del tallo y en la raíz.

PSS: → Plantas con síntomas severos consistentes en manchas grandes de color café oscuras en la raíz y en la base del tallo (tejido necrotico), fácilmente apreciadas.

PM: → Plantas muertas.

Cuadro 8. Porcentaje de emergencia de plántulas a los 10 días, número de plantas afectadas y grado de ataque ocasionado por el aislamiento 3 de *Rhizoctonia* en siete hospedantes (cultivos). UAAAN-UL. Torreón, Coah. 1999.

Cultivo	% de emergencia	No. de plántulas afectadas por grado de ataque						Plántulas sobrevivientes a los 21 días	
		P*	A*	PSL	PSM	PSS	PM	No.	%
Alfalfa	47	0	4	1	9	1		11	67
Sandia	0	0	15					0	0
Algodonero	14	0	13			2		2	13
Frijol	34	0	8		3	2	2	5	33
Maíz	46	0	8	4	3			7	46
Melón	0	0	15					0	0
Sorgo	14	0	12		3			3	20

Grado de Ataque: P*: → Plantas sanas desarrollándose en las macetas.

PSL: → Plantas con síntomas leves, los cuales consisten en lesiones café rojizas apenas perceptibles en la base del tallo o la raíz.

PSM: → Plantas con síntomas moderados, consistentes en lesiones color café rojizo visibles en la base del tallo y en la raíz.

PSS: → Plantas con síntomas severos consistentes en manchas grandes de color café oscuras en la raíz y en la base del tallo (tejido necrotico), fácilmente apreciadas.

PM: → Plantas muertas.

Cuadro 9. Porcentaje de emergencia de plántulas a los 10 días, número de plantas afectadas y grado de ataque ocasionado por el aislamiento 4 de *Rhizoctonia* en siete hospedantes (cultivos). UAAAN-UL. Torreón, Coah. 1999.

Cultivo	% de emergencia	No. de plántulas afectadas por grado de ataque						Plántulas sobrevivientes a los 21 días	
		P*	A*	PSL	PSM	PSS	PM	No.	%
Alfalfa	54	0	2	3		10		13	86
Sandía	0	0	15					0	0
Algodonero	0	0	15					0	0
Frijol	13	0	12			2	1	2	13
Maíz	27	0	7	2	2		4	4	27
Melón	0	0	15					0	0
Sorgo	27	0	11		2	2		4	27

Grado de Ataque: P*: → Plantas sanas desarrollándose en las macetas.

PSL: → Plantas con síntomas leves, los cuales consisten en lesiones café rojizas apenas perceptibles en la base del tallo o la raíz.

PSM: → Plantas con síntomas moderados, consistentes en lesiones color café rojizo visibles en la base del tallo y en la raíz.

PSS: → Plantas con síntomas severos consistentes en manchas grandes de color café oscuras en la raíz y en la base del tallo (tejido necrotico), fácilmente apreciadas.

PM: → Plantas muertas.

Cuadro 10. Porcentaje de emergencia de plántulas a los 10 días, número de plantas afectadas y grado de ataque ocasionado por el aislamiento 5 de *Rhizoctonia* en siete hospedantes (cultivos). UAAAN-UL. Torreón, Coah. 1999.

Cultivo	% de emergencia	No. de plántulas afectadas por grado de ataque						Plántulas sobrevivientes a los 21 días	
		P*	A*	PSL	PSM	PSS	PM	No.	%
Alfalfa	60	0	2			13		13	86
Sandía	0	0	15					0	0
Algodonero	28	0	10			5		5	33
Frijol	60	0	4		11			11	66
Maíz	40	0	9	2	2	2		6	40
Melón	0	0	15					0	0
Sorgo	40	0	9		3	3		6	40

Grado de Ataque: P*: → Plantas sanas desarrollándose en las macetas.

PSL: → Plantas con síntomas leves, los cuales consisten en lesiones café rojizas apenas perceptibles en la base del tallo o la raíz.

PSM: → Plantas con síntomas moderados, consistentes en lesiones color café rojizo visibles en la base del tallo y en la raíz.

PSS: → Plantas con síntomas severos consistentes en manchas grandes de color café oscuras en la raíz y en la base del tallo (tejido necrotico), fácilmente apreciadas.

PM: → Plantas muertas.

4.3. Identificación De Grupos De Compatibilidad De *Rhizoctonia*.

El material de los aislamientos se fijo y tiño de acuerdo a la técnica descrita por Johansen (1968), después del proceso de fijación y tinción los núcleos de las células hifales adquirieron una tonalidad de azul marino oscuro y de forma redondeada. El citoplasma adquirió una tonalidad azul claro translucido.

En el cuadro 11 se presenta el rango del número de núcleos que se encontraron en cada célula hifal en los diferentes aislamientos examinados y se da un rango promedio de los números mínimos y máximos de núcleos.

Cuadro 11. Número total de núcleos y promedio por célula hifal.

Aislamiento	Rango del Número de Núcleos	Rango promedio de Número Mínimo y Máximo de Núcleos
1	4-11	5-11
2	4-14	6-11
3	4-16	5-14
4	3-17	6-13
5	3-10	4-9

Considerando que el número de núcleos por célula hifal varió desde 3 (mínimo) hasta 17 (máximo), con un promedio de 4 a 14 núcleos por célula (Cuadro 11), los aislamientos de *Rhizoctonia* fueron identificados como multinucleados.

4.4. Prueba De Anastomosis (Fusión De Células Hifales).

Los resultados de esta prueba indicaron que no hubo fusión entre ninguno de los aislamientos de *R. solani*. Aún cuando hubo crecimiento encontrado de las hifas.

CAPITULO V

DISCUSION

5.1. Ensayo De Patogenicidad.

Todas las plantas de los cultivos utilizados en el ensayo, fueron dañadas en menor o mayor grado al inocularlas con los aislamientos de *Rhizoctonia* mantenidos en condiciones de laboratorio con substrato artificial APD y APDZ. Esto indica que los dos medios sintéticos mencionados son apropiados para mantener la actividad y patogenicidad del hongo al igual que los medios propuestos por Ko y Hora (1971), Baruch, *et al.*, 1991; Vincelli, (1989).

Los síntomas observados en este experimento variaron desde manchas café claro a oscuro en la base del tallo, quemadura de las hojas, marchitez o decaimiento de las plantas en las macetas y daños desde ligeros a severos en el sistema de raíz y muerte de las plantas. Los síntomas observados coinciden con los descritos por algunos autores (Jones y Belmar, 1989; Yang *et al.*, 1990; citados por Sneh *et al.*, 1991; McCoy y Kraft, 1984; Artículo Internet Pudrición radicular por *Rhizoctonia*.htm, 1998; Molinero Ruiz, 1998; Engelkes y Windels 1998; Caesar *et al.*, 1993).

En todos los casos el testigo se desarrolló libremente sin ninguna restricción ya que este se encontraba en arena estéril y al igual que las macetas inoculadas no tuvo estrés de agua.

La técnica de inoculación utilizada en el ensayo de patogenicidad reporta resultados confiables, por lo que se propone como otra opción de inoculación, al igual que la técnica de caldo y la del método de grano entero Baruch, et al., (1991).

5.2. Determinación De Rango De Hospedantes De *Rhizoctonia*.

Los siete cultivos que fueron sometidos a esta prueba resultaron susceptibles a la presencia del hongo en mayor o menor grado ya que en todos se presentaron síntomas que fueron desde leves hasta muy severos y en algunos casos, hubo muerte de las plantas. Los resultados confirman lo aseverado por: Ogoshi, (1987), Yang y Kharbanda, (1996), Herrera y Ulloa, (1990), Julián et. al., (1996), quienes dicen que este fitopatógeno es de gran importancia y ampliamente distribuido esta presente tanto en suelos cultivados como en no cultivados. Además se confirma lo aseverado anteriormente, de que el rango de hospedantes es muy amplio y consecuentemente los cultivos regionales de importancia económica son susceptibles.

Todos los aislamientos afectan a todos los cultivos en mayor o menor grado. Esto coincide con los resultados del ensayo de patogenicidad.

5.3. Identificación De Grupos.

Todos los aislamientos se mantuvieron en APD y APDZ, y mostraron en la zona central la formación de esclerocios, distribuidos en y sobre el agar alrededor del origen (Fig. 1, aislamiento 3 en el centro). Esto concuerda con los resultados publicados por Yang y Kharbanda, (1996). Los aislamientos utilizados corresponden a *Rhizoctonia* multinucleados.

5.4. Prueba de Anastomosis.

Puesto que no hubo fusión de hifas, posiblemente los grupos de anastomosis fueron diferentes. Se considera que estos resultados son parciales y que muy probablemente son menos de cinco los grupos presentes. La existencia de varios grupos de compatibilidad ha sido mencionada en otros lugares como Japón (1985) y Alemania (1936).

En la Región Lagunera posiblemente existen varios grupos de compatibilidad o anastomosis de *R. solani* presentes en los suelos. Con base en las pruebas de anastomosis, se comprobó que entre los cinco aislamientos monitoreados no hubo fusión de las hifas de uno u otro aislamiento, lo cual indica que posiblemente se tuvieron diferentes grupos de anastomosis. Esto corrobora y acepta lo propuesto en la primera hipótesis de este trabajo, sin embargo se considera que estos resultados son parciales y que muy probablemente son menos de cinco los grupos presentes. Se sugiere un estudio más completo de estos aislamientos (posiblemente hasta a nivel molecular), para estar realmente seguros de la existencia de cinco grupos de anastomosis de *R. solani* en la Comarca Lagunera.

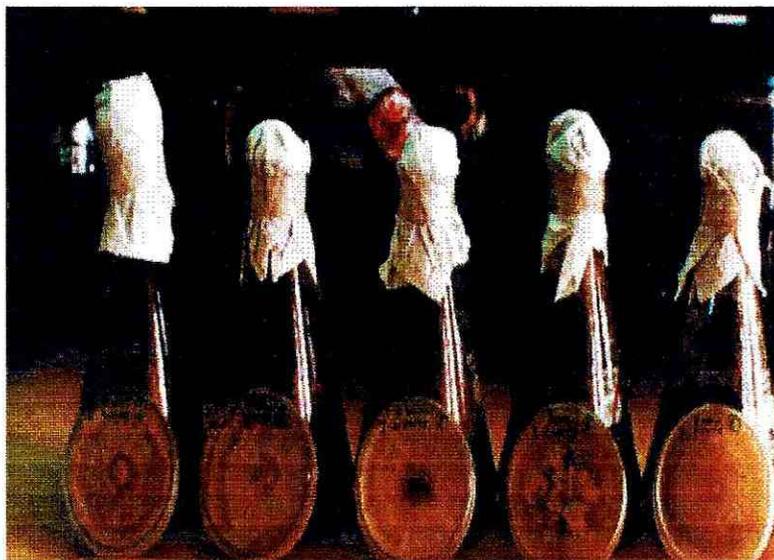


Fig. 1. Inóculo de *Rhizoctonia solani*. En la caja petri central se observa la formación de esclerocios (centro de la caja parte oscura).



Fig. 2. Plántulas de melón del ensayo de patogenicidad en las cuales se aprecia los síntomas causado por el hongo; éste va desde ligero (las dos centrales) a moderado (primeras dos de izquierda a derecha y plántulas testigo sanas, las dos de la derecha).

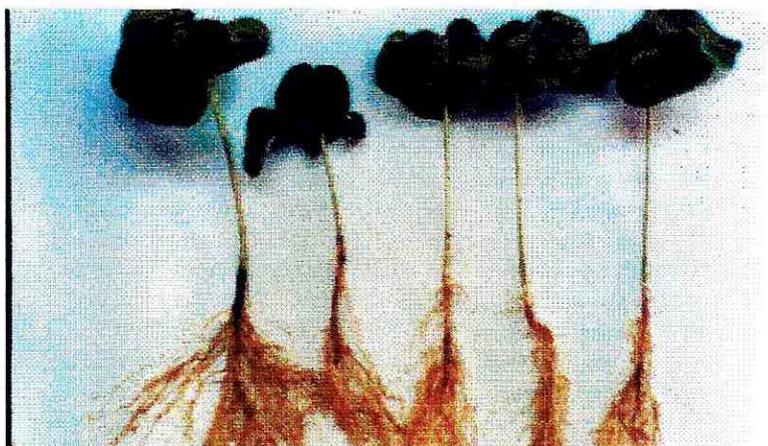


Fig. 3. Plántulas de algodón que muestran los síntomas causados por los diferentes aislamientos de *R. solani*. Todas las plantas muestran daños muy severos donde se aprecian claramente las lesiones características de este patógeno.

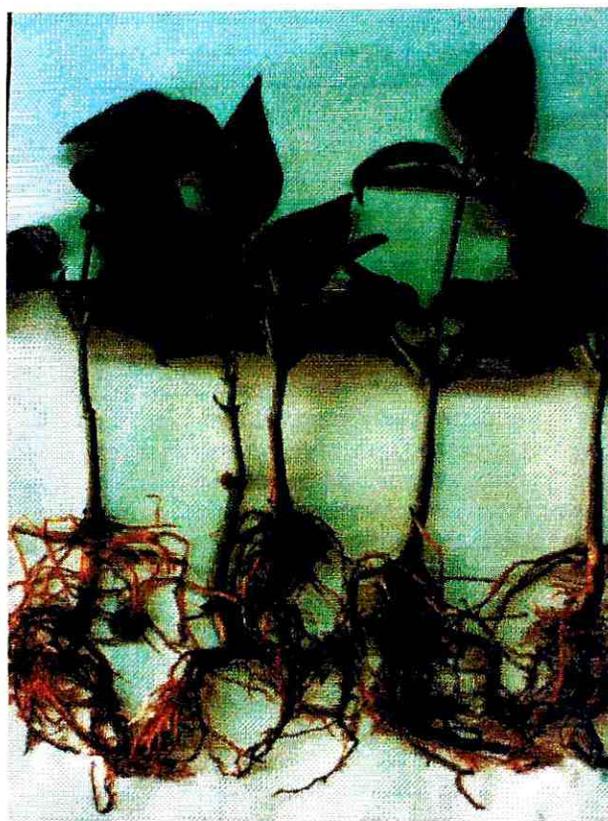


Fig. 4. Plantas de frijol que presentan daños severos en su sistema radical causados por la inoculación de los diferentes aislamientos de *R. solani*.



Fig. 5. Plantas de sorgo que muestran síntomas (Mancha café oscuro en la base de la raíz principal) de moderados (primera planta izquierda) a severos (plantas restantes), en su sistema de raíces.



Fig. 6. Acción de los diferentes aislamientos de *R. solani*, sobre el cultivo del melón. Nótese que el testigo (derecha) crece normalmente en comparación con los diferentes aislamientos (del 1 al 5 de derecha a izquierda).



Fig. 7. Respuesta del frijol a la inoculación de *Rhizoctonia* las macetas testigo (derecha) las plantas crecieron normalmente, el aislamiento 1 y 2 provocó el ahogamiento de semillas (marchitez preemergente), en tanto los aislamientos 3, 4 y 5 solo presentaron lesiones.

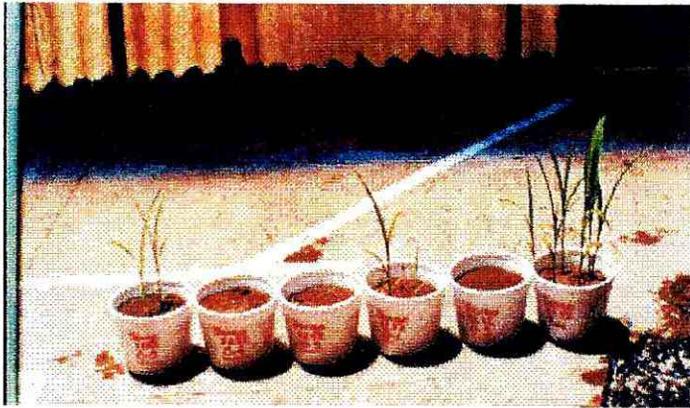


Fig. 8. Efecto de los aislamientos de *Rhizoctonia* sobre sorgo. Se observa que los aislamientos 1, 3 y 4 provocaron muerte preemergente en tanto los aislamientos 2 y 5 solo presentaron lesiones en las raíces de este.



Fig. 9. Respuesta del maíz a los aislamientos de *Rhizoctonia*. Se observa claramente que el aislamiento 4 es el más agresivo, seguido del 5 y el 2.

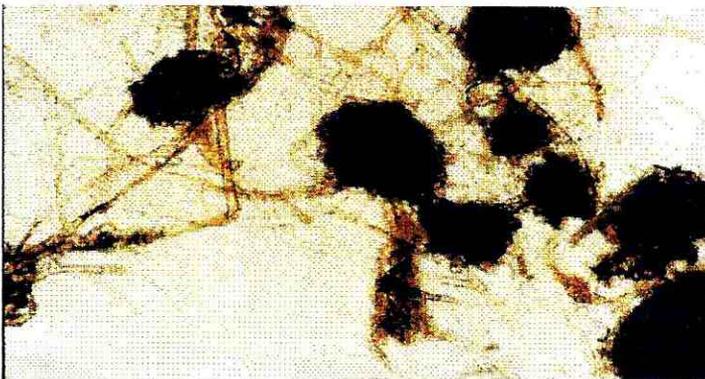


Fig. 10. Microfotografía de *Rhizoctonia solani*, en la cual se observa la característica principal del hongo, que es la formación de esclerocios (las manchas negras) y la ramificación de las hifas en ángulo de 90°.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

La determinación de grupos de compatibilidad y rango de hospedantes de *R. solani* en la Comarca Lagunera, está principalmente basada en la identificación microscópica de la cantidad de núcleos presentes en las células vegetativas y en la identificación de los hospedantes de estos aislamientos.

La especie del patógeno presente en los suelos de la Comarca Lagunera es *R. solani* multinucleada de acuerdo al número de núcleos observados.

Los posibles grupos de compatibilidad o anastomosis de *R. solani* presentes en los suelos de la Comarca Lagunera difieren en el grado de patogenicidad más no en el rango de hospedantes ya que los aislamientos monitoreados de *R. solani* en alfalfa, son patogénicas en mayor o menor grado a los principales cultivos de importancia económica de esta región.

La acción de los diferentes aislamientos de *R. solani* sobre los cultivos de melón y sandía fue muy drástica cuando las semillas son sembradas en suelos con una densidad de inóculo mayor al 3 % ya que el hongo provoca el ahogamiento de las semillas y favorece la pudrición de éstas.

CAPITULO VII

RESUMEN

Este trabajo se realizó en el campo y en el laboratorio del Departamento de Parasitología Agrícola de la UAAAN-UL en Torreón, Coah., en colaboración con el laboratorio de fitopatología e invernaderos del Campo Experimental de la Laguna en Matamoros, Coah., durante el período de Noviembre de 1997 a Julio de 1999.

Se colectaron cinco aislamientos de *Rhizoctonia* en plantas de alfalfa obtenidas de cinco municipios en la Comarca Lagunera de Coahuila con el fin de identificar los grupos de compatibilidad de *Rhizoctonia solani* y determinar el rango de hospedantes de este patógeno. Los aislamientos ya puros se mantuvieron en medio sintético APD y APDZ, en condiciones de laboratorio resemebrando continuamente para mantener siempre activo el hongo.

La fase experimental se llevo a cabo en dos partes: un ensayo de patogenicidad y determinación de grupos de compatibilidad y rango de hospedantes. Estas se llevaron a cabo inóculando directamente en la raíz el hongo (bocados de agar APDZ), para el ensayo de patogenicidad y preparando macetas con una concentración del 4% de inóculo (con medio arena-harina de maíz), para determinación de grupos de compatibilidad y rango de

hospedantes, en cultivos representativos y de importancia económica para esta región, como lo son: maíz A791 (*Zea mays* L.), sorgo híbrido 8232 (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), algodónero Deltapine 5690 (*Gossypium hirsutum* L.), frijol Lagunero 87 (*Phaseolus vulgaris* L.), melón Hearts O'Gold (*Cucumis melo* L.), sandía Striped Klondyke (*Citrullus lanatus* (Thumb) Mansf) y alfalfa (*Medicago sativa* L.).

Se determinó que los cultivos sometidos a este experimento, resultaron susceptibles a la presencia del hongo en mayor o menor grado ya que en todos los casos se presentaron síntomas que fueron desde leves hasta muy severos y en algunos casos, hubo muerte de las plantas. Los resultados confirman lo aseverado por la literatura, donde se establece que este fitopatógeno es de gran importancia y está ampliamente distribuido en todo el mundo, presente tanto en suelos cultivados como en no cultivados. Además se confirma que el rango de hospedantes es muy amplio y consecuentemente los cultivos regionales de importancia económica son susceptibles.

El número de núcleos por célula hifal vegetativa varió desde 3 (mínimo) hasta 17 (máximo), siendo un promedio de 4 a 14 núcleos por célula hifal vegetativa, por lo que los aislamientos de *Rhizoctonia* fueron identificados como *Rhizoctonia solani* especies multinucleados. En la Región Lagunera posiblemente existen varios grupos de compatibilidad o anastomosis de *R. solani* presentes en los suelos. Con base en las pruebas de anastomosis, se

comprobó que entre los cinco aislamientos monitoreados no hubo fusión de las hifas de uno u otro aislamiento.

CAPITULO VIII

LITERATURA CITADA

- Anguiz, R., and C. Martin. 1989. Anastomosis Grups, Pathogenicity, and Other Characteristics of *Rhizoctonia solani*, Isolated From Potatoes in Peru. *Plant Dis.* 73:199-201.
- Anderson, A. N. 1982. The Genetics and Pathology of *Rhizoctonia solani*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 20:329-47.
- Anónimo, 1984. Guía para la Asistencia Técnica Agrícola en la Comarca Lagunera. CIAN-INIA-SAG. 223pp.
- Armentrout, V. N., A. J. Downer, D. L., Grasmick and A. R. Weinhold. 1987. Factors Affecting Infection Cushion Development by *Rhizoctonia solani* on Cotton. *Phytopathology* 77: 623-630.
- Artículo Internet, 1998. Resumen de Investigación R.s..htm.
- Artículo Internet, 1998. SANINET Pudrición Radicular por *Rhizoctonia*.htm
- Bains, P. S. And V. S. Bisht. 1995. Anastomosis Grups Identity and Virulence of *Rhizoctonia solani* Isolates Collected From Potato Plants in Alberta, Canada. *Plant Dis.* 79:241-242.
- Barksdale, T. H. 1974. Evaluation of Tomato Fruit For Resistance to *Rhizoctonia* Soil Rot. *Plant Dis.* 58, 406-408.
- Baird, R.E. and D. E. Carling. 1995. Frist Report of *Rhizoctonia solani* AG-7 in Indiana. *Plant Dis.* 79:321.
- Baker, K. F. 1970. Types of *Rhizoctonia* Diseases and their Occurrence on: P 125-148 of *Rhizoctonia solani*, Biology and Pathology. Parmeter, JR. J. R. (ed) University of California Press, Berkeley 225pp.
- Baker R. 1971. Analyses Involving Inoculum Density of Soil-Borne Plant Pathogens in Epidemiology. *Phytopathology* 61:1280-1292.
- Burpee L. and B. Martin 1992. Biology of *Rhizoctonia* Species Associated with Turfgrasses. *Plant Dis.* 76: 112-117.

- Baruch, S., Burpee L. and A. Ogoshi. 1991. Identification of *Rhizoctonia* Species. APS PRESS. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. USA. 133pp
- Belmar, S. 1986. The influence of Cropping Systems on *Rhizoctonia solani* and Sheath Blight of Rice. Plant Pathology Seminar.
- Caesar, A. J., N. E. Rees, N. R. Spencer and P. C. JR. Quimbt 1993. Characterization of *Rhizoctonia* spp. Causing Disease of Leafy Spurge in the Northern Plains. Plant Dis. 77: 681-684.
- Castañeda, V.L.R. 1997. Manual de Laboratorio para Micología. U.A.A.A.N. U.L. Torreón, Coah. México pp. 7-17.
- Engelkes, Ch. A. and C.E. Windels. 1998. Pathogenicity of AG-2-2 Cultures of *Rhizoctonia solani* Isolated Fron Legumes and Sugarbeet on Adult Sugarbeet Roots. Artículo Internet..htm. 4pp.
- García, Salinas A. 1994. Interacción Entre Aislamientos De *Rhizoctonia solani* Kühn A La Resistencia a *Mustia Hilachosa* En Genotipos De Frijol Común *Phaseolus vulgaris* L. De Dos Acervos Genéticos Diferentes. Agraria. UAAAN 10 :2110-117.
- Herrera, T. y M. Ulloa. 1990. El Reino De Los Hongos. Micología Básica y Aplicada Universidad Nacional Autónoma de México Cd. Universitaria, 04510 México D.F. Fondo de Cultura Económica SW.A: C.V.
- Hefner J.J. 1968. Screening cotton for Resistance to Damping-Off by *Rhizoctonia solani* Beltwide Cotton Production Research Conferences Proceedings 164-165.
- Huang, J. W. and E. G. Kuhlman.1989. Recovery and Pathogenicity of *Rhizoctonia solani* and Binucleated *Rhizoctonia*-like Fungi in Forest Nurseries. Plant Dis. 73: 968-972.
- Jones, R. K. and B. Belmar. 1989. Characterizatón and Pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. Isolated from Rice, Soybean, and Other Crops Grown in Rotation with Rice in Texas. Plant Dis. 73 : 1004-1010
- Johansen A. D., 1968. Plant Microtechnique McGraw-Hill Book Company New York, 61.
- Julián, M. C., F. Debets and J. Keijer 1996. Independence of Sexual and Vegetative Incompatibility Mechanisms of *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) Anastomosis Grup 1. Phytopathology 86:566-574.

- Ko, W. and F. K.. Hora 1971. A Selective Medium for the Quantitative Determination of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 61:707-710.
- Lee, F. N. 1980. Number, Viability and Buoyancy of *Rhizoctonia solani* Sclerotia in Arkansas Rice Fields. *Plant Dis.* 64:298-300.
- Lewis, J. A. and G. C. Papavizas. 1980. Integrated Control of *Rhizoctonia* Fruit Rot of Cucumber. *Phytopathology* 70:85-89.
- McCoy, R. J. and J. M. Kraft 1984. Comparison of Techniques and Inoculum Sources in Evaluating Peas (*Pisum sativum*) for Resistance to Stem Rot Caused By *Rhizoctonia solani*. *Plant Dis.* 68 : 53-55.
- Mendoza, R. V., Romo Cerda J.J. y Hernández C. F. D. 1995. Efectividad De *Bacillus subtilis* Y Fungibac Sobre *Rhizoctonia solani* Kühn En Papa Bajo Invernadero. *Agraria UAAAN.* 11:120-127.
- Minton, E. B., G. C. Papavizas and J. A. Lewis, 1982. Effect of Fungicide Seed Treatments and Seed Quality on Seedling Diseases and Yield of Cotton. *Plant Dis.* 66:832-835.
- Minton, E. B. and R. H. Garber. 1983. Controlling the Seedling Disease Complex of Cotton. *Plant Dis.* 67:115-118.
- Molinero, R. L. 1995. Relación Densidad de Inóculo-Cantidad de Enfermedad en el Patosistema *Rhizoctonia solani* – *Phaseolus vulgaris*. Artículo Internet.htm.
- Papavizas, G. C., P. B. Adams, R. D. Lumsden, J. A. Lewis, R. L. Dow, W. A. Ayers and J. G. Kantzes. 1975. Ecology and Epidemiology of *Rhizoctonia solani* in Field Soil. *Phytopathology* 65:871-877.
- Poswal, M. 1985. Gene Action and Inheritance of Resistance to *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum* in Cotton Seedlings. *Plant Pathology Seminar.*
- Reynolds, M., A. R. Weinhold and T. J. Morris. 1983. Comparison of Anastomosis Groups of *Rhizoctonia solani* by Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Soluble Proteins. *Phytopathology* 73:903-906.
- Romero, C. S. 1988, Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma de Chapingo. Dirección del Patronato Universitario, A.C. Editor Tress V. L., México.

- Runion, G. B. And W. D. Kelley. 1993. Characterization of Binucleate *Rhizoctonia* Species Causing Foliar Blight of Loblolly Pine. *Plant Dis.* 77:754-755.
- Ogoshi, A. 1975. Studies On The Anastomosis Groups Of *Rhizoctonia solani* Kühn and on their Perfect Stages. *Bull. Natl. Inst. Agric. Ser. C.* 30:1-60.
- Ogoshi, A. 1987. Ecology and Pathogenicity of Anastomosis and Intraspecific Groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25:125-43.
- Snah, B., L. Burpee and A. Ogoshi, 1991, Identification of *Rhizoctonia* Species, APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul, Miennesota. USA. 133pp.
- Vincelli, P. C. and C. M-S. Beaupre. 1989. Comparison of Media for Isolating *Rhizoctonia solani* from Soil. *Plant Dis.* 73 : 1014-1017.
- Walla, W. J. and L. S. Bird. 1914. The Cotton Seedling Disease Complex and its Control. Fact Sheet Texas Agricultural Extension Service. The Texas A&M University System. College Station, Texas.
- Watanabe, B. and A., Matsuda. 1966. Studies On The Grouping Of *Rhizoctonia solani* Kühn Patogenic To Upland Crops. *Bull. App Esp. Plant Dis. Insect Pests* 7:1-131.
- Wiant, J. S. 1929. The *Rhizoctonia* Damping-off of Conifers and its Control by Chemical Treatment of the Soil. N.Y. Agric. Exp. Stn. (Cornell) Mem. 124:1-64.
- Windels E. C. and D. J. Nabben, 1988. Identification of *Rhizoctonia solani* Strains From Diseased Sugarbeet Seedlings and Roots. *Articulo Internet. Identification of Rhizoctonia solani Strains...htm.*
- Windels E. C. and D. J. Nabben, 1998a. Pathogenicity of *Rhizoctonia solani* Strains (Anastomosis Grups) on Sugarbeet Seedlings and Adult Plants. *Articulo Internet...htm.*
- Yang J. and P.D. Kharbanda, 1996, Characterization, Virulence, and Genetic Variation of *Rhizoctonia solani* AG-9 in Alberta. *Plant Dis.* 80:513-518.

CAPITULO IX

APENDICE 1

9.1. Metodología Para La Preparación De APD.

Para la preparación del agar papa dextrosa se siguió la metodología propuesta por la casa comercial Bioxon Becton Dickinson de México, S. A. de C. V.

9.2. Metodología Para La Preparación De APDZ.

Ingredientes:	Cantidad por Lt.
MgSO ₄	0.3 gr
CaC O ₃	0.2 gr
Agar	10 gr
Papa Dextrosa Agar (Comercial)	40 gr
Peptona	2.5 gr
Jugo de Zanahoria Natural	15 ml.
Agua Destilada	1 Lt.
Extracto de Levadura	0.5 gr

Todos los ingredientes se disuelven previamente calentándolos y se procede a esterilizar en autoclave por 30 min. Se vacía en cajas prtri estériles y se almacenan en refrigerador hasta que son utilizadas.

9.3. Metodología Para La Preparación De Medio Arena Harina de Maíz. (Preparación De Inóculo).

Ingredientes:

96 gr de Arena tamizada (2mm)

4 gr de Harina de Maíz (maseca)

20 ml de Agua destilada.

La arena se lava perfectamente con agua destilada, ya seca se tamiza con una malla de 2mm, se coloca en un matraz, se revuelve perfectamente con la harina de maíz y se le agrega el agua; el matraz se tapa perfectamente y se esterilizar en autoclave durante 60 min. Ya estéril se le adiciona agar APDZ, cortada en cuadros menores a 0.5 cm (aproximadamente 3 cm²), en el cual el hongo estaba creciendo. Se deja a temperatura ambiente durante 18 días para que el hongo ocupe todo el medio disponible,