

Variabilidad morfológica, patogénica y susceptibilidad a fungicidas de *Rhizoctonia solani* aislado de rizósfera de *Vitis vinifera* var. *perlette seedless*

Amparo Meza-Moller¹, Martín Esqueda^{1*}, Alfonso Gardea¹
Martín Tiznado¹, Gil Virgen-Calleros²

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Apartado Postal 1735, Hermosillo, Sonora, México, 83000.

²Universidad de Guadalajara. Apartado Postal 129, Zapopan, Jalisco, México, 44100

Morphological variability, pathogenicity and susceptibility to fungicides of *Rhizoctonia solani* isolated from rhizosphere of *Vitis vinifera* var. *perlette seedless*

Abstract: Morphological variability, hyphal anastomosis reactions, pathogenicity and susceptibility to fungicides of *Rhizoctonia solani* isolated from the rhizosphere of ungrafted *Vitis vinifera* var. *perlette seedless* from Sonora, Mexico, were studied. Isolates were obtained using the wet sieving method and culturing in water-agar 2 % in sterile Petri dishes. One hundred and twenty two isolates were morphological characterized by having from 3 to 9 nuclei per cell, hyphal diameter from 3 to 8 μm and colony color from off white to dark brown. Isolates had characteristics of the anastomosis group AG-4 and two vegetative incompatible groups. The 100 % of evaluated isolates caused roots damage with wounds longer than 5 mm and they were susceptible to the evaluated concentrations of tolclofos-metil, tiabendazol and were less sensitive to azoxistrobin. *Rhizoctonia solani* is a potential risk to *Vitis vinifera* var. *perlette seedless* in vineyards of Sonora, Mexico.

Key words: Anastomosis reactions, morphological variability, fungicides.

Resumen: Se estudió la variabilidad morfológica, reacción de anastomosis, patogenicidad y susceptibilidad a fungicidas de *Rhizoctonia solani* aislado de la rizósfera de *Vitis vinifera* var. *perlette seedless* plantada a pie franco en Sonora, México. El hongo se aisló mediante el método de tamizado en húmedo y la siembra en agar-agua 2 %. Se obtuvieron 122 cepas, las cuales presentaron hifas con 3 a 9 núcleos por célula, de 3 a 8 μm de diámetro y de color blanco sucio a moreno oscuro. Los aislamientos correspondieron al grupo anastomótico AG-4 y a dos grupos de incompatibilidad vegetativa. El 100 % de las cepas inoculadas causaron pudrición de raíces con lesiones mayores a 5 mm de longitud y fueron susceptibles a las concentraciones evaluadas de los fungicidas tolclofos-metil, tiabendazol y en menor grado a azoxistrobin. *Rhizoctonia solani* es un patógeno potencial para *Vitis vinifera* var. *perlette seedless* en viñedos de Sonora, México.

Palabras clave: Reacciones de anastomosis, variabilidad morfológica, fungicidas.

Received 13 October 2006; Accepted 30 March 2007.

Recibido 13 de octubre 2006; Aceptado 30 de marzo 2007.

Introducción

Rhizoctonia solani Kühn es un patógeno de distribución cosmopolita nativo del suelo, que afecta a un gran número de hospederos, principalmente cultivos anuales [15]. En la producción de plantas forestales y frutales se presenta como

Autor para correspondencia: Martín Esqueda
esqueda@cascabel.ciad.mx

un problema de vivero y aunque se ha reportado que afecta árboles silvestres y cultivados, aún no se considera un patógeno importante de raíces de plantas maduras [9, 11]. *R. solani* AG-4 provoca daño en raíces de vid desarrolladas en vivero [19]. En las regiones vitícolas de Sonora no se tienen registros al respecto, pero el hongo se ha aislado de plantas maduras con pudrición radicular en viñedos de la región de

Pesqueira, Sonora, México (Ávila-Salazar, *com. pers.*).

Rhizoctonia solani es una especie compleja que comprende cepas con una apariencia altamente variable en cultivos axénicos, así como en el ancho de hifas, morfología de esclerocios, patogenicidad y susceptibilidad a fungicidas [1, 8, 14]. La clasificación de sus aislamientos se basa en la reacción de anastomosis hifal, la cual es una respuesta de incompatibilidad vegetativa entre las cepas confrontadas [3, 4, 5, 7]. Actualmente se consideran cuatro categorías: C0 indica que los aislamientos confrontados pertenecen a diferentes grupos anastomóticos (AG) y carecen de una relación vegetativa; C1, representa una relación distante, que puede ser encontrada dentro de AG altamente heterogéneos; la categoría C2 comprende aislamientos relacionados que corresponden al mismo grupo anastomótico, pero a diferentes poblaciones vegetativamente compatibles; y la categoría C3 incluye una relación muy cercana, las cepas pertenecen al mismo AG y a la misma población vegetativamente compatible, siendo una posibilidad que se trate del mismo individuo [2].

Dada la variabilidad entre aislamientos y grupos anastomóticos de *R. solani* en su patogenicidad, tolerancia a la temperatura y sensibilidad a fungicidas, la implementación de métodos de control exitosos depende de un conocimiento completo del patógeno. Por ello, el objetivo principal de este trabajo fue determinar la variabilidad morfológica, reacción de anastomosis, patogenicidad y susceptibilidad a fungicidas de *Rhizoctonia solani* aislado de la rizósfera de plantas francas de *Vitis vinifera* var. *perlette seedless* en viñedos de Sonora.

Materiales y métodos

Obtención de aislamientos

Se seleccionaron tres viñedos de La Costa de Hermosillo y tres de la región de Pesqueira, municipio de San Miguel de

Horcasitas, Sonora, México. En cada campo se eligieron tres cuadrantes al azar (5 ha/cuadrante) y en cada uno de ellos se realizó un muestreo en zig-zag, tomando muestras de suelo de la rizósfera de 5 plantas en cada punto, con 20 a 30 puntos por cuadrante, a una profundidad de 15 a 30 cm. El suelo se procesó por el método de Weinhold de tamizado en húmedo [20]. Los residuos obtenidos se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo agar-agua 2 % e incubaron a 25 °C por 24 h. El crecimiento micelial se observó al microscopio de luz, seleccionando las puntas de hifas de los individuos con características afines a *Rhizoctonia* y sembrándose nuevamente en agar-agua, bajo las mismas condiciones de temperatura.

Número de núcleos y diámetro de hifas

Se tomaron 4 muestras de 1 cm² de la periferia del crecimiento micelial de cada una de las colonias incubadas a 25 °C por 24 h y se tiñeron con azul de tripano en lactofenol al 0.5 %, observándose al microscopio de luz (400x) un total de 50 hifas por cada cepa. Se midió el diámetro de cada una y determinó el número de núcleos por célula [15].

Características del micelio

Los aislamientos multinucleados se sembraron en medio de cultivo con extracto de levadura-agar-glucosa (mismo que se utilizó para todas las pruebas de caracterización), incubándose a 25 °C. Al llenarse la caja de cultivo con el micelio, se registró el color, apariencia del micelio y presencia de esclerocios. Las cepas se agruparon con base en el color y apariencia micelial y se seleccionó un aislamiento representante de cada grupo con los cuales se realizaron las pruebas posteriores.

Reacción de anastomosis

Todos los aislamientos representantes de grupo se confrontaron entre sí y con aislamientos de grupos control para determinar su reacción de anastomosis. En una caja Petri

con agar-agua al 2 % se colocó, al centro el grupo control, un disco de 8mm, y alrededor de éste la cepa multinucleada en tres discos de 8 mm. Se incubaron a 25 °C por 12 a 18 h hasta formarse una zona de traslape entre las hifas de ambas cepas. Parte de esta zona se colocó en un portaobjetos y se determinó el tipo y número de reacciones de compatibilidad (C0, C1, C2, C3) observada en tres campos visuales (400x) [2, 10, 11]. Para determinar una reacción de anastomosis positiva se consideraron cinco puntos de fusión en cada confrontación o una frecuencia de fusión mayor a 15 % [2, 8, 12]. Los grupos anastomóticos utilizados como control, elegidos considerando las condiciones ambientales de la región y los reportes existentes de los grupos que afectan a frutales fueron: AG1-1C CSKA, AG-6 y AG-4 aislados de plantas de Chile en Sayula, Jalisco.

Compatibilidad vegetativa

Se determinó la compatibilidad vegetativa entre aislamientos de cada grupo con base en la similitud micelial y entre los representantes de éstos y el aislamiento de AG-4. En una caja Petri con medio de cultivo con extracto de levadura-glucosa se colocó al centro el grupo control (un disco de 8 mm) y alrededor de éste la cepa multinucleada (tres discos de 8 mm). Se incubaron a 25 °C por 72 h hasta formarse una zona de traslape entre las colonias de ambas cepas. Los resultados se registraron como: a) aislamientos vegetativamente compatibles, si el traslape de las colonias no presenta una línea divisoria entre los márgenes de cada una; b) incompatibilidad vegetativa débil, si los márgenes de las colonias se observan delimitados; y c) incompatibilidad vegetativa fuerte, si se encuentran en la zona de traslape el crecimiento de hifas aéreas [6].

Patogenicidad en vid

Las cepas a evaluar se desarrollaron en papa-dextrosa-agar durante 3 días. Estacas de vid de la variedad *perlette seedless* se colocaron en perlita húmeda durante 6 semanas para su

enraizamiento. Posteriormente se transplantaron a bolsas de plástico de 15 x 25 cm con arena esterilizada. El hongo se inoculó en el transplante (20 discos de medio de cultivo con el hongo por planta). Las plantas inoculadas se mantuvieron en invernadero y regaron una vez por semana con solución nutritiva (150 mg/kg N, 50 mg/kg P, 100 mg/kg K, 3 mg/kg Fe), durante 5 semanas; transcurrido este período se revisaron las raíces y se determinó el grado de daño con base en la siguiente escala arbitraria: 0 = raíz sana; 1 = daño menor (lesiones < 5 mm); 2 = daño intermedio (lesiones > 5mm); 3 = daño mayor (lesiones grandes, mayoría de tejido muerto) y 4 = todas las raíces muertas [5].

Porcentaje de incidencia

Una vez realizado el ensayo de patogenicidad se tomaron 10 secciones de raíz de 1cm de longitud de cada uno de los tratamientos y repeticiones. Los trozos se lavaron con agua destilada y se desinfectaron en una solución de alcohol al 80 % por 5 min.; después se pasaron a una solución de hipoclorito de sodio al 33 % por 2 min. Se lavaron 3 veces con agua destilada estéril, se secaron y sembraron en cajas Petri con papa dextrosa agar con rosa de bengala y ácido láctico, incubándose a 25 °C por 24 a 48 h. Después del período de incubación se confirmó el crecimiento de *R. solani* en cada uno de los trozos de raíz de cada tratamiento y se registró como porcentaje de incidencia del hongo en el sistema radical.

Sensibilidad a fungicidas

Cada uno de los aislamientos se sembró en cajas Petri con papa dextrosa agar adicionado con fungicida e incubó a 25 °C durante 48 h. Los fungicidas evaluados fueron azoxistrobin (Amistar 25 %, Syngenta México), tiabendazol (Mertec, Arysta LifeScience México) y tolclofos-metil (Rizolex 75 PH, Valent de México), en dosis de 100 mg/kg y se incluyó un tratamiento control sin fungicida. Cada tratamiento consideró tres repeticiones, registrándose dos mediciones

(perpendiculares entre sí) del diámetro del crecimiento micelial a las 48 h después de la incubación, determinando el porcentaje de inhibición de cada tratamiento fungicida con respecto al crecimiento del testigo [17].

Análisis estadístico

Los experimentos de patogenicidad, incidencia del hongo y sensibilidad a fungicidas se realizaron bajo un diseño completamente al azar, aplicando un análisis de varianza y determinando diferencias de medias por medio de la prueba de Tukey ($P=0.95$), empleando el paquete estadístico SAS versión 6.12.

Resultados y discusión

Morfología

En los seis viñedos muestreados se obtuvieron 122 aislamientos de *Rhizoctonia solani* con micelio de color blanco sucio a moreno oscuro, de 3 a 9 núcleos por célula e hifas de 3.1 a 8.8 μm de diámetro. Estas características se determinaron a partir de los nueve grupos conformados con base en la similitud morfológica de los cultivos desarrollados a 25 °C. En las pruebas de crecimiento con temperaturas extremas (10, 35 y 40 °C) se observaron cambios en la apariencia y coloración del micelio (datos no mostrados). En cuatro de los nueve grupos se desarrollaron esclerocios amorfos, moreno oscuro con exudados de color similar, producidos generalmente en el centro de la colonia. Las diferencias observadas en las características morfológicas de los aislamientos, así como la influencia de la temperatura sobre la apariencia de la colonia, concuerdan con los resultados obtenidos por otros autores [12, 16] y corroboran que dichas características no son determinantes para el establecimiento de grupos del complejo *R. solani*.

Reacción de anastomosis

Todas las cepas presentaron autofusión hifal, ratificándose su capacidad de autoanastomosis. Ninguno de los nueve grupos correspondió a AG-1 y AG-6 (reacción de anastomosis C0) y con AG-4 sólo el aislamiento M200 presentó una frecuencia de fusión del 15 % (C3), perteneciendo a dicho grupo anastomótico. En el resto de las colonias se observó frecuentemente una relación distante entre los aislamientos confrontados (Tabla 1).

Para determinar que un aislamiento pertenece a un grupo anastomótico, su frecuencia de fusión hifal debe ser mayor a 15 % con un aislamiento representante de dicho AG [17]. En nuestro estudio sólo la cepa M200 mostró ese porcentaje (Tabla 1). Sin embargo, Carling [2] señaló que para definir la categoría (C0, C1, C2 ó C3) y la reacción de anastomosis entre aislamientos confrontados, se requiere la observación mínima de cinco puntos de reacción característica por categoría. Con estas consideraciones los aislamientos M141, M165 y M200 se definieron como individuos pertenecientes al AG-4. Así mismo con base en el criterio de Carling *et al.* [3], estos aislamientos pertenecen al grupo anastomótico AG-4, ya que todos presentaron más de seis puntos de fusión, quedando en la categoría C1.

Tabla 1. Reacción de anastomosis de aislamientos de *Rhizoctonia solani* obtenidos de la rizósfera de *Vitis vinifera* var. *perlette seedless* confrontados con el grupo anastomótico AG-4

Aislamiento	Categorías de la reacción				Frecuencia de fusión (%)
	C0	C1	C2	C3	
M99	22*	19	2	2	4
M109	23	10	0	0	0
M131	17	11	0	0	0
M141	16	12	4	3	8
M165	18	24	5	3	6
M166	19	13	0	0	0
M189	14	6	0	0	0
M200	11	6	5	4	15
M211	18	10	0	0	0

* Nueve colonias por aislamiento confrontadas.

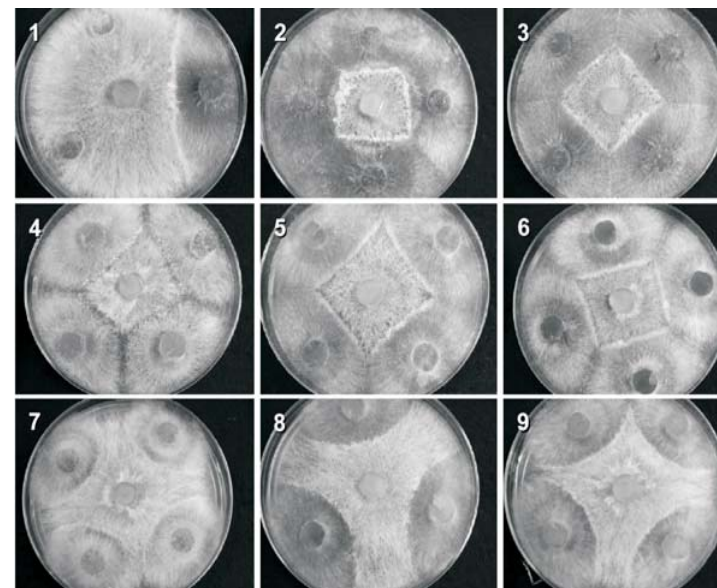
Compatibilidad vegetativa

Los resultados de la anastomosis y la compatibilidad vegetativa no mostraron congruencia, ya que los aislamientos con mayor reacción de anastomosis (C2, C3) tuvieron una incompatibilidad vegetativa fuerte. Esto puede significar que los puntos calificados con reacción C3, realmente correspondían a C2 y por ende, las cepas confrontadas pertenecen al mismo grupo anastomótico pero a distinto grupo de compatibilidad vegetativa. En el caso de AG-4 (Figuras 1-9), cuatro cepas (M109, M131, M189 y M211) mostraron incompatibilidad débil y las cinco restantes una incompatibilidad fuerte, observándose hifas aéreas en la zona de traslape. La reacción de incompatibilidad vegetativa débil, podría indicar una relación más cercana entre las cepas confrontadas y apoyaría la decisión tomada de determinar estas cepas como AG-4 [6, 16].

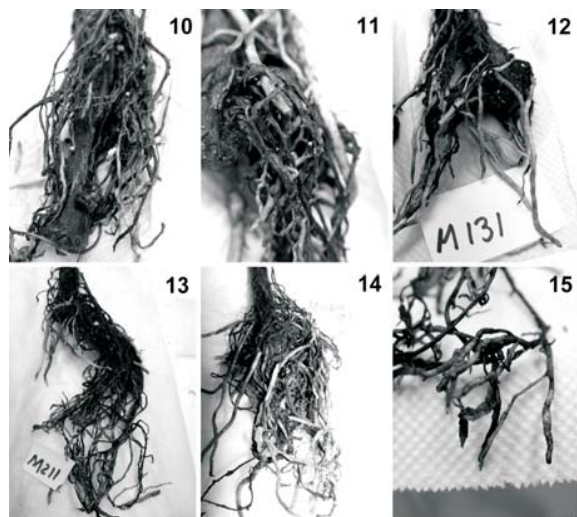
Patogenicidad y porcentaje de incidencia

Con excepción del testigo, en todos los tratamientos las raíces presentaron lesiones de color rojizo oscuro alrededor de las raicillas, ocasionando ahorcamiento de las mismas mientras que otras estaban completamente podridas (Figuras 10-15). Las lesiones se presentaron generalmente en el inicio de las ramificaciones o en la longitud media de las raicillas. El grado de daño fue de 2 y 3 en todos los tratamientos inoculados con *R. solani*. Éste se realizó en todos los tratamientos, con excepción del testigo, con un porcentaje de incidencia del 26 al 80 % en cada tratamiento (Tabla 2), correspondiendo el menor porcentaje a las cepas AG-1.

Con excepción de la cepa M200, todas las demás tuvieron una incidencia mayor al 50 %. Con ello se comprobó la capacidad patogénica de los aislamientos de *R. solani* en vid var. *perlette seedless*, observándose variación en el



Figuras 1-9. Confrontación de cepas de *Rhizoctonia solani* aisladas de la rizósfera de *Vitis vinifera* var. *perlette seedless* vs el grupo anastomótico AG-4. 1. M99, 2. M165, 3. M166, 4. M131, 5. M142, 6. M200, 7. M109, 8. M211, 9. M189.



Figuras 10-15. Raíces de *Vitis vinifera* var. *perlette seedless* inoculadas con *Rhizoctonia solani*. 10. AG-4, 11. AG-1, 12. M131, 13. M165, 14. M211, 15. M142.

porcentaje de incidencia sobre el sistema radical, aunque el grado de daño ocasionado por las distintas cepas fue similar. Esta variabilidad en la frecuencia de recuperación fue reportada por Walker [19] e indica la diferencia en la extensión del daño producido por diversos aislamientos de AG-4.

Tabla 2. Incidencia de *Rhizoctonia solani* en raíces de vides inoculadas

Aislamiento	Incidencia de <i>R. solani</i> (%) *
AG-1	26 b
AG-4	60 ab
M99	74 a
M109	54 ab
M131	62 a
M142	68 a
M165	68 a
M166	58 ab
M189	70 a
M200	46 ab
M211	80 a
Testigo	0 c

* Valores seguidos de igual letra son estadísticamente iguales, Tukey (P>0.05). Promedios de 5 repeticiones.

Sensibilidad a fungicidas

Las cepas de *R. solani* mostraron diferente grado de sensibilidad ante los fungicidas evaluados. Tolclofos-metil y tiabendazol inhibieron en un 100 % el crecimiento de todos los aislamientos, mientras que azoxistrobin fue menos efectivo, causando un porcentaje de inhibición entre 22 y 68

Tabla 3. Inhibición del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* desarrollado en medio de cultivo adicionado con fungicidas

Aislamiento	Inhibición de crecimiento (%) *		
	Azoxistrobin	Tiabendazol	Tolclofos-metil
AG-1	69 a	100 a	100 a
AG-4	54 bc	100	100
M109	42 d	100	100
M131	39 d	100	100
M142	48 cd	100	100
M165	38 d	100	100
M166	62 ab	100	100
M189	26 ef	100	100
M200	37 de	100	100
M211	22 f	100	100

*Valores con igual letra por columna son estadísticamente iguales, Tukey (P>0.05).

(Tabla 3). En general, las cepas M166 y AG-1 fueron las más sensibles. La susceptibilidad mostrada ante tolclofos-metil concordó con el reporte de Virgen-Calleros *et al.* [18]. Aunque azoxistrobin mostró porcentajes de inhibición menores, en campo ha dado mejores resultados y se recomienda para el control de *Rhizoctonia* spp. al igual que tolclofos-metil [13, 18].

Con base en este estudio se establece que *R. solani* forma parte de la rizósfera de *V. vinifera* var. *perlette seedless* en dos de las tres regiones vitícolas más importantes de Sonora, entidad federativa que genera más del 75 % de la producción nacional de uva y este hongo representa un riesgo potencial en los sitios de replante. Así mismo, resulta importante realizar estudios en campo para determinar la patogenicidad sobre cultivos de vid establecidos, prestando particular atención a los diferentes portainjertos utilizados.

Agradecimientos

Al Ing. Ricardo Osuna (CESUES) y M. en C. Alfonso Sánchez (CIAD) por su apoyo en los muestreos de campo e Ing. Ana Cecilia Gallego-López (CESUES) en el ensayo de patogenicidad. Al M. en C. Aldo Gutiérrez (CIAD) por su apoyo logístico.

Literatura citada

- Anderson, N.A., 1982. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. Annual Review of Phytopathology 20: 329-247.
- Carling, D.E., 1996. Grouping in *Rhizoctonia solani* by hyphal anastomosis reaction. In: Sneh, B., S. Jabaji-Hare, S. Neate, G. Dijkstra (eds.), *Rhizoctonia* species: Taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht/Boston/London. pp. 37-47.
- Carling, D.E., R.E. Baird, R.D. Gitaitis, K.A. Brainard, S. Kuninaga, 2002. Characterization of AG-13, a newly reported anastomosis group of *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 92: 893-899.
- Carling, D.E., S. Kuninaga, K.A. Brainard, 2002. Hyphal anastomosis reactions, rDNA-internal transcribed spacer sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-2 (AG-2) and AG-BI. Phytopathology 92: 43-50.
- Carling, D.E., R.H. Leiner, 1990. Effect of temperature on virulence of *Rhizoctonia solani* and other *Rhizoctonia* on potato. Phytopathology 80: 930-934.
- Ceresini, P.C., H.D. Shew, R.J. Vilgalys, M.A. Cubeta, 2002. Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* AG-3 from potato and tobacco in North Carolina. Mycologia 94: 437-449.
- Cubeta, M.A., R. Vilgalys, 1997. Population biology of the *Rhizoctonia solani* complex. Phytopathology 87: 480-484.
- Elias-Medina, R., F. Ponce-González, S. Romero-Cova, 1997. Grupos anastomóticos de *Rhizoctonia solani* Kühn que atacan papa, frijol y haba en cuatro municipios del Estado de México y Chile en San Luis Potosí. Revista Mexicana de Micología 13: 33-40.
- Hietala, A.M., R. Sen, 1996. *Rhizoctonia* associated with forest trees. In: Sneh, B., S. Jabaji-Hare, S. Neate, G. Dijkstra (eds.), *Rhizoctonia* species: Taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht/Boston/London. pp. 351-358.
- Martin, F.N., 2000. *Rhizoctonia* spp. recovered from strawberry roots in Central Coastal California. Phytopathology 90: 345-353.
- Mazzola, M., 1997. Identification and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. isolated from apple roots and orchard soils. Phytopathology 87: 582-587.
- Meyer, L., F.C. Wehner, L.H. Nel, D.E. Carling, 1998. Characterization of the crater disease strain of *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 88: 366-371.
- Kiewnick, S., B.J. Jacobsen, A. Braun-Kiewnick, J.L.A. Eckhoff, J.W. Bergman, 2001. Integrated control of *Rhizoctonia* crown and root rot of sugar beet with fungicides and antagonistic bacteria. Plant Disease 85: 718-722.
- Ogoshi, A., 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. Annual Review of Phytopathology 25: 125-143.
- Sneh, B., L. Burpee, A. Ogoshi, 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. APS Press, St. Paul, Minnesota. 133 p.
- Stevens, J.J., R.K. Jones, 2001. Differentiation of three homogeneous groups of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 4 by analysis of fatty acids. Phytopathology 91: 821-830.
- Virgen-Calleros, G., 2003. Variabilidad genética de *Rhizoctonia solani* en papa y su importancia en el manejo químico y biológico. Tesis de Doctorado, CINVESTAV, Irapuato, Guanajuato, México.
- Virgen-Calleros, G., V. Olalde-Portugal, D.E. Carling, 2000. Anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* on potato in Central México and potential for biological and chemical control. American Journal of Potato Research 77: 219-224.
- Walker, G.E., 1997. Effects of *Meloidogyne* spp. and *Rhizoctonia solani* on the growth of grapevine rootings. Journal of Nematology 29: 190-198.
- Weinhold, A.R., 1977. Population of *Rhizoctonia solani* in agricultural soils determined by a screening procedure. Phytopathology 67: 566-569.