

# IDENTIFICACION DE GRUPOS DE ANASTOMOSIS DE CEPAS DE *Rhizoctonia solani* Kühn AISLADAS DE TOMATES EN LA V REGION DE CHILE \*

*(Rhizoctonia solani* Kühn anastomosis groups identification of strains isolated from tomato crops at the V Region of Chile)

Jaime Montealegre<sup>1</sup>;  
Rodrigo Reyes<sup>1</sup>; Ximena Besoain<sup>2</sup>;  
Luz M. Pérez<sup>3</sup> & Rodrigo Herrera<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Casilla 1004, Santiago, Chile. E-mail: jmonteal@uchile.cl

<sup>2</sup> Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía, Quillota, Chile.

<sup>3</sup> Universidad Andrés Bello, Facultad de Ciencias de la Salud, Santiago, Chile.

(\*Financiado por Proyecto FONDECYT N° 1990785-99)

**Palabras clave:** *Lycopersicon esculentum*, *Rhizoctonia solani*, grupos de anastomosis, efecto de la temperatura, pH, salinidad

**Key words:** *Lycopersicon esculentum*, *Rhizoctonia solani*, anastomosis group, effect of temperature, pH, salinity.

## RESUMEN

Una de las enfermedades que ataca al tomate (*Lycopersicon esculentum*) en la V Región de Chile es *Rhizoctonia solani*, desconociéndose a la fecha los grupos de anastomosis presentes en esta zona; por tal motivo, se estudiaron cepas del hongo obtenidas a partir de plantas enfermas. En las cepas estudiadas, se determinó la presencia de los grupos de anastomosis GA-4 y GA-2-1, ubicándose cuatro en el grupo de anastomosis 4. Todas las cepas fueron virulentas, siendo la más agresiva la cepa 618 perteneciente al GA-4 y la menos agresiva la 509 V perteneciente al GA-2-1. También se estudió el efecto de la temperatura, pH y salinidad en las cepas de los dos grupos identificados. Las cepas del GA-4 crecieron mejor a una temperatura de 22°C con un pH entre 5 y 7 y con una salinidad cercana a 0 mM de NaCl, mientras que las GA-2-1 crecieron mejor a 20 °C con pH 7,0 y salinidad de 50 mM.

## INTRODUCCION

En Chile, el tomate (*Lycopersicon esculentum* M.) es la hortaliza más importante en cuanto a superficie y a consumo, tanto al estado fresco como procesado (Escaff, 1993). Del total de hectáreas cultivadas, 1073,4 corresponden a cultivos de tomate bajo invernadero frío

## ABSTRACT

*Rhizoctonia solani* is a pathogen that can be found attacking tomato (*Lycopersicon esculentum* M.) plants in the V Region of Chile. However there is no information about the existing anastomosis groups and their characteristics in this zone; for this reason some strains collected from diseased plants were examined. The presence of anastomosis groups AG-4 and AG-2-1 was determined in the strains under study, 4 of them prevailing in the anastomosis group 4. All the strains were virulent, being strains 618 from AG-4 the most aggressive and strain 509V from AG-2-1 the least aggressive. Besides the effect of temperature, pH and salinity on the strains of the 2 identified group was studied, strains from AG-4 showed a better growth at 22 °C with a 5-7 pH and a salinity level reaching as far as NaCl 0mM, whereas AG-2-1 grew better at 20 °C, 7pH and 50 mM salinity.

(INE, 2001), que se ubican especialmente en las comunas de Quillota, La Calera y Limache.

La producción de tomates para consumo fresco en Chile no ha estado ajena a problemas fitopatológicos generados por las condiciones de monocultivo, lo cual ha originado importantes mermas en los rendimientos (CORFO, 1990).

Una de las enfermedades que afecta al cultivo del tomate en la V Región, es causada por *Rhizoctonia solani* Kühn, hongo habitante del suelo que presenta una amplia gama de hospederos, y es capaz de dañar las raíces, cuello y frutos que estén en contacto o cerca del suelo, causando bajas significativas en la producción (Mármol, 1991). En la V Región generalmente causa caída de plántulas en los cultivos que se efectúan en el período otoño-invierno, pero también puede ocasionar canchros en la base de las plantas de tomate.

La forma de clasificar las cepas de *R. solani* que atacan a diversos cultivos, consiste en reunir las según sus características en grupos de anastomosis (GA) (Vilgalys & Cubeta, 1994), es decir, aquellos aislados pertenecientes al mismo GA, sus hifas sufren una fusión celular produciéndose vacuolización y muerte de las células cercanas; este fenómeno se conoce con el nombre de "reacción de muerte" (Carling et al., 1988).

En Chile se desconocen los GA de cepas de *R. solani* patógenas en el cultivo del tomate, por tal razón el objetivo de esta investigación fue determinar sus grupos de anastomosis (GA), grado de virulencia y características más importantes en cuanto a efectos de la temperatura, pH y salinidad, en cepas aisladas de cultivos de tomate bajo invernaderos fríos en la V Región.

## MATERIALES Y METODOS

### Identificación de los grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani*

La investigación se desarrolló en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile. Las diferentes cepas de *R. solani* fueron obtenidas de plantas enfermas de tomate cultivados en invernaderos fríos de la V Región, que presentaban síntomas de canchrosis en la base del tallo o que manifestaban caída de plántulas; éstas se aislaron en agar papa-dextrosa (APD) (Sneh et al. (1996).

Una vez obtenidos los cultivos puros, se efectuaron microcultivos sobre un porta objetos recubierto con agar agua (pH 8,5), confrontando a 3 cm de distancia, un aislado del grupo de anastomosis (GA) conocido, con el aislado de la cepa de *R. solani* a identificar (Sneh et al., 1996). Se utilizaron 12 grupos de anastomosis conocidos proporcionados por el Dr. Mark Mazzola (USDA-ARS, Tree Fruit Res. Sta. Wenatchee, USA).

Una vez que los aislados entraron en contacto (aproximadamente 24 horas después) se tiñó esta zona con safranina y se enjuagó el exceso de colorante con KOH al 3%. Luego se procedió a observar al microscopio óptico la ocurrencia de anastomosis. Además, se confrontaron los aislados en placas de Petri con medio

APD para realizar una observación directa de la zona de contacto, para verificar la existencia de una zona clara en el margen de las colonias que corresponde a la vacuolización y muerte de células de la parte cercana a la zona de unión (Ogoshi, 1987).

También se determinó la virulencia de las diferentes cepas de *R. solani* ya identificadas con su grupo de anastomosis. Para esto se procedió a sembrar, con las distintas cepas del hongo, semillas de avena previamente esterilizadas, estas se dejaron crecer a 22°C por 3 semanas (Pumarino, 1995). Posteriormente, se procedió a depositar este inóculo en la zona del cuello de plántulas de tomate en maceteros de la variedad susceptible Alondra, al estado de 3 hojas verdaderas, las que se hicieron crecer en invernadero a una temperatura de 18°C con 12 horas de fotoperiodo.

Posteriormente, mediante la observación directa de las lesiones en la zona del cuello, se evaluó el grado de virulencia a los 30 días del trasplante, utilizándose para tal efecto una escala relativa de 0 a 10 considerando el porcentaje del perímetro del tallo dañado.

0: sin daño	
1: 0,1 a 10%	6: 50,1 a 60%
2: 10,1 a 20%	7: 60,1 a 70%
3: 20,1 a 30%	8: 70,1 a 80%
4: 30,1 a 40%	9: 80,1 a 90%
5: 40,1 a 50%	10: muerte de plántulas

Las pruebas de virulencia de las distintas cepas de *R. solani*, se realizaron en cuatro plantas, considerándose también plantas testigo.

Para determinar el efecto de la temperatura sobre las diferentes cepas, estas se expusieron a 10, 15, 20, 22, 28 y 37 °C en APD.

El efecto del pH se determinó ajustando éste en el medio APD a 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 y, en el caso de la salinidad, las cepas se hicieron crecer en el mismo medio a concentraciones de 0, 50, 100, 150, 200 y 250 mM de NaCl.

Se evaluó el crecimiento radial de las diferentes cepas en medio de cultivo APD a las 48 h de incubación a 22°C. Se realizaron 4 repeticiones para cada uno de los factores evaluados en las diferentes cepas de *R. solani* (554, 617, 618, 644 y 509V). Los resultados fueron analizados mediante ANDEVA y la Prueba de Rango Múltiple de Duncan.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Grupos de Anastomosis

Los resultados de los grupos de anastomosis (GA) identificados se presentan en la Tabla I, se observó que

Tabla 1.- Virulencia de *Rhizoctonia solani* sobre plantas de tomate var. Alondra.

<i>R. solani</i> Cepa N°	Nivel de daño	GA
618	8,75 <sup>1/</sup>	4
554	6,75	4
617	4,25	4
509 V	2,75	2-1

1/. Escala relativa (0-10)

las cepas 554, 617, 618, correspondieron al GA-4, con excepción de la 509 V que correspondió al GA-2-1.

Como se indicó en Materiales y Métodos, todas las cepas estudiadas fueron aisladas de plantas de tomate enfermas, llamando la atención la identificación de la cepa 509 V que correspondió al GA-2-1. Este grupo, según Sneh *et al.* (1996), está reportado sólo en coliflor (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.), espinaca (*Spinacea*

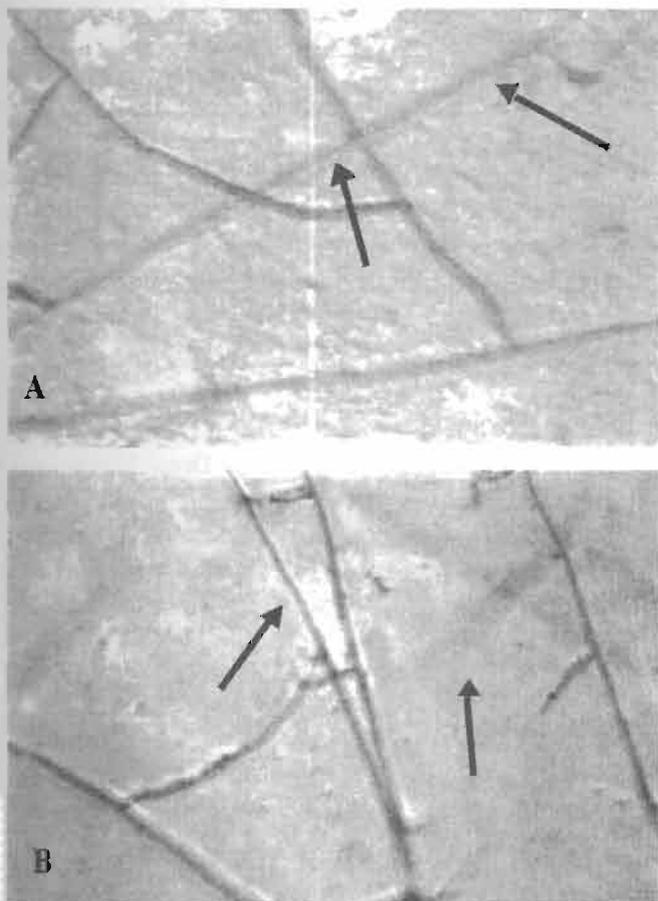


Figura 1.- Determinación de GA de *R. solani*: 1A. Anastomosis de hifas de aislamientos pertenecientes al GA-4. 1B. Anastomosis de hifas de aislamientos pertenecientes al GA-2-1. Flechas indican el sentido de crecimiento de las hifas.

*oleracea* L.), papa (*Solanum tuberosum* L.) y raps (*Brassica napus* var. *napus* L.) y no en tomate, no así el GA-4 que ataca a una amplia gama de cultivos.

Los representantes del GA-4 se caracterizan por ser de climas más calurosos que GA-2-1: por otro lado este grupo también se caracteriza por producir daño en la zona del cuello de las plantas, afectando más a plantas adultas, mientras que el GA-2-1 lo hace en plántulas y plantas adultas, siendo responsable de caída de plántulas y pudrición de raíces en raps (Sneh *et al.*, 1996).

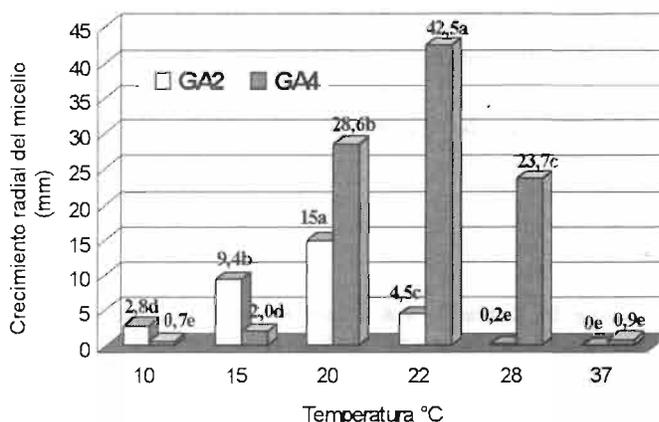
En la Figura 1 se muestran observaciones microscópicas de algunas de las pruebas de determinación de los grupos de anastomosis.

### Pruebas de Virulencia

En la tabla 1 se presentan los resultados de virulencia de las cepas, siendo la más virulenta la cepa 618 perteneciente al GA-4, y la menos la cepa 509 V perteneciente al GA-2-1, lo cual probablemente esta relacionado con que este GA, esta reportado a nivel mundial atacando a otras especies de plantas (espinaca, coliflor, papas y raps) y no al tomate. El que se haya aislado de tomate en la V Región podría significar que no sea su hospedero principal, sino alguna de las otras hortalizas indicadas, las cuales se cultivan en forma intensiva en esta zona (con excepción del raps).

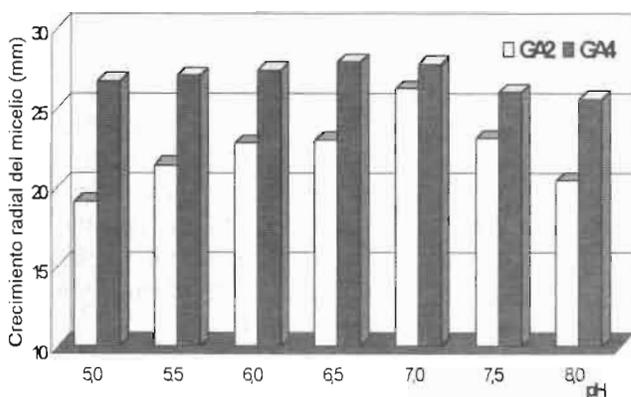
### Efecto de la temperatura, pH y salinidad

Los resultados de los efectos de la temperatura sobre el promedio de crecimiento de las cepas GA-4 y GA-2-1, indicaron que las cepas GA-4 se desarrollan a medida que aumenta la temperatura, observándose un pico

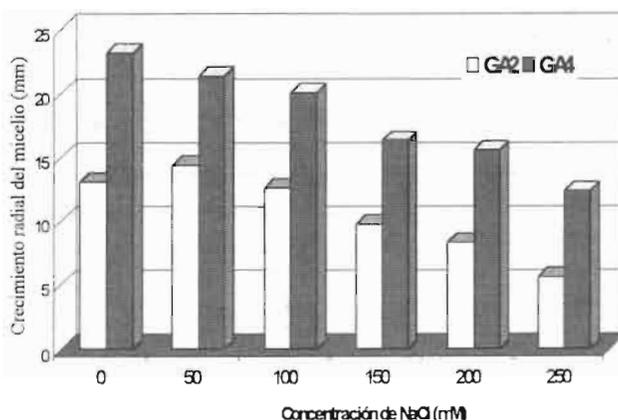


Letras iguales significa que no existen diferencias estadísticas significativas según la prueba de Rango Múltiple de Duncan.

Figura 2.- Efecto de la t° en el crecimiento radial del micelio de los GA-4 y GA-2-1 de *R. solani*.



**Figura 3.- Efecto de distintos pH sobre el crecimiento radial del micelio de los GA-4 y GA-2-1 de *R. solani* (GA = Grupo de anastomosis)**



**Figura 4. Efecto de la salinidad sobre el crecimiento radial del micelio de los GA-4 y GA-2-1 de *R. solani*.**

a 22 °C, mientras que la GA-2-1 alcanza un máximo a los 20 °C (Figura 2). Estos antecedentes concuerdan con lo señalado por Sneh *et al.* (1996), quienes indican que los GA-4 son de zonas más cálidas que los GA-2-1.

Respecto al pH, las cepas GA-4 se desarrollaron mejor entre 5,0 y 7,0 mientras que GA2-1 creció mejor a 7,0 (Figura 3); estos pH son levemente más altos que los encontrados en los suelos de la V Región desde donde fueron aisladas. Con excepción del pH 7 y 7,5, en los restantes se observó diferencias significativas entre los crecimientos de las cepas GA-4 y GA-2-1.

En relación al efecto de diferentes concentraciones de NaCl sobre los GA, el GA-4 fue afectado por la salinidad, creciendo mejor a 0 mM de NaCl. En el caso del GA2-1 este creció mejor a 50 mM de NaCl. Hasta 150 mM, hubo diferencias significativas de crecimiento entre ambas cepas, sin embargo, las concentraciones evaluadas (0-250 mM) no pudieron inhibir el crecimiento de ambos GA (Figura 4). Es decir, la salinidad no parece ser un factor que inhiba el desarrollo de ambos grupos de anastomosis de *R. solani*, pudiéndose desarrollar tanto en suelos con bajo como con alto contenido de sales.

## CONCLUSIONES

De las cinco cepas patógenas de *R. solani* estudiadas en tomates cultivados en la V Región, cuatro correspondieron al GA-4 y una al GA-2-1.

Todas las cepas de *R. solani* fueron virulentas en plantas de tomate, siendo la más agresiva la cepa 618 (GA-4) y la menos agresiva la cepa 509V (GA-2-1).

Las cepas GA-4 se desarrollaron mejor a 22 °C mientras que la cepa GA-2-1 lo hizo a 20°C.

La cepa GA-2-1 se desarrolló mejor a pH 7,0 mientras que las GA-4 lo hicieron entre pH 5,0 y 7,0.

La cepa GA-2-1 toleró mejor la salinidad que las cepas GA-4, sin embargo las concentraciones de salinidad estudiadas (0-250 mM) no fueron inhibitorias para el desarrollo de las cepas de *R. solani*.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los Dres. Nilton Luis de Souza, de la Universidad de Sao Paulo – Brasil, por la confirmación de la identificación de los grupos de anastomosis, y al Dr. Mark Mazzola del USDA-ARS, Tree Fruit Res. Sta. Wenatchee, USA, por facilitar las cepas de los diferentes grupos de anastomosis.

## REFERENCIAS

Carling, D.; Kuninaga, S. & Leiner, R. (1988). Relatedness within and among intraspecific groups of *Rhizoctonia solani*: A comparison of grouping by anastomosis and by DNA hybridization. *Phytoparasitica* 16:209-210

CORFO. (1990). Enfermedades del tomate en invernadero frío. Valparaíso, Chile.

Escaff, M. (1993). Variedades de tomate para cultivo en invernadero con producción de hortalizas protegidas bajo plástico. Curso Internacional INIA La Platina N° 5. Cap. 4: 1-29

INE. (2001). VI Censo agropecuario. Disponible en: [http://www.ine.cl/censo\\_agrop/601.htm](http://www.ine.cl/censo_agrop/601.htm) 18/06/2001

Mármol, J. (1991). Enfermedades de hortalizas en invernaderos. Servicios de Extensión Agraria. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España.

Ogoshi, A. (1987). Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Annu. Rev. Phytopathol.* 25: 125-143

**Pumarino, A.** (1995). Evaluación *in vitro* del control biológico de la fusariosis del frejol. Memoria de Título Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Fac. Cs. Agrarias y Forestales. Santiago, Chile.

**Sneh, B.; Lee, B. & Akira, O.** (1991). Identification of *Rhizoctonia* Species. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, U.S.A.

**Sneh, B.; Jabaji-Hare, S.; Neate, S.; Dijst, G.** (1996). *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

**Vilgalys, R. & Cubeta, M.** (1994). Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia*. Annu. Rev. Phytopathol. 32: 135-145