UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
INSTITUTO DE PRODUCCION Y SANIDAD VEGETAL

Caracterización de *Rhizoctonia solani* Kühn a partir de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) provenientes de diferentes predios de la Décima Región de Chile

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Licenciado en Agronomía

Carolina Lorena Giovannini Campos

VALDIVIA-CHILE

2004

PROFESOR PATROCINANTE:

Nancy Andrade S. _____

Ing. Agr., M. Sc.

PROFESORES INFORMANTES:

Andrés Contreras M. _____

Ing. Agr.

Eduardo Valenzuela F. _____

Lic. Cs. Biol., M. Sc.

Dr. Sc.

INSTITUTO DE PRODUCCION Y SANIDAD VEGETAL

A mis Padres,

Javier, Giannina y Fernando.

Investigación financiada por Proyecto Fondo SAG 24-10-100
“ Diseño de una Estrategia de Control Integrado Orientada a Incrementar la Calidad Fitosanitaria del Cultivo de la Papa en la Región Sur de Chile”

AGRADECIMIENTOS

A la Profesora Nancy Andrade S., por su ayuda, aportes y valiosas sugerencias durante el desarrollo de este trabajo, por toda la confianza depositada en mi y por la paciencia durante todo este tiempo. De igual manera, quiero agradecer a mis profesores informantes, Don Andrés Contreras M. y Don Eduardo Valenzuela F., por sus valiosos aportes y correcciones.

Agradezco el gran aporte inicial de la Sra. Susana González (†), por su ayuda y dedicación durante la primera etapa de este trabajo. A todo el personal del Laboratorio de Fitopatología, Señorita Hortensia Cárcamo, Don Ramón Alarcón, Sylvia Barrera y quienes forman parte del Proyecto Fondo SAG 24-10-100, Judith Carrasco y Julie Valdés, por la excelente disposición, colaboración y apoyo que me brindaron en todo momento.

A mis padres Juan y Eliana, por todo el apoyo que me han brindado siempre, ya que a ellos les debo la vida y lo que he logrado hasta ahora y a ellos les dedico este logro tan importante en la vida. A Javier y Giannina que me ayudaron en varios detalles y me entregaron siempre su cariño y amistad. Quiero agradecer de igual manera a Fernando, por estar conmigo y apoyarme en los momentos difíciles y sobre todo por todo el amor incondicional y comprensión que me ha entregado siempre.

Quiero agradecer a Ingrid Castro por su colaboración, sugerencias, discusiones y simplemente por su amistad, del mismo modo a todos los compañeros y amigos que de una u otra forma me entregaron su apoyo y amistad durante la realización de este trabajo, Cristian Vásquez, Patricia Navarro, Jaime Huaquín, Shirley Schwaner, Claudia Rodriguez, Solange Faulbaum, Jaime Miño, Carola Villalobos y Carolina Fuenzalida, entre otros.

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCION	1
2	REVISION BIBLIOGRAFICA	3
2.1	El cultivo de la papa	3
2.2	Factores que afectan al cultivo de la papa	4
2.2.1	Agentes fitopatógenos	4
2.2.1.1	El género *Rhizoctonia*	4
2.2.1.2	*Rhizoctonia solani* Kühn	6
2.2.1.2.1	Características de *R. solani*	6
2.2.1.2.1.1	Características del micelio	7
2.2.1.2.1.2	Número de núcleos por célula	8
2.2.1.2.1.3	Células monilioides	8
2.2.1.3	“Rizoctoniasis” y “Costra negra”	9
2.2.1.4	El telomorfo: *Tanatephorus cucumeris*	12
2.2.1.5	Agrupamiento de *R. solani*	13
2.2.1.5.1	Anastomosis	13
2.2.1.5.2	Mecanismos de fusión de hifas	14
2.2.1.5.3	Grupos de Anastomosis	16
2.2.1.5.4	Subgrupos de *R. solani*	16
2.2.1.6	Ecología y epidemiología	18
2.2.1.7	Ciclo de la enfermedad	19
2.2.1.7.1	Sobrevivencia y desarrollo de *R. solani*	19
2.2.1.7.2	Colonización e infección	21

Capítulo		Página
2.2.1.7.3	Penetración e invasión de los tejidos	22
2.2.1.8	Patogenicidad de *R. solani*	24
2.2.1.9	Genética de *R. solani*	25
2.2.1.10	Control	25
3	MATERIAL Y METODO	27
3.1	Materiales	27
3.1.1	Material biológico	27
3.1.2	Material e instrumental de laboratorio	27
3.1.3	Reactivos	28
3.1.4	Medios de cultivo	28
3.2	Método	28
3.2.1	Obtención de los aislamientos	28
3.2.1.1	Selección de las muestras	28
3.2.1.2	Desinfección de los tubérculos	31
3.2.1.3	Obtención de cultivos puros	31
3.2.2	Parámetros evaluados	34
3.2.2.1	Caracterización morfológica de los aislamientos	34
3.2.2.1.1	Tipo de crecimiento en medio de cultivo	34
3.2.2.1.2	Características de las hifas	34
3.2.2.1.3	Diámetro de las hifas	34
3.2.2.1.4	Células multinucleadas	35
3.2.2.2	Determinación de patogenicidad	35
3.2.2.2.1	Obtención del inóculo	35
3.2.2.2.2	Inoculación de los esquejes	36
3.2.3	Análisis de los resultados	38

Capítulo		Página
4	PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS	40
4.1	Aislamiento y obtención de cultivos puros	40
4.2	Caracterización morfológica de los aislamientos	42
4.2.1	Características miceliales	43
4.2.2	Diámetro de hifas	44
4.2.3	Células multinucleadas	44
4.2.4	Células monilioides	45
4.2.5	Tipo de crecimiento	46
4.2.5.1	Crecimiento tipo 1	47
4.2.5.2	Crecimiento tipo 2	49
4.2.5.3	Crecimiento tipo 3	51
4.2.5.4	Crecimiento tipo 4	52
4.3	Pruebas de patogenicidad *in vitro*	58
4.3.1	Grados de patogenicidad	60
4.3.2	Desarrollo de la enfermedad y sintomatología	68
4.3.3	Variabilidad de patogenicidad	75
4.3.3.1	Aislamientos patogénicos	78
4.3.3.2	AG 3	79
4.3.3.3	Aislamientos no patogénicos	79
4.3.3.4	Testigo	83
5	CONCLUSIONES	87
6	RESUMEN	88
	SUMMARY	90

Capítulo		Página
7	BIBLIOGRAFIA	92
	ANEXOS	110

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Reacciones de Anastomosis descritas para *R. solani*	15
2	Grupos de anastomosis (AG) descritos para *R. solani*, hospederos y enfermedad	17
3	Número de predio, agricultor, localidad y cultivar a partir de los cuales fueron obtenidos los tubérculos	29
	Escala de evaluación para el grado de necrosis	38
5	Número de tubérculos analizados y esclerocios aislados por predio	42
6	Porcentaje de aislamientos que presentaron las características que determinan a la especie *R. solani*	43
7	Características de los tipos de crecimientos	47
8	Número y porcentaje de cepas de *R. solani* caracterizadas para cada tipo de crecimiento	55
9	Tipos de crecimiento caracterizados en los distintos predios	56
10	Resumen de aislamientos para cada grado de daño	60
11	Porcentaje de aislamientos patogénicos y no patogénicos obtenidos en cada predio	62

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ubicación geográfica de los predios a partir de los cuales se obtuvieron los aislamientos de *R. solani*.	30
2	Representación esquemática del procedimiento para la obtención de cultivos puros de *R. solani*	33
3	Representación esquemática del procedimiento para la inoculación de esquejes	37
4	Grados de necrosis producidos por los aislamientos	39
5	Características miceliales de *R. solani*	44
6	Células multinucleadas de *R. solani*	45
7	Células monilioides de *R. solani*	46
8	Crecimiento tipo 1 en medio de cultivo APD	48
9	Formación de esclerocios en crecimiento tipo 1	49
10	Crecimiento tipo 2 en medio de cultivo APD	50
11	Formación de esclerocios en crecimiento tipo 2	50

Figura		Página
12	Crecimiento tipo 3 en medio de cultivo APD	51
13	Crecimiento tipo 4 en medio de cultivo APD	52
14	Formación de esclerocios en crecimiento tipo 4.	53
15	Anillos concéntricos formados por algunos aislamientos de *R. solani* en medio de cultivo APD	54
16	Número de aislamientos patogénicos y no patogénicos del total de aislamientos evaluados	61
17	Porcentaje de aislamientos patogénicos y no patogénicos obtenidos por predio	63
18	Necrosis grado 1	66
19	Necrosis grado 2	66
20	Necrosis grado 3	67
21	Necrosis grado 4	68
22	Crecimiento de micelio sobre el tejido del esqueje	68
23	Necrosis alrededor del punto de inoculación	69
24	Abundante crecimiento de micelio sobre el tejido del esqueje	70
25	Formación de esclerocios sobre el tejido afectado	70

Figura		Página
26	Necrosis grado 0	80
27	a) Testigo inoculado con APD estéril, b) Herida en el punto de inoculación	83
28	Distribución geográfica de los tipos de crecimiento y grados de patogenicidad de los aislamientos	85

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Preparación de medios de cultivo y tinciones.	111
2	Caracterización morfológica de los aislamientos provenientes de cada predio.	112
3	Grado de patogenicidad para cada uno de los aislamientos evaluados por predio.	113
4	Determinación de patogenicidad para los aislamientos evaluados.	119

1 INTRODUCCION

En Chile, el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) es afectado por numerosas enfermedades que reducen el rendimiento y la calidad de la producción. Una de gran importancia y distribución mundial es causada por *Rhizoctonia solani* Kühn, que afecta todos los estados fenológicos de la planta, causando pudrición de raíces y cancro de tallo en plantas jóvenes o adultas. Este patógeno causa, además graves problemas en el establecimiento de plantas de vivero, como hortalizas, flores, gramíneas, árboles y arbustos.

En plantas de papa, esta enfermedad puede afectar yemas, brotes, tallos, raíces y estolones, produciendo lesiones necróticas de color café oscuro, caída de plántulas y cancros en tallos que interfieren con el transporte a través del floema y xilema. Además, en tubérculos se producen esclerocios del hongo, casposidades sobre la piel y deformaciones.

Esta especie se divide en grupos por la anastomosis que ocurre entre sus hifas, pero además se diferencian morfológica, fisiológica y serológicamente, por su rango de hospederos, distribución en la naturaleza y variación de patogenicidad entre aislamientos.

Se han reportado cerca de 13 grupos de anastomosis en todo el mundo, atacando a diferentes cultivos y se han encontrado patogénicos a papa AG 2, AG 3, AG 4, AG 5, AG7 y AG 8, pero en Chile sólo se sabe de la ocurrencia de AG 3 y AG 4.

En este cultivo, *R. solani* existe en tres fases distintas, una parasítica, que corresponde a micelio del hongo sobre la planta de papa, y otras dos fases no patogénicas.

La etapa sexual de este hongo, que se desarrolla en la base de los tallos de las plantas sin causar enfermedad y los esclerocios presentes sobre la piel de los tubérculos, corresponden a las dos fases no patogénicas, constituyendo esta última, una fuente de inóculo para la planta que se desarrollará a partir del tubérculo infectado.

Se ha demostrado que el inóculo en forma de esclerocios y micelio son la principal causa de fallas en la emergencia y que el uso de tubérculos infectados incrementa las poblaciones de *R. solani* en el suelo. En base a la información a cerca de la biología, ecología y epidemiología de este patógeno, se plantea la hipótesis de que todos los esclerocios desarrollados sobre la superficie de los tubérculos presentan las características de *R. solani*, pero no todos ellos son capaces de producir la sintomatología de la enfermedad y en consecuencia no son patogénicos al cultivo.

El objetivo general de esta investigación consistió en la caracterización de aislamientos de *R. solani* a partir de esclerocios obtenidos de tubérculo semillas provenientes de diferentes predios ubicados en la Décima Región.

Dentro de los objetivos específicos, los aislamientos se caracterizaron morfológicamente de acuerdo al tipo de crecimiento en medio de cultivo, además de los parámetros descritos por PARMETER y WHITNEY (1970), para esta especie que se señalan a continuación:

- Ramificación del micelio en ángulo recto cerca del septo distal de las células de la hifa
- Constricción de la ramificación en el punto de origen
- Formación de un septo cercano al punto de ramificación
- Presencia de células multinucleadas
- Diámetro de las hifas adultas superior a 6 µm.

Además, se determinó el grado de patogenicidad de los aislamientos provenientes de esclerocios.

2 REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 El cultivo de la papa.

El cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L) es el cuarto en orden de importancia en la alimentación humana mundial después del arroz (*Oryza sativa* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.) y maíz (*Zea mays* L.) (CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA, CIP, 2004).

Según FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, FAO (2004), el año 2003 la producción mundial de papas alcanzó 310 millones de toneladas, con una superficie de 19 millones de hectáreas y un rendimiento de 16,4 toneladas. CIP (2004) agrega que más de un tercio de las exportaciones mundiales provienen de países en desarrollo.

Según el VI Censo Nacional Agropecuario, en la temporada 1996/1997, la producción nacional alcanzó 1,3 millones de toneladas en una superficie de 80.685 hectáreas, con un rendimiento promedio de 161,7 quintales métricos por hectárea (CHILE, OFICINA DE ESTUDIOS Y POLÍTICAS AGRARIAS, ODEPA, 2004).

La papa se cultiva en todo Chile, concentrándose la producción comercial en la zona centro norte, centro y zona sur (CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE ESTADISTICAS, INE, 2004). La mayor producción proviene de la zona sur, principalmente de las Regiones IX y X, con 332 y 493 mil toneladas respectivamente para la temporada 1996/1997 (ODEPA, 2004). En Chile, las papas se producen principalmente para consumo interno, pero las exportaciones a Brasil y Bolivia están aumentando, por lo que existe un gran potencial para abrir nuevos mercados en Sudamérica y otros continentes (CHILE, SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO, SAG, 2000).

2.2 Factores que afectan al cultivo de la papa.

Para ROWE (1993), el cultivo de la papa puede estar limitado por factores ambientales, malezas, plagas, nemátodos fitoparásitos y enfermedades, siendo los problemas fitosanitarios, una de las grandes limitantes para la producción, pudiendo afectar gravemente las exportaciones.

2.2.1 Agentes fitopatógenos. Según el SAG (1982), este cultivo es afectado por diversos problemas fitosanitarios, algunos de los cuales pueden reducir considerablemente el rendimiento y la calidad de la producción.

Con respecto a las enfermedades producidas por bacterias, las mas importantes para el país son: sarna común causada por *Streptomyces scabies* (Taxter) Waksman & Henrici, marchitez bacteriana inducida por *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al*.; pudrición húmeda y pie negro producidas por *Erwinia caratovora* subsp. *caratovora* (Jones) Bergey *et al*. y subsp. *atroseptica* (Van Hall) Dye, respectivamente (citados por SANDOVAL, 1987)

Dentro de las enfermedades fungosas, podemos señalar como las más importantes para la zona sur de Chile, la costra negra, producida por *Rhizoctonia solani* Kühn, tizón tardío, cuyo agente causal es *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary y pudrición seca causada por *Fusarium* spp. (SANDOVAL, 1987). Además, el SAG (2000) indica que en los últimos años han adquirido importancia en la zona sur enfermedades como sarna plateada, causada por *Helmintosporium solani* Durieu & Montagne y sarna polvorienta, producida por S*pongospora subterranea* (Wallr.) Lagerh.

2.2.1.1 El género *Rhizoctonia*. Este género fue descrito por DeCandole en 1815, quien designó a *R. crocorum* (Pers.) DC. como la especie tipo, mientras que *R. solani*, la más importante de las especies de este género, fue descrita por Kühn en 1858 (citados por OGOSHI, 1996).

El género *Rhizoctonia* se distribuye en suelos cultivados y no cultivados de todo el mundo, pudiendo ser patógenos de numerosas especies vegetales (OGOSHI, 1987). CARLING *et al*.(1999), señala que este género posee buena habilidad competitiva y al parecer, algunas cepas pueden vivir como saprofitos en el suelo e incluso como micorrizas asociadas a varios cultivos. Sin embargo, las especies patogénicas son más importantes para el hombre, ya que las pérdidas de calidad disminuyen los rendimientos (JAGER *et al*., 1982).

Este género consiste en una variada colección de telomorfos, encontrándose actualmente cerca de 120 especies, variedades o formas especiales descritas para *Rhizoctonia* spp. (OGOSHI, 1996). AGRIOS (1997), agrega que estas especies raramente producen un estado telomorfo Basidiomycota, que en condiciones de alta humedad aparece sobre el suelo, hojas y tallos infectados como una capa delgada de micelio.

Según OGOSHI (1996), debido a la diversidad de telomorfos, las especies reconocidas se refieren a cinco géneros de formas distintas. Los géneros con telomorfos relacionados a *Rhizoctonia* son *Helicobasidium*, *Tanatephorus*, *Ceratobasidium, Waitea*, *Tulasnella* y *Sebacina*.

Según OGOSHI (1987), *Rhizoctonia* se caracteriza por presentar hifas adultas de pigmentación café que se ramifican cerca del septo distal de las células jóvenes, formando un septo y una constricción en la ramificación cerca del punto de origen. Presentan un septo tipo doliporo, sin conexiones tipo hebilla o “clamp connections”, no forman conidias, excepto células monilioides, los esclerocios no se diferencian en corteza y médula y no poseen rizomorfo.

Es necesario evaluar cuidadosamente algunas de las características vegetativas mencionadas anteriormente, ya que la mayoría de ellas varían con la temperatura, luz y composición del medio de cultivo (ANDERSEN, 1990).

En base a algunas de las características mencionadas, el género se divide en tres grupos: uno de ellos corresponde a *Rhizoctonia* multinucleada, que posee tres o más núcleos por célula, hifas grandes (6-10μm de diámetro) y el telomorfo pertenece al género *Tanatephorus* Donk. Otro grupo es el de *Rhizoctonia* binucleada, que presenta dos núcleos por célula, hifas pequeñas (4-7μm de diámetro) y el telomorfo corresponde al género *Ceratobasidium* Rogers. El tercer grupo, incluye a *R. oryzae* y *R. zeae*, que son multinucleados y el telomorfo pertenece al género *Waitea* Warcup & Talbot (OGOSHI, 1987).

2.2.1.2 *Rhizoctonia solani* Kühn. *Rhizoctonia solani* Kühn es el estado anamorfo de un habitante común del suelo, el Basidiomycota *Tanatephorus cucumeris* (Frank) Donk. (JAGER *et al*, 1982). MENZIES (1970), señala que Julius Kühn observó en 1858 un hongo sobre tubérculos de papa y lo llamó *Rhizoctonia solani*. Sin embargo, no fue sino hasta 1918, cuando se demostró que el hongo descrito por Kühn era realmente patogénico a papa.

Existe gran variedad dentro de la especie *R. solani* en cuanto a rango de hospederos, patogenicidad, morfología, características culturales, fisiológicas y serológicas. (OGOSHI, 1987; CASTRO, 1989).

PARMETER y WHITNEY (1970), señalan que no hay una única característica, exceptuando el estado perfecto, que sirva para distinguir a *R. solani* de otros hongos similares, por lo que el reconocimiento de las especies depende de una combinación de varias características.

2.2.1.2.1 Características de *R. solani*. PARMETER y WHITNEY (1970), señalan algunas características de esta especie.

1. Micelio de rápido crecimiento, de color café y de 6-10 μm de diámetro en hifas adultas, con ramificaciones en ángulos rectos cerca del septo distal de las células de la hifa.
2. Constricción de la ramificación de la hifa en el punto de origen.
3. Formación de un septo en la ramificación cerca del punto de origen.

4. Producción de células monilioides, de forma de barril o clamidosporas, en cadenas o agregados.
5. Formación de esclerocios de textura mas o menos uniforme, que varían en tamaño y forma, desde pequeños y redondeados, menores a 1 mm de diámetro hasta finas capas que cubren varios centímetros.
6. Patogenicidad a un amplio rango de hospederos, resultando una variedad de síntomas que incluyen caída de plántulas, pudrición de raíces y otras partes subterráneas de la planta, marchitamiento de hipocótilos, tallos y hojas, caída de frutos y semillas.
7. Poseen un telomorfo Basidiomycota llamado *Tanatephorus*.
8. Poseen un septo tipo doliporo.
9. Las células son multinucleadas en las hifas de crecimiento activo.

En la taxonomía de *R. solani* es necesario considerar que ciertas características varían bastante mientras que otras parecen estables y uniformes (PARMETER y WHITNEY, 1970)

2.2.1.2.1.1 Características del micelio. Según AGRIOS (1997), el micelio de *R. solani* es incoloro cuando joven, pero se torna amarillento o café claro a medida que madura. Según PARMETER y WHITNEY (1970), esta pigmentación varía entre distintos medios nutritivos, pero todas las colonias maduras muestran algún tono de color café. El micelio está constituido por largas células y se ramifica desde la hifa principal, con una ligera constricción en la ramificación y un septo cerca de este punto.

CERESINI (2003), señala que las hifas se ramifican en ángulo recto, sin embargo, PARMETER y WHITNEY (1970), agregan que este ángulo puede variar entre aislamientos, particularmente en las zonas de avance de la colonia. La ramificación ocurre cerca del septo distal de una célula joven en una hifa vegetativa, pero en hifas adultas puede ocurrir en cualquier lugar.

Los diámetros de las hifas, pueden variar entre y dentro de un mismo aislamiento con la edad, composición del medio de cultivo y temperatura (PARMETER y WHITNEY, 1970).

Las hifas del micelio se dividen en células individuales mediante un septo tipo doliporo, que permite el movimiento del citoplasma, mitocondrias y núcleos de una célula a otra (CERESINI, 2003) y PARMETER y WHITNEY (1970), agregan que este tipo de septo es una característica prominente, uniforme y confiable de la especie *R. solani*.

2.2.1.2.1.2 Número de núcleos por célula. El número de núcleos por célula se utiliza para diferenciar a *R. solani* de otras especies del género (CERESINI, 2003) y muchos estudios indican que las células de hifas jóvenes en crecimiento activo son multinucleadas, por lo que se trata de una característica estable para distinguir a *R. solani* de otros hongos similares con células regularmente binucleadas (PARMETER y WHITNEY, 1970)

2.2.1.2.1.3 Células monilioides. Esta especie produce células compactas, ovaladas, de paredes mas gruesas que las del micelio, llamadas células monilioides, que se ramifican en cadenas y se fusionan en agregados para formar los esclerocios (TREDWAY y BURPEE, 2001 y UCHIDA, 2003).

La gran variación del tamaño de las células monilioides, tal como ocurre con los diámetros de hifas o los tamaños y formas de los esclerocios, sugiere que esta medida no es un criterio apropiado para distinguir entre especies. Bajo ciertas condiciones, el hongo produce aglomeraciones de células anchas y cortas, que funcionan como clamidosporas o eventualmente se desarrollan en esclerocios de apariencia mas suelta, de color café a negro, muy comunes sobre tubérculos de papa (AGRIOS, 1997).

2.2.1.3 “Rizoctoniasis” y Costra negra. La rizoctoniasis causa pérdidas en casi todos los vegetales, incluyendo flores, plantas de cultivo, gramíneas e incluso plantas ornamentales perennes, árboles y arbustos. Los síntomas varían en los diferentes cultivos, estado de crecimiento en que las plantas son atacadas y las condiciones ambientales prevalecientes, siendo el síntoma mas común en la mayoría de las especies, la caída de plántulas (“damping-off”). Las plantas mas nuevas pueden morir antes de emerger, mientras que en plantas de más edad, el hongo invade los tejidos corticales externos, desarrollando lesiones elongadas de color pardo a café, que pueden aumentar hasta estrangular el tallo (AGRIOS, 1997).

La rizoctoniasis está presente en todas partes del mundo donde se cultivan papas, sin embargo, los síntomas o signos asociados con cualquiera de las fases en que el patógeno afecta al cultivo pueden ser mas o menos visibles dependiendo del potencial del inóculo y de las condiciones climáticas locales (HOOKER, 1986, BANVILLE *et al*, 1996).

En el cultivo de la papa, la denominación de “costra negra”, se debe, según el SAG (1982), AGRIOS (1997) y CUBETA *et al*. (1998), a la presencia de pequeños esclerocios de color negro que se forman sobre la superficie de los tubérculos. Estos corresponden a aglomeraciones de hifas que se producen hacia el final del ciclo vegetativo de la planta y que constituyen la forma de resistencia y diseminación del hongo y como agregan Christias y Lockwood, (1973), citados por JAGER *et al*.(1991), éstos aparecen al ser estimulados por exudados de los tubérculos, redistribuyendo recursos de las hifas a los esclerocios.

Los tubérculos infectados se agrietan o deforman, resultando en severas pérdidas de tubérculos de valor comercial (JAGER *et al.*, 1991; POWELSON *et al*., 1993; AGRIOS, 1997 y CUBETA *et al.*, 1998). El daño a los estolones a menudo produce tubérculos deformes y de pequeño tamaño, que normalmente

no se cosechan, constituyéndose en malezas y fuente de diseminación de enfermedades en el cultivo (JAGER *et al.*, 1991).

LEES (2001), indica que el desarrollo de la planta es afectado desde la emergencia a la cosecha. La enfermedad ocurre principalmente bajo el suelo, donde se observa gran variedad de síntomas en brotes, raíces, tallos y estolones, produciendo manchas necróticas de color café, que pueden ser superficiales o extenderse internamente hacia el centro del tallo o raíz, estrangulando estos órganos (SANDOVAL,1987; BANVILLE *et al*., 1996 y AGRIOS, 1997).

Según CALDERONI (1978), CASTRO (1989) y CUBETA *et al.* (1998), se producen infecciones en brotes primarios, comenzando con áreas decoloradas o manchas de color café rojizo que terminan por destruir el tejido y matar el brote, debido a que el punto de crecimiento muere, por lo que generalmente el brote no alcanza a emerger, disminuyendo así el número de tallos. Al morir los brotes en desarrollo, se formarán brotes adicionales hasta que uno de ellos emerja del suelo. El sucesivo desarrollo de nuevos brotes en reemplazo de aquellos que han muerto puede acabar con las reservas del tubérculo semilla necesarias para el crecimiento posterior, retardando así la emergencia y produciendo un bajo establecimiento. Ocurre además estrangulamiento de los estolones, disminuyendo la formación de tubérculos o dando lugar a tubérculos de tamaño no comercial. Según AGRIOS (1997), cuando la planta ha emergido, son atacados los tallos, quedando blandos e incapaces de sostener a la plántula, la cual termina por caer y finalmente muere.

En plántulas y plantas adultas, se producen lesiones radiculares de color pardo o café, primeramente bajo el suelo, pero en climas fríos y húmedos, las lesiones crecen en todas direcciones y pueden aumentar en tamaño y número hasta cubrir toda la base del tallo y las raíces, lo que resulta en debilitamiento, amarillez y a veces muerte de la planta (AGRIOS, 1997).

Al ser afectadas las raíces y tallos subterráneos de plantas ya desarrolladas, se manifiestan síntomas como amarillez de brotes y hojas apicales, las que adquieren un tono púrpura debido a la acumulación de antocianinas, además de enrrollamiento y arrosetamiento de las partes superiores de las plantas (CALDERONI, 1978; BANVILLE *et al*., 1996), síntomas que según SANDOVAL (1987), se asemejan a aquellos causados por el virus del enrollamiento de la hoja (PLRV).

Luego en la temporada, se forman himenios pertenecientes al estado telomórfico en la parte inferior de los tallos aéreos cerca del suelo, estos son superficiales y no causan daño físico a la superficie sobre la cual se forman. Algunas veces, el himenio está asociado a la cepa que se encuentra atacando a la parte subterránea de la planta (BANVILLE *et al*., 1996).

Los tejidos meristemáticos y tejidos suculentos jóvenes subterráneos son mas susceptibles de ser atacados y por lo general no se observan síntomas ni signos de rizoctoniasis en la parte aérea, sino sólo respuestas secundarias al daño producido bajo el suelo (BANVILLE *et al*., 1996).

Poco se sabe del efecto de la rizoctoniasis sobre la calidad interna de los tubérculos, pero BANVILLE (1989), menciona una disminución del contenido de materia seca de los tubérculos, factor importante en el procesamiento industrial. Tampoco están claros los efectos sobre el rendimiento del cultivo, pero WEINHOLD *et al*. (1982), han reportado mayores rendimientos como resultado de una reducción de los cancros en tallos y estolones, sin embargo, en otros casos la severidad de los cancros producidos no tiene relación con el rendimiento. CARLING y LEINER (1986), agregan que los menores rendimientos inducidos por *R. solani* no son significativos y que no vale la pena controlar la enfermedad.

2.2.1.4 El telomorfo: *Tanatephorus cucumeris*. Según OGOSHI (1987) y AGRIOS (1997), *T. cucumeris* se clasifica en el género *Tanatephorus*, Orden Ceratobasidiales, dentro del Phylum Basidiomycota.

TALBOT (1970), indica que la relación de *R. solani* con un telomorfo Basidiomycota fue primero sugerida por Rolfs en 1903 y que el género *Tanatephorus* fue propuesto por Donk en 1956. MENZIES (1970), indica que al ser descubierto por Prillieux y Delacroix en 1891 este fue llamado *Hypochnus solani*. Más tarde se le llamó *Corticum vagum*, luego *Pellicularia filamentosa* y actualmente *Tanatephorus cucumeris*.

OGOSHI (1987), señala que el actual telomorfo de *R. solani* fue mencionado por primera vez en 1863, por Frank, quien describió a *Hypochnus cucumeris* (*Tanatephorus cucumeris*).

Este género se distingue por poseer un himenio (racimos de basidios) discontinuo y variable. Los holobasidios son cortos y anchos, de forma barrilada a subcilíndrica, no uniformes, ni constreñidos cerca de la mitad y un poco más anchos que la hifa de soporte. Los basidios se producen sobre una capa membranosa de micelio y tienen cuatro esterigmas fuertes, generalmente erguidos y cada uno produce una basidiospora mucosa, de pared delgada, prominentemente apiculada, no amiloide, hialina, de forma elipsoidal, aplastada por un lado y, a menudo, más ancha hacia el extremo distal (TALBOT, 1970).

WINDELS *et al*. (1997), señalan que la formación del telomorfo en condiciones de campo requiere alta humedad relativa y temperaturas de 20 a 30ºC, CARLING *et al*. (1999), agregan que se producen abundantes basidiosporas en condiciones naturales de frío y humedad, pero se cree que las cepas de AG-3 patogénicas a papa, no han sido capaces de formar basidiosporas en medio de cultivo.

En otros cultivos, las basidiosporas de *T. cucumeris* constituyen una importante fuente de inóculo, pero no hay evidencia de un rol importante en la epidemiología de la rizoctoniasis en el cultivo de la papa (WINDELS *et al*., 1997; CERESINI *et al*., 2001).

2.2.1.5 Agrupamiento de *R. solani*. Esta es una especie compleja y los intentos por dividir a esta especie en grupos y subgrupos se basan principalmente en dos categorías: en primer lugar, las diferencias de patogenicidad, apariencia en medios de cultivo, morfología, fisiología o ecología; y diferencias en la anastomosis de hifas en medio de cultivo (OGOSHI, 1987 y O`SULLIVAN y KAVANAGH, 1991).

2.2.1.5.1 Anastomosis. En *R. solani*, la anastomosis se define como la manifestación de una incompatibilidad somática o vegetativa entre cepas diferentes pero relacionadas entre sí (ANDERSON, 1982).

PARMETER y WHITNEY (1970), indican que las hifas que pertenecen a un mismo grupo de anastomosis (AG) se atraen y fusionan una con otra sin causar su muerte, mientras que aislamientos de distintos AGs reaccionan entre sí provocando muerte celular.

Este es un proceso complejo, ya que algunos aislamientos se fusionan mezclando su citoplasma, otros fusionan sus paredes celulares pero el citoplasma de las células fusionadas no se mezcla, mientras que otros aislamientos no se fusionan. Observaciones realizadas por CARLING (1996), muestran que la mezcla de citoplasmas lleva a la muerte de las células fusionadas y en ocasiones, de las células adyacentes, cuando no corresponden a un mismo grupo de anastomosis.

2.2.1.5.2 Mecanismos de fusión de hifas. En el proceso de fusión de hifas, YOKOYAMA y OGOSHI (1984), distinguen una fusión perfecta y una imperfecta, produciéndose en ésta última, muerte celular luego de la fusión.

La fusión perfecta comienza con el crecimiento de las hifas, secreción de sustancias atrayentes, contacto entre las hifas y cese de su crecimiento, formación de proyecciones tipo rama, luego las paredes celulares se diluyen, conectándose el protoplasto. Un aislamiento de un AG puede reconocer y fusionarse sólo con miembros del mismo AG, por lo que se asume que las sustancias son distintas entre grupos diferentes (OGOSHI, 1987).

Luego de la anastomosis, se produce bajo ciertas condiciones, una hifa heterocariótica de alguna de las células que se fusionan. Sin embargo, en la mayoría de las veces, cinco o seis células en cualquier lado de la fusión mueren, apareciendo una zona vacía en la unión de las colonias. Esta “reacción de muerte” entre aislamientos del mismo grupo de anastomosis es la expresión de incompatibilidad somática o vegetativa, que limita los cruzamientos a unos pocos grupos compatibles. (AGRIOS, 1997)

Como muestra el Cuadro 1, los tipos de anastomosis han sido categorizados según la reacción que ocurre entre los aislamientos.

CUADRO 1 Reacciones de anastomosis descritas para *R. solani*.

Categoría	Descripción de la interacción	Relación de los aislamientos
C3	Fusión de paredes y membranas. Las células fusionadas y adyacentes pueden morir pero no es lo común.	Cercanamente relacionados. (mismo AG, misma PVC, mismo aislamiento)
C2	Unión evidente de las paredes celulares, no así de las membranas. Células fusionadas y adyacentes siempre mueren	Relacionados. Mismo AG pero diferente PVC
C1	Contacto de hifas, aparente conexión de paredes celulares pero no de las membranas. A veces una o ambas células fusionadas y adyacentes mueren.	Distantemente relacionados. Diferente AG o mismo AG
C0	No hay interacción	No relacionados. Diferente AG

FUENTE: Adaptado de CARLING (1996).
(PCV = Población Vegetativamente Compatible, AG = Grupo de Anastomosis)

CARLING (1996), señala que todas estas categorías pueden dividir los aislamientos en AGs, pero C3 permite separarlos en subunidades mas homogéneas llamadas “clones” por OGOSHI y UI (1983), gracias a que esta reacción indica un mayor grado de similitud entre los aislamientos y se ha propuesto el término Población Vegetativamente Compatible (PVC) para describir aislamientos dentro de un AG, que producen este tipo de reacción.

La categoría C0 no es una reacción y C1 y C2 son intentos fallidos de anastomosis, por lo que sólo la reacción C3 puede considerarse una reacción de anastomosis exitosa (CARLING 1996)

2.2.1.5.3 Grupos de Anastomosis. Según OGOSHI (1987), CARLING y LEINER (1990a) y CARLING (1996), esta especie se divide en grupos de anastomosis, que representan el aislamiento genético de las poblaciones. Estas reacciones pueden ubicar a la mayoría de los aislamientos dentro de un grupo, sin embargo, algunos aislamientos pueden fusionarse con miembros de uno o más AGs, mientras que otros no se fusionan con ninguno de los grupos conocidos ni con ellos mismos, producen abundante micelio aéreo, no crecen en suelo estéril, no contienen melanina ni forman esclerocios (CARLING, 1996).

Los grupos de anastomosis de *R. solani* se encuentran en todo el mundo, pero su población y distribución dependen de los cultivos que allí se encuentran, lo que puede limitarlos a una pequeña área (CASTRO, 1989).

Se han descrito 12 AGs para *R. solani* y algunos se dividen en subgrupos en base a características físicas, químicas y moleculares (CARLING *et al*., 1999 y RUBIO, 2001). Se sabe que AG-3 es el principal causante de “rizoctoniasis” en papa, aunque como indican OGOSHI (1987) y MUÑOZ *et al.* (2001), en algunas regiones productoras de papa en Perú, Brasil y México, se han encontrado patogénicos a papa los grupos AG-2, AG-4, AG-5 y AG-7.

2.2.1.5.4 Subgrupos de *R. solani*. OGOSHI (1987), señala que el comportamiento de este hongo no puede entenderse sólo en términos de AGs y debido a la variabilidad de patogenicidad, morfología de sus esclerocios, apariencia en medio de cultivo, características fisiológicas, etc, se cree que este hongo tiene muchos grupos intraespecíficos (ISG), razón por la cual los investigadores reconocen que *R. solani* es una sola especie dividida en AGs y subgrupos. Mediante estudios de patogenicidad se ha evidenciado que, en general, las enfermedades características de un cultivo son causadas por un AG específico o un subgrupo determinado (OGOSHI, 1987), tal como puede apreciarse en el Cuadro 2.

CUADRO 2 Grupos de anastomosis (AG) descritos para *R. solani*, hospederos y enfermedad.

AG (Subgrupo)	Hospedero	Enfermedad	Cita
AG 1 (IA, IB, IC)	Remolacha, alforfón, arroz, pino	Tizón foliar en gramíneas caída de plántulas en remolacha	OGOSHI (1987) CARLING *et al*. (1999)
AG 2 (1, 2IIIB,2IV)	Soya, Arroz, Junco, Remolacha	Tizón de la lámina, caída de plántulas, pudrición de raíz y corona	CARLING *et al*. (1999) BAIRD *et al*. (1996)
AG 3	Papa y otras solanáceas, cereales, soya y remolacha	Pudrición de tallo y raíces	CASTRO (1989), WINDELS *et al*. (1997)
AG 4 (HG-I, HG-II)	Papa, maní, remolacha, algodón, soya	Caída de plántulas y pudrición de raíz	OGOSHI (1987) WINDELS *et al*. (1997)
AG 5	Papa, remolacha, leguminosas y ornamentales	Pudrición en raíz y tallo , Caída de plántulas	WINDELS *et al*. (1997)
AG 6 (HG-IB y GV)	No patogénico	Suelos no cultivados	CARLING Y SUMMER (1992)
AG 7	Patógeno del suelo	Puede causar daño menor en algunos cultivos (sandía, arroz, algodón, soya)	BAIRD *et al*. (1996) OGOSHI (1987)
AG 8 (ZG1-1,2,3,4,5)	AG puente (AG-2 y AG-BI) Cebada, papas, lupino, avena	“bare patch” de los cereales, pudrición radicular en papas y caída de plántulas	CARLING y SUMNER (1992)
AG 9 (TP, TX)	Patógeno débil del suelo, puede atacar papas y otros vegetales	Caída de plántulas y pucrición de raíz	CARLING y SUMNER, (1992).
AG 10	Patógeno del suelo	Principalmente saprofito (cultivos de granos)	OGOSHI *et al.* (1990)
AG 11	Lupino, arroz	Caída de plántulas y pudrición de hipocotilos	OGOSHI (1987)
AG 12	Orquídeas	Micorrizas	WINDELS *et al*. (1997)
AG BI	Grupo puente (AG-2-1, AG-3 y AG-6, AG-8, AG-11y AG-2-2)	Patógeno del suelo No hay evidencia de su patogenicidad	OGOSHI, (1987).

FUENTE: Adaptado de OGOSHI (1987), CARLING y SUMNER (1992), WINDELS *et al*.(1997) y BAIRD *et al*. (1996).

La división de subgrupos se basa en la morfología de las colonias, patogenicidad, complementariedad de ADN y patrones de zimograma. Cabe señalar que los subgrupos, con algunas excepciones, no se distinguen de otros miembros de su AG en base a reacciones de anastomosis (CARLING, 1996).

Aun cuando los conceptos de Grupo de Anastomosis y Subgrupos representan el método más común de clasificación, entregan poca información a cerca de la diversidad genética de este patógeno y últimamente se han desarrollado técnicas bioquímicas, serológicas y moleculares que permiten realizar estudios genéticos y sistemáticos de *R. solani*.

Dentro de los métodos bioquímicos se encuentran la electroforésis de proteínas solubles e isoenzimas que expresan la constitución genética de la célula y permiten diferenciar entre AGs y subgrupos, los zimogramas de enzimas pectinolíticas, que agrupan aislamientos de características culturales y patogénicas similares dentro de un AG y el uso de lectinas y perfiles de ácidos grasos, que son específicos para cada AG. Además existen métodos serológicos que usan anticuerpos, que enfrentados a proteínas miceliales, permiten distinguir distintos AGs.

KUNINAGA (1996), agrega que la composición del ADN permite demostrar una alta relación genética entre miembros de un respectivo AG y entre subgrupos y que se pueden establecer diferencias genéticas entre ellos mediante RFLP, usando PCR y Southern Blott.

2.2.1.6 Ecología y epidemiología. Las poblaciones de *R. solani* en el suelo son muy variables y se encuentran según MARTIN *et al.* (1983), en los primeros 15 cm, mientras que JAGER y VELVIS (1986), agregan que la distribución de los propágulos es heterogénea y localizada.

En los campos de cultivo, las poblaciones de *R. solani* incrementan durante la estación de crecimiento debido a la presencia del hospedero y a la temperatura adecuada (OGOSHI, 1987), siendo mayores en los primeros estados de crecimiento del cultivo y disminuyendo conforme completan su desarrollo las plantas hospederas (SCHNETTLER, 1993).

R. solani crece libremente a través del suelo y sobre las raíces con las que establece contacto, para infectar sus extremos susceptibles, registrando velocidades de crecimiento de 1 cm/día, preferentemente en sentido horizontal (SCHNETTLER, 1993). Debido a las relaciones que establece con otros organismos, este hongo posee gran habilidad para sobrevivir y crecer en el suelo, bajo un amplio rango de condiciones (CASTRO, 1989).

2.2.1.7 Ciclo de la enfermedad. El desarrollo de la enfermedad depende en gran medida de la sobrevivencia del patógeno y la forma en que éste coloniza e invade los tejidos de la planta sobre la cual se desarrolla.

2.2.1.7.1 Sobrevivencia y desarrollo de *R. solani*. Los propágulos de *R. solani* sobreviven en el suelo en forma independiente, como saprofitos asociados a la materia orgánica o sobre los tejidos del hospedero infectado (CASTRO, 1989). Por otro lado, este patógeno sobrevive a través de los esclerocios presentes en el suelo, sobre tubérculos de papa e incluso sobre o dentro de semillas verdaderas de papa (CUBETA *et al*., 1998).

JAGER *et al.* (1991), indican que las fuentes de infección pueden ser tubérculos semilla que contengan esclerocios o hifas del hongo y la presencia de inóculo en el suelo. BAINS *et al*. (2002), agregan que estos tipos de inóculo constituyen la fuente primaria de infección para el desarrollo de la enfermedad.

Los esclerocios de *R. solani* pueden sobrevivir en el suelo por mas de 5 años, como observaron JAGER y VELVIS (1983), en campos que no se habían plantado con papas por 10 a 12 años y que fueron capaces de infectar y dañar

plantas originadas de tubérculos libres de esclerocios. Explican, además que la sobrevivencia de *R. solani* puede deberse a cultivos de rotación o malezas que son infectadas por el hongo y actúan como fuente de inóculo.

Se ha demostrado la importancia de los esclerocios provenientes de tubérculos en incrementar el nivel de inóculo del suelo, reportándose gran influencia del inóculo del suelo y de los tubérculos sobre la emergencia de brotes y el desarrollo de la enfermedad en terreno (FRANK y LEACH, 1980; WEINHOLD *et al*., 1982, LOOTSMA y SCHOLTE, 1996).

A diferencia de otras enfermedades causadas por *Rhizoctonia*, la fase proveniente del tubérculo semilla tiene gran importancia ya que puede dispersar al patógeno a grandes distancias y una vez establecido en el suelo, el micelio y los esclerocios constituyen la fuente primaria de inóculo (CERESINI *et al*., 2002).

Cualquiera sea la fuente de infección responsable de la enfermedad, la importancia en el desarrollo de los síntomas dependerá de las cantidades de inóculo y de las condiciones ambientales (CARLING *et al*., 1989). Según CASTRO (1989), el inóculo del suelo se relaciona estrechamente con el desarrollo de la enfermedad durante la temporada, mientras que el inóculo del tubérculo está involucrado con la sobrevivencia del hongo.

Sobre plantas hospederas o en la superficie del suelo cercana a ellas, *R. solani* forma basidiosporas (*T. cucumeris*), que pueden persistir en el suelo y producir nuevas infecciones (OGOSHI, 1987).

La planta de papa puede ser afectada por el hongo durante cualquier etapa de su desarrollo, dependiendo de las condiciones de temperatura y humedad (CARLING y LEINER, 1990b). AGRIOS (1997), agrega que para la mayoría de las cepas, la temperatura óptima para la infección es de 15 a 18ºC, siendo algunas mas infectivas a temperaturas de hasta 35º C y como indica

WINDELS *et al*. (1997), algunos grupos de anastomosis como el AG-3 son más patogénicos a papa a temperaturas de 10ºC. La enfermedad es más severa en suelos moderadamente mojados que en suelos inundados o secos y las plantas jóvenes son atacadas con mayor fuerza cuando el crecimiento es lento debido a condiciones ambientales desfavorables para la planta.

La enfermedad comienza cuando en condiciones de suelo frío y húmedo (entre 10 y 15ºC), micelio y esclerocios germinan formando hifas vegetativas que colonizan el terreno bajo la superficie del suelo y en respuesta a exudados de las raíces, invaden brotes, tallos, raíces y estolones a través de heridas, lenticelas o de la cutícula intacta (SANDOVAL, 1987; CUBETA *et al.*, 1998). El desarrollo del tubérculo u otros agentes lesivos, ocasionan heridas en la piel, a través de las cuales el hongo puede penetrar sin formar estructuras de infección. Lo mismo ocurre en las heridas provocadas en el punto de desarrollo de raíces laterales, donde la corteza y epidermis de la raíz son rotas por el extremo emergente de la nueva raicilla (DODMAN y FLENTJE, 1970).

2.2.1.7.2 Colonización e infección. Al entrar en contacto con la planta, las hifas comienzan a crecer sobre la superficie, adquiriendo una forma redondeada, sin adherirse aun al hospedero (CASTRO, 1989; KEIJER, 1996). Luego el hongo se expande sobre raíces y estolones para formar una extensa red de hifas anastomosadas, pero durante esta fase de colonización la planta hospedera no presenta síntomas ya que las estructuras de infección no se han formado.

Luego de 10 a 12 horas, las hifas se vuelven aplanadas y se adhieren firmemente a la superficie de la planta, comenzando en este momento el proceso de infección, para lo cual parece ser requisito la adherencia de las hifas, además se ha observado la formación de una película mucilaginosa alrededor de las hifas adheridas a la planta (KEIJER, 1996).

La infección comienza luego de unas horas cuando los internudos de las hifas se acortan y las células de la punta de la hifa se ramifican en ángulo recto

(forma de “T”), sobre tallos y estolones, estas ramificaciones son una característica determinante de las estructuras de infección de *R. solani*. (HOFMAN y JONGEBLOED, 1988).

A partir de las ramificaciones se originan estructuras semejantes a apresorios, que poseen hifas cortas e hinchadas, fuertemente adheridas, que se ramifican repetidamente, resultando en un “cojinete de infección” que corresponde a un conjunto de ramificaciones agrupadas fuertemente y de forma redondeada (CASTRO, 1989; JAGER *et al*., 1991; KEIJER, 1996). Se cree que los cojinetes de infección son requisito para el desarrollo de lesiones en tallos y estolones y sirve como base de alimentación adicional para la posterior colonización de la planta (JAGER *et al*., 1991).

2.2.1.7.3 Penetración e invasión de los tejidos. En la próxima etapa, conocida como crecimiento directo, las hifas siguen las paredes anticlinales de las células de la epidermis, como respuesta a la liberación de nutrientes o componentes estimulatorios específicos cerca de los puntos de contacto entre las células epidermales de la planta, pero se cree que la topología de la superficie juega también un rol importante (ARMENTROUT *et al*., 1987 y KEIJER, 1996).

La penetración comienza cuando a partir de las hifas hinchadas que forman los cojinetes de infección se producen delgados husos de penetración, que atraviesan la cutícula y la pared de las células de la epidermis. Los husos de penetración se forman simultáneamente a partir de diferentes hifas, aumentando la posibilidad de penetrar a los tejidos (KEIJER, 1996).

Dentro de la planta, la hifa recupera su diámetro normal, invadiendo el tejido epidérmico y las capas externas de la corteza, y dependiendo de la cepa, las hifas crecen intracelularmente o en los espacios intercelulares, (YANG *et al*., 1992 y KEIJER, 1996).

Aun cuando este patógeno parece estar muy especializado en la penetración mecánica de tejidos intactos, probablemente existen enzimas involucradas en el proceso de infección y penetración (TRAIL y KÖLLER, 1990).

Se ha estudiado que en brotes de papa, muchas hifas penetran las células epidérmicas, mediante husos de penetración y se ha observado bajo los cojinetes de infección un tejido de color claro alrededor del sitio de penetración, lo que indica que las paredes celulares localmente serían mas delgadas debido a la acción de enzimas, por lo que la penetración debiera ser mecánica y enzimática (WEINHOLD y SINCLAIR, 1996). Se ha demostrado que la cutinasa sería una de las enzimas que facilita la penetración a través de la cutícula, pero, durante las primeras etapas de la infección, el hongo produce además enzimas pectinolíticas y celulolíticas, que juegan un importante rol en la colonización y se cree que algunas cepas hipovirulentas carecen de alguna de estas enzimas (WEINHOLD y SINCLAIR, 1996).

R. solani secreta algunas enzimas extracelulares como pectinasa, pectinliasa, pectin metilesterasa, celulasa y fosfatasa, pero además se sabe de la producción de ADNasa, ARNasa, alfaamilasa, quitinasa, betaglucanasa, xilanasa, proteasa y ureasa (BERTAGNOLLI *et al*., 1996).

Normalmente *R. solani* penetra los tejidos de un hospedero mediante estructuras de infección, sin embargo, se sabe de la capacidad de penetrar a través de heridas, lenticelas y estomas en menor grado (MURRAY, 1982).

Luego de la penetración de las células, las hifas se ramifican en el lumen celular y hacia las células adyacentes. En plantas de papa la colonización del tejido ocurre primero en algunas células bajo el cojinete de infección, pero finalmente las lesiones pueden alcanzar varias capas de células y llegar hasta el tejido vascular, estrangulando los tallos de plantas jóvenes (HOFMAN y JONGEBLOED, 1988).

Una vez que las hifas han penetrado a través de la cutícula, el citoplasma de las células invadidas colapsa, observándose plasmólisis y destrucción de organelos celulares en las células adyacentes, además de una apariencia granular y vacuolación del citoplasma del tejido infectado. Las paredes celulares se estiran y ocurre un cambio de la estructura fina de las capas de celulosa, la membrana nuclear se desintegra parcialmente y las mitocondrias se desorganizan (WEINHOLD y SINCLAIR, 1996).

2.2.1.8 Patogenicidad de *R. solani*. Se ha comprobado la gran variabilidad de patogenicidad que existe en esta especie y se ha observado que cepas provenientes de esclerocios sobre tubérculos causan frecuentemente mayor incidencia de pudrición del tallo que cepas provenientes del suelo (BAKER y MARTINSON, 1970). Otros estudios indican que la patogenicidad de cepas provenientes de esclerocios es similar a la de aquellas colectadas desde otras partes de la planta (FRANK y LEACH, 1980). CARLING *et al*. (1989), agrega que aislamientos de AG-3 que sobreviven en el suelo en ausencia de papa pueden presentar altos grados de patogenicidad, mientras que por otro lado se sugiere que el patógeno es más virulento cuando las hifas son más jóvenes, delgadas y hialinas. Sin embargo, las poblaciones del hongo varían continuamente en este aspecto, debido posiblemente a la ramificación y anastomosis de las hifas (BAKER y MARTINSON, 1970).

Una patogenicidad exitosa implica una compleja interacción de factores, que involucran tanto a la planta como al patógeno y el medio ambiente. Todo su desarrollo, desde la penetración hasta que se produce el síntoma característico, dependerá de la confluencia de los factores óptimos en los tres niveles señalados (BAKER y MARTINSON, 1970; AGRIOS, 1995).

Aun cuando la capacidad de penetrar superficies intactas de formas principalmente mecánicas permitiría a este patógeno infectar a un amplio rango de hospederos, ocurre gran especialización dentro de la especie y se ha

observado que en los aislamientos patogénicos a una determinada especie, ocurren todos los estados del proceso de infección, resultando en la colonización y colapso de la plántula, mientras que cuando los aislamientos no son patogénicos, las hifas crecen hacia la planta y sobre ella, pero no se adhieren ni continúan con las etapas siguientes del proceso de infección (KEIJER, 1996).

WEINHOLD y SINCLAIR (1996), demuestran un marcado efecto de la disponibilidad de nutrientes del suelo sobre la patogenicidad de esta especie y que cuando el inóculo es deficiente en nutrientes, el micelio crece sobre la superficie de la planta pero no se desarrollan estructuras de infección.

2.2.1.9 Genética de *R. solani*. La genética y patogenicidad de *R. solani* es compleja y se cree que la variación encontrada se debe a los diferentes grupos de anastomosis, que son vistos como grupos genéticamente aislados. Pero actualmente se reconoce que hay también variación genética dentro de los subgrupos de los AGs (ADAMS, 1996).

El mismo autor señala que *T. cucumeris* puede ser vista como una especie funcionalmente sexual o asexual. Cuando se considera una especie asexual, la heterocariosis es el mecanismo de mayor potencial para permitir recombinación genética sin meiosis. Al considerarla como una especie sexual, cobra relevancia la heterocariosis y las fuerzas genéticas que controlan su función. La heterocariosis es crucial, ya que une dos núcleos de diferente genotipo en un mismo citoplasma, dando a un hongo haploide las ventajas de la heterozigocidad de uno diploide. En este sentido, KEIJER (1996), agrega que las basidiosporas, constituyen una importante fuente de variación genética.

2.2.1.10 Control. En la mayoría de las regiones productoras de papa, el uso de fungicidas constituye la práctica mas común para el control de este patógeno, pero los resultados varían debido posiblemente a la diferente sensibilidad a los fungicidas que presentan los aislamientos (KATARÍA *et al*., 1991).

Otras prácticas para el manejo de este patógeno son la selección de semilla, destrucción de los residuos, rotación de cultivos, manejo del agua y uso de fertilizantes y cal, además del control biológico y la solarización del suelo que se han desarrollado con la finalidad de reducir la incidencia de las enfermedades del suelo (MUÑOZ *et al*., 2001).

El uso de semilla sana o tratada con fungicidas es importante, especialmente cuando se cultiva en suelos que no han tenido papas y por lo tanto, el inóculo del suelo tiene menos importancia (BAINS *et al*., 2002).

Otras medidas de control para este patógeno incluyen la rotación de cultivos con gramíneas por un período de tres a cuatro años, para reducir el inóculo del suelo. Realizar plantaciones a una profundidad media de 15 cm y efectuar la aporca 20 a 30 días después de la brotación.

Los cultivares de papa tienen distinta susceptibilidad a este patógeno, por lo que el uso de variedades resistentes constituye una forma de disminuir la incidencia de la enfermedad (RIBEIRO *et al*. 1996; BAINS *et al*., 2002).

3. MATERIAL Y METODOS

Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias, como parte del Proyecto de Control Integrado de papas (Fondo SAG-Papas 24 - 10 -100)

3.1 Materiales.

A continuación se detallan los materiales utilizados durante el ensayo.

3.1.1 Material biológico. En la fase experimental de este estudio se utilizaron tubérculos de papa de diversos cultivares provenientes de 10 predios ubicados en diferentes zonas agroclimáticas de la Décima Región de Chile, con síntomas evidentes de “costra negra”, a partir de los cuales se aislaron esclerocios de *R. solani.* Para realizar las pruebas de patogencidad se utilizaron esquejes de plantas de papa cv Desireé.

3.1.2 Material e instrumental de laboratorio. Para el desarrollo de la parte experimental se utilizó el siguiente instrumental de laboratorio: autoclave Quimis, balanza analítica Sartorius Basic Cientec (Modelo BA-610), cámara de flujo laminar Labconco (Modelo 36139-00B), cámara de incubación Heraeus (Modelo BK-600), estufa esterilizadora de aire caliente Memmert (Modelo ULM-500), destilador de agua GFL (Modelo 2008), microondas Somela, cámaras bioclimáticas, microscopio óptico Motic y lupa estereoscópica Motic. Dentro de los materiales de laboratorio se utilizó además un micrómetro objetivo, micrómetro ocular, refrigeradores, matraces Erlenmeyer, matraces aforados, tubos de ensayo (9 ml), placas Petri (9 cm de diámetro), vasos de precipitado, probetas, pipetas, embudo, asa de siembra, pinzas, bisturí, agua destilada,

alcohol de quemar, alcohol 96%, algodón hidrófilo, algodón Cardé, parafina sólida, parafilm, gasa estéril, papel absorbente estéril, bandejas de plástico, y bolsas plásticas transparentes.

3.1.3 Reactivos. Los reactivos utilizados en la fase experimental fueron los siguientes: hipoclorito de sodio (producto comercial al 5%), anilina al 0,5% en lactofenol, Twin 20, ácido láctico al 25%.

3.1.4 Medios de cultivo. Como medio de cultivo standard para el crecimiento de *R. solani* se utilizó agar papa dextrosa (APD) Merk® al 2%, que para algunas metodologías fue acidificado con 20-30 gotas por litro de ácido láctico al 25 % para inhibir el desarrollo bacteriano.

3.2 Método.

A continuación se describe la metodología empleada en esta investigación.

3.2.1 Obtención de los aislamientos.

Para obtener los aislamientos a partir de diferentes predios de la Décima Región se realizó una selección de los tubérculos, luego de lo cual se llevó a cabo la metodología para la extracción de los esclerocios.

3.2.1.1 Selección de las muestras. Con el objetivo de evaluar otras enfermedades en tubérculos, además de costra negra, durante la época de cosecha en el desarrollo inicial del proyecto, se obtuvieron 100 tubérculos de cada uno de 10 predios ubicados en diferentes localidades de la Décima Región de los Lagos.

En el Cuadro 3 se indican los predios, localidades y cultivares a partir de los cuales se obtuvieron los tubérculos y la Figura 1 muestra la ubicación geográfica de cada predio.

CUADRO 3 Número de predio, agricultor, localidad y cultivar a partir de los cuales fueron obtenidos los tubérculos.

Nº Predio	Agricultor	Localidad	Cultivar
1	Gerardo Karachón	Los Muermos	Desireé
2	Guido Klenner	Los Muermos	Cardinal
3	Cirilo Calisto	Los Muermos	Desireé
4	Abel Bahamonde	Los Muermos	Desireé
5	Julián Pérez	Los Muermos	Desireé
6	Semillas SZ	Casma	Monalisa
7	Semillas SZ	Macal	Kennebec
8	Semillas SZ	Colegual	Asterix
12	Prosepa	Loncotoro	Desireé
16	Ciro Neumann	La Paloma	Yagana

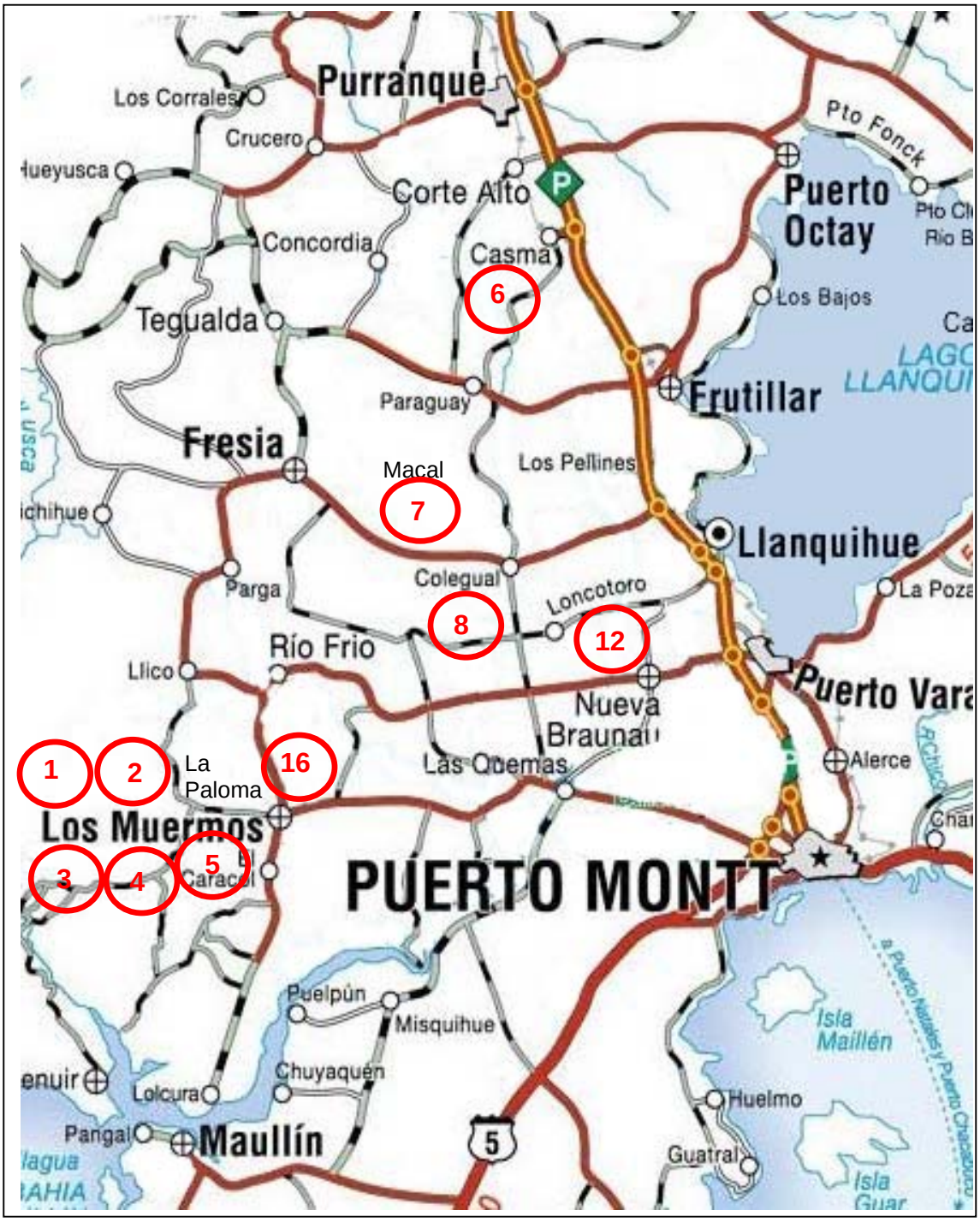

FIGURA 1 **Ubicación geográfica de los predios a partir de los cuales se obtuvieron los aislamientos de *R. solani*.**

Una vez realizadas las evaluaciones pertinentes, se seleccionaron 20 tubérculos con signos o esclerocios sobre la superficie y a partir de ellos, se aislaron aquellos de mayor tamaño y ubicados en forma aislada. Debido al gran número de aislamientos, en este ensayo sólo se procesaron 10 predios y de cada tubérculo seleccionado se aisló aproximadamente el 10% de los esclerocios.

Cabe señalar que para algunas localidades se aisló un bajo número de esclerocios, debido a la escasa presencia de signos de la enfermedad.

3.2.1.2 Desinfección de los tubérculos. Para eliminar todo residuo de suelo adherido a los tubérculos, éstos fueron lavados en agua corriente por 45 minutos. Posteriormente, fueron inmersos en una solución al 5% de hipoclorito de sodio (producto comercial de concentración 5 %), durante dos minutos, para después realizar tres enjuagues con agua destilada estéril, a fin de eliminar el exceso de hipoclorito de sodio. Por último, los tubérculos fueron secados con papel absorbente estéril.

Bajo la cámara de flujo laminar se procedió a extraer en forma individual cada esclerocio sobre un papel filtro estéril, dividiendo éste en tres porciones aproximadamente iguales, con ayuda de una pinza y bisturí previamente flameado y enfriado en el agar, como se indica en la Figura 2.

3.2.1.3. Obtención de cultivos puros. Para mayor seguridad en la obtención de cultivos puros, cada uno de los trozos obtenidos a partir de un esclerocio fue sembrado en una placa Petri de 9 cm de diámetro con APD acidificado con ácido láctico, de manera que cada aislamiento fue cultivado simultáneamente tres veces. Al mismo tiempo, en cada placa se sembraron trozos provenientes de 5 a 6 aislamientos distintos, dispuestos en forma equidistante en el borde de la placa. Las placas fueron rotuladas indicando el número de predio, número de tubérculo y número de esclerocio.

Como muestra la Figura 2, los aislamientos fueron incubados en cámara de cultivo a 20 ºC durante 48 horas, hasta el desarrollo inicial de micelio.

Con la finalidad de eliminar toda contaminación y obtener un cultivo puro, cada aislamiento fue repicado a otra placa Petri con APD acidificado, descartándose de forma inmediata cualquier cultivo que no correspondiera a *R. solani*. Los cultivos puros fueron incubados nuevamente a 20ºC por 48 horas para luego ser transferidos a 3 tubos de ensayo con APD inclinado para constituir un cepario. Los tubos se incubaron igualmente a 20ºC y una vez desarrollado el hongo, hasta la formación de esclerocios, fueron sellados en forma definitiva con parafina sólida y parafilm para evitar su deshidratación, y ser guardados en refrigerador a 5ºC. De los tres tubos de cada aislamiento, uno de ellos fue utilizado para la caracterización morfológica de la especie y otro se usó en las pruebas de patogenicidad.

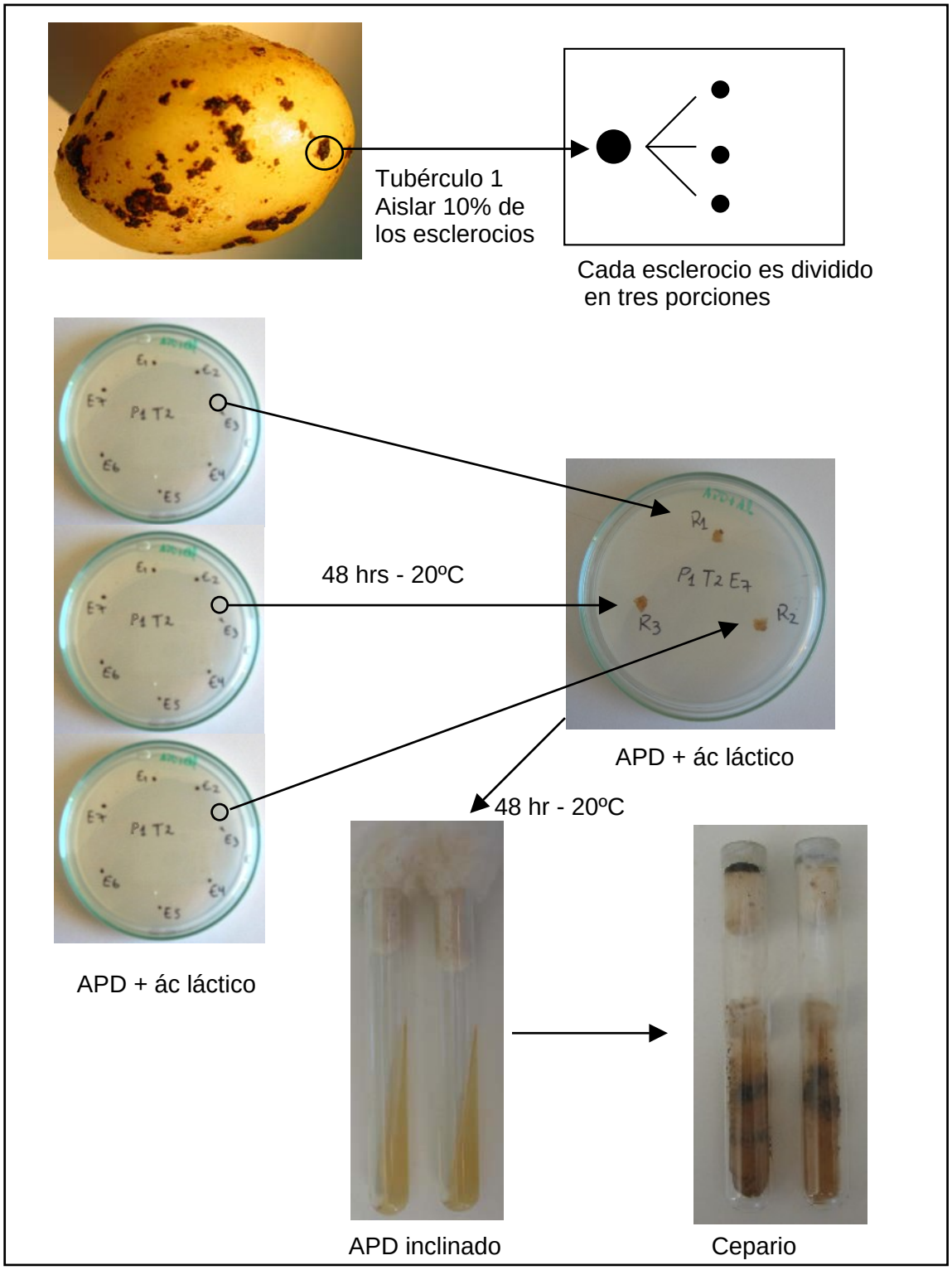

FIGURA 2 Representación esquemática del procedimiento para la obtención de cultivos puros de *R. solani.*

3.2.2 Parámetros evaluados. Los parámetros evaluados consistieron en la caracterización morfológica de todos los esclerocios aislados y el grado de patogenicidad observada para un porcentaje de los aislamientos.

3.2.2.1 Caracterización morfológica de los aislamientos. Un total de 750 aislamientos obtenidos de esclerocios fueron evaluados a partir de su morfología, coloración del micelio y formación de esclerocios en medio de cultivo y mediante las características de las hifas mencionadas por PARMETER y WHITNEY (1970), que determinan a la especie *R. solani*.

3.2.2.1.1 Tipo de crecimiento en medio de cultivo. Para esta evaluación, cada aislamiento fue cultivado en APD al 2% a 25ºC, observándose al cabo de 5 y 15 días, el color y tipo de crecimiento del micelio, además de la forma, coloración y distribución de los esclerocios en la placa de cultivo.

3.2.2.1.2 Características de las hifas. Para estudiar las características de los aislamientos. éstos fueron cultivados según el método descrito por BAIRD *et al.* (1996), en placas Petri de 9 cm de diámetro, con agar papa dextrosa (APD) al 2%, durante 6 días a 25 ºC en ausencia de luz.

Se observó la coloración de hifas adultas de 6 días de crecimiento, mediante comparación con una carta de colores de suelos. En las mismas hifas se observaron al microscopio las otras características miceliales tales como ramificación de las hifas en ángulo recto cerca del septo distal de las células jóvenes, formación de un septo y constricción de la ramificación cerca del punto de origen.

3.2.2.1.3 Diámetro de las hifas. El diámetro de las hifas se determinó para cada aislamiento, midiendo con ayuda de un micrómetro ocular y un micrómetro objetivo, 3 células de cada aislamiento en las mismas hifas adultas en que se observaron las características mencionadas en el punto anterior.

3.2.2.1.4 Células multinucleadas. Para la identificación de las células multinucleadas de todos los aislamientos, se utilizó el método rápido de tinción de núcleos descrito por HERR (1979), para lo cual una solución mojante de Twin 20 acidificada con ácido láctico al 85% fue depositada sobre las hifas de cada aislamiento, que luego de unos minutos fueron teñidas con una gota de anilina azul al 0,5% en lactofenol e inmediatamente observadas al microscopio óptico (40X).

3.2.2.2 Determinación de patogenicidad. Del total de aislamientos caracterizados, se seleccionaron al azar 98 de ellos para realizar pruebas de patogenicidad, lo que constituyó aproximadamente el 13% de los esclerocios aislados de la mayoría de los predios. Para aquellos predios que presentaron bajo número de esclerocios aislados, las pruebas de patogenicidad se realizaron con un porcentaje mayor de aislamientos.

3.2.2.2.1 Obtención del inóculo. A partir de los tubos con cultivo puro, se extrajo un trozo de agar con micelio, que fue sembrado en placas Petri de 9 cm de diámetro con APD al 2% y fue llevado a estufa de incubación a 25º C. El inóculo estuvo constituido por un pequeño trozo de micelio con un resto de medio de cultivo que fue extraído con aguja previamente flameada a partir del margen de cada cultivo puro de *R. solani* en crecimiento activo, cuya edad al momento de la inoculación fue de 5 días según la metodología descrita por BAIRD *et al.* (1996).

3.2.2.2.2 Inoculación de los esquejes. Los esquejes de tallo de aproximadamente 7 cm de largo y una hoja, usados para realizar la inoculación fueron extraídos con un bisturí desinfectado en alcohol de 96% a partir de plantas adultas de papa cv Desireé.

Los esquejes fueron previamente lavados en agua corriente durante 30 minutos y luego desinfectados sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio al 10% (solución comercial al 5%) por 2 minutos, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril.

Como se puede observar en la Figura 3, cada uno de los aislamientos fue inoculado, facilitando la penetración del hongo mediante una herida producida en la axila de la hoja con un bisturí previamente flameado, y sobre esta herida se depositó el trozo de micelio de cada aislamiento. Para evitar cualquier contaminación, este procedimiento fue realizado bajo la cámara de flujo laminar.

El ensayo estuvo constituido por 98 aislamientos seleccionados del cepario, además de un aislamiento de AG 3 usado como control positivo (por ser el grupo mas patogénico a papa) y un testigo que fue inoculado con un trozo de APD estéril, según lo indicado por CARLING y LEINER (1990a).

Para dar las condiciones adecuadas de humedad y temperatura, los esquejes inoculados fueron puestos en una cámara húmeda a temperatura ambiente de 25-30 ºC, que corresponde a la temperatura óptima de crecimiento señalada por CARLING y LEINER (1990b), para la mayoría de los AG de *R. solani*.

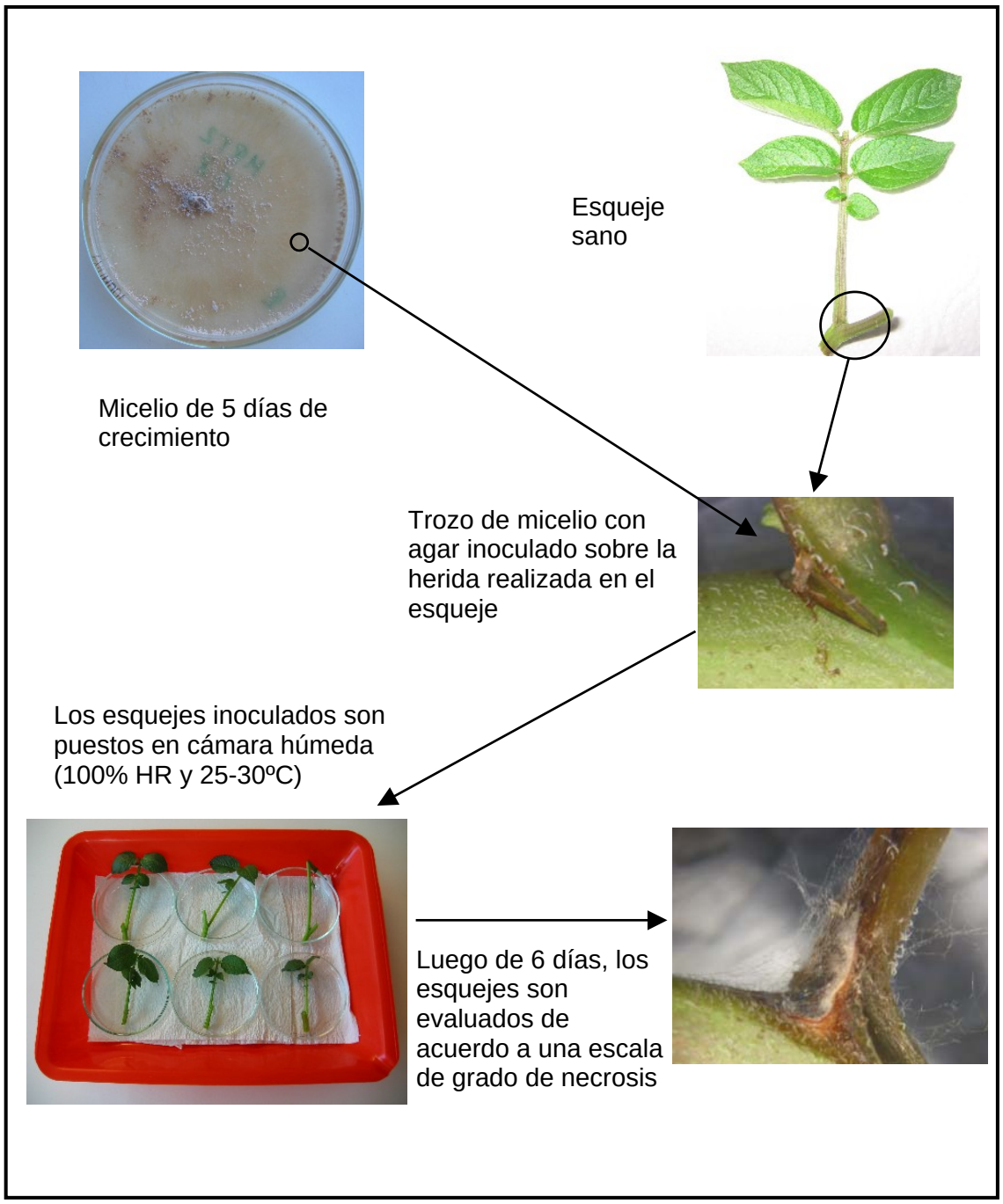

FIGURA 3 Representación esquemática del procedimiento para la inoculación de esquejes.

Se realizaron 6 repeticiones constituidas de un esqueje inoculado para cada uno de los 98 esclerocios de patogenicidad desconocida, además del testigo y el aislamiento de AG 3.

Al cabo de 6 días los esquejes fueron evaluados para observar la presencia de necrosis causada por el patógeno sobre el tejido.

Cada aislamiento fue evaluado de acuerdo al grado de necrosis producido mediante una estimación visual bajo lupa estereoscópica, y clasificado en base a una escala de 0-4, como se detalla en el Cuadro 4.

CUADRO 4. Escala de evaluación para el grado de necrosis.

Grado	Porcentaje de necrosis o pudrición
0	No hay evidencia de necrosis
1	Evidencia de necrosis alrededor del punto de inoculación o hasta 25% del tejido con necrosis o pudrición
2	Sobre 25% o hasta 50% del tejido con necrosis o estrangulamiento del esqueje
3	Sobre 50% o hasta 75% del tejido con necrosis o pudrición y estrangulamiento del esqueje
4	Sobre 75% de necrosis o pudrición completa del esqueje

3.2.3 Análisis de los resultados. Con respecto a la caracterización morfológica de los aislamientos, éstos fueron agrupados en tipos de crecimiento de acuerdo a la coloración del micelio, tipo de crecimiento y características de los esclerocios en medio de cultivo. Fueron caracterizados como *R. solani*, todos aquellos aislamientos que presentaron las características miceliales descritas.

En cuanto a las pruebas de patogenicidad realizadas para los 98 aislamientos escogidos del total de cultivos puros, además de AG 3 y un testigo, los resultados de los grados de necrosis producidos no fueron sometidos a análisis estadísticos por corresponder a una variable categórica. Se consideraron patogénicos aquellos esclerocios que presentaron una mediana de grado de necrosis superior o igual a uno y no patogénicos aquellos en que la mediana fue igual a cero.

En la Figura 4, se observan los diferentes grados de daño producidos por los aislamientos en los cuales se basaron las categorías de la escala de evaluación.

FIGURA 4 Grados de necrosis producidos por los aislamientos. De izquierda a derecha: grado 0, grado 1, grado 2, grado 3, grado 4.

4. PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

En Chile, el SAG (1982), menciona la importancia y amplia distribución de *R. solani* en suelos agrícolas. Sin embargo, la multiplicidad de formas y la complejidad de la especie hacen necesario el estudio de algunas de las características, que pueden ser útiles en la búsqueda de resistencia al patógeno en el germoplasma chileno de papas y de nuevas formas de control.

Las características que diferencian a la especie y los aspectos involucrados en el desarrollo de la enfermedad y el grado en que ésta ocurre, demuestran la variabilidad y complejidad del patógeno al atacar al cultivo.

Con respecto a lo anterior, OGOSHI (1987), señala que las diferencias entre cepas pueden expresarse mediante su apariencia en medios de cultivo, morfología, fisiología o ecología, anastomosis de sus hifas y patogenicidad. Los resultados obtenidos en los ensayos relacionados con las características morfológicas y de patogenicidad de los aislamientos se presentan y discuten a continuación.

4.1 Aislamiento y obtención de cultivos puros.

Se aislaron 750 esclerocios a partir de tubérculos de papa con síntomas evidentes de costra negra y el procedimiento utilizado para obtener cultivos puros, realizado de acuerdo a lo sugerido por SCHNETTLER (1993), resultó efectivo para el aislamiento de este patógeno.

Al igual que los resultados obtenidos por SCHNETTLER (1993), fue posible aislar cultivos puros y mantenerlos en buenas condiciones para realizar las evaluaciones mencionadas en los objetivos.

El método utilizado resultó relativamente simple, con respecto a otras técnicas usadas para el aislamiento a partir del suelo de los campos de cultivo o a partir de partes de la planta infectadas, con el propósito de realizar estudios de patogenicidad o de caracterización morfológica, ya que en estos casos se requieren medios selectivos o modificados con antibióticos y/o funguicidas para privilegiar el crecimiento de *R. solani* sobre otros hongos, bacterias y organismos propios del suelo, además de complicados procesos de desinfección de las plantas.

La desinfección de los tubérculos, previo a la extracción de los esclerocios, además de la acidificación del medio de cultivo con ácido láctico permitió aislar los esclerocios casi sin presencia de contaminantes. Queda clara, entonces, la importancia de la desinfección de los tubérculos con una concentración adecuada de hipoclorito de sodio y la exposición del esclerocio por un tiempo suficiente que asegure la eliminación de microorganismos propios del suelo, preservando únicamente las cepas de *R. solani*. El lavado de los tubérculos antes de la extracción de los esclerocios, disminuye significativamente las posibilidades de contaminación, junto con resaltar la presencia de éstos para evitar confundirlos con restos de suelo.

4.2 Caracterización morfológica de los aislamientos. A partir de tubérculos provenientes de 10 predios ubicados en diversas localidades de la Décima Región se aislaron 750 esclerocios, como muestra el Cuadro 5.

CUADRO 5 Número de tubérculos analizados y esclerocios aislados por predio.

Nº Predio	Agricultor	Cultivar	Nº de Tubérculos	Nº de Esclerocios
1	Gerardo Karachón	Desireé	19	170
2	Guido Klenner	Cardinal	20	104
3	Cirilo Calisto	Desireé	20	93
4	Abel Bahamonde	Desireé	18	87
5	Julián Pérez	Desireé	6	11
6	Semillas SZ	Monalisa	5	5
7	Semillas SZ	Kennebec	4	7
8	Semillas SZ	Asterix	5	6
12	Prosepa	Desireé	20	147
16	Ciro Neumann	Yagana	20	120
	Total		137	750

Como muestra el Cuadro 6, el total de aislamientos presentó las características de las hifas descritas por PARMETER y WHITNEY (1970), que determinan a la especie, confirmándose que el total de cultivos aislados a partir de esclerocios correspondió a *R. solani*.

CUADRO 6 Porcentaje de aislamientos que presentaron las características que determinan a la especie *R. solani.*

Características de las hifas que determinan a la especie	Porcentaje de total de aislamientos que presentaron las características
Ramificación de las hifas en ángulo recto	100%
Constricción de la ramificación	100%
Formación de un septo cerca del punto de origen	100%
Diámetro de las hifas superior a 6 µm	100%
Células multinucleadas	100%
Células monilioides	100%

4.2.1 Características miceliales. Las características que definen a la especie como ramificación en ángulo recto cerca del septo distal de las células de la hifa (1), constricción de la ramificación (2) y formación de un septo en ella, cerca del punto de origen (3), fueron observadas como muestra la Figura 5, en hifas adultas de 6 días, aunque algunas de estas características fueron variables en las zonas de avance de la colonia o cuando el micelio es aún muy joven, como han señalado PARMETER y WHITNEY (1970).

FIGURA 5 Características miceliales de *R. solani*.

4.2.2 Diámetro de hifas. La observación del diámetro de las hifas indicó que todos los aislamientos caracterizados presentaron un diámetro superior a 6 µm en promedio para las tres células medidas, con una variación entre 6-11 µm. Estos resultados coinciden con los obtenidos por CARLING *et al.* (2002) y corresponden con el diámetro superior a 6 µm señalado por PARMETER y WHITNEY (1970) como una característica que define a *R. solani* y permite diferenciarla de otras especies de *Rhizoctonia*.

4.2.3 Células multinucleadas. La tinción nuclear con anilina azul sugerida por HERR (1979) permitió diferenciar células multinucleadas en micelio de crecimiento activo de 4-5 días y debido al gran número de aislamientos, sólo se evaluó la presencia de mas de dos núcleos por célula para las 750 cepas sometidas a caracterización morfológica, lo que coincide con un promedio de 6 núcleos por célula obtenidos por CARLING *et al.* (2002) y por YANG *et al.* (1996), mediante una técnica similar. Los resultados de esta evaluación cumplieron con la característica de células multinucleadas descrita por PARMETER y WHITNEY (1970).

La técnica usada fue útil para la visualización de los núcleos y constituye un método rápido y fácil de aplicar a un gran número de cepas. Tal como fue señalado por HERR (1979), los núcleos se observaron con mayor nitidez en las células jóvenes que constituyen la hifa, como se observa en la Figura 6 y tal como indica el mismo autor, las preparaciones perdieron calidad con el tiempo y a pesar de mantenerse refrigeradas, debieron ser fotografiadas de inmediato.

Como fue indicado por HERR (1979), las hifas son difíciles de mojar, lo que justifica el uso de solución mojante para dar mayor consistencia y facilitar la tinción de los núcleos, aun cuando para muchos aislamientos esta observación fue difícil y debió repetirse varias veces.

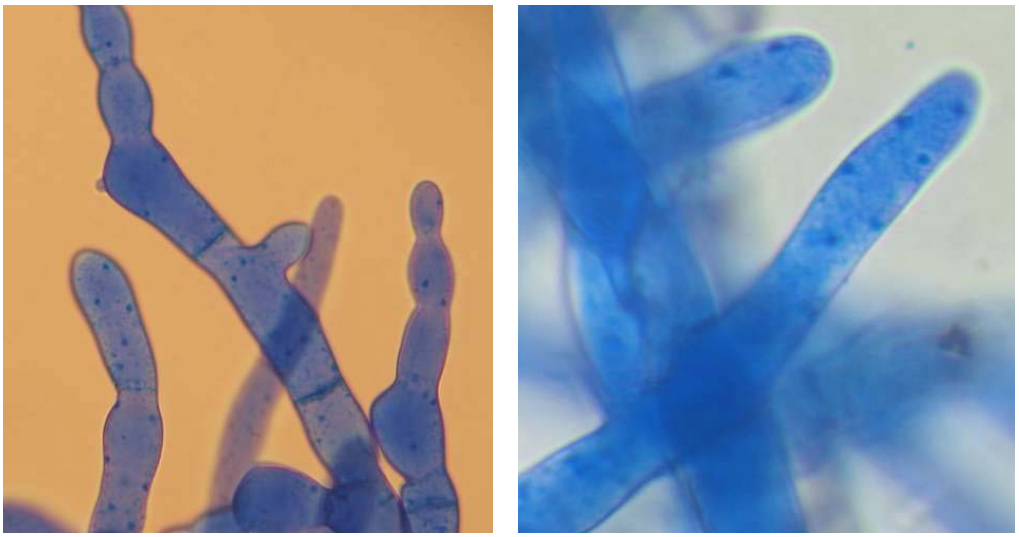

FIGURA 6 Células multinucleadas de *R. solani*

4.2.4 Células monilioides. En todos los aislamientos, previo a la formación de esclerocios se observaron densos agregados de células monilioides de forma de barril (Figura 7), que en la mayoría de los aislamientos se formaron primeramente al centro de la colonia y luego cubrieron toda la superficie del medio de cultivo para constituirse en esclerocios, mientras que en otras cepas se distribuyeron al azar sobre el medio de cultivo.

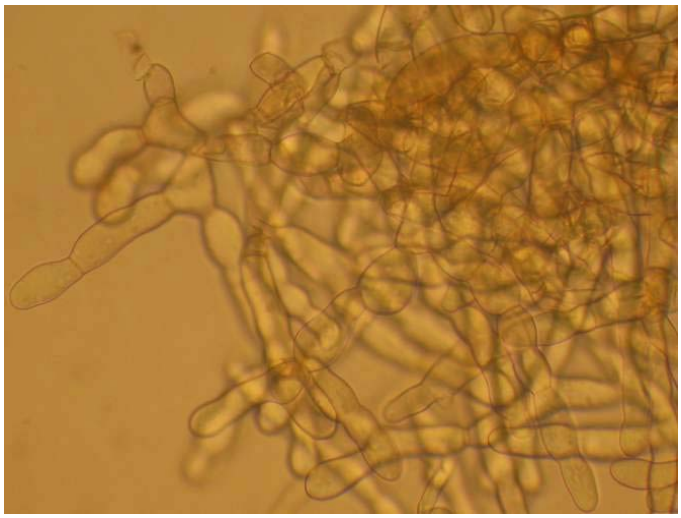

FIGURA 7 Células monilioides de *R. solani.*

4.2.5 Tipo de crecimiento. Dentro de los primeros 3 días de incubación a 25ºC, todos los cultivos presentaron un micelio incoloro, alcanzando alrededor de los 5 a 6 días el borde de la placa con medio de cultivo agar papa dextrosa.

Dentro de la caracterización morfológica, los aislamientos mostraron gran variabilidad en cuanto a su apariencia en medio de cultivo, tal como han observado STEVENS *et al.* (1993), entre aislamientos provenientes de distintos hospederos y BAINS y BISHT (1995), en distintos AGs.

PARMETER y WHITNEY (1970) y KEIJER *et al.* (1996), consideran a *R. solani* como un complejo de hongos morfológicamente similares pero variables en cariotipo, que muestran diferente apariencia y características de crecimiento en medio de cultivo.

Además del color y crecimiento del micelio en medio de cultivo, muchos aislamientos formaron esclerocios de características diferentes, de manera que del total de aislamientos evaluados para estos parámetros, fue posible distinguir cuatro tipos de crecimiento, los cuales se resumen en el Cuadro 7 y se describen posteriormente.

CUADRO 7 Características de los tipos de crecimiento.

Tipo de Crecimiento	Color del micelio	Tipo de crecimiento del micelio	Color y forma de los esclerocios
1	Café	Micelio adherido al medio de cultivo	Esclerocios de color café, formas indefinidas, en aglomerados y sobre el agar
2	Café rojizo	Micelio más abundante que el tipo 1 y adherido al medio de cultivo	Esclerocios de color café rojizo, pequeño tamaño, individuales e inmersos en el agar
3	Amarillo claro (casi blanco)	Micelio aéreo muy abundante	Escasa o nula formación de esclerocios, tamaño muy pequeño y color café muy oscuro, individuales e inmersos en el agar
4	Amarillo claro (casi blanco)	Micelio aéreo muy abundante	Escasa formación de esclerocios, de color casi negro y pequeño tamaño, individuales e inmersos en el agar

4.2.5.1 Crecimiento tipo 1. Este tipo de crecimiento se observó para 735 de los aislamientos de *R. solani* evaluados en este estudio lo que constituyó el 98% y se encontró en aislamientos provenientes de diversos predios (Cuadro 8).

Aproximadamente luego de 4-5 días de cultivo, los aislamientos caracterizados dentro de este tipo adquirieron un tono amarillo, transformándose después de 6-7 días en hifas adultas con diversas tonalidades de color café, que crecieron adheridas al medio de cultivo, tal como mencionan CASTRO *et al.* (1983), STEVENS *et al.* (1993) y BAINS y BISHT (1995), quienes observaron estas características en varias cepas de AG 3 obtenidas de plantas de papa.

Este tipo de crecimiento también fue observado en la cepa de AG 3 utilizada en esta investigación, pero no se puede afirmar que los aislamientos caracterizados dentro de este tipo pertenezcan a AG 3, ya que BAIRD *et al.*

(1996), observaron similares características en cepas de AG 7, además de YANG *et al.* (1996), quienes las mencionan para cepas de AG 9, CARLING *et al.* (1994) para AG 11, y CARLING *et al.* (1999) para AG 12, por lo tanto, este tipo de crecimiento, no sería único para cepas de AG 3.

Como se observa en la Figura 8, a los 15 días, los aislamientos caracterizados dentro de este tipo han adquirido una coloración café con abundante producción de esclerocios del mismo color.

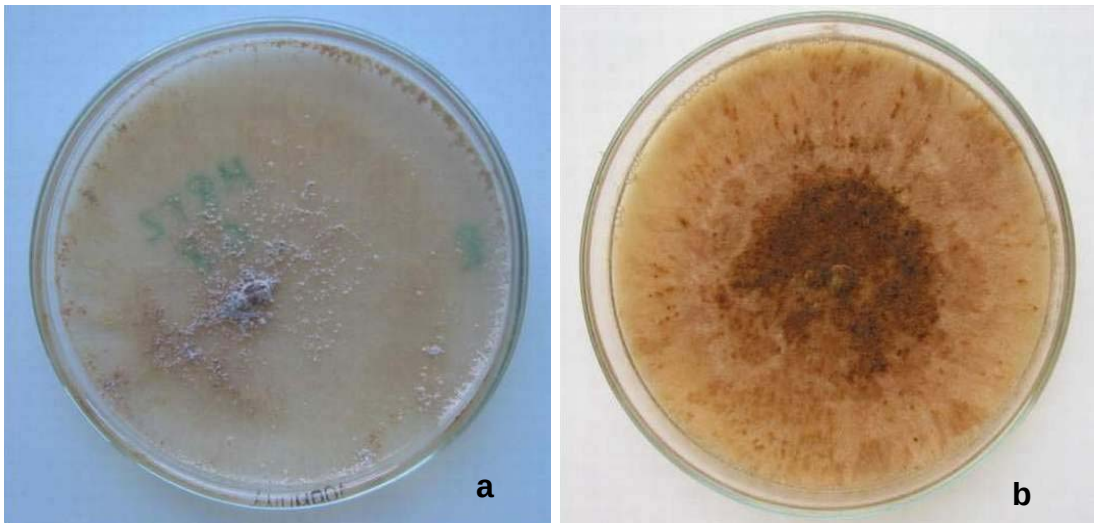

FIGURA 8 Crecimiento tipo 1 en medio de cultivo APD.

a) micelio de 5 días, b) micelio de 15 días.

Los aislamientos correspondientes a este grupo, formaron abundantes esclerocios de color café y diversas formas, que crecieron sobre el medio de cultivo. Este tipo de esclerocios fue observado para la mayoría de los aislamientos de *R. solani*, junto con la cepa de AG 3 usada como control positivo en esta investigación. Estas características han sido descritas para AG 3 por BAINS y BISHT (1995) y para AG 7 por BAIRD *et al.* (1996), YANG *et al.* (1996), señalan además que estos esclerocios pueden alcanzar un diámetro superior a 2 mm.

Los esclerocios comenzaron a formarse a partir del punto de inoculación aproximadamente luego de 7 días, para distribuirse por toda la superficie del medio de cultivo en forma individual o en agregados cubriendo incluso varios milímetros, lo que fue observado por YANG *et al.* (1996) y CARLING *et al.* (2002), en cepas de varios grupos de anastomosis.

CARLING *et al.* (2002), señalan que los esclerocios se forman por una condensación del micelio, y que durante el inicio del crecimiento, éstos presentan una coloración hialina a blanco amarillento y pequeño tamaño pero posteriormente adquieren un color café oscuro, sin formas definidas y por lo general en agregados, como se muestra en la Figura 9. Cabe señalar que muchas veces los esclerocios se forman sobre los anillos de micelio de color oscuro que forman algunos aislamientos.

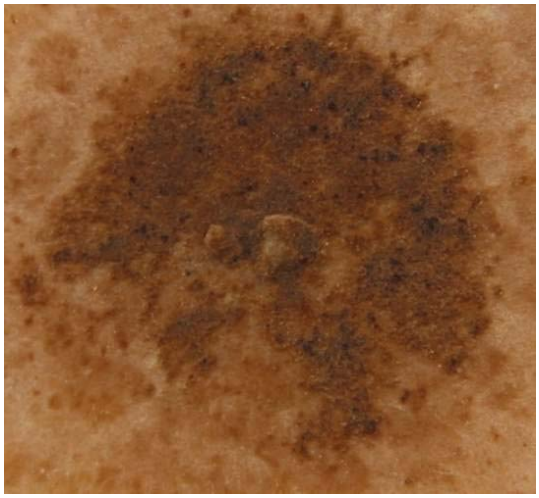

FIGURA 9 Formación de esclerocios en tipo de crecimiento 1.

4.2.5.2 Crecimiento tipo 2. Cinco aislamientos provenientes del predio 7, que constituyeron el 0,5% del total, se caracterizaron dentro de este tipo y como muestra la Figura 10, estas cepas formaron un micelio aéreo más abundante que en el tipo 1, incoloro al principio, pero que luego fue adquiriendo un color amarillo y por último un color café rojizo.

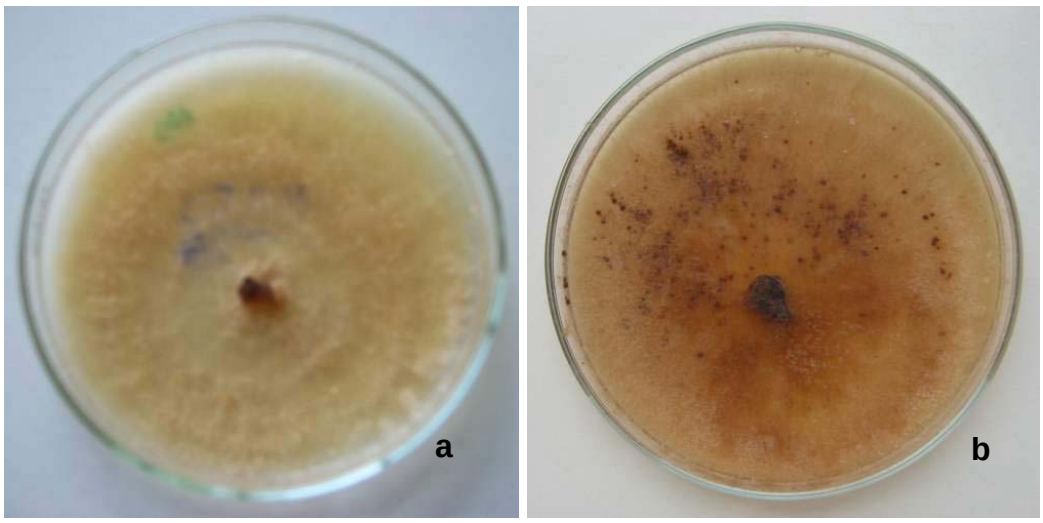

FIGURA 10 Crecimiento tipo 2 en medio de cultivo APD.

a) micelio de 5 días, b) micelio de 15 días.

Este tipo de crecimiento se diferenció del tipo 1 principalmente por las características de sus esclerocios, ya que se formaron en menor cantidad que en el Tipo 1 y fueron de color café rojizo y pequeño tamaño (1 mm), como muestra la Figura 11, se distribuyeron individualmente e inmersos en el medio de cultivo, tal como observaron CARLING *et al.* (1999) en cepas de AG 12, señalando que a veces formaron agregados.

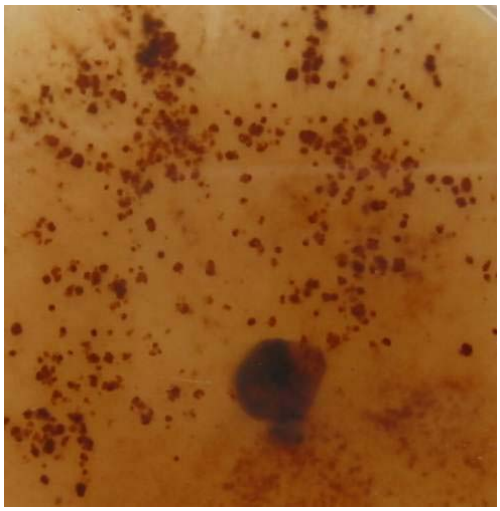

FIGURA 11 Formación de esclerocios en tipo de crecimiento 2.

4.2.5.3 Crecimiento tipo 3. Este tipo de crecimiento se observó en 6 aislamientos provenientes de los predios 6, 7 y 8, lo que corresponde a un 0,8% del total de esclerocios aislados (Cuadro 7). Estas cepas produjeron abundante micelio aéreo de color casi blanco, más claro que los tipos 1 y 2, características muy similares a las descritas por O´SULLIVAN y KAVANAGH (1991) para AG 2 y AG 5. BAIRD *et al.* (1996), las observaron en AG 4 y BAINS y BISHT (1995), en AG 5, haciendo referencia sólo al color claro y no a un micelio aéreo abundante. Al mismo tiempo, CARLING *et al.* (1994), describieron este tipo de crecimiento en cepas de AG 11.

A medida que los cultivos maduraron, el micelio comenzó a adherirse al medio de cultivo, tal como lo señalado por CARLING *et al.* (1999), en aislamientos de AG 12.

Como se observa en la Figura 12, éstas características se mantuvieron por más de 15 días, observándose una pequeña coloración café oscura en el centro de la placa.

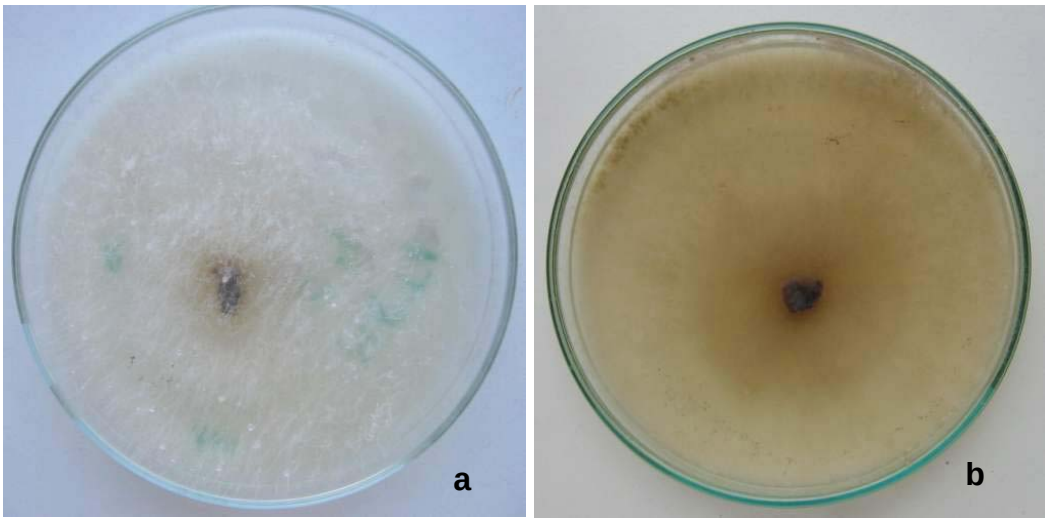

FIGURA 12 Crecimiento tipo 3 en medio de cultivo APD.
a) micelio de 5 días, b) micelio de 15 días.

Al contrario de lo observado en los demás tipos de crecimiento, estos aislamientos presentaron escasa o nula formación de esclerocios, tal como observaron BAINS y BISHT (1995), en cepas de AG 5 y CARLING *et al.* (1999), en aislamientos de AG 12. Algunos esclerocios se formaron mucho tiempo después que en los otros tipos, con un tamaño muy reducido y color oscuro, además de crecer en forma individual, principalmente en los bordes de la placa.

4.2.5.4 Crecimiento tipo 4. Este tipo de crecimiento se observó en 5 cepas provenientes de los predios 6 y 8, lo que corresponde al 0,7% del total de aislamientos caracterizados. Como muestra la Figura 13, al igual que en el Tipo 3, se observó formación de abundante micelio aéreo de color claro (casi blanco), que mantuvo este color por mas de 20 días, tal como lo observado por CARLING *et al.* (2002), en aislamientos de AG 13, quienes a diferencia de nuestros resultados, señalan que el micelio mostró posteriormente una tonalidad café oscuro. El tipo de esclerocios formados permitió diferenciar estos aislamientos del tipo de crecimiento 3 ya que las características del micelio fueron muy similares.

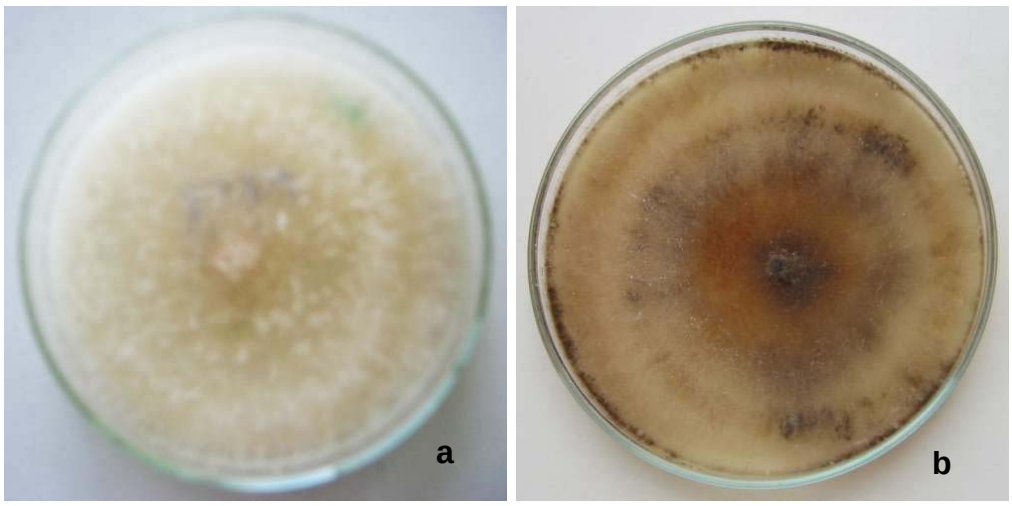

FIGURA 13 Crecimiento tipo 4 en medio de cultivo APD.
a) micelio de 5 días, b) micelio de 15 días.

Como muestra la Figura 14, éstos aislamientos mostraron escasa formación de esclerocios, de pequeño tamaño (menor a 1 mm), color café muy oscuro (casi negro) y que crecieron en forma individual, inmersos en el agar y sin presencia de exudado, similar a lo observado por BAIRD *et al*. (1996).

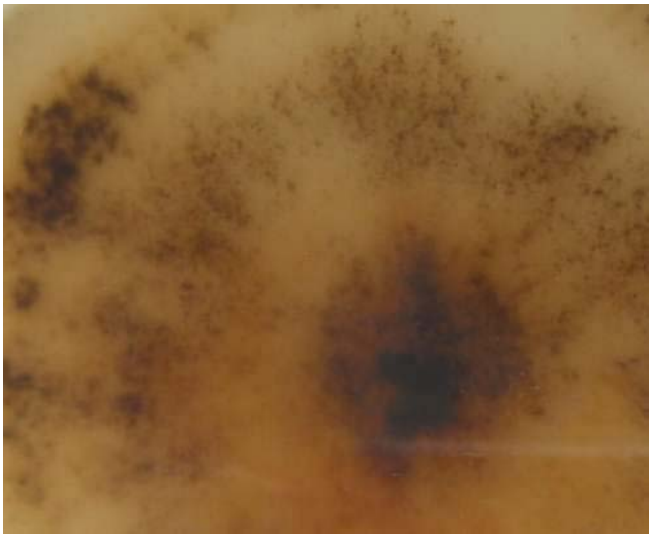

FIGURA 14 Formación de esclerocios en tipo de crecimiento 4.

Como se puede observar en las respectivas figuras, las cepas caracterizadas dentro de los tipos 3 y 4 mantuvieron un micelio de color claro por mas de 15 días, al contrario de lo sucedido para los aislamientos 1 y 2, cuyos micelios habían adquirido un color café al cabo de este tiempo.

Las cepas correspondientes al tipo de crecimiento 1, que constituyeron un alto porcentaje de los aislamientos analizados en esta investigación, formaron esclerocios en la superficie y un menor número de cepas que se caracterizaron dentro de los tipos de crecimiento 2, 3 y 4 exhibieron esclerocios de pequeño tamaño e inmersos en el medio de cultivo, tal como lo observado por CARLING *et al.* (2002).

Es importante señalar que las características de crecimiento, coloración del micelio y formación de esclerocios no permiten diferenciar entre grupos de anastomosis, ya que según señalan diversos investigadores, las diferentes características se pueden encontrar simultáneamente en varios grupos.

Muchos de los aislamientos formaron anillos concéntricos de micelio claro y oscuro sobre el agar, aparentemente en los primeros estados de crecimiento, pero posteriormente tendieron a desaparecer como confirman CARLING *et al.* (1994), o formaron esclerocios sobre el micelio de color oscuro, tal como muestra la Figura 15. Estos anillos concéntricos también fueron observados por YANG *et al.* (1996), en cepas de AG 9, mientras que CARLING *et al.* (1999), las menciona en aislamientos de AG 12 y CARLING *et al.* (2002), en cepas de AG 13, por lo tanto se puede asumir que esta no es una característica propia de un grupo de cepas, ya que fue observada en muchas de ellas, incluso en la cepa de AG 3 incluida en esta investigación.

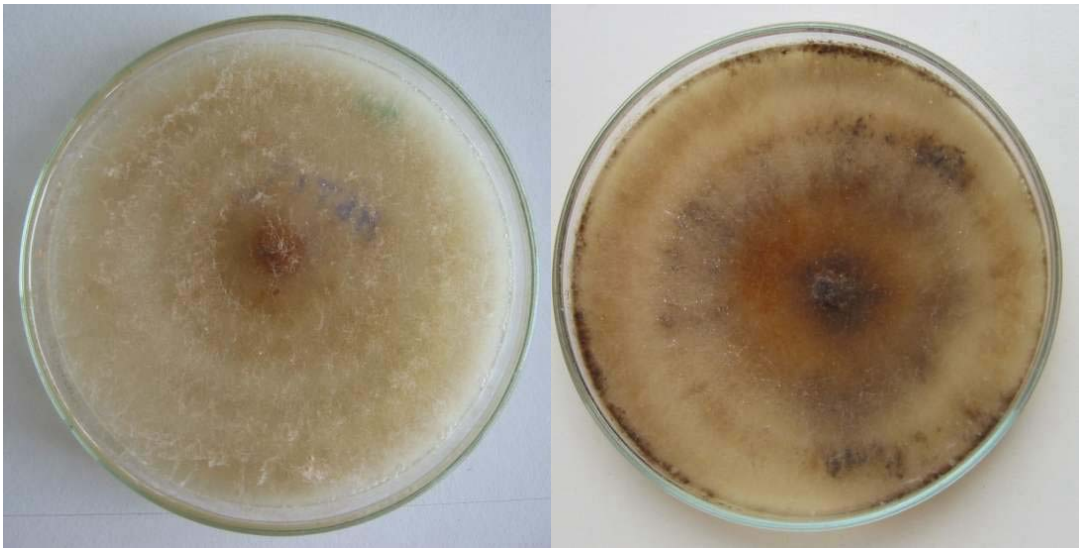

FIGURA 15 Anillos concéntricos formados por algunos aislamientos en medio de cultivo APD.

CUADRO 8 Número y porcentaje de cepas de *R. solani* caracterizadas para cada tipo de crecimiento.

Tipo de crecimiento	Nº de cepas aisladas	% del total de aislamientos
1	734	98%
2	5	0,7%
3	6	0,8%
4	5	0,7%
Total	750	100%

Los resultados con respecto a la apariencia de los aislamientos en medio de cultivo demuestran que existe variabilidad entre las cepas de *R. solani* analizadas, diferencias que concuerdan con lo señalado anteriormente por PARMETER y WHITNEY (1970), y han hecho que muchos investigadores como OGOSHI (1987), CASTRO (1989) y CARLING y LEINER (1990a), entre otros, hayan agrupado las variantes de acuerdo a grupos de anastomosis.

Aun cuando no se realizaron pruebas de anastomosis a las cepas estudiadas, es posible que la mayoría de ellas corresponda a AG 3, ya que en Chile se conoce como el grupo mas patogénico y distribuido en el cultivo de la papa y estudios como los realizados por DELGADO *et al*.(2003) y CASTRO *et al*. (2003), mencionan sólo la existencia este grupo de anastomosis en aislamientos provenientes de esclerocios en la X Región. Sin embargo, ANDRADE y GUTIERREZ (1990), determinaron la presencia de AG 3 y AG 4 en aislamientos provenientes de plantas de papa en el sur de Chile.

A pesar de las diferencias encontradas en cuanto a la apariencia de los aislamientos en medio de cultivo, las características y el diámetro de las hifas, además del número de núcleos por célula, permitieron clasificar a los 750 aislamientos dentro de los rangos descritos previamente por PARMETER y WHITNEY (1970), CARLING *et al.* (1987) y OGOSHI (1987) para *R. solani*.

El Cuadro 9 indica que a partir de la mayoría de los predios se aislaron cepas con tipo de crecimiento 1 y que los tipos de crecimiento 2, 3 y 4 fueron obtenidos de tubérculos de los cultivares Monalisa, Kennebec y Asterix, los cuales han sido introducidos recientemente y no son cultivados en gran cantidad en la zona sur de nuestro país. Se puede indicar, por lo tanto, que existe una relación entre el cultivar de papa y el tipo de cepa que se desarrolla mejor en ella y que algunos aislamientos de características particulares se desarrollan mejor en determinados cultivares.

CUADRO 9 Tipos de crecimiento caracterizados en los distintos predios.

Predio	Localidad	Variedad de papa	Tipos de crecimiento			
			1	2	3	4
1	Los Muermos	Desireé	X			
2	Los Muermos	Cardinal	X			
3	Los Muermos	Desireé	X			
4	Los Muermos	Desireé	X			
5	Los Muermos	Desirée	X			
6	Casma	Monalisa	X		X	X
7	Macal	Kennebec		X	X	
8	Colegual	Asterix	X		X	X
12	Loncotoro	Desireé	X			
16	La Paloma	Yagana	X			

MORDUE *et al.* (1996), agregan que la producción de esclerocios es muy variable y a veces está relacionada con los grupos de anastomosis o con la patogenicidad en terreno, y que es de gran importancia la diferente habilidad de los aislamientos para producir esclerocios, el inóculo proveniente del suelo o del tubérculo y la sobrevivencia de aquellos aislamientos saprófitos.

Diferencias en los tipos de crecimiento y patogenicidad que se describirán mas adelante sugieren que podría tratarse de distintos grupos de anastomosis o subgrupos dentro de ellos, como fue observado por STEVENS *et al.* (1993). A este respecto, CASTRO *et al.* (1983) y CARLING (1996), señalan que las agrupaciones de *R. solani* no siempre están asociadas a diferencias de patogenicidad o anastomosis, sino también a diferencias morfológicas y otras propiedades físicas de las colonias. YANG *et al.* (1996), agregan que dentro de un mismo grupo de anastomosis se pueden encontrar diferentes características culturales y de patogenicidad con respecto a determinados hospederos y BAIRD *et al.* (1996), mencionan, además, variaciones en la velocidad de crecimiento de diferentes AGs y entre cepas de un mismo AG.

SWEETINGHAM *et al.* (1986), separaron aislamientos de *R. solani* de acuerdo a diferencias bioquímicas como patrones de zimogramas pécticos, demostrando que aislamientos con características culturales y patogénicas similares, corresponden con las agrupaciones basadas en marcadores RAPD. Resultados similares obtenidos por BALALI *et al.* (1995), sugieren una relación de los grupos de zimogramas con la morfología de los esclerocios en los tubérculos y con los síntomas producidos. MORDUE *et al.* (1996), agregan que los distintos AGs varían en cuanto a su sensibilidad a los fungicidas, crecimiento, zonación y producción de esclerocios y pigmentos.

Los mismos autores indican que la caracterización *in vitro* se refleja funcionalmente en diferencias de patogenicidad y al mismo tiempo, las diferencias de patogenicidad sugieren propiedades funcionales para caracterización.

Cualquier estudio que involucre características morfológicas de *R. solani* debe tener en cuenta la influencia del medio de cultivo, temperatura de incubación, luz y otras condiciones ambientales y a pesar de que las características morfológicas y citológicas que PARMETER y WHITNEY (1970),

describen para esta especie tienen una base genética, SNEH *et al.* (1991), agregan que muchas de ellas tienen una significancia funcional por la variabilidad genética entre los distintos aislamientos.

Las diferencias morfológicas con respecto a las características del micelio y a los diferentes tipos de esclerocios que los aislamientos exhibieron en medios de cultivo, si bien, no son suficientes para diferenciar entre grupos de anastomosis, indican que es posible encontrar cepas distintas (AGs o subgrupos) de *R. solani* en una misma zona geográfica o incluso en un mismo tubérculo, lo que demuestra la gran variabilidad genética de esta especie. Estas pruebas preliminares justifican la realización de pruebas de anastomosis, además del estudio de la patogenicidad en condiciones *in vitro* y en terreno. En este sentido, BAIRD *et al.* (1996), concuerdan en que el estudio de las características de los cultivos es de gran valor en la diferenciación previa de los diferentes grupos dentro de la especie y señalan la necesidad de confirmar mediante pruebas de anastomosis o pruebas moleculares si estas diferencias se deben a una distinta composición genética.

4.3 Pruebas de patogenicidad *in vitro*.

Según AGRIOS (1995), una prueba de patogenicidad consiste en aplicar inóculo en alguna de sus formas al hospedero, de manera de inducir los síntomas de la enfermedad en forma completa o al menos parcial tal como se observó en este ensayo.

SCHNETTLER (1993), confirma que para comprobar la patogenicidad de los aislamientos es necesario inocular tejido sano de plantas de papa con el patógeno y son muchas las formas descritas para llevar a cabo estas pruebas. Varias metodologías descritas por JAGER *et al*. (1982), HAYGOOD y MARTIN (1990), CARLING y LEINER (1990a), LEACH y WEBB (1993), STEVENS *et al*.

(1993) y BAINST y BISHT (1995), realizan aplicaciones directas de micelio sobre tubérculos brotados o a plántulas de diversas especies.

YANG *et al*. (1996), KHANGURA *et al*. (1999) y CARLING *et al.* (2002), indican el uso de granos de cereales como medio de transporte y NELSON *et al*. (1996) y WINDELS *et al*. (1997), mencionan una técnica que consiste en depositar una capa de medio de cultivo con micelio del patógeno entre dos capas de suelo, depositando semillas en la superficie para verificar la patogenicidad. O'SULLIVAN y KAVANAGH (1991) describen el uso de inóculo líquido mezclado con el sustrato donde se depositan semillas, plántulas o tubérculos. Por último, BETANCOURT (1996), asoció la cantidad de la fitotoxina producida por *R. solani* AG 3, patogénico a papa con una mayor o menor capacidad para producir enfermedad.

Para las pruebas de patogenicidad *in vitro* realizadas en esta investigación se depositó inóculo directamente sobre el tejido sano de esquejes de tallo de plantas de papa cv. Desirée en condiciones de alta humedad y temperatura de manera de inducir los síntomas causados por *R. solani*. Del total de esclerocios de *R. solani* aislados, se escogieron 98 de ellos, lo que constituyó un 13% del total, además de una cepa de AG 3 y un testigo inoculado sólo con APD estéril.

Cabe señalar que el tipo de inóculo y las condiciones ambientales no necesariamente representan las condiciones naturales de suelo, pero resultó una metodología fácil de implementar, asegurando un rápido crecimiento del hongo sobre el tejido, lo que le permitió infectar e inducir el daño característico. Aun cuando esta forma de inoculación es útil para ser usada en laboratorio, no lo sería para un gran número de plantas o en ensayos de terreno, ya que resultaría engorroso y expondría al patógeno a un estrés significativo al cambiar bruscamente sus condiciones de desarrollo, poniendo en riesgo su sobrevivencia y potencial patogénico durante el ensayo.

No existen reportes a cerca de la inoculación de esquejes, por lo que sería aconsejable el uso de pruebas adicionales que confirmaran la virulencia del hongo en plantas de papa. En este caso se podrían usar tubérculos sanos en condiciones ambientales similares a las que ocurren en suelos de la X Región, de manera de posibilitar el ataque del patógeno a los brotes emergentes, por ser ésta la etapa en que el cultivo es mayormente afectado.

4.3.1 Grados de patogenicidad. El grado de patogenicidad de las cepas de *R. solani* se midió en una escala de 0 a 4 y cada uno de estos valores expresa un porcentaje de necrosis producido a los esquejes. Categorías similares de necrosis fueron usadas por STEVENS *et al*. (1993) y EL BAKALI *et al.* (2000), concluyendo sobre la importancia que reviste el esclerocio en la producción de necrosis y el posterior estrangulamiento de las plántulas.

El número de aislamientos que causó cada uno de los grados de necrosis se resume en el Cuadro 10, donde se observa que 31 aislamientos produjeron el grado mas alto, seguido por los grados de necrosis 2 y 3, que no mostraron gran diferencia en cuanto al número de aislamientos capaces de producir cada uno de ellos. Un pequeño número de cepas produjo un grado de daño 1 y por último, seis aislamientos presentaron grado cero de necrosis, al igual que el testigo inoculado con APD estéril.

CUADRO 10 Resumen de aislamientos para cada grado de daño.

	Grado de necrosis de acuerdo a la escala					
	0	1	2	3	4	Total
Nº de Aislamientos	6	15	24	22	31	98

A pesar de las diferencias observadas en los niveles de necrosis producidos por los aislamientos, éstos no fueron agrupados según los grados de daño que son capaces de inducir y sólo se caracterizaron cepas patogénicas y no patogénicas dentro del total de aislamientos evaluados.

Debido a que el grado de patogenicidad es una variable discreta, se usó la mediana como medida de tendencia central para comparar los niveles de daño de las repeticiones y separar entre cepas patogénicas y no patogénicas. Se consideraron patogénicos aquellos aislamientos que obtuvieron una mediana de grado de patogenicidad mayor o igual a uno, entre las 6 repeticiones inoculadas. Del mismo modo los aislamientos con una mediana igual a cero se caracterizaron como no patogénicos y los resultados de las pruebas de patogenicidad se expresaron como porcentaje del total de aislamientos, como se indica en la Figura 16.

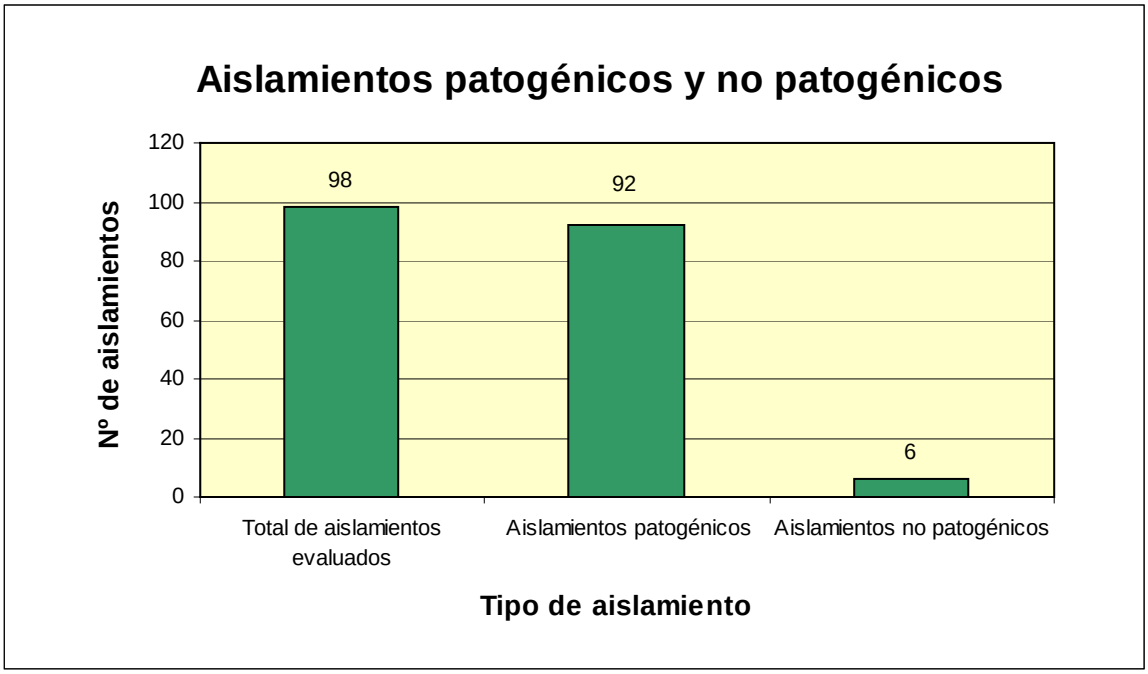

FIGURA 16 Número de aislamientos patogénicos y no patogénicos del total de aislamientos evaluados.

Del total de 98 aislamientos inoculados, 92 de ellos fueron capaces de producir síntomas necróticos en los esquejes, obteniendo valores de grado de necrosis que fluctuaron entre 1 y 4, es decir, desde necrosis alrededor del punto de inoculación hasta causar la muerte total del esqueje sano en condiciones de cámara húmeda.

CUADRO 11 Porcentaje de aislamientos patogénicos y no patogénicos obtenidos en cada predio.

Predio	Cultivar	Total de Aislamientos evaluados	% Aislamientos patogénicos	% Aislamientos no patogénicos
1	Desireé	15	100%	0%
2	Cardinal	9	100%	0%
3	Desireé	9	100%	0%
4	Desireé	11	90,9%	9,1%
5	Desireé	10	80%	20%
6	Monalisa	5	100%	0%
7	Kennebec	8	75%	25%
8	Asterix	6	83%	17%
12	Desireé	15	100%	0%
16	Yagana	10	100%	0%

El Cuadro 11 y la Figura 17, muestran que a partir de la mayoría de los predios se aislaron principalmente esclerocios patogénicos y sólo en cuatro predios fue posible encontrar aislamientos no patogénicos, lo que confirma la importancia de la presencia de esclerocios sobre los tubérculos en la diseminación de la enfermedad.

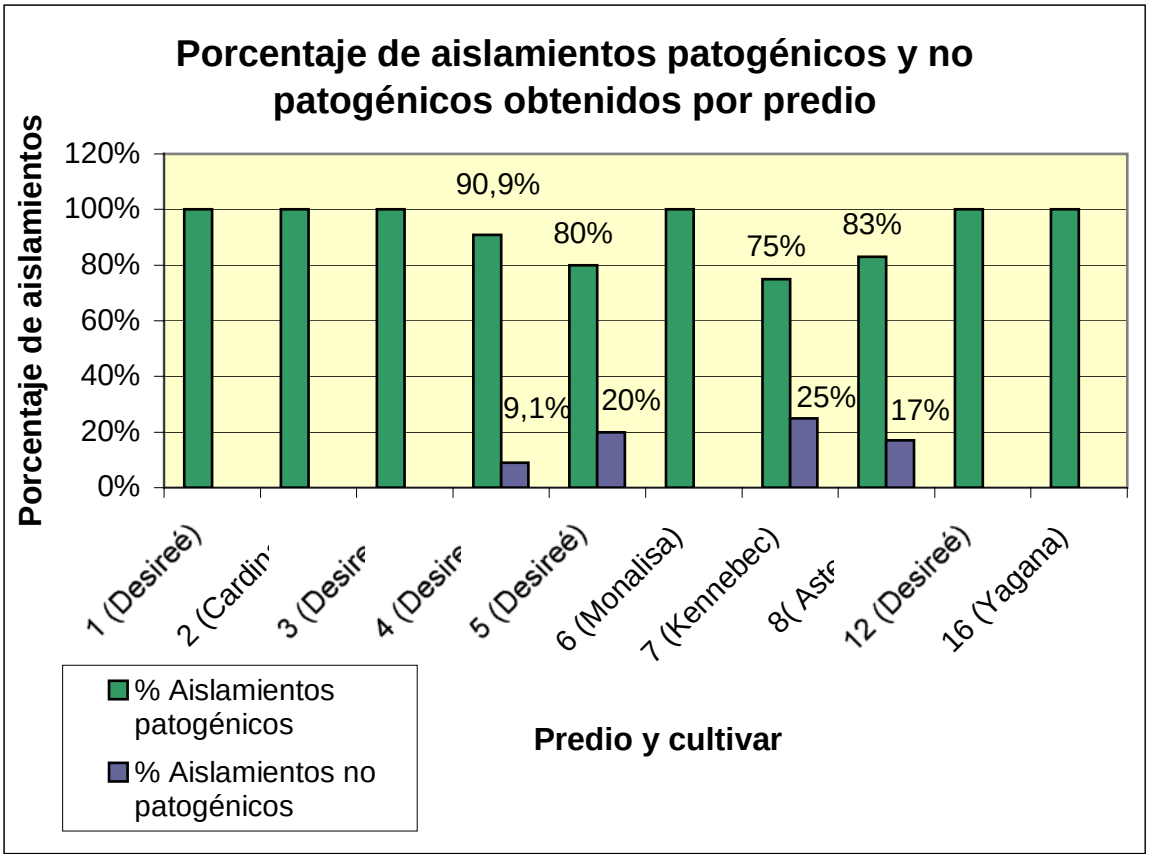

FIGURA 17 Porcentaje de aislamientos patogénicos y no patogénicos obtenidos por predio.

Los resultados de esta evaluación muestran un alto porcentaje de aislamientos patogénicos, capaces de producir síntomas necróticos en el tejido sano. La importancia del inóculo proveniente del tubérculo semilla en forma de esclerocios también ha sido reportada por autores como FRANK y LEACH (1980), HIDE y CAYLEY (1982), WEINHOLD *et al.* (1982), MULDER y ROOSJEN (1984), CARLING *et al.* (1989), ADAMS (1996) y LOOTSMA y SCHOLTE (1996) y agregan la importancia del inóculo del suelo para el inicio de la rizoctoniasis en el cultivo y concuerdan en que la presencia de esclerocios sobre la superficie de los tubérculos constituye una fuente primaria de infección.

HIDE y HORROCKS (1994), indican que el cáncer de tallos y estolones es causado por inóculo presente en tubérculos y por el que sobrevive en el suelo, siendo una de las causas de fallas en la emergencia. CARLING *et al.* (1989) y PLATT *et al.* (1993), demostraron que la semilla infectada con *R. solani* afecta la emergencia de las plantas ya que el patógeno ataca los brotes emergentes, por lo que el estudio de estos tipos de inóculo permitiría orientar hacia un mejor control de la enfermedad.

A pesar de que los esclerocios sobre tubérculos se consideran la fase no patogénica de la enfermedad, los resultados demuestran que frente a condiciones de temperatura y humedad adecuadas, pueden germinar, formando un micelio capaz de invadir el tejido de la planta y producir síntomas necróticos.

Las observaciones de HILL y ANDERSON (1989), CARLIING *et al*. (1998) y EL BAKALI *et al*. (2000), muestran que los aislamientos provenientes de esclerocios constituyen el grupo más virulento, junto con aquellos extraídos de estolones e himenio, mientras que aislamientos provenientes de tallos, muestran una virulencia intermedia.

Estudios citados por HILL y ANDERSON (1989) y FRANK y LEACH (1980), concuerdan en que la patogenicidad de los esclerocios es muy similar a la que exhiben los aislamientos obtenidos de etapas patogénicas. Pero otros reportes indican que la mayoría de los aislamientos provenientes de esclerocios tienen baja patogenicidad (Sanford, 1937, Sanford, 1938 y Person, 1945; citados por HILL y ANDERSON, 1989).

Al igual que los estudios citados, el aislamiento de este patógeno a partir de esclerocios permitió comprobar la capacidad patogénica de los esclerocios de *R. solani* y su importancia en el cultivo de papa en la zona sur de Chile.

Teniendo en cuenta la patogenicidad observada en los aislamientos, queda claro que la sobrevivencia del patógeno en el tejido del hospedero puede

significar una importante reserva de inóculo para la siguiente temporada de cultivo, tal como confirman BAIRD *et al.* (1996).

Los esquejes de plantas adultas utilizados en este ensayo poseen una epidermis mas gruesa y resistente a la acción de enzimas y toxinas producidas por *R. solani,* razón por la cual se facilitó la entrada del patógeno mediante heridas en el punto de inoculación. Por este motivo, los resultados podrían no mantenerse en terreno y sería necesario realizar evaluaciones posteriores bajo otras condiciones experimentales, inoculando tejido joven.

La humedad y temperatura fomentaron un rápido crecimiento del micelio sobre el tejido, el cual mostró síntomas a los 6 días, dificultándose incluso la observación del límite de la zona de necrosis. Por esa razón sólo se consideró la producción de necrosis y tejido blando en el tallo y a pesar de desarrollarse micelio también sobre las hojas del esqueje, esto no se consideró como necrosis ya que el testigo presentó la misma característica.

Los resultados muestran que los esclerocios evaluados varían en patogenicidad y fue posible visualizar diferencias entre los grados de necrosis que los aislamientos fueron capaces de producir, manifestando síntomas en distintos grados.

Al momento de la evaluación, al cabo de 6 días de inoculados, algunos esquejes presentaron poco desarrollo de micelio y se observaron lesiones necróticas sólo alrededor del punto de inoculación o algunas que cubrieron hasta un 25% del tejido, por lo que fueron clasificadas dentro del grado 1 de necrosis (Figura 18).

FIGURA 18 Necrosis grado 1.

Algunas cepas fueron capaces de inducir lesiones de mayor tamaño, que abarcaron hasta un 50% del esqueje o produjeron pardeamiento, ablandamiento y estrangulamiento en la base de éste. Estos aislamientos fueron clasificados dentro del grado de necrosis 2 y los síntomas se pueden observar en la Figura 19.

FIGURA 19 Necrosis grado 2.

La Figura 20, muestra los síntomas observados en muchas cepas que causaron pudrición, ablandamiento y estrangulamiento del tejido, alcanzando hasta un 75 % del esqueje, por lo que fueron clasificadas dentro del grado 3 de necrosis en la escala de evaluación.

FIGURA 20 Necrosis grado 3.

La mayoría de los aislamientos presentó alta patogenicidad, observándose un grado de necrosis 4, con lesiones que cubrieron sobre un 75% del tejido o hasta la totalidad del esqueje como muestra la Figura 21, presentando un tejido de aspecto blando y acuoso, que se desintegra fácilmente.

FIGURA 21 Necrosis grado 4.

4.3.2 Desarrollo de la enfermedad y sintomatología. Aunque el ataque de este organismo ocurra en condiciones favorables, WEINHOLD *et al.* (1969), exponen que para que ocurra infección, el propágulo del hongo debe germinar, las hifas deben crecer en dirección del hospedero, formar estructuras de infección, penetrar la epidermis y establecerse dentro del mismo. La Figura 22 muestra una primera etapa del crecimiento del micelio de *R. solani* sobre el tejido sano de los esquejes.

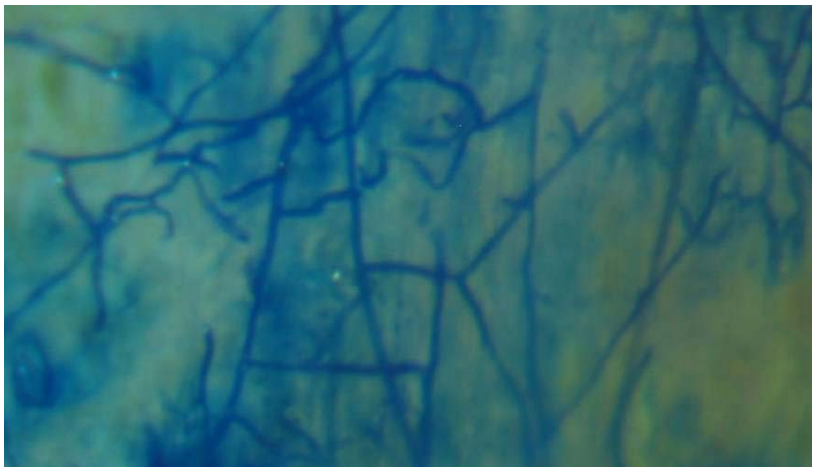

FIGURA 22 Crecimiento de micelio sobre el tejido del esqueje.

JEGER *et al.* (1996), señalan que durante la etapa de colonización mientras que no se han formado estructuras de infección, el hospedero permanece sin síntomas. Los primeros pasos de la infección comienzan por una diferenciación de las puntas de las hifas en ramificaciones en forma de T que se transforman en cojinetes de infección sobre el tejido, a partir de los cuales surgen delgadas hifas de infección que penetran el tejido de la planta.

Al cabo de 3 a 4 días de inoculados, los esquejes presentaron lesiones necróticas de color café y de pequeño tamaño, inicialmente alrededor del punto de inoculación (Figura 23), tal como comienzan a manifestarse los síntomas descritos por KHANGURA *et al.* (1999), para algunos aislamientos patogénicos.

FIGURA 23 Necrosis alrededor del punto de inoculación.

Posteriormente el micelio creció en forma abundante a lo largo del esqueje y en los casos más severos, éste resultó con una pudrición completa, de aspecto blando y acuoso de color café, al final del periodo de incubación, como se observa en la Figura 24.

FIGURA 24 Abundante crecimiento de micelio sobre el tejido del esqueje.

Los síntomas producidos mostraron una variación desde un tono amarillo hasta un color café cuando se produjo la pudrición total, BETANCOURT (1996), explica que estas diferencias se deben a que el micelio de *R. solani* en crecimiento activo puede producir diferentes toxinas. Esto tiene sentido ya que en muchos aislamientos, al momento de la evaluación el micelio ya había invadido todo el esqueje, formando incluso esclerocios sobre el tejido muerto como muestra la Figura 25.

FIGURA 25 Formación de esclerocios sobre el tejido afectado.

El daño de este hongo sobre los tejidos sanos no se produce únicamente por la invasión del patógeno como indican FRANK y FRANCIS (1976), sino que la destrucción de los tejidos es reflejo de acciones enzimáticas y tóxicas, ya que DODMAN y FLENTJE (1970), consideran que ambas pertenecen al estado de post penetración. ROANE (1973), ha indicado que muchos patógenos producen toxinas, que inducen al menos parcialmente síntomas característicos del síndrome observado, cuando un hospedero es invadido por el patógeno.

AGRIOS (1997), indica que la lesión se desarrolla luego de la etapa de penetración, producto de enzimas que son esenciales para atravesar la barrera física que constituye la cutícula y SHERWOOD y LINDBERG (1962), han señalado que esta virulencia se debe en parte a la acción de enzimas pectinolíticas y celulolíticas producidas por el hongo. Al mismo tiempo, MORDUE *et al.* (1996), agregan que no hay evidencia directa de que la similitud de las lesiones se deba a la acción de las pectinasas y si su acción determina la patogenicidad o sólo modifica la expresión de los síntomas.

El trabajo de BETANCOURT (1996), evidencia que productos de naturaleza no enzimática están involucrados en la patogénesis de esta especie, lo cual había sido demostrado por FRANK y FRANCIS (1976) y FRANK *et al*. (1976), señalando que el ácido fenilacético puede inducir síntomas necróticos en raíces y estolones, enrollamiento de hojas, estrangulamiento y clorosis en los bordes de las hojas de plantas de papa.

WILLIE (1962), demostró que la patogenicidad de algunos aislamientos de *R. solani* se relaciona con la habilidad para producir suficiente material tóxico, que mediante un proceso de “ablandamiento” favorece la invasión del micelio. YODER (1980), agrega que, aun cuando está clara la importancia de algunas toxinas en el desarrollo de la enfermedad, la virulencia de una cepa no necesariamente depende de su cantidad producida en condiciones *in vitro*.

Los mismos autores señalan que las fitotoxinas son determinantes secundarios en la patogenicidad, que pueden presentarse en cepas virulentas como avirulentas y ROANE (1973), ha señalado que cuando las toxinas actúan como un determinante primario de patogenicidad, la sensibilidad a la toxina se relaciona altamente con la susceptibilidad a la enfermedad.

Según el orden en que actúan, YODER (1980), indica que serían las enzimas, las mayores responsables de la lesión, como corresponde a determinantes primarios de patogenicidad.

CASTRO (1989) y JEGER *et al*. (1996), señalan que por tratarse de un patógeno primario de tejidos juveniles, muchos de sus hospederos son sensibles a la penetración e invasión de los tejidos durante los estados inmaduros de las plántulas, que según STOCKWELL y HANCHEY (1984) y MARTIN y TORRES (1989), constituyen la etapa más lábil de la planta, ya que las células no han desarrollado paredes gruesas y lignificadas. A esto, VAN DEN BOOGERT y JAGER (1984), agregan que las partes subterráneas son susceptibles de ser atacados durante toda la estación de crecimiento, por lo que el tubérculo semilla constituye una importante fuente de inoculo.

Aún cuando los esquejes no constituyen un tejido juvenil, existen brotes en crecimiento activo en las axilas de las hojas y heridas en el punto de inoculación, que junto con la alta humedad y temperatura, permitieron que *R. solani* se desarrollara abundantemente sobre el tejido, provocando lesiones necróticas y en algunos casos la pudrición total del esqueje.

Con respecto a las heridas, JAGER *et al.* (1982), demostraron que las puntas filosas de las partículas del sustrato son capaces de causar heridas a través de las cuales se facilitaría la entrada de *R. solani* a los brotes de papa.

Las temperaturas entre 25ºC y 30ºC en las que se desarrolló el ensayo, permitieron que AG 3, al igual que la mayoría de las cepas, fuera capaz de

producir altos niveles de necrosis, llegando incluso a la pudrición total de los esquejes, lo que coincide con lo señalado por CARLING y LEINER (1990b), quienes señalan a AG 3 como el grupo mas patogénico a papa.

El alto número de cepas patogénicas puede ser causa de las altas temperaturas y humedad relativa en las que se realizó el ensayo. CARLING y LEINER (1990b), concuerdan en que estas condiciones son importantes para el establecimiento del patógeno y ENGELSK y WINDELS (1994), las consideran como los factores más importantes ya que afectan su tasa de crecimiento.

Estos autores agregan que el crecimiento activo del micelio favorece y posibilita el desarrollo e invasión de *R. solani*. Por lo tanto, si existen condiciones con bajo porcentaje de humedad relativa, al momento de inocular el hongo, este no podría invadir los tejidos.

Según IZQUIERDO y LOPEZ (1991), un grupo de células puede ser más sensible que una planta entera a un cambio en las condiciones del medio. Por lo que el ambiente donde se desarrolló la infección y la sintomatología asociada, difieren bastante entre un esqueje o segmento de planta y una planta completa, lo que podría explicar la alta producción de necrosis.

DEACON (1996), indica que *R. solani* puede translocar nutrientes desde una base de alimentación, que pueden ser propágulos del hongo, nutrientes del suelo y exudados de la planta hospedera, agregando que todo el proceso de infección depende de la movilización de estos nutrientes a los cojinetes de infección o a otras estructuras de penetración.

Según KEIJER *et al.* (1996), los cojinetes de infección son prerrequisito para el desarrollo de lesiones necróticas y sirven de base de alimentación para la posterior colonización del tejido y según WEINHOLD *et al.* (1969), para producir enfermedad, los requerimientos nutricionales de esta especie son mayores que para su crecimiento vegetativo, por lo cual, *R. solani* responde a la

falta de nutrientes removilizando los recursos del micelio hacia el esclerocio en desarrollo e incorpora nutrientes del suelo para sobrevivir en él.

Estamos frente a un patógeno biológicamente complejo cuya acción puede verse afectada por factores ambientales que a menudo actúan también sobre el hospedero, afectando la interacción entre ambos. Por lo tanto existe una relación con factores de naturaleza no genética, que actúan previo a la infección para afectar la susceptibilidad de las plantas (SCHOENEWEISS, 1975), disponiéndolas al ataque y afectando la virulencia del patógeno.

El mismo autor opina que las diferentes formas de enfermedad producidas por este hongo en diferentes hospederos y órganos constituyen una expresión de la capacidad de los tejidos del hospedero para reaccionar.

El uso de una escala categórica para definir grados de daño es un parámetro un tanto variable y se observaron diferencias entre los grados de necrosis de las repeticiones de un mismo aislamiento. Razón por la cual los datos no fueron analizados estadísticamente, ya que se podría haber llegado a conclusiones erróneas.

El problema de la variabilidad entre las repeticiones podría haberse disminuido incluyendo un mayor número de esquejes por repetición, sin embargo, no siempre resulta posible implementar un método de evaluación *in vitro* que sea rápido, de fácil desarrollo y económico, con un alto número de repeticiones. Aun así, el método desarrollado permitió en un corto periodo de tiempo obtener los síntomas característicos de la enfermedad, ya que se establecieron condiciones adecuadas para el ataque del patógeno. La gran variabilidad observada en esta investigación, la mencionan también BANDY y TAVANTZIS (1990), quienes además señalan que otros investigadores han tenido experiencias similares al estudiar el sistema *R. solani*- papa.

Las diferencias observadas en los grados de patogenicidad sólo podrían deberse a la variabilidad entre los aislamientos y no al hospedero ya que los

esquejes utilizados provienen de clones de papa del cultivar Desireé, multiplicados vegetativamente, que por lo tanto son genéticamente iguales. Las condiciones ambientales fueron igualmente controladas para todos los aislamientos por lo que las diferencias observadas se deberían a la patogenicidad de las cepas, tal como mostraron los resultados obtenidos por BAIRD *et al.* (1996) con AG 4 y AG 7.

El uso de este cultivar como hospedero se basó en su gran importancia comercial en la zona sur de Chile y a que la mayoría de los esclerocios fueron aislados a partir de tubérculos de este cultivar.

4.3.3 Variabilidad de patogenicidad. Las diferencias de patogenicidad observadas entre las cepas concuerdan con los resultados de SNEH *et al.* (1991), quienes describen una amplia variabilidad entre cepas de *R. solani*. Esto podría significar que al igual que el aislamiento de AG 3 usado como control positivo, las demás cepas que mostraron grados similares de necrosis también correspondan a este grupo.

Lo anterior no ocurriría en todos los casos, según explican CARLING y LEINER (1986), BANDY *et al.* (1988), HILL y ANDERSON (1989) y CARLING y LEINER (1990a), ya que los aislamientos de este grupo varían desde altamente patogénicos a no patogénicos, dependiendo, de la parte específica de la planta de la cual son extraídos ya que ocurre una alta especialización fisiológica de la especie. Por lo mismo, las cepas que obtuvieron otros grados de patogenicidad podrían corresponder a AG 3 o a otros grupos.

JEGER *et al.* (1996), afirman que los aislamientos de un mismo grupo de anastomosis son similares entre sí, pero que hay diferencias de patogenicidad, dependiendo del cultivar de papa en que se desarrollan y MORDUE *et al*. (1996), agregan que aislamientos de un mismo AG pueden variar en agresividad y rango de hospederos mientras que aislamientos de distintos AGs pueden producir expresiones de enfermedad similares en hospederos

relacionados, por lo que sería de gran utilidad realizar estas pruebas en otros cultivares para verificar que los aislamientos mas patogénicos mantienen esa característica.

Los resultados de las pruebas de patogenicidad, que indican una mayor o menor capacidad de los aislamientos para producir enfermedad, además de las diferentes características morfológicas observadas, dejan claro que se trata de aislamientos genéticamente distintos.

ANDERSON (1982) y BETANCOURT (1996), observaron que algunas cepas no tienen la misma habilidad para infectar plantas de papa y se podría pensar que aun cuando las cepas analizadas pertenecieran a un mismo AG, pueden manifestar diferentes grados de enfermedad en un hospedero sano, supuestos que son apoyados por los resultados obtenidos por EL BAKALI *et al* (2000), con cepas de AG 3 en brotes de papa.

Otros autores han reportado variación en la magnitud de los síntomas producidos por aislamientos de diferentes grupos de anastomosis, inoculados en diversos hospederos (HERR y ROBERTS, 1980; WINDELS y NABBEN, 1989; O´SULLIVAN y KAVANAGH, 1991; LEACH y CHAPMAN, 1992; YANG *et al.*, 1996 y WINDELS *et al*., 1997).

Estudios moleculares realizados por YANG *et al.* (1996), concuerdan en que existe variación genética entre aislamientos de un mismo AG provenientes de distintas zonas geográficas y CERESINI *et al.* (2001), agregan que el transporte de semillas de papa de un lugar a otro tiene importancia en la distribución geográfica de las cepas de *R. solani* y posiblemente contribuye a la diversidad genética observada.

Se sabe de la amplia distribución de esta especie en el mundo y existe bastante información sobre su variabilidad patogénica, cultural y fisiológica (OGOSHI, 1987), sin embargo, en Chile, no existe suficiente información a

cerca de la distribución geográfica de aislamientos pertenecientes a diferentes grupos de anastomosis y subgrupos.

ANDERSON (1982), menciona la necesidad de determinar si existen sistemas genéticos aislados entre cepas de AG 3 de América Central y Sur, que constituyen centros de dispersión de este cultivo y por lo tanto de *R. solani*. En este sentido, ADAMS (1988), concuerda en que si la especialización del hospedero ha resultado de una presión de selección que afectó a ambos y que, en consecuencia condujo al aislamiento genético, se podría pensar que los aislamientos que se encuentran en el sur de Chile, sean distintos de otros informados en la literatura.

R. solani es un hongo heterocariótico que no produce esporas en su fase asexual, pero sus hifas pueden presentar variación por anastomosis, lo que es de gran importancia en la complejidad genética de la especie.

A partir de observaciones microscópicas de la anastomosis, VAN DEN BOOGERT (1996), asume que las poblaciones al menos de AG 3 están constituidas por grupos de compatibilidad vegetativa con características genéticas propias y que aislamientos de un mismo grupo de compatibilidad conectan sus hifas permitiendo un flujo nuclear de genes extracromosomales, en tanto que los aislamientos que no forman estas conexiones pertenecen a distintos grupos y no son capaces de intercambiar información genética y serían fisiológicamente distintos.

CERESINI *et al.* (2001), mencionan que cepas provenientes de diferentes hospederos varían en la biología, ecología y epidemiología e identificaron varios grupos de compatibilidad somática dentro de AG 3 obtenidos de diferentes hospederos y más aun, todos los aislamientos obtenidos de papa resultaron distintos y somáticamente incompatibles con aislamientos obtenidos de otros hospederos, lo que hace presumir que las poblaciones de AG 3 se dividen

mediante la especialización por los hospederos (OGOSH, 1987; KUNINAGA *et al.*, 1997; CERESINI *et al.,* 2001 y GONZALEZ *et al.,* 2001).

Según JEGER *et al.* (1996), cada planta infectada con *R. solani* mantiene su propio grupo de compatibilidad vegetativa y CARLING (1996), agrega que se trataría de un clon (subunidad cercanamente relacionada por sus reacciones de anastomosis) y que a nivel de campo se pueden encontrar varios de estos grupos. Contrario a esto, CARLING *et al.* (2002), indican que los grupos vegetativamente compatibles provienen del mismo predio, pero pueden venir de distintas plantas y sugiere que a medida que los puntos de colección son más distantes, disminuye la probabilidad de relación clonal entre las cepas.

ADAMS (1988) y ADAMS (1996), afirman que existen diferencias genéticas entre subgrupos de un mismo AG, que justificarían las características de patogenicidad mediante la capacidad de producir toxinas y enzimas. Al mismo tiempo, CARLING *et al.*, (2002), sugieren que la identificación de subgrupos dentro de un AG requiere el uso de criterios como el rango de hospederos, virulencia o ciertas pruebas moleculares, además de la diferenciación a través de la secuencia de rADN.

4.3.3.1 Aislamientos patogénicos. A pesar de que BAINS *et al* (2002), indican que el cultivar Desireé demuestra baja susceptibilidad al ataque de *R. solani*, el 94% de los aislamientos resultó patogénico, mostrando altos grados de necrosis en condiciones de laboratorio, pero es posible que estos valores hubiesen sido diferentes al inocular esquejes de otra variedad. El alto porcentaje de cepas patogénicas obtenidas en esta evaluación concuerda con los resultados de BAINS y BISHT (1995), quienes obtuvieron un 99% de cepas patogénicas a papa, apoyando también las diferencias de patogenicidad entre aislamientos.

Los resultados indicaron que muchos de los esclerocios de *R. solani* poseen un potencial de patogenicidad, provocando desde un grado mínimo de

necrosis hasta la muerte completa del esqueje. (El grado de necrosis producido por cada uno de los aislamientos se muestra en el capítulo de Anexos).

4.3.3.2 AG 3. La actividad patogénica se observó también para el inóculo de AG 3, que junto a otros 30 aislamientos fueron capaces de producir grandes lesiones necróticas y estrangulamiento del tejido, síntomas que se asemejan a los descritos por CARLING *et al.* (2002) y que corresponden al grado 4 de necrosis obtenido en este ensayo, por lo que AG 3 se encontraría dentro de los aislamientos más patogénicos.

CARLING y LEINER (1990a), señalan que AG 3 puede causar significativamente mas daño a plantas de papa que varios otros grupos de anastomosis y ANDERSON (1982), CARLING *et al.* (1987), BANDY *et al.* (1988), BAINS y BISHT (1995), CARLING *et al.* (1999) y EL BAKALI *et al.* (2000), concuerdan en que AG 3 es el principal patógeno capaz de causar cancro de tallos y estolones, así como esclerocios sobre los tubérculos de papa.

Además de HILL y ANDERSON (1989), quienes mencionan la posibilidad de que todos los esclerocios sobre tubérculos de papa correspondan a AG 3, en Chile se conoce como el grupo más patogénico y distribuido en el cultivo y estudios realizados por CASTRO *et al.* (2003) y DELGADO *et al*. (2003), en la zona sur, señalan haber aislado sólo cepas de este grupo a partir de esclerocios. Sin embargo, ANDRADE y GUTIERREZ (1990), determinaron la presencia de AG 4, además de AG 3, afectando al cultivo. Por lo tanto, no se puede asegurar que los aislamientos más patogénicos de este ensayo correspondan a AG 3.

4.3.3.3 Aislamientos no patogénicos. El estudio de la patogenicidad de los aislamientos resulta necesario, ya que si bien, en Chile se reconoce a *R. solani* como uno de los principales patógenos que afectan a la papa, diversos trabajos han demostrado que algunas cepas pueden ser no patogénicas al cultivo.

Las cepas Nº 44, 46, 54, 63, 64 y 72, provenientes de los predios 4, 5, 7 y 8, corresponden al 6 % de las cepas evaluadas, que resultaron no patogénicas, obteniendo un grado cero de necrosis y escaso desarrollo de micelio sobre el tejido, sin producción de síntomas necróticos (Figura 26), como lo indicado por BAIRD *et al.* (1996). Esto se podría explicar por una inhabilidad para sobrevivir y migrar a lo largo de la superficie del hospedero, degradar su tejido y nutrirse de la planta mediante enzimas y toxinas.

FIGURA 26 Necrosis grado 0.

Se puede establecer que existen cepas no patogénicas provenientes de esclerocios, tal como lo obtenido por NELSON *et al.* (1996), entre distintos AGs, quienes mencionan que aislamientos patogénicos a un cultivo, no son capaces de producir un grado de enfermedad significativo en otro.

Las cepas determinadas como no patogénicas o con bajo grado de patogenicidad podrían estar asociadas a otros grupos de anastomosis, distintos de AG 3, que según CARLING y LEINER (1990a), presentan bajo grado de patogenicidad en papas, por lo que sería necesario realizar pruebas de anastomosis a los aislamientos no patogénicos y determinar a que grupo pertenecen.

Se ha señalado que los esclerocios no constituyen un estado de importancia en la enfermedad y CHAND y LOGAN (1983), CARLING *et al.* (1987) y SCHNETTLER (1993), agregan que no todos los esclerocios sobre la piel de los tubérculos son capaces de producir enfermedad, agregando que existen grupos o subgrupos de *R. solani* que colonizan el cultivo, pero que se pueden comportar como saprofitos, sin causar síntomas. DIJST (1985), explica que los aislamientos saprófitos de *R. solani* contribuyen a la formación de esclerocios a fines de la estación de crecimiento, pero que difícilmente dañan tallos o estolones de plantas de papa y que, por el contrario, proveerían alguna protección contra la infección por aislamientos patogénicos al ocupar espacio.

Como señalan O´SULLIVAN y KAVANAGH (1991), *R. solani* sobrevive como esclerocios o micelio saprofítico colonizando restos de sustrato y como se observó en este ensayo, en condiciones ambientales favorables, estos estados de latencia pueden germinar, produciendo síntomas en el tejido.

Según ICHIELEVICH–AUSTER *et al.* (1985), las cepas no patogénicas pueden alcanzar proporciones de 10 a 30% del total de las poblaciones de *Rhizoctonia* y sugieren que esas cepas deben su característica a las diferencias genéticas con respecto al resto de los aislamientos.

Excepto por la capacidad de producir síntomas, los individuos hipovirulentos tienen características similares a aquellos virulentos, incluso la competitividad para colonizar y ocupar el mismo nicho ecológico sobre la planta (JEGER *et al.*,1996), formando esclerocios sobre los tubérculos, lo que disminuye su calidad comercial (JAGER y VELVIS, 1983)

La pérdida o disminución de patogenicidad de las cepas puede deberse según explican Castaño y Butler (1978), citados por JEGER *et al.* (1996), a un ARN de doble hebra que causa una enfermedad degenerativa controlada en el patógeno, que se caracteriza por la pérdida de pigmentación micelial, menor

produción de esclerocios y cojinetes de infección, lo cual ha sido corroborado por TAVANTZIS *et al.* (1994) y RUBIO *et al.* (1996).

AGRIOS (1997), indica que algunas cepas avirulentas de *R. solani* pueden traspasar esta característica a cepas virulentas mediante anastomosis, por lo tanto, los genes capaces de modificar la virulencia podrían transmitirse para conferir virulencia o hipovirulencia, mediante su dispersión en las poblaciones.

ICHIELEVICH-AUSTER *et al.* (1985) y BANDY y TAVANTZIS (1990), demostraron que la aplicación de cepas hipoviruentas permite disminuir el área afectada por necrosis y que al adherir al tubérculo inóculo de baja patogenicidad se lo podría proteger de propágulos patogénicos, por lo tanto, independiente del mecanismo de protección, el hecho de que la semilla esté cubierta por inóculo no patogénico podría ser ventajoso.

Además de las razones genéticas que hayan determinado la falta de patogenicidad de los aislamientos, es probable que su mantención prolongada y los sucesivos repiques en medio de cultivo hayan reducido la agresividad o causado la pérdida de patogenicidad, lo que ha sido señalado por MILLER y MAXWELL (1983), GUTIERREZ y TORRES (1990) y BETANCOURT (1996).

BETANCOURT (1996), señala que la influencia del ambiente afecta también la patogenicidad en cuanto a la producción de enzimas y toxinas. WOODARD y JONES (1983), agregan que cuando las condiciones climáticas no son favorables para la patogenicidad, el ambiente permite que ciertos aislamientos se comporten como saprofitos y YANG *et al.* (1996), mostraron que algunas cepas que en condiciones *in vitro* se comportan como patogénicas, son menos virulentas en condiciones de invernadero, por lo que muchos de los aislamientos que resultaron patogénicos en esta investigación, podrían no serlo en otras condiciones.

Además del testigo, en la determinación de patogenicidad habría sido de gran interés contar con alguna cepa conocida como avirulenta, para ser usada como control negativo y contar con parámetros de comportamiento en el caso de cepas no patogénicas.

4.3.3.4 Testigo. Las observaciones indicaron que el testigo inoculado con APD estéril no presentó síntomas de la enfermedad y se comportó de forma similar a las cepas no patogénicas, ya que como se muestra en la Figura 27.a, los tallos de los esquejes mantuvieron un color verde amarillento y no mostraron síntomas necróticos ni crecimiento de micelio, el tejido permaneció sano y sólo fue posible notar la herida realizada al momento de la inoculación (Figura 27.b).

FIGURA 27 a) Testigo inoculado con APD estéril, b) Herida en el punto de inoculación.

Si bien, las pruebas de patogenicidad no permiten establecer la capacidad de producir el síntoma conocido como sarna negra, ya que este se presenta al final de la estación de crecimiento y depende de otros factores, fue posible observar en algunos esquejes que presentaron un grado 4 de necrosis, la formación de esclerocios sobre el tejido enfermo. Sin embargo, los efectos de

la enfermedad en el tejido pueden producir una dramática pérdida de plantas, ya que éstas detienen su crecimiento, pudiendo alcanzar pérdidas de rendimiento de hasta un 30%, según indican estudios realizados por S.A.G. (2000).

Como último paso de los postulados de Koch para confirmar la patogenicidad de los aislamientos, se reaislaron las cepas a partir de las lesiones producidas, confirmándose la presencia de *R. solani* ya que se observaron las mismas características de los cultivos puros a partir de los cuales fueron inoculados los esquejes. A esto se debe agregar que, a pesar de la desinfección de los esquejes, luego de evaluada la presencia de síntomas, se encontró en el tejido infectado y en el tejido sano, algún tipo de contaminación bacteriana además de *R. solani*, lo que se debe, según lo mencionado por MENELEY y STANGHELLINI (1972), a que plantas que no presentan síntomas frecuentemente poseen una microflora interna y Ciampi *et al.* (1976), citado por SCHNETTLER (1993), indican que un vasto número de bacterias se presentan normalmente en la superficie y bajo la cutícula de plantas de papa.

Los resultados de este estudio indican que esclerocios aislados de un mismo tubérculo pueden presentar características culturales y de patogenicidad diferentes. En la Figura 28, se muestra el tipo de aislamientos encontrados en cada predio y su ubicación geográfica, observándose que dentro de la población de *R. solani* de una determinada zona agrícola existen individuos diferentes, tal como han demostrado CARLING *et al.* (1999), señalando que a pesar de que los aislamientos sean obtenidos de una misma zona geográfica, existe gran diversidad dentro de la población.

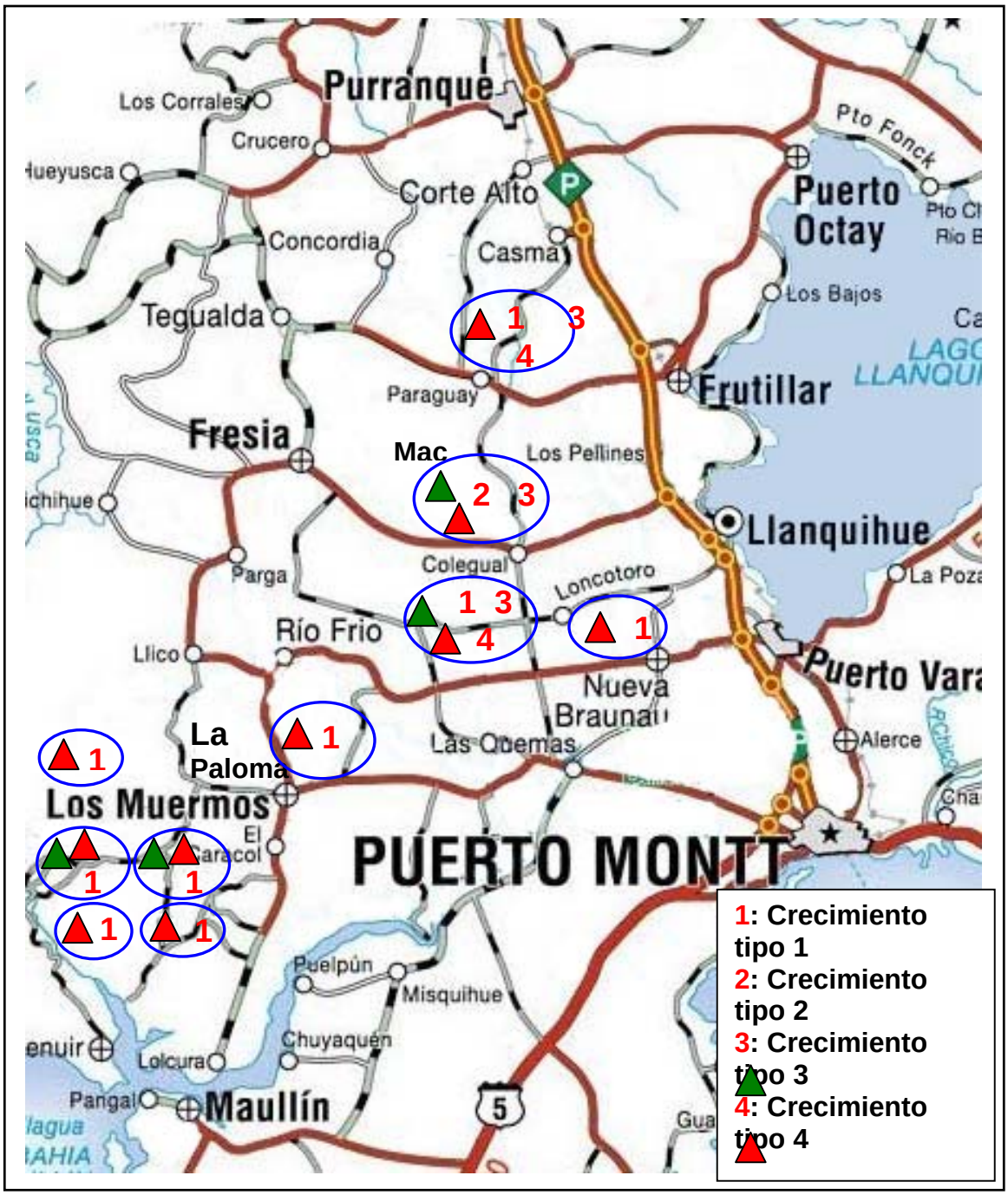

FIGURA 28 **Distribución geográfica de los tipos de crecimiento y patogenicidad de los aislamientos.**

Boosalis (1950), citado por BETANCOURT (1996), explica que las diferencias de características culturales y de patogenicidad entre cepas de un mismo hongo, ponen de manifiesto lo que constituye las razas fisiológicas de *R. solani* sugeridas por los taxónomos y KUNINAGA (1996), ha demostrado que ciertos aislamientos de un mismo AG corresponden a subgrupos definidos en base a morfología de los cultivos, patogenicidad y requerimientos nutricionales.

Ha quedado claro mediante las pruebas de patogenicidad, que *R. solani* es un patógeno importante en los suelos de algunas zonas agroclimáticas de la X Región de Chile, ya que muchas de ellas están dedicadas en gran parte al cultivo de papas, uno de los hospederos más importantes para este patógeno. Es necesario realizar nuevas investigaciones respecto a la patogenicidad en otros cultivos, de manera de verificar que, aunque no sean dañados en una alta proporción, ellos podrían mantener grandes cantidades de inóculo de *R. solani* en el suelo y afectar a cultivos de papa en el futuro.

5 CONCLUSIONES

El aislamiento de esclerocios adheridos a la superficie de tubérculos de papa provenientes de diferentes predios de la X Región, permitió confirmar mediante caracterización morfológica que el total de las cepas corresponden a *R.solani*, según los parámetros descritos para esta especie.

Existen diferencias culturales en cuanto al tipo de crecimiento, coloración del micelio y características de los esclerocios que presentan los aislamientos en medio de cultivo, observándose cuatro tipos distintos de crecimiento.

Las pruebas de patogenicidad realizadas a un porcentaje de aislamientos mostraron que el inóculo proveniente del tubérculo semilla en forma de esclerocios posee un alto grado de patogenicidad, siendo capaz de inducir síntomas necróticos en el tejido de la planta.

Las pruebas de patogenicidad han demostrado que la población de *R. solani* presente sobre tubérculos de papa es variable, existiendo desde aislamientos altamente patogénicos hasta encontrarse algunos que no muestran habilidad patogénica.

Aun cuando todos los aislamientos corresponden a *R. solani*, existen diferencias culturales y patogénicas entre los aislamientos, que podrían estar relacionadas con la variedad de papa en la cual se desarrollan los esclerocios o con la localidad donde fueron cosechados los tubérculos, lo que sugiere una amplia diversidad genética de esta especie.

6 RESUMEN

La Rizoctoniasis y Costra Negra, causadas por *Rhizoctonia solani* Kühn, es una enfermedad de gran importancia económica para el cultivo de la papa en la zona sur de nuestro país. Esta enfermedad afecta las partes subterráneas de la planta causando cancros en brotes, tallos, estolones y raíces, lo que disminuye la emergencia y el rendimiento del cultivo. Quizás la fase mas aparente de esta enfermedad es la costra negra constituida por los esclerocios que se forman sobre la superficie de los tubérculos, disminuyendo su calidad comercial.

Una fase importante de esta enfermedad proviene del tubérculo semilla o del suelo, a través de los esclerocios, órganos de resistencia que, proporcionan un mecanismo de dispersión del patógeno y constituyen una importante fuente de inóculo.

Con el objetivo de caracterizar morfológicamente las cepas, se aislaron 750 esclerocios a partir de tubérculos de papa con síntomas evidentes de costra negra, provenientes de 10 predios de la Décima Región. Se evaluaron parámetros descritos para la especie como ramificación de las hifas en ángulo recto, constricción de la ramificación y formación de un septo cerca del punto de origen, además de verificarse la presencia de células multinucleadas, células monilioides y diámetro de las hifas. De acuerdo a las características mencionadas, el total de los aislamientos evaluados fue caracterizado como *R. solani*.

Se evaluó, además, el tipo de crecimiento, color del micelio y formación de esclerocios en medio de cultivo, lo que permitió clasificar a los aislamientos en 4 tipos de acuerdo a sus características culturales.

El 13% de los aislamientos fue sometido a pruebas de patogenicidad mediante la inoculación de esquejes de plantas de papa del cultivar Desireé con micelio de *R. solani* en crecimiento activo.

Los síntomas se manifestaron con diferente intensidad, por lo que los esquejes fueron graduados en una escala de 0 a 4, donde el grado 0 corresponde a tejido sin necrosis y el grado 4, a la muerte completa del esqueje. De los 98 aislamientos evaluados en esta etapa, el 94 % resultó patogénico, siendo capaces de inducir lesiones necróticas blandas, de color café oscuro, que fueron capaces de estrangular los tallos de los esquejes sanos.

Esta investigación reafirma la complejidad de esta especie y la gran variabilidad que se puede encontrar con respecto a las características culturales y patogénicas que muestran los aislamientos de *R. solani*, esto demuestra la amplia diversidad de la población que es posible encontrar en determinadas zonas geográficas.

SUMMARY

Rhizoctonia disease and black scurf, caused by *Rhizoctonia solani* Kühn, is an economically important disease of potatoes in Southern Chile. This disease affects underground portions of the plant, causing cankers on sprouts, stems, stolons and roots, which can decrease plant emergence and yield. Perhaps, the most apparent phase of the disease is black scurf, produced by sclerotia present on tubers surfaces, limiting their marketable quality.

An important tuberborne phase of this disease are sclerotia, resistance organs that provide a mechanism for long distance dispersal of the pathogen and are an additional source of inoculum.

For morphological characterization of the strains, 750 sclerotia were isolated from potato tubers showing clear symptoms of black scurf, collected from 10 fields of Décima Región. Several parameters described for the specie such as hyphal branching at a right angle with a constriction and septum near the point of origin, presence of multinucleate and monilioid cells and hyphal diameter were evaluated. All isolates examined were identified as *R. solani*, according to the characteristics mentioned previously.

Micelial growth, color and sclerotial formation were also observed on culture medium, which allowed to place all isolates in 4 different types according to their cultural characteristics.

Pathogenicity tests were made to 13% of the cultures, inoculating potato plant cuttings of cultivar Desireé with mycelium of actively growing *R. solani*. Symptoms were observed in different intensity and cuttings were rated for necrosis severity using a 0 to 4 scale, where grade 0 corresponds to tissue without lesions and grade 4 means completely death of the plant cutting. Of 98

isolates evaluated, 94 % were determined to be pathogenic, inducing brown and sunken necrotic lesions that were capable of girdling stems of healthy cuttings.

This research confirms the complexity of the specie and the wide variation of cultural and pathogenic characteristics that isolates of *R. solani* show, indicating the population diversity that It is possible to find in a certain geographic zone.

7 BIBILOGRAFIA

ADAMS, G. 1988. *Tanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*), a species complex of wide host range. In Ingram, D. y Willians, P. (eds.), Advances in Plant Pathology. London, England. pp: 535-552.

ADAMS, G. 1996. Genetics of *Rhizoctonia* species. In Sneh, B.; Jabaji-Hare, S.; Neate, S. y Dijst, G. (eds), *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Dordrecht, The Netherlands. Kluwer Academic Publishers. pp: 101-116.

AGRIOS, G. 1995. Fitopatología. México. Limusa. 838 p.

AGRIOS, G. 1997. Plant Pathology. 4º ed. San Diego, Estados Unidos. Academic Press. 635 p.

ANDERSEN, T. 1990. A study of hyphal morphology in the form genus *Rhizoctonia*. Mycotaxon. 37: 25-46.

ANDERSON, N. 1982. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. Ann. Rev. Phytopathol. 20: 329-347.

ANDRADE, N. y GUTIERREZ, M. 1990. Determinación de grupos de anastomosis (GA) de *Rhizoctonia solani* en papas del sur de Chile. Simiente. Chile.60 (3): 192.

ARMENTROUT, V.; DOWNER, A.; GRASMICK, D. y WEINHOLD, A. 1987. Factors affecting infection cushion development by *Rhizoctonia solani* on cotton. Phytopathology. 77: 623-630.

BAINS, P. y BISHT, V. 1995. Anastomosis group identity and virulence of *Rhizoctonia solani* isolates collected from potato plants in Alberta, Canada. Plant Disease. 79 (3): 241-242.

BAINS, P.; BENNYPAUL, D.; LYNCH, D.; KAWCHUK, L. y SCHAUPMEYER, A. 2002. *Rhizoctonia* disease of potatoes (*Rhizoctonia solani*): Fungicidal efficacy and cultivar susceptibility. American Journal of Potato Research. 79: 99-106.

BAIRD, R.; CARLING, D. y MULLINIX, B. 1996. Characterization and comparison of isolates of *Rhizoctonia solani* AG 7 from Arkansas, Indiana and Japan, and selected AG 4 isolates. Plant Disease. 80 (12): 1421-1424.

BAKER, R. y MARTINSON, C. 1970. Epidemiology of diseases caused by *Rhizoctonia solani*. In Parmeter, J. (ed), Biology and pathology. Berkeley, U.S.A. Univ. California Press. pp: 172-188.

BALALI, G. ; NEATE, S.; SCOTT, E.; WHISSON, D. y WICKS, T. 1995. Anastomosis group and pathogenicity of isolates of *Rhizoctonia solani* from potato crops in South Australia. Plant Pathology. 44: 1050-1057.

BANDY, B. y TAVANTZIS, S. 1990. Effect of hypoirulent *Rhizoctonia solani* on *Rhizoctonia* disease, growth and development of potato plants. Am. Pot. J. 67: 189-199.

BANDY, B.; LEACH, S. y TAVANTZIS, S. 1988. Anastomosis group 3 is the mayor cause of *Rhizoctonia* disease of potato in Maine. Plant Disease. 72:596-598.

BANVILLE, G. 1989. Yield losses and damage to potato plants caused by *Rhizoctonia solani* Kühn. Am. Pot. J. 66: 821-834.

BANVILLE, G.; CARLING, D. y OTRYSKO, B. 1996. *Rhizoctonia* disease on potato. In Sneh, B.; Jabaji-Hare, S.; Neate, S. y Dijst, G. (eds), *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Dordrecht, The Netherlands. Kluwer Academic Publishers. pp. 321-330.

BERTAGNOLLI, B.; DAL SOGLIO, F. y SINCLAIR, J. 1996. Extracellular enzyme profile of the fungal pathogen *Rhizoctonia solani* isolate 2B-12 and of two antagonists, *Bacillus megaterium* strain B153-2-2 and *Trichoderma harzianum* isolate Th008.I. Possible correlations with inhibition of growth and biocontrol. Physiology and Molecular Plant Pathology. 45: 253-258.

BETANCOURT, O. 1996. Evaluación del daño tisular en germoplasma de papa (*Solanum tuberosum* L.) mediante el uso de filtrados fitotóxicos producidos por *Rhizoctonia solani* Kühn AG 3. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 167 p.

CALDERONI, A. 1978. Enfermedades de la papa y su control. Buenos Aires, Argentina. Hemisferio Sur. 143 p.

CARLING, D. y LEINER, R. 1986. Isolation and characterization *of Rhizoctonia solani*-like fungi from aerial stems and subterranean organs of potato plants. Phytopathology. 76 (7): 725-729.

----------; ---------- y KEBLER, K. 1987. Characterization of new anastomosis group (AG 9) of *Rhizoctonia solani*. Phytopathology.77: 1609-1612.

----------; ---------- y WESTPHALE, P. 1989. Symptoms, signs and yield reduction associated with *Rhizoctonia* disease of potato induced by tuberborne inoculum of *Rhizoctonia solani* AG 3. Am. Pot. J. 66: 693-701.

---------- y ---------- 1990a. Virulence of isolates of *Rhizoctonia solani* AG 3 collected from potato plant organs and soil. Plant Disease. 74 (11): 901-903.

---------- y ---------- 1990b. Effect of temperature on virulence of *Rhizoctonia solani* and other *Rhizoctonia* on potato. Phytopathology. 80 (10): 930-934.

---------- y SUMNER, D. 1992. *Rhizoctonia*. In Singleton, L.; Mihail, j. y Rush, C. (eds.). Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi. American Phytopathologycal Society, St. Paul, Minesota, USA. pp:157-156.

----------; ROTHROCK, G.; MACNISH, M.; SWEETINGHAM, M.; BRAINARD, K. y WINTERS, S. 1994. Characterization of anastomosis group 11 (AG 11) of *Rhizoctonia solani*. Phytopathology. 84 (12): 1387-1393.

---------- 1996. Grouping of *Rhizoctonia solani* by hyphal anastomosis reaction. In Sneh, B.; Jabaji-Hare, S.; Neate, S. y Dijst, G. (eds.). *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Dordrecht, The Netherlands. Kluwer Academic Publishers. pp: 37-47.

----------; BRAINARD, K.; VIRGEN, G y OLALDE, V. 1998. First report of *Rhizoctonia solani* AG 7 on potato in Mexico. Plant Disease. 82: 127.

----------; POPE, E.; BRAINARD, K. y CARTER, D. 1999. Characterization of mycorrhizal isolates of *Rhizoctonia solani* from an orchid, including AG 12, a new anastomosis group. Phytopathology. 89(10): 943-946.

----------; BAIRD, R.; GITAITIS, R.; BRAINARD, K. y KUNINAGA, S. 2002. Characterization of AG 13, a newly reported anastomosis group of *Rhizoctonia solani*. Phytopathology. 92 (8): 893-899.

CASTRO, C. 1989. Ecology of *Rhizoctonia solani* and disease development in relation to anastomosis groups. In International Center of Potato. CIP. Fungal Diseases of the Potato. Lima, Perú. pp: 181-190.

----------; DAVIS, J. y WIESE, M. 1983. Differential medium for identification of *Rhizoctonia solani* AG 3. Plant Disease. 67(10): 1069-1071.

CASTRO, I.; ANDRADE, N.; VALENZUELA, E. y CONTRERAS, A. 2003. Patogenicidad de cepas de *Rhizoctonia solani* Kühn en plántulas de papa. XIII Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología. Marbella, Chile. pp:66.

CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP). 2004. About Potato. http://www.cipotato.org/potato/potato.htm >(16 mar. 2004). On line.

CERESINI, P. 2003. *Rhizoctonia solani*. North Carolina State University. In Boletín de la Papa. 5 (13) <http://www.redepapa.org/boletinnoventauno.html> (10 jul. 2004). On line.

----------; SHEW, H.; VILGALYS, R.; ROSEWICH, U. y CUBETA, M. 2001. Genetic structure of populations of *Rhizoctonia solani* AG 3 from potato in eastern North Carolina. Mycologia. 93 p.

----------; SHEW, D.; VILGALYS, R. y CUBETA, M. 2002. Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* AG 3 from potato and tobacco in North Carolina. Mycologia. 94 (3): 437-449.

CHAND, T. y LOGAN, C. 1983. Cultural and pathogenic variation in potato isolates of *Rhizoctonia solani* in Northern Ireland. Trans. Br. Mycol. Soc. 81: 585-589.

CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE ESTADISTICAS (INE). 2004. Cultivos anuales esenciales. Superficie, producción y rendimientos, según región año agrícola 2002/2003. < http://www.ine.cl/16-agrope/i-menuagro.htm > (15 Mar. 2004). On line.

CHILE, OFICINA DE ESTUDIOS Y POLÍTICAS AGRARIAS (ODEPA). 2004. estadísticas de la agricultura chilena. < http:// www.odepa.gob.cl/base-datos> (11 agos. 2004) On line.

CHILE, SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO (SAG). 1982. Plagas y enfermedades comunes de la papa. Departamento de diagnóstico y vigilancia. División de protección agrícola. Informe fitosanitario Nº11. 1p.

CHILE, SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO (SAG). 2000. Enfermedades y plagas de la papa en el sur de Chile. Proyecto “Control de enfermedades de la papa”. SAG. Fondo Nacional de Desarrollo Regional. Décima Región, Chile. 125 p.

CUBETA, M.; CODY, B.; CERESINI, P. 1998. *Rhizoctonia* disease of potato. Vegetable disease information. Note Nº 26. Department of Plant Pathology. North Carolina State University. < http://www.ces.ncsu.edu/ plymouth/pubs/scurf.html>. (4 Sep. 2004).

DEACON, J. 1996. Translocation and transfer in *Rhizoctonia*: mechanisms and significance. In Sneh, B.; Jabaji-Hare, S.; Neate, S. y Dijst, G. (eds), *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Dordrecht, The Netherlands. Kluwer Academic Publishers. pp: 117-125.

DELGADO, J.; ACUÑA, I.; SAGREDO, B. y MANCILLA, S. 2003. Identificación y caracterización por apareamiento de grupos de anastomosis y por métodos moleculares de cepas de *Rhizoctonia solani* asociados al cultivo de papas en la zona sur de Chile. XIII Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología. Marbella, Chile. pp: 29.

DIJST, G. 1985. Investigations on the effect of haulm destruction and additional root cutting on black scurf on potato tubers. Neth. J. Pl. Pathol. 91: 153-162.

DODMAN, R. y FLENTJE, N. 1970. The mechanism and physiology of plant penetration by *Rhizoctonia solani*. In Parmeter, J. (ed.). *Rhizoctonia solani*, Biology and Pathology. Berkeley, U.S.A. Univ. California Press. pp: 172-188.

EL BAKALI, M.; MARTÍN, M.; GARCIA, F. y MONTON, R. 2000. First report of *Rhizoctonia solani* AG 3 on potato in Catalonia (NE Spain). Plant Disease. 84 (7): 806.

ENGELSK, C. y WINDELS, C. 1994. Relationship of plant age, cultivar and isolate of *Rhizoctonia solani* AG 2-2 to sugar beet root and crown rot. Plant Disease. 78: 685-689.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FAO. (2004). Faostat Agriculture Data. <http://apps.fao.org/page/ collections? subset = agriculture > (10 jul. 2004). On line.

FRANK, J. y FRANCIS, 1976. The effect of *Rhizoctonia solani* phytotoxin on potatoes. Can. J. Bot. 54: 2536-2540.

----------; LEACH, S. y WEBB, R. 1976. Evaluation of potato clone reaction to *Rhizoctonia solani*. Plant Disease Rep. 60 (11): 910-912.

---------- y ---------- 1980. Comparison of tuberborne and soilborne inoculum in the *Rhizoctonia* Disease of Potato. Phytopathology. 70 (1): 51-53.

GONZALEZ, D.; CARLING, D.; KUNINAGA, S.; VILGALYS, R. y CUBETA, M. 2001. Ribosomal DNA systematics of *Ceratobasidium* and *Tanatephorus* with *Rhizoctonia* anamorphs. Mycologia. 93: 1138-1150.

GUTIERREZ, P. y TORRES, H. 1990. Control biológico de *Rhizoctonia solani* con *Rhizoctonia* binucleada. Fitopatología. 25 (2): 45-50.

HAYGOOD, R. y MARTIN, S. 1990. Characterization and pathogenicity of species of *Rhizoctonia* associated with Centipedegrass and St. Agustinegrass in South Carolina. Plant Disease. 74 (7): 510-514.

HERR, L. 1979. Practical nuclear staining procedures for *Rhizoctonia* like fungi. Phytopathology. 69 (9): 958-961.

---------- 1982. Characteristics of himenial isolates of *Tanatephorus cucumeris* on sugar beets in Ohio. Plant Disease. 66(3): 246-249.

---------- y ROBERTS, D. 1980. Characteristics of *Rhizoctonia* populations obtained from sugar beet fields with differing soil textures. Phytopathology. 70: 476-480.

HIDE, G. y CAYLEY, G. 1982. Chemical techniques for control of stem canker and black scurf (*Rhizoctonia solani*) disease of potatoes. Annals of Applied Biology. 100: 105-116.

---------- y HORROCKS, J. 1994. Influence of stem canker (*Rhizoctonia solani* Kühn) on tuber yield, tuber size, reducing sugars and crisp colour in cv. Record. Potato Research. 37:43-49.

HILL, C. y ANDERSON, N. 1989. An evaluation of potato disease caused by isolates of *Rhizoctonia solani* AG 3. Am. Potato J. 66: 709-722.

HOFMAN, T. y JONGEBLOED, P. 1988. Infection process of *Rhizoctonia solani* on *Solanum tuberosum* and effects of granular nematicides. Neth. J. Pl. Path. 94: 243-252.

HOOKER, W. 1986. Compendium of potato diseases. American Phytopathological Society. St. Paul, Minesota, USA. 125 p.

ICHIELEVICH-AUSTER, M.; SNEH, B.; KOLTIN, Y. y BARACH, I. 1985. Suppression of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* spp. by non-pathogenic *R. solani*. Phytopathology.75: 1080-1084.

IZQUIERDO, J. y LOPEZ, Y. 1991. Análisis e interpretación estadística de la experimentación *in vitro*. In Roca, W. y Mroginski, L. (eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT. Cali, Colombia. pp: 213-221.

JAGER, G.; HEKMAN, W. y DEENEN, A. 1982. The Occurrence of *Rhizoctonia solani* on subterranean parts of wild plants in potato fields. Neth. J. Pl. Path. 88: 155-161.

---------- y VELVIS, H. 1983. Suppresion of *Rhizoctonia solani* in potato fields. I. Occurrence. Neth. J. Pl. Pathol. 89: 21-29.

---------- y ---------- 1986. Biologycal control of *Rhizoctonia solani* on potatoes by antagonists. The efectiveness of three isolates of *Verticillium biguttatum* for seed tubers and of soil treatment with a low dosage of pencycuron. Neth. J. Pl. Pathol. 92: 231-238.

----------; ----------; LAMERS, J.; MULDER, A. y ROOJSEN, J. 1991. Control of *Rhizoctonia solani* in potato by biological, chemical and integrated measures. Potato Research. 34: 269-284.

----------; HIDE, G.; VAN DEN BOOGERT, P.; TERMORSHUIZEN, A. y VAN BAARLEN, P. 1996. Pathology and control of soil-borne fungal pathogens of potato. Pot. Res. 39: 437-469.

KATARIA, H.; VERMAN, P. y GISI, V. 1991. Variability in sensivity of *Rhizoctonia solani* anastomosis groups to fungicides. J. Phytopathology. 133: 121-133.

KEIJER, J. 1996. The initial steps of the infection process in *Rhizoctonia solani*. In Sneh, B.; Jabaji-Hare, S.; Neate, S. y Dijst, G. (eds.). *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. pp: 149-162.

KHANGURA, R.; BARBETTI, M. y SWEETINGHAM, M. 1999. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* species on canola. Plant Disease. 83 (8):714-721.

KUNINAGA, S. 1996. DNA base sequene complementary analyses. In Sneh, B.; Jabaji-Hare, S.; Neate, S. y Dijst, G. (eds.). *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Dordrecht, The Netherlands. Kluwer Academis Publishers. pp: 73-80.

----------; NATSUAKI, T.; TAKEUCHI, T. y YOKOSAWA, R. 1997. Sequence variation of the rDNA ITS regions within and between anastomosis groups in *Rhizoctonia solani*. Curr. Genet. 32: 237-243.

LEACH, S. y CHAPMAN, W. 1992. *Rhizoctonia solani* on white lupin. Plant Disease. 76: 417-419.

---------- y WEBB, R. 1993. Evaluation of potato cultivars, clones, and true seed population for resistance to *Rhizoctonia solani*. Am. Potato J. 70: 317-328.

LEES, A. 2001. Detection and epidemiology of *Rhizoctonia solani.* Harper Adams University College SAC. <http://www.scri.sari.ac.uk/Health/ HostPara/PotPath /Rhizoct.htm > (27 sep. 2003) On line.

LOOTSMA, M. y SHOLTE, K. 1996. Effect of soil desinfection and potato harvesting methods on stem infection by *Rhizoctonia solani* Kühn in the following year. Potato Research. 39: 15-22.

MARTIN, C. y TORRES, H. 1989. Control of *Rhizoctonia* and other soil-borne diseases of TPS. In Centro Internacional de la Papa CIP (eds.). Fungal

Diseases of the Potato. Report of the Planning Conference on Fungal Diseases of the Potato. Lima, Perú. pp:191-205.

----------; CAMPBEL, S. y LUCAS, L. 1983. Horizontal distribution and characterization of *Rhizoctonia* spp. in tall fescue from turf. Phytopathology. 73: 1064-1068.

MENELEY, J. y STANGHELLINI, M. 1972. Occurrence and significance of soft rotting bacteria in healty vegetables. Phythopathol. 62: 778.

MENZIES, J. 1970. Introduction: The first century of *Rhizoctonia solani*. In Parmeter, J. (ed.). *Rhizoctonia solani*, Biology and Pathology. Berkeley, U.S.A. University of California Press. pp: 3-5.

MILLER, S. y MAXWELL, D. 1983. Evolution of disease resistance. In Evans, D.; Sharp, W.; Ammirato, V. y Yamada, Y. (eds.). Techniques for propagation and breeding. Canadá. Collier MacMillan. pp: 853-879.

MORDUE, E.; BANNIZA, S.; BRIDGE, P.; RUTHERFORD, M. y HOLDERNESS, M. 1996. Integrated biochemical, cultural and numerical methods. In Sneh, B.; Jabaji-Hare, S.; Neate, S. y Dijst, G. (eds.). *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Dordrecht, The Netherlands. Kluwer Academic Publishers. pp: 87-98.

MULDER, A. y ROOJSEN, J. 1984. Control of *Rhizoctonia solani* in seed potato crops by soil treatments with tolcofos-methyl, furmecyclox and pencycuron. In Abstracts of Conference Papers of the 9th Triennial Conference of The EAPR. pp: 107-108.

MUÑOZ, C.; VIRGEN, G.; HERRERA, A. y OLALDE, V. 2001. Introducción de agentes de control biológico de *Rhizoctonia solani* en suelos solarizados o encalados en condiciones de invernadero. Manejo Integrado de Plagas. México. 59: 10-14.

MURRAY, D. 1982. Penetration of barley root and coleoptile surface by *Rhizoctonia solani*. Trans. Br. Mycol. Soc. 79: 354-360.

NELSON, B.; HELMS, T.; CHRISTIANSON, T. y KURAL, I. 1996. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* from soybean. Plant Disease. 80 (1): 74-80.

OGOSHI, A. y UI, T. 1983. Diversity of clones within anastomosis group of *Rhizoctonia solani* Kühn in a field. Ann. Phytopathol. Soc. Japan. 49: 239-245.

---------- 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraespecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. Ann. Rev. Phytopathol. 25: 125-143.

----------; COOK, R. y BASSETT, E. 1990. *Rhizoctonia solani* species and anastomosis groups causing root rot of wheat and barley in the Pacific Northwest. Phytopathology. 80: 784-788.

---------- 1996. The genus *Rhizoctonia.* In Sneh, B.; Jabaji-Hare, S.; Neate, S. y Dijst, G. (eds.) *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Dordrecht, The Netherlands. Kluwer Academic Publishers. pp: 1-9.

O`SULLIVAN, E. y KAVANAGH, J. 1991. Characteristics and pathogenicity of isolates of *Rhizoctonia* spp. asssociated with damping-off of sugar beet. Plant Pathology. 40: 128-135.

PARMETER, J. y WHITNEY, H. 1970. Taxonomy and nomenclature of the imperfect stage. In Parmeter, J. (ed.). *Rhizoctonia solani*, Biology and Pathology, Berkeley, U.S.A. Univ. California Press. pp: 7-19.

PLATT, H.; CANALE, F. y GIMENEZ, G. 1993. Effects of tuber-borne inoculum of *Rhizoctonia solani* and fungicidal seed potato treatment on plant growth and *Rhizoctonia* disease in Canada and Uruguay. Am. Pot. J. 70: 553-559.

POWELSON, M.; JOHNSON, K. y ROWE, R. 1993. Management of diseases caused by soilborne pathogens In Rowe, R. (ed.). Potato Health Management. St. Paul, Minesota, USA. American Phytopathological Society. pp: 149-158p.

RIBEIRO, F.; ZAMBOLIM, L. y COSTA, H. 1996. Doenças causadas por fungos em batata. Belo Horizonte. Brasil. 18 (184): 29-35.

ROANE, C. 1973. Trends in breeding for disease resistanse in crops. Ann. Rev. Phytopathol. 11: 463-486.

ROWE, R. 1993. Potato health management. St. Paul, Minesota, USA. American Phytopathologycal Society Press. 178 p.

RUBIO, V. 2001. Identificación molecular de *Rhizoctonia solani*. Genética y control biológico. <http://www.ag.ohio-state.edu> (20 agos. 2002). On line.

----------; TAVANTZIS, S. y LAKSHMAN, D. 1996. Extrachromosomal elements and degree of pathogenicity in *Rhizoctonia solani*. In Sneh, B.; Jabaji-Hare, S.; Neate, S. y Dijst, G. (eds), *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Dordrecht, The Netherlands. Kluwer Academic Publishers. pp: 127-138.

SANDOVAL, C. 1987. Enfermedades fungosas y bacterianas en papa. Estación Experimental Remehue, Chile. Boletín técnico Nº 116. 32 p.

sCHNETTLER, E. 1993. Efecto de bacterias antagonistas en la incidencia de *Rhizoctonia solani* Kühn AG 3 agente causal de la sarna negra en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis Lic. Agr. Valdivia, Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. 152 p.

SCHOENENWEIS, P. 1975. Predisposition, stress and plant disease. Ann. Rev. Phythopathol. 13: 193-211.

SHERWOOD, R. y LINDBERG, C. 1962. Protection of a phytotoxin by *Rhizoctonia solani*. Phytopathol. 52: 586-587.

SNEH, B.; BURPEE, B. y OGOSHI, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. St. Paul, Minesota, USA. American Phytopathological Society Press. 133 p.

STEVENS, J.; JONES, R.; SHEW, H. y CARLING, D. 1993. Characterization of populations of *Rhizoctonia solani* AG 3 from potato and tobacco. Phytopathology. 83 (8): 854-858.

STOCKWELL, V. y HANCHEY, P. 1984. The role of the cuticule in resistance of beans to *Rhizoctonia solani*. Phytopathol. 13: 193-211.

SWEETINGHAM, M.; CRUICKSHANK, R. y WONG, D. 1986. Pectic zimograms, taxonomy and pathogenicity of the Ceratobasidiaceae. Trans. Br. Mycol. Soc. 86: 305-311.

TALBOT, P. 1970. Taxonomy and nomenclature of the perfect stage. In Parmeter, J. (ed.). *Rhizoctonia solani*, Biology and Pathology. Berkeley, U.S.A. University of California Press. pp: 20-31.

TAVANTZIS, S. 1994. Double stranded RNA-associated cytoplasmic hypovirulence in *Rhizoctonia solani*: Prospects for developing a reliable target-specific biocontrol system. In Zehnder, G.; Powelson, R.; Jannson, R.; Raman, K. (eds.), Advances in Potato Pest Biology and Management. St. Paul, Minesota, U.S.A. American Phytopathologycal Society Press. pp: 565-579.

TRAIL, F. y KÖLLER, W. 1990. Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: Evidence for relationship between enzyme properties and tissue specificity. Physiol. Mol. Pl. Pathol. 36: 495-508.

TREDWAY, L. y BURPEE, L. 2001. *Rhizoctonia* disease of turfgrass. The American Phytopathological Society < http://www.apsnet.org/education/ LessonsPlantPath/ *Rhizoctonia*/top.htm> (10 abr. 2003) On line.

UCHIDA, Y. 2003. *Rhizoctonia solani*. Department of Plant Pathology. University of Hawaii. < http://www.exento.hawaii.edu/kbase/crop/type/r_solani.htm > (20 nov. 2003) On line.

VAN DEN BOOGERT, P. y JAGER, G. 1984. Biologycal control of *Rhizoctonia solani* on potatoes by antagonists. 3. Inoculation of seed potatoes with different fungi. Neth. J. Pl. Pathol. 90: 117-126.

VAN DEN BOOGERT, P. 1996. Mycoparasitism and biocontrol. In Sneh, B.; Jabaji-Hare, S.; Neate, S. y Dijst, G. (eds.). *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Dordrecht, The Netherlands. Kluwer Academic Publishers. pp: 485-493.

WEINHOLD, A; BOWMAN, T. y DODMAN, R. 1969. Virulence of *Rhizoctonia solani* as affected by nutrition of the pathogen. Phytopathol. 65: 47-51.

----------; ---------- y HALL, D. 1982. *Rhizoctonia* disease of potato: effect on yield and control by seed tuber treatment. Plant Disease. 66: 815-818.

---------- y SINCLAIR, J. 1996. *Rhizoctonia solani*: Penetration, colonization and host response. In Sneh, B.; Jabaji-Hare, S.; Neate, S. y Dijst, G. (eds.). *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Dordrecht, The Netherlands. Kluwer Academic Publishers. pp: 163-174.

WILLIE, T. 1962. Effect of metabolic by products of *Rhizoctonia solani* on the roots of chippewa soybean seedlings. Phythopathol. 18: 103-129.

WINDELS, C. y NABBEN, D. 1989. Characterization and pathogenicity of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* isolated from *Beta vulgaris*. Phytopathology 79:83-88.

----------; KUZNIA, R. y CALL, J. 1997. Characterization and pathogenicity of *Tanatephorus cucumeris* from sugar beet in Minnesota. Plant Disease. 81(3): 245-249.

WOODARD, K. y JONES, B. 1983. Soil populations and anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* associated with peanut inTexas and New Mexico. Plant Disease. 67(4): 385-387.

YANG, J.; VERMA, P. y TEWAR, J. 1992. Histopathology of resistant mustard and susceptible canola hypocotyls by *Rhizoctonia solani*. Mycological Research. 96: 171-179.

----------; KHARBANDA, P.; WANG, H. y McANDREW, D. 1996. Characterization, virulence and genetic variation of *Rhizoctonia solani* AG 9 in Alberta. Plant Disease. 80 (5): 513-518.

YODER, O. 1980. Toxins in pathogenesis. Ann. Rev. Phytopathol. 18: 103-129.

YOKOYAMA, K. y OGOSHI, A. 1984. Studies on hyphal anastomosis of *Rhizoctonia solani*. IV. Observation of imperfect fusion. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 50: 398.

ANEXOS

ANEXO 1 Preparación de medios de cultivo y tinciones.

1) Agar Papa Dextrosa: en un matraz, depositar 39 g de agar papa dextrosa Merk® en un litro de agua destilada. La mezcla se disuelve a baño María y se reparte en dos matraces. Esterilizar los matraces en autoclave a 1 atm (121ºC), por 15 minutos. Terminada la esterilización, se deposita el medio líquido en placas Petri estériles para su solidificación.

Para acidificar el medio de cultivo, una vez finalizada la esterilización, se agregan 3 gotas de ácido láctico al 25%, por cada 100 mL de solución, antes de que sea depositada en placas Petri.

En el caso de los tubos para cepario, se debe disolver la mezcla a baño María y se depositan 2 mL en cada tubo de ensayo. Los tubos se esterilizan en autoclave (1atm, 121ºC), luego de lo cual se inclinan para su solidificación.

2) Tinción de núcleos (HERR, 1979)

Solución jabonosa: Se disuelve 1 mL de Tween 20 en 1L de agua destilada y 1mL de ácido láctico al 85%.

Solución de azul de anilina al 0,5 %: disolver 0,5 g de azul de anilina en 100 mlL de lactofenol.

Lactofenol: 20 g de fenol en cristal
20 mL de ácido láctico al 85%
40 mL de glicerina
20 mL de agua destilada

ANEXO 2 Caracterización Morfológica de los aislamientos provenientes de cada predio.

Predio	1	2	3	4	5	6	7	8	12	16
Coloración del micelio	Café, Café oscuro	Café, Café oscuro	Café, Café oscuro	Café, Café oscuro	Café, Café oscuro	Amarillo Café claro, Café	Amarillo Café claro, Café	Amarillo Café claro, Café	Café, Café oscuro	Café, Café oscuro
Ramificación en ángulo recto	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
Septo al inicio de la ramificación	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
Constricción de la ramificación	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
Células monilioides	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
Células Multinucleadas	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
Diámetro Promedio de las hifas	8,2	7,8	7,5	8,4	7,9	7,7	7,2	7,9	8,4	8,0

ANEXO 3 Grado de patogenicidad observado para cada uno de los aislamientos evaluados por predio.

Predio 1		
Aislamiento	Promedio	Mediana
1	1,0	1,0
2	2,0	2,0
3	2,0	2,0
4	2,7	3,0
5	1,2	1,0
6	1,8	2,0
7	1,7	2,0
8	1,0	1,0
9	1,7	2,0
10	1,8	2,0
11	3,0	3,0
12	2,2	3,0
13	1,8	2,0
14	1,3	1,0
15	1,2	1,0

(continúa)

Continuación Anexo 3

Predio 2		
Aislamiento	Promedio	Mediana
16	3,8	4,0
17	1,8	2,0
18	3,7	4,0
19	3,5	4,0
20	3,8	4,0
21	2,0	2,0
22	3,2	3,0
23	3,2	4,0
24	3,8	4,0

Predio 3		
Aislamiento	Promedio	Mediana
25	2,2	2,0
26	3,7	4,0
27	3,7	4,0
28	2,2	2,0
29	3,7	4,0
30	3,5	4,0
31	4,0	4,0
32	3,7	4,0
33	3,2	3,0

(continúa)

Continuación Anexo 3

Predio 4		
Aislamiento	Promedio	Mediana
34	2,8	3,0
35	2,8	4,0
36	3,0	4,0
37	3,3	4,0
38	3,0	4,0
39	3,0	4,0
40	1,3	1,0
41	2,5	3,0
42	1,3	1,0
43	2,2	2,0
44	0,7	0,0

Predio 5		
Aislamiento	Promedio	Mediana
45	2,0	2,0
46	0,2	0,0
47	3,3	4,0
48	1,2	1,0
49	3,0	4,0
50	1,8	2,0
51	1,5	1,0
52	2,0	2,0
53	2,5	3,0
54	0,7	0,0

(continúa)

Continuación Anexo 3

Predio 6		
Aislamiento	Promedio	Mediana
55	3,5	4,0
56	2,0	2,0
57	1,7	2,0
58	2,0	2,0
59	1,8	2,0

Predio 7		
Aislamiento	Promedio	Mediana
60	2,2	2,0
61	1,5	1,0
62	1,0	1,0
63	0,5	0,0
64	0,7	0,0
65	2,0	2,0
66	0,8	1,0
67	2,7	3,0

Predio 8		
Aislamiento	Promedio	Mediana
68	1,5	2,0
69	1,8	2,0
70	1,2	1,0
71	1,3	1,0
72	0,8	0,0
73	1,2	1,0

(continúa)

Continuación Anexo 3

	Predio 12	
Aislamiento	Promedio	Mediana
74	3,0	3,0
75	3,2	3,0
76	2,0	3,0
77	3,2	4,0
78	3,0	3,0
79	3,5	4,0
80	2,8	3,0
81	3,3	3,0
82	3,0	3,0
83	3,5	4,0
84	2,5	3,0
85	3,5	4,0
86	3,2	3,0
87	2,5	3,0
88	3,8	4,0

(continúa)

Continuación Anexo 3

	Predio 16	
Aislamiento	Promedio	Mediana
89	2,3	3,0
90	2,7	3,0
91	3,5	4,0
92	1,8	3,0
93	2,0	2,0
94	3,7	4,0
95	3,5	4,0
96	3,5	4,0
97	3,3	4,0
98	3,7	4,0

AG 3	3,7	4,0
TESTIGO	0,0	0,0

ANEXO 4 Determinación de Patogenicidad para los aislamientos evaluados.

Nº	**Aislamiento**	Patogenicidad	Nº	**Aislamiento**	**Patogenicidad**
1	P1T6E63	Patogénico	26	P3T3E15	Patogénico
2	P1T4E44	Patogénico	27	P3T19E107	Patogénico
3	P1T19E178	Patogénico	28	P3T6E33	Patogénico
4	P1T6E57	Patogénico	29	P3T17E94	Patogénico
5	P1T7E73	Patogénico	30	P3T17E93	Patogénico
6	P1T8E74	Patogénico	31	P3T9E46	Patogénico
7	P1T14E132	Patogénico	32	P3T13E70	Patogénico
8	P1T13E120	Patogénico	33	P3T4E24	Patogénico
9	P1T13E125	Patogénico	34	P4T15E81	Patogénico
10	P1T8E79	Patogénico	35	P4T3E15	Patogénico
11	P1T6E62	Patogénico	36	P4T9E48	Patogénico
12	P1T16E150	Patogénico	37	P4T6E34	Patogénico
13	P1T3E25	Patogénico	38	P4T4E1	Patogénico
14	P1T3E24	Patogénico	39	P4T17E96	Patogénico
15	P1T1E10	Patogénico	40	P4T19E106	Patogénico
16	P2T12E73	Patogénico	41	P4T20E119	Patogénico
17	P2T1E4	Patogénico	42	P4T19E109	Patogénico
18	P2T3E14	Patogénico	43	P4T1E6	Patogénico
19	P2T15E89	Patogénico	44	P4T10E54	No patogénico
20	P2T8E50	Patogénico	45	P5T18E62	Patogénico
21	P2T7E43	Patogénico	46	P5T1E3	No patogénico
22	P2T17E94	Patogénico	47	P5T10E39	Patogénico
23	P2T1E1	Patogénico	48	P5T8E30	Patogénico
24	P2T9E55	Patogénico	49	P5T8E32	Patogénico
25	P3T2E7	Patogénico	50	P5T7E25	Patogénico

(continúa)

Continuación Anexo 4

51	P5T5E16	Patogénico	76	P12T2E27	Patogénico
52	P5T8E28	Patogénico	77	P12T2E24	Patogénico
53	P5T5E17	Patogénico	78	P12T1E12	Patogénico
54	P5T5E18	No patogénico	79	P12T3E37	Patogénico
55	P6T8E66	Patogénico	80	P12T10E105	Patogénico
56	P6T19E69	Patogénico	81	P12T7E78	Patogénico
57	P6T19E71	Patogénico	82	P12T1E1	Patogénico
58	P6T12E61	Patogénico	83	P12T2E28	Patogénico
59	P6T1E1	Patogénico	84	P12T8E76	Patogénico
60	P7T15E18	Patogénico	85	P12T5E58	Patogénico
61	P7T15E21	Patogénico	86	P12T7E64	Patogénico
62	P7T12E49	Patogénico	87	P12T4E40	Patogénico
63	P7T12E48	No patogénico	88	P12T5E52	Patogénico
64	P7T6E26	No patogénico	89	P16T5E36	Patogénico
65	P7T12E51	Patogénico	90	P16T2E12	Patogénico
66	P7T12E50	Patogénico	91	P16T14E102	Patogénico
67	P7T4E17	Patogénico	92	P16T8E58	Patogénico
68	P8T2E7	Patogénico	93	P16T5E38	Patogénico
69	P8T2E8	Patogénico	94	P16T12E84	Patogénico
70	P8T3E10	Patogénico	95	P16T13E93	Patogénico
71	P8T1E4	Patogénico	96	P16T14E97	Patogénico
72	P8T6E23	No patogénico	97	P16T14E94	Patogénico
73	P8T8E31	Patogénico	98	P16T1E2	Patogénico
74	P12T7E67	Patogénico	99	AG 3	Patogénico
75	P12T10E94	Patogénico	100	TESTIGO	No Patogénico