

Bioagro
ISSN: 1316-3361
bioagro@ucla.edu.ve
Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado
Venezuela

Escalona, Yoleidy; Rodríguez, Dorian; Hernández, Alexander
Estudio de Rhizoctonia solani Kühn aislado de papa (Solanum tuberosum L.) En los estados Táchira, Mérida, Trujillo y Lara. II. Virulencia y caracterización molecular
Bioagro, vol. 24, núm. 1, enero-abril, 2012, pp. 13-22
Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado
Barquisimeto, Venezuela

Disponible en: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85723518003

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Bioagro 24(1): 13-22. 2012

ESTUDIO DE *Rhizoctonia solani* Kühn AISLADO DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.) EN LOS ESTADOS TÁCHIRA, MÉRIDA, TRUJILLO Y LARA. II. VIRULENCIA Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

Yoleidy Escalona[1], Dorian Rodríguez[1] y Alexander Hernández[1]

RESUMEN

Rhizoctonia solani ocasiona la enfermedad conocida como rizoctoniosis en el cultivo de la papa y constituye un serio problema en Venezuela. En el país se han identificado los grupos anastomósicos presentes y se ha realizado la caracterización cultural del hongo pero no la molecular ni la de virulencia, por lo que estos objetivos fueron planteados en el presente trabajo. Se utilizaron cuarenta aislamientos obtenidos de los estados Táchira, Mérida, Trujillo y Lara. Se utilizaron las técnicas de RAPD, UPR e ITS para la caracterización molecular, y pruebas de patogenicidad en papa 'Kennebec' para determinar la virulencia. Con las tres técnicas moleculares se observaron variaciones genéticas entre las cepas del hongo y se confirmó la presencia de AG-3 y AG-2.1 de *R. solani*. Las cepas mostraron diferencias significativas en la virulencia, la cual estuvo influenciada por la temperatura.
Palabras clave adicionales: RAPD, ITS, UPR, rizoctoniasis

ABSTRACT

***Rhizoctonia solani* Kühn isolated from potato in various Venezuelan states. II. Virulence and molecular characterization**

Rhizoctonia solani causes the disease known as rizoctoniosis in potato and it is a serious problem in Venezuela. Anastomosis groups and cultural characterization have been determined in the country, but neither molecular nor virulence characterization. Therefore, the research focused on those two objectives. Forty isolates from Táchira, Merida, Trujillo and Lara States were used on which RAPD, UPR and ITS techniques were performed; also, pathogenicity tests were run on 'Kennebec' potato plants. Genetic variability among isolates was observed with all three molecular techniques and presence of AG-3 and AG-2.1 was confirmed. Isolates showed significant difference with regard to virulence, which was influenced by temperature.
Additional key words: RAPD, ITS, UPR, rhizoctoniasis

INTRODUCCIÓN

Rhizoctonia solani Kühn (teleomorfo: *Thanatephorus cucumeris* (A.B. Frank) Donk) ocasiona la enfermedad conocida como rizoctoniosis en el cultivo de la papa (Cedeño et al., 2001). Los síntomas de la misma se caracterizan por lesiones necróticas de raíces, estolones y cuello de la planta, que conducen a la formación de tubérculos aéreos en las axilas de las hojas; sobre los tubérculos, además, se forman esclerocios aislados o en masa, lo cual se conoce como costra negra (Powelson et al., 1993). Algunos aislamientos de *R. solani* tienen la capacidad de fusionar sus hifas, y si esto ocurre, se dice que las cepas son genéticamente similares y pertenecen al mismo grupo anastomósico (AG) (Ogoshi, 1987). Basado en este concepto, se han identificado 14 AG (González, 2002), que incluyen subgrupos dentro de los grupos principales. Los AG más frecuentemente asociados con papa son AG-2 y AG-3, y menos frecuente, AG-4 y AG-5 (Woodhall et al., 2007). En Venezuela, se han identificado el AG-3, con una frecuencia del 94 al 97 %, y en segundo lugar el AG-2.1, en un 2,5 a 6 % (Cedeño et al., 2001; Escalona et al., 2011).

Además del grupo anastomósico, para caracterizar las poblaciones de *R. solani,* se han utilizado rasgos morfológicos, el número de núcleos, patología, sensibilidad a fungicidas, caracteres bioquímicos y moleculares (González, 2002, Woodhall et al., 2007), los cuales pueden mostrar variabilidad en los individuos y las

Recibido: Junio 11, 2010 Aceptado: Junio 30, 2011
[1] Postgrado de Fitopatología, Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Apdo. 400. Barquisimeto. Venezuela. e-mail: eyoleidy@yahoo.es; rdorian@ucla.edu.ve; ahernandez@ucla.edu.ve

poblaciones dentro de cada AG (Lehtonen et al., 2008), y ha servido, en algunos casos, para generar los grupos intraespecíficos (Ogoshi, 1987; González, 2002). En Venezuela, se observaron diferencias entre las poblaciones de *R. solani,* pertenecientes al AG-3, con respecto a la velocidad de crecimiento de la colonia, diámetro de las hifas, tamaño y número de esclerocios (Escalona et al., 2011).

En relación a los caracteres moleculares se han utilizado diversas técnicas para demostrar la variabilidad o las relaciones filogenéticas entre las poblaciones. Entre estas técnicas están la amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD) (Vilgalys y Cubeta, 1994), los espaciadores internos transcritos del ADN ribosomal (ITS) (Lehtonen et al., 2008), e iniciadores universales de arroz (UPR) (Sharma et al., 2005). De éstos, los ITS han sido usados satisfactoriamente para identificar los AG, basados en el análisis filogenético e incluyendo cepas referenciales de AG (Woodhall et al., 2007; Lehtonen et al., 2008).

En cuanto a las pruebas de patogenicidad se ha observado una relación entre los AG y la virulencia; así, algunos autores han reportado que los aislamientos pertenecientes al AG-3 han sido significativamente más virulentos que aquellos ubicados en AG-2.1, AG-4 y AG-5 (Bains y Bisht, 1995; Cedeño et al., 2001). En otros casos, AG-4 ha sido más virulento que AG-3, mas aún, se han observado diferencias en patogenicidad entre aislamientos del mismo AG proveniente de diferentes localidades (Anguiz y Martin, 1989). Carling y Leiner (1990) observaron una relación entre la virulencia y el AG condicionada por la temperatura.

En Venezuela no se han caracterizado molecularmente las poblaciones de *R. solani* en papa, por lo tanto los objetivos del presente trabajo fueron caracterizar molecularmente 40 aislamientos del hongo provenientes de los estados Mérida, Táchira, Trujillo y Lara, a través de las técnicas de ITS, RAPD y UPR, y comparar la virulencia de las poblaciones del hongo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 40 aislamientos obtenidos en 25 localidades de los estados Táchira, Mérida, Trujillo y Lara, Venezuela, a partir de esclerocios de tubérculos y lesiones de raíces de plantas, los cuales habían sido previamente caracterizados culturalmente (Escalona et al., 2011).

La extracción de ADN fue realizada siguiendo la metodología de Hoisington et al. (1994). El ADN fue purificado con ARNasa y llevado a una concentración de 10 $ng \cdot mL^{-1}$ para su utilización en las reacciones de PCR. La caracterización molecular se realizó mediante la utilización de las técnicas RAPD, UPR e ITS. Para la primera técnica se empleó la metodología usada por Sharma et al. (2005), para lo cual se utilizaron iniciadores cuyos productos de amplificación eran de un peso molecular de 0,3-3,5 Kb. Se probaron los siguientes 11 iniciadores: OPA-04, OPA-07, OPA-10, OPA-13, OPA-18, OPA-11, OPC-18, OPC-19, OPE-06, OPF-14 y OPG-09. Para la realización de las reacciones se preparó 15 µL de la reacción conteniendo 1 unidad de Taq DNA polimerasa, 0,2 mM de mix dNTP, buffer PCR 1X (20 mM Tris-HCl pH 8,4), 50 mM KCl, 3 mM MgCl, 0,2 µM del iniciador, 0,001 % de gelatina y 25-50 ng del ADN.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer 2400 con una temperatura de 93 °C por 1 min para la desnaturalización del ADN, 36 °C por 1 min para la alineación, 72 °C por 1 min, para la extensión (44 ciclos) y una extensión final a 72 °C por 5 min. El producto de la PCR fue visualizado por electroforesis en geles de agarosa 1,5 % en TAE buffer 0,5 X, a 80 V por 1 h y 40 min, teñidos con bromuro de ethidio, los geles fueron visualizados en un trasluminador de luz ultravioleta.

Con los iniciadores UPR también se utilizó la metodología usada por Sharma et al. (2005). Se usaron tres iniciadores UPR, URP2R, URP13R y URP17R. La PCR fue realizada con un volumen de reacción similar a la de los RAPD, y la temperatura de desnaturalización fue de 95 ºC por 5 min, la de alineación fue 65 ºC por 45 s y la de extensión de 72 ºC por 1 min. Luego de 45 ciclos se realizó un ciclo adicional a 72 °C por 10 min.

En cuanto a los ITS se empleó la metodología aplicada por Perdomo et al. (2007). Se utilizó la mezcla de los iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTATTGATATGC-3'). Para la preparación de las reacciones se colocó 2,0 µL de ADN, 3 µL de buffer 10X, 20,8 µL de agua

destilada, 0,6 µL de dNTP'S (10 mM), 1,8 µL de Mg^{+2} (25 mM), 1,5 µL de iniciador (f+R) (10X) y 0,3 µL de Taq DNA polimerasa en tubos para PCR preparados en frío en la cámara.

La amplificación se realizó en un termociclador Perkin Elmer 2400 por 35 ciclos a una temperatura de alineación de 58 °C, el producto de la amplificación fue digerido con las enzimas AluI, HaeIII, EcoRI y KpnI. En donde 4 µL del producto de la PCR fue mezclado con 1,5 µL de tampon-2, 8,5 µL de agua destilada y 1 µL de cada enzima; se dejó incubar a 37 °C por 2 h. Posteriormente, la visualización del producto de la digestión se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 %. La tinción de los geles se realizó con $AgNO_3$ al 0,2 % según metodología aplicada por Sarguinetti et al. (1994).

Para la caracterización del ADN a través de las técnicas de RAPD y UPR se utilizaron 40 aislamientos (10 por estado) y para la técnica del ITS, 36 (9 por estado). Asimismo, se realizó la caracterización de ADN de patrones representativos de los grupos de anastomosis AG-3 y AG-2.1, para un total de 42 muestras para RAPD y UPR y 38 para los ITS.

Las bandas de ADN reproducibles, presentes en cada muestra, fueron contadas como presencia (1) o ausencia (0) de productos amplificados. Comparaciones de pares-acertados de las muestras fueron realizadas mediante la estimación de los coeficientes de similaridad de Jaccard (GS): a/(n-d), donde a = número positivo de coincidencias, n = tamaño de muestra, y d = número negativo de coincidencias. Se construyeron fenogramas usando un método de grupos-pares no ponderados con promedios aritméticos (UPGMA) y análisis de coordenadas principales. Todos los análisis fueron realizados usando el programa NTSYS v.1.70 (Setauket, NY).

Para la evaluación de virulencia de los aislamientos se sembraron trozos de tubérculos de papa greladas del cultivar Kennebec en vasos plásticos conteniendo una mezcla de suelo y cáscara de arroz (2:1), previamente esterilizada con vapor de agua por 3 h. Inmediatamente después de la siembra se procedió a la inoculación para lo cual se usaron aislados de *R. solani* previamente identificados y caracterizados culturalmente (Escalona et al., 2011), y siguiendo la metodología de Bains y Bisht (1995), en el cual discos de micelio de 6 mm de diámetro, de los aislados de 5 días de edad, crecidos en PDA se colocaron en el hoyo donde se sembraron los trozos de tubérculos de papa y luego se cubrieron con una capa de 2 cm de suelo. Los vasos fueron colocados en cámaras de crecimiento a temperaturas de 20 y 30 °C, con una intensidad de luz promedio 25 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. Cuarenta y cinco días después de la siembra e inoculación se examinaron las lesiones en la base de los tallos de las plantas obtenidas, se midió su longitud y los valores fueron utilizados para expresar la severidad de la enfermedad, la cual fue sometida a un análisis de varianza previa transformación de los datos por $\sqrt{x+1}$. Se utilizó el programa estadístico SAS Jump v. 7 y el análisis se realizó para cada estado y temperatura.

RESULTADOS

De los 11 iniciadores RAPD probados y evaluados, sólo cuatro fueron seleccionados debido a que presentaron una mayor calidad de resolución de las bandas y permitieron observar mayor polimorfismo. Esos iniciadores fueron OPA-04 (5`- AATCGGGCTG-3`), OPA-18 (5`-AGGTGACCGT-3`), OPC-18 (5`-TGAGTGGGTG-3`) y OPF-14 (5`- TGCTGCAGGT-3`), los cuales amplificaron un total de 70 alelos, representando un rango de 16 a 21 alelos por marcador.

Un fenograma general permitió caracterizar los 40 aislamientos de *R. solani* y los dos patrones representativos. Se pudieron observar dos grandes grupos, en uno se ubicaron todos los aislamientos analizados, incluyendo el patrón AG-3 los cuales mostraron 28 a 100 % de similitud, y el otro grupo representado por AG-2.1 (Figura 1). El sistema de ordenación mostró la gran variación en cuanto a las distancias génicas entre las muestras evaluadas (Figura 2); sin embargo, puede notarse que en general tienden a formarse tres grupos: Trujillo, Mérida y Táchira-Lara; en este último grupo se ubicó además una muestra del estado Trujillo.

La gran mayoría de los aislamientos mostraron relación con el AG-3, en particular las muestras del estado Trujillo mientras que el patrón AG-2.1 salió del sistema de ordenación, con una gran distancia génica. También se mostró una mayor variación entre las muestras de los estados Táchira y Lara, debido a que presentaron mayor dispersión, en total la técnica explicó un 22,15 % de variación (Figura 2).

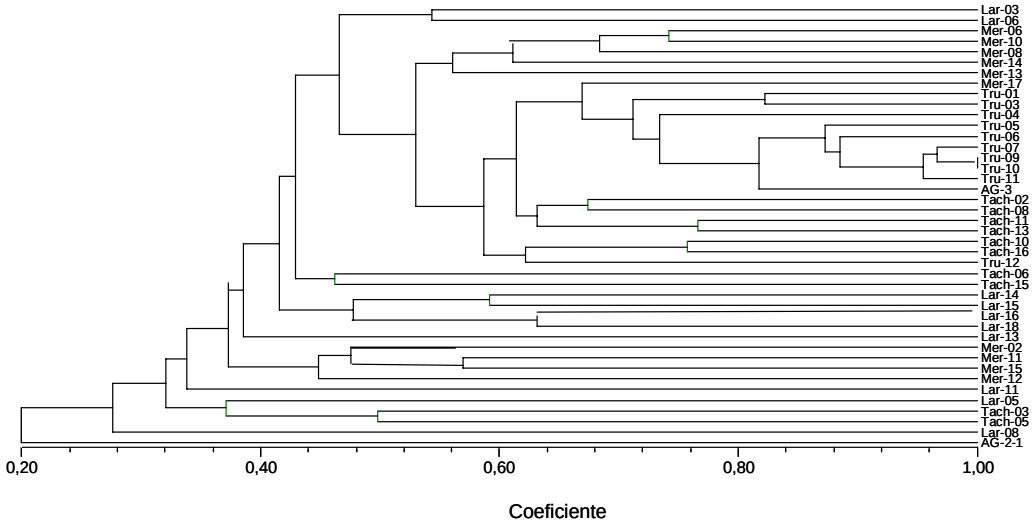


Figura 1. Fenograma obtenido mediante el algoritmo de UPGMA de los coeficientes de similitud de Jaccard con datos obtenidos a partir de RAPD en 40 aislamientos de *R. solani* colectados en localidades productoras de papa en los estados Mérida (Mer), Táchira (Tach), Trujillo (Tru) y Lara (Lar) y los patrones AG-3 y AG-2.1

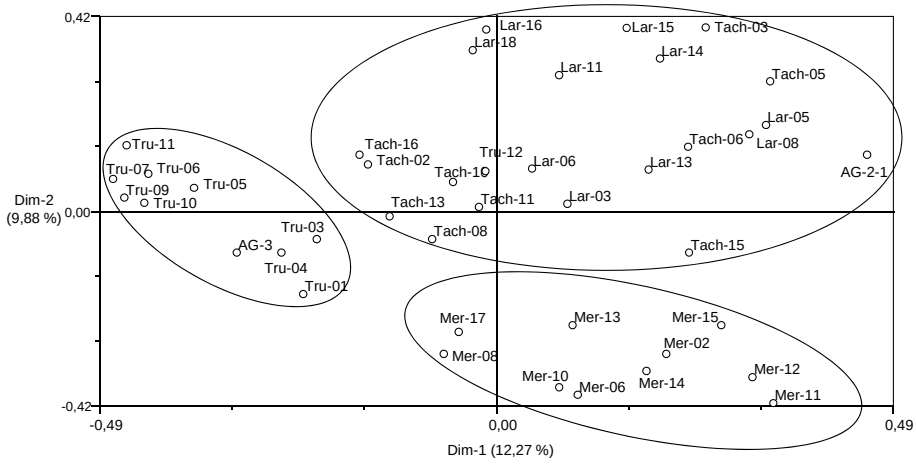


Figura 2. Sistema de ordenación obtenido mediante el algoritmo de UPGMA de los coeficientes de similitud de Jaccard con datos obtenidos a partir de RAPD en 40 aislamientos de *R. solani* colectados en localidades productoras de papa en los estados Mérida (Mer), Táchira (Tach), Trujillo (Tru) y Lara (Lar) y los patrones AG-3 y AG-2.1

Para la caracterización con UPR los tres iniciadores amplificaron un total de 32 alelos con una variación de 7 a 13 alelos por iniciador, mostrando bandas monomórficas y polimórficas. En el fenograma general se pudo observar como los aislamientos comparten de 22 a 100 % de similitud y cómo éstos se agruparon por estado (Figura 3). Los patrones compartieron más del 80 % de similitud y se ubicaron en el centro del fenograma, lo cual indica que todos los aislamientos comparten parte del acervo genético con ambos patrones. En el sistema de ordenación (Figura 4) se observó el mismo comportamiento de los patrones y los aislamientos que en el fenograma. De manera similar a la prueba RAPD, se formaron tres grupos ya que Táchira y Lara forman uno solo, lo cual indica que estas muestras presentan

menor distancia génica entre ellas, por lo tanto comparten gran parte del acervo genético. Este comportamiento es explicado por un 34,05 % de la variación.

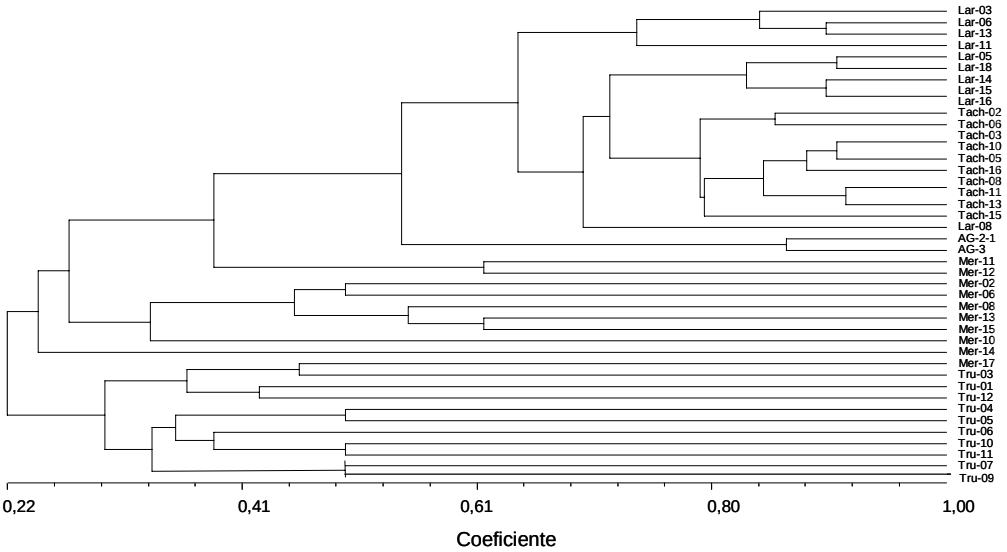


Figura 3. Fenograma obtenido mediante el algoritmo de UPGMA de los coeficientes de similitud de Jaccard con datos obtenidos a partir de UPR en 40 aislamientos de *R. solani* colectados en localidades productoras de papa en los estados Mérida (Mer), Táchira (Tach), Trujillo (Tru) y Lara (Lar) y los patrones AG-3 y AG-2.1

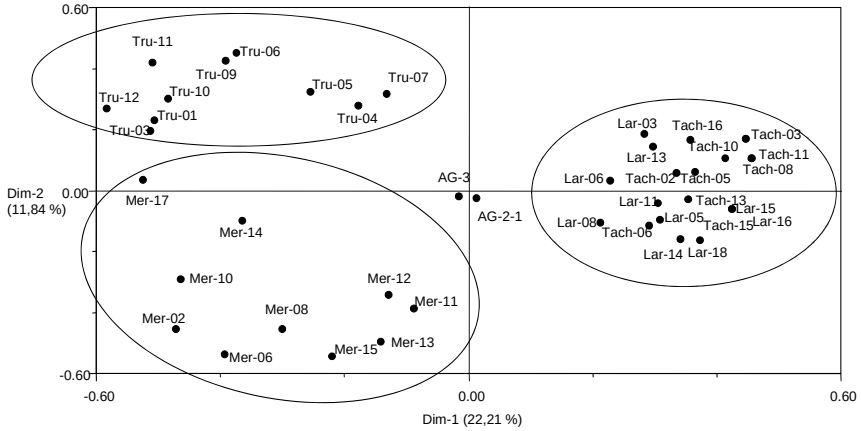


Figura 4. Sistema de ordenación obtenido mediante el algoritmo de UPGMA de los coeficientes de similitud de Jaccard con datos obtenidos a partir de UPR en 40 aislamientos de *R. solani* colectados en localidades productoras de papa en los estados Mérida (Mer), Táchira (Tach), Trujillo (Tru) y Lara (Lar) y los patrones AG-3 y AG-2.1

En cuanto a los ITS, en todos los aislamientos, se produjo un patrón complejo correspondiente a un peso molecular de 700 pb. Se observó un total de 30 alelos amplificados, los cuales variaron de 7 a 9 alelos por cada enzima. El fenograma general (Figura 5) permitió caracterizar los aislamientos de *R. solani* y los dos patrones representativos formándose dos grandes grupos: uno representado por el patrón AG-2.1 y el aislamiento Ta06, y el otro donde se ubicó el resto de las muestras analizadas y el patrón AG-3. Con los coeficientes de similitud también se

construyó un sistema de coordenadas (Figura 6) en el que el patrón AG-2.1 presentó mayor distancia génica y muy cerca de ella se ubicó la muestra Ta06, tal como se observó en el fenograma general, indicando esto que ambas muestras comparten similitud genética. En un segundo grupo se ubicó el resto de los aislamientos y el patrón AG-3, una con mayor distancia génica que la otra pero compartiendo un patrón de similitud entre ellas. Este sistema de coordenadas explicó el 42,93 % de variación entre las muestras.

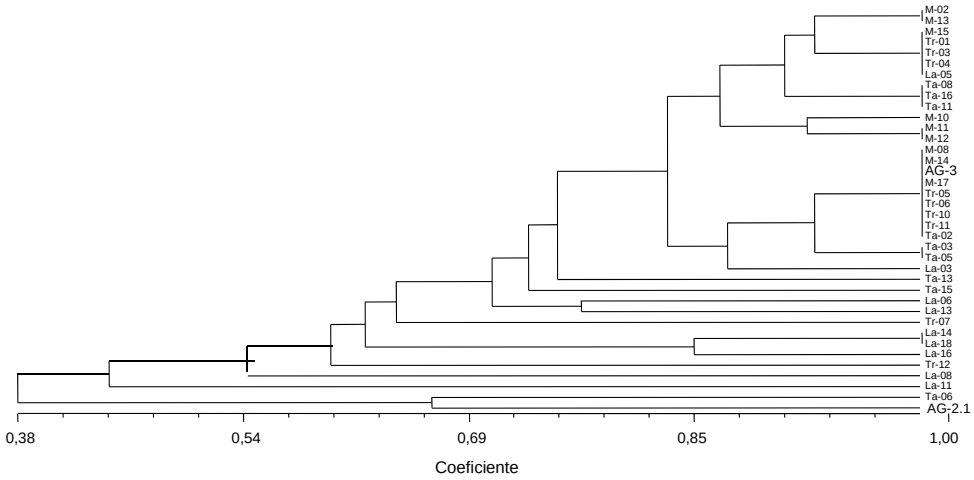


Figura 5. Fenograma obtenido mediante el algoritmo de UPGMA de los coeficientes de similitud de Jaccard con datos obtenidos a partir ITS en 36 aislamientos de *R. solani* colectados en localidades productoras de papa en los estados Mérida (Mer), Táchira (Tach), Trujillo (Tru) y Lara (Lar) y los patrones AG-3 y AG-2.1

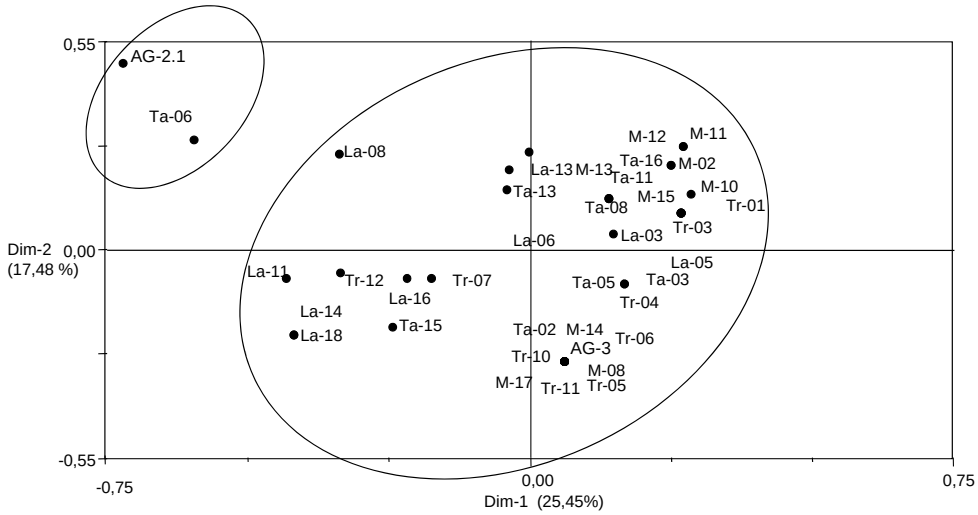


Figura 6. Sistema de ordenación obtenido mediante el algoritmo de UPGMA de los coeficientes de similitud de Jaccard con datos obtenidos a partir ITS en 36 aislamientos de *R. solani* colectados en localidades productoras de papa en los estados Mérida (Mer), Táchira (Tach), Trujillo (Tru) y Lara (Lar) y los patrones AG-3 y AG-2.1

Al evaluar la virulencia de las cepas, combinando todas las muestras, se observaron diferencias significativas ($P \leq 0,01$) tanto para los aislamientos como para temperatura, y para la

interacción aislamiento x temperatura (Cuadro 1), combinando todas las muestras. Se observó que el mayor tamaño de las lesiones fue expresado por el patógeno en la temperatura de 20 ºC con una media de 2,9 mm mientras que a 30 ºC la lesión fue de 1,57 mm.

Cuadro 1. Cuadrados medios (CM) para las características tamaño de lesión con datos transformados √x+1 en 40 muestras de los estados Mérida. Trujillo, Táchira y Lara (10 muestras/estado) a 20 y 30 °C

FV	GL	CM
Modelo	83	3,16**
Error	156	0,16
Total	239	1,20
R^2		0,91
Rep/Temp	4	0,40 ns
Temperatura	1	106,34**
Aislamiento	39	2,23**
Temp*aislamiento	39	2,67**
C.V.(%)		17,56

ns: no significativo; **: significativo (P≤0,001)

Un análisis de los aislamientos sometidos a 20 ºC mostró la variabilidad de ellos en cuanto a su virulencia, con lesiones desde 1,57 hasta 23 mm. Al agrupar los resultados obtenidos por entidad se encontró que no había diferencias entre estados (Cuadro 2), pero sí dentro de ellos con la misma tendencia observada en el análisis general. Táchira mostró el mayor número de aislamientos (60 %) con tamaño de lesiones de 10 mm o más de longitud, y Trujillo el menor (10 %).

Cuadro 2. Tamaño promedio de lesión en raíces de papa causada por los aislamientos de *Rhizoctonia solani* obtenidos de cada estado, en el ensayo a 20 ºC

Estado	Promedio de lesión (mm)
Táchira	10,47 a
Trujillo	8,17 a
Lara	7,47 a
Mérida	7,40 a

DISCUSIÓN

Aun cuando en cada metodología el anclaje de los iniciadores es en sitos distintos del genoma del patógeno, éste es explorado en mayor o menor magnitud y hay variación en el poder discriminatorio de las bandas amplificadas; el estudio molecular se corrobora en cada una de las técnicas. Sin embargo, los resultados utilizando ITS se corresponde con mayor fidelidad con los valores de anastomosis y la variabilidad detectada por este método fue mayor. Es decir, el polimorfismo detectado en el rADN-ITS permitió una caracterización más precisa de los aislamientos de *Rhizoctonia solani* al compararlo con los UPRs y los RAPDs.

Al contrastar los tres tipos de marcadores RAPD, UPR e ITS se observó, en general, que las cepas en estudio se agruparon formando tres grupos con los RAPD y UPR, y dos grupos con los ITS. La variación (grado de dispersión) fue mayor en RAPD y UPR, mientras que para los ITS esto se observó pero dentro de un mismo grupo. El porcentaje de variación explicado por cada técnica fue de 22,17% para RAPD con un valor similar en UPR y el mayor porcentaje fue explicado por la técnica de ITS con 42,93%. En general, el análisis de RAPD muestra la separación de AG-2.1 del resto de las muestras colectadas, observando variación entre ellas; igualmente, los UPR no indican mucha similitud entre las muestras a diferencia de algunos aislamientos en Táchira y Lara, los cuales fueron iguales entre sí. Los patrones se ubicaron en el centro del fenograma, lo cual indica que las muestras en estudio comparten algunos genes de los dos.

Por otra parte, cabe mencionar que la utilización de estos iniciadores agrupó las muestras por estado, indicando que la información genética que presentan podría estar conservándose por zona y/o influencia ambiental. Sin embargo, con los ITS se pudo observar mayor similitud entre las cepas notándose, al igual que con otros marcadores, que Lara presentó mayor variación entre sus muestras.

La mayor variación entre los aislamientos fue observada en Táchira y Lara, con una mayor dispersión entre ellas. Lara también mostró un comportamiento similar en las características culturales, especialmente fue muy variable en cuanto a crecimiento del patógeno y diámetro de las hifa (Escalona et al., 2011); esto pudo deberse a la diversidad de pisos altitudinales, por lo que el acervo genético de las cepas podría estar menos conservado. En Táchira, sin embargo, no hubo grandes cambios en altitud, pero la variación en

este estado pudo deberse a que allí ingresa semilla de Colombia, lo cual puede indicar la entrada de otros genotipos de *R. solani.*

Además, se nota coincidencia al comparar los tres tipos de marcadores en el análisis molecular, en cuanto a la clasificación. En RAPD e ITS hay la tendencia de agrupar la mayoría de las muestras con el AG-3. Con los ITS, de las 36 muestras evaluadas se pudo corroborar que 35 pertenecen al AG-3 y sólo una (Ta06) pertenece al AG-2.1, tal como se observó en la fusión hifal en las prueba de anastomosis en la que de 40 muestras evaluadas, 39 pertenecieron a los AG-3 (Escalona et al., 2011). La clasificación con RAPD mostró variación en el total de muestras evaluadas, indicando la diversidad del patógeno dentro y entre los diferentes estados, mientras que la utilización de los UPR discriminó mayor variación entre las cepas. Los resultados de los distintos fenogramas y sistemas de evaluación analizados indican que el AG-3 es el grupo anastomósico que se encuentra ampliamente diseminado en los estados productores de papa del país y que son éstos, además, los de mayor ocurrencia, tal como lo han observado otros autores en los estados Mérida y Trujillo (Cedeño et al., 2001). Woodhall et al. (2007) y Lehtonen et al. (2008) encontraron que más del 90 % de las cepas de *R. solani* aisladas de papa pertenecieron al grupo AG-3.

En este trabajo se pudieron determinar diferencias entre las cepas mediante el uso de RAPD y UPR; sin embargo, en la determinación de los AG fue de gran utilidad el uso de la técnica de ITS debido a que permitió agrupar las muestras con los patrones evaluados, cosa que ocurrió de una manera no muy específica en RAPD y no ocurrió con los UPR; esto debido a que los rADN de las zonas ITS son completamente conservadas. Vilgalys y Cubeta (1994) también encontraron diferencias genéticas dentro de los AG por medio de marcadores RAPD y pudieron diferenciar entre grupos instraespecíficos del complejo *R. solani*. Otros autores que han usado RAPD en estudios de diferenciación del complejo *R. solani* fueron Sharma et al. (2005), quienes indicaron que la técnica de UPR fue superior a otras técnicas debido a que fue más específica en la caracterización del patógeno.

Acuña (2004) aisló e identificó *Rhizoctonia solani* de papa en el sur de Chile; así mismo, mediante la técnica de PCR con iniciadores específicos logró identificar AG-3, a partir de los ITS, y con marcadores RAPD lograron determinar que todas las cepas se agruparon dentro de la rama estándar AG-3. Justasen et al. (2003), mediante la secuenciación de los ITS y RAPD, encontraron variabilidad genética entre 60 cepas aisladas de papa en Dinamarca; la clonación y secuenciación de las zonas ITS les resultaron en bandas polimórficas dentro de la ITS1 de los diferentes aislamientos, los cuales mediante comparación de secuencias determinaron que pertenecían al AG-3.

En cuanto a la virulencia de las poblaciones del hongo, se observó que la temperatura de 20 ºC fue la más adecuada para el desarrollo de la rizoctoniosis, por lo tanto el análisis comparativo de los aislamientos se concentró en esta temperatura. Escalona et al. (2011) señalaron que la temperatura de 20 ºC fue la mejor para el desarrollo micelial de este hongo, así como para la producción de esclerocios del mismo, lo cual influye en forma determinante sobre la colonización y el parasitismo del hongo.

El comportamiento variable de los aislamientos fue similar en los estados evaluados, lo que indicó que no hubo un efecto significativo de la localidad sobre las diferencias mostradas entre ellos. Como el 97,5 % de las cepas eran AG-3, esa variabilidad está implícita en ese grupo anastómosico. Carling y Leiner (1990) observaron también que en este AG se encuentran desde cepas altamente patogénicas hasta no patogénicas. Así mismo, Bandy et al. (1988) encontraron que este AG era el principal causante de la enfermedad en Maine, Estados Unidos. Bains y Bisht (1995) evaluaron la virulencia de *R. solani* en papa en la provincia de Alberta (Canadá), donde encontraron tres grupos de anastomosis (AG-3, AG-4 y AG-5) y observaron diferencias significativas en cuanto a virulencia entre éstos, siendo los AG-3 los más virulentos. Woodhall et al. (2007), en Gran Bretaña, y Lehtonen et al. (2008) en Finlandia, analizaron la severidad de la enfermedad causada por este hongo en papa y encontraron diferencias significativas entre los grupos de cepas.

Woodhall et al. (2007) consideran que la presencia de un AG particular es un factor importante en papa, especialmente cuando se busca una estrategia de control de la enfermedad,

ya que los AG difieren en su sensibilidad a fungicidas; además, pueden tener diferentes rangos de hospederos y la presencia de hospedantes alternativos en los campos de papa puede incrementar el nivel de inóculo en el suelo, tal como ha sido señalado la presencia de AG-3 en pecíolos de remolacha (Cedeño et al., 2001)

CONCLUSIONES

Con las técnicas moleculares utilizadas (RAPD, UPR e ITS) se encontraron variaciones genéticas entre las cepas de *Rhizoctonia solani* provenientes de diferentes localidades productoras de papa de los estados Táchira, Mérida, Trujillo y Lara. La presencia de AG-3 y AG-2.1 de *R. solani* fue confirmada a través de la técnica de la rDNA-ITS, es decir, se corroboró la razón por la cual los ITS se usan satisfactoriamente para identificar los AG. Las cepas mostraron diferencias significativas en la virulencia sobre tallos del cultivar Kennebec. La virulencia mostrada por las diferentes cepas evaluadas estuvo muy influenciada por la temperatura.

AGRADECIMIENTO

Al CDCHT-UCLA por el financiamiento parcial, a través del proyecto No. 008-AG-2007, y al Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación, a través de los proyectos de BID-FONACIT II No. 2004000370, sub-proyecto No. 26133, y de Incentivo de Laboratorio No. 2007001014. Así mismo, se agradece a los productores por su colaboración, al permitir el muestreo en sus fincas.

LITERATURA CITADA

1. Acuña, I. 2004. Rizoctoniosis de la Papa. Instituto de Investigaciones Agropecuarias – Centro de Investigaciones Remehue. Osorno, Chile. Informativo Remehue N° 46.

2. Anguiz. R. y C. Martin. 1989. Anastomosis group identity and virulence of *Rhizoctonia solani* isolates collected from potatoes in Peru. Plant Disease 73: 199-201.

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

4. Bandy, B., S. Leach y S. Tavantziz. 1988. Anastomosis group 3 is the mayor cause of *Rhizoctonia* disease of potato in Maine. Plant Disease 72: 596-598.

5. Carling, D. y R. Leiner. 1990. Virulence of isolates of *Rhizoctonia solani* AG-3 collected from potato plants and soil. Plant Disease 74: 901-903.

6. Cedeño, L., C. Carrero, K. Quintero, Y. Araujo, H. Pino y R. García. 2001. Identificación y virulencia de grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* Kühn asociados con papa en Mérida, Venezuela. Interciencia 26: 296-300.

7. Escalona, Y., D. Rodríguez y A. Hernández. 2011. Estudio de *Rhizoctonia solani* Kühn aislado de papa (*Solanum tuberosum* L.) en Mérida, Trujillo, Táchira y Lara. I. Caracterización cultural. Bioagro 23(3): 161-168.

8. González, D. 2002. Estado actual de la taxonomía de *Rhizoctonia solani* Kühn. Revista Mexicana de Fitopatología 20: 200-205.

9. Hoisington, D., M. Khairallah y D. Gonzalez de Leon. 1994. Laboratory Protocols CIMMYT Applied Molecular. Genetics Laboratory. Mexico, D.F. 73 p.

10. Justasen, A., D. Yohalem, A. Bay y M. Nicolaisen. 2003. Genetic diversity in potato field populations of *Thanatephorus cucumeris* AG-3, revealed by ITS polymorphism and RAPD markers. Mycological Research 7:1323-1331.

11. Lehtonen, M., P. Ahvenniemi, P. Wilson, M. German-Kinnari y J. Valkonen. 2008. Biological diversity of *Rhizoctonia solani* (AG-3) in a northen potato-cultivation environment in Finland. Plant Pathology 57: 141-151.

12. Ogoshi, A. 1987. Ecological and pathogenicity

of anastomosis group of *Rhizoctonia solani* Kühn. Phytopathology 25: 125-143.

13. Perdomo, R., A. Hernández, A. González, J. Pineda y J. Alezones. 2007. Caracterizacion y evaluación de virulencia en aislamientos de *Rhizoctonia solani* Kuhn, causante de la mancha bandeada en maíz. Interciencia 32: 48-55.

14. Powelson, M., J. Kenneth y R. Rowe. 1993. Management of diseases caused by soilborne pathogens. *In*: Randall Rowe (ed.). Potato Health Management. APS Press. St Paul, Minnesota. pp. 149-158.

15. Sarguinetti, C., E. Neto y A. Sempson. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamide gels. Biotechniques 17: 915-919.

16. Sharma, M., K. Gupta y T. Sharma. 2005. Characterization of variability in *Rhizoctonia solani* by using morphological and molecular markers. Journal Phytopathology 153: 449-456

17. Vilgalys, R. y M. Cubeta. 1994. Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia.* Annu. Rev. Phytopathology 32: 135-155.

18. Woodhall, J., A. Lees, S. Edwards y P. Jenkinson. 2007. Characterization of *Rhizoctonia solani* from potato in Great Britain. Plant Pathology 56: 286-295.