

## Tesis de Posgrado

# El complejo Rhizoctonia en la Argentina : Distribución, patogenicidad y biocontrol

Gasoni, Amelia Laura

1994

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Gasoni, Amelia Laura. (1994). El complejo Rhizoctonia en la Argentina : Distribución, patogenicidad y biocontrol. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2665\\_Gasoni.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2665_Gasoni.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Gasoni, Amelia Laura. "El complejo Rhizoctonia en la Argentina : Distribución, patogenicidad y biocontrol". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1994. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2665\\_Gasoni.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2665_Gasoni.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**EL COMPLEJO *RHIZOCTONIA* EN LA ARGENTINA:  
DISTRIBUCION, PATOGENICIDAD Y BIOCONTROL**

**Lic. Amelia Laura Gasoni**  
**Director: Dr. Miguel Angel Galvagno**  
**Co-Director: Dr. Jorge Wright**

**Departamento de Ciencias Biológicas**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**  
**Universidad de Buenos Aires**

**Tesis presentada para optar por el título de**  
**Doctor de la Universidad de Buenos Aires**

**1994**

*tesis*  
*2665*  
*Ej. 2*

**A mis queridos Jorge y Alejandro**  
**A mis queridos padres**  
**A toda mi familia**

## **AGRADECIMIENTOS:**

Ha finalizado una etapa, tal vez la más importante, que resume muchos recuerdos de situaciones difíciles y alegres compartidas con amigos, compañeros y familiares.

No puedo dejar de rememorar a la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de Córdoba, a mis compañeros y profesores que en tanto contribuyeron a graduarme como Bióloga y a despertar mi interés por continuar en la investigación sobre aspectos micológicos.

Fue en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Institución que me aceptó como becaria estudiante y luego como investigadora de plantel permanente, que vos Corvalio Fortugno y vos Lidia Rossi me incitaron a estudiar los hongos causantes de enfermedades radiculares.

A vos Fortugno, no tengo palabras para agradecerle la ayuda que me brindaste. Sin duda que mereces un párrafo aparte ya que te he aburrido obligándote a leer miles de veces distintas versiones de Introducción, Materiales y Métodos y Discusión. Cuántas noches te has quedado despierto para terminar de corregir el texto y cuanto estímulo me has dado para finalizar conforme este trabajo de Tesis.

Al iniciar este trabajo de investigación fue junto a mi querida amiga Pili Huergo que comencé a evaluar los daños causados por la memorable *Rhizoctonia* y toda su familia.

Tengo que agradecerle Miguel Angel Galvagno por haber aceptado entonces, dirigir mi trabajo de Tesis, por el tiempo que me dedicaste y por todo lo que me enseñaste. A Ud. Dr. Jorge Wright por su colaboración y fundamentalmente por su enseñanza, sus consejos y su aliento.

Los ensayos se hicieron cada vez más intensivos y no se podrían haber llevado a cabo sin tu ayuda Betty Gurfinkel que con infinita colaboración y desinterés me brindaste tu amistad, todo tu trabajo, tu conocimiento y tu compañía. Cuantos ensayos me ayudaste a evaluar y cuantos consejos fitopatológicos me proporcionaste.

A vos María Rosa González por tu permanente e invaluable ayuda en el laboratorio y a vos María de la Paz Paglilia por tantas anastomosis positivas, dedico todo mi agradecimiento.

En la Facultad de Ciencias Exactas de la UBA, compañeros y amigos me brindaron desinteresadamente toda su ayuda para develar el misterio de las enzimas. Querida Cristina Paveto, cuantos contratiempos y cortes de energía nos depararon las determinaciones de AMPcíclico y las enzimas de su metabolismo en los patógenos y no patógenos. Sin tu enorme colaboración, yo no los hubiera resuelto jamás.

Tampoco dejo de recordar la compañía de esos mediodías de ensayos en la Facultad con Giorgia Egidy, María Leonor Cantore, Silvia Moreno, Pedro Fernández Murray, Damián Romero, Lilian Montero y otros tantos y queridos amigos.

Agradezco muy especialmente a la Dra Susana Passeron por facilitarme el uso del laboratorio de Biología Molecular, materiales, drogas, por interesarse en mi trabajo y brindarme su ayuda.

Querida Teresa Alconada, como puedo agradecerte toda la ayuda que me proporcionaste para estudiar las celulasas de los protagonistas de mi Tesis. Cuantos reactivos preparaste y me ayudaste a preparar para que yo no perdiera tiempo en mis travesías desde el INTA hasta la Facultad. Cuántos hermosos momentos hemos compartido junto a María Delia Bertoni, Laura Levín y Nuria Romero.

Agradezco muy especialmente a la Dra Silvia López por brindarme desinteresadamente, como profesora y amiga, su asesoramiento y toda su ayuda. Al Dr. Daniel Cabral por todo su interés, sus consejos y colaboración con el desarrollo del trabajo de Tesis. A mi querida amiga Sonia González por ayudarme a descubrir al endófito biocontrolador dentro de un pelo radical y a comprobar su comportamiento micorrícico. A la Dra Amalia Bolaño y a la Ing. Agr. Emilia Rivero por su coordinación y enorme colaboración en los ensayos de dosaje de fósforo, para comprobar la movilización del fósforo soluble del suelo.

No puedo olvidar a todos los amigos del INTA que me ayudaron para la finalización de este trabajo. A vos Ricardo Moschini que dedicaste horas y horas para confeccionar impresionantes tablas con todos los datos de patogenicidad y sintomatología. A la gente querida de Administración que colaboró hasta con el préstamo de su computadora. A Adriana Fuica que dedicó desinteresadamente todo su tiempo a compaginar y convertir tablas y gráficos interminables. A mis compañeros: Doris Barreto, Eduardo Irigoyen, Delia Erbaggi, Julio Tillería y Jorge Noverazco que compartieron tantas alegrías y desventuras. Y qué podría haber hecho yo sin tu enorme ayuda y tus "rebusques" en distintas bibliotecas y hemerotecas del mundo querida Estela Favret.

Como podría olvidar todas las extracciones de proteínas realizadas y tanto material utilizado en tu laboratorio, Esteban Hopp. Cuánta colaboración me brindaste en drogas, reactivos, marcadores de peso molecular etc. y hasta la hospitalidad de tu casa en Guelph, querida Ruth Heinz.

Agradezco especialmente a Cristina Dizeo y al Dr. Gaggino por su tiempo y desinteresada dedicación en la preparación y tinción de los cortes para microscopía. Al Sr. Rodríguez por todo el trabajo fotográfico de esta Tesis.

Mi más sincero agradecimiento a toda la gente amiga que dedicó su tiempo y su trabajo a facilitar los ensayos realizados en el campo: Juan Carlos Torres, Elías Magrino y Marcos Miskow que luego del calor violento del verano, jamás olvidaron regar "el algodón" y cuidar cada ensayo como propio. Tampoco podría olvidarme de vos Luisita Quinos que siempre te ocupaste de dejar el material impecable para los ensayos.

Agradezco especialment al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Buenos Aires por facilitarme y permitirme realizar este trabajo de Tesis.

A todos, Muchas Gracias

**FCE y N BIBLIOTECA**

**INDICE**



## INTRODUCCION

<b>1.</b>	<b>Hongos Fitopatógenos de suelo-Enfermedades Radiculares</b>	
1. a.	Ecología de Hongos de Suelo	14
1. b.	Potencial de inóculo	16
1. c.	Parasitismo y Patogenicidad	18
1. d.	"Damping-off"	20
<b>2.</b>	<b>Complejo <i>Rhizoctonia</i></b>	<b>24</b>
2. a.	Características taxonómicas	24
2. b.	Anastomosis hifal	27
2. c.	Saprofitismo y parasitismo	32
<b>3.</b>	<b>Hongos endofíticos y movilización del P soluble del suelo</b>	<b>35</b>
<b>4.</b>	<b>Aspectos moleculares relacionados con la patogenicidad</b>	
4.a.	Celulasas	39
4.b.	3':5' monofosfato cíclico de adenosina (AMP cíclico)	43
<b>5.</b>	<b>Métodos de Control</b>	<b>46</b>
5. a.	Interacciones microbianas con los patógenos	46
5. b.	Procesos defensivos del hospedante-Incremento de fenoles	48

## OBJETIVOS

## MATERIALES Y METODOS

<b>1.</b>	<b>Relevamiento del género <i>Rhizoctonia</i> como saprófito y como patógeno en la Argentina</b>	<b>56</b>
1. a.	Métodos de aislamiento del género <i>Rhizoctonia</i>	57
1. b.	Características morfológicas del género <i>Rhizoctonia</i>	58

<b>2.</b>	<b>Determinacion del grupo de anastomosis</b>	<b>59</b>
<b>2.a.</b>	<b>Determinación del grupo de anastomosis por apareamiento hifal</b>	<b>59</b>
<b>2.b.</b>	<b>Determinación del grupo de anastomosis por electroforesis en geles de poliacrilamida.</b>	<b>61</b>
<b>2. b.1.</b>	<b>Método de cultivo de los aislamientos para electroforesis</b>	<b>61</b>
<b>2. b.2.</b>	<b>Extracción de proteínas y preparación de las muestras</b>	<b>62</b>
<b>2. b.3.</b>	<b>Electroforesis</b>	<b>63</b>
	<b>Gel de poro grueso</b>	<b>63</b>
	<b>Gel de poro fino</b>	<b>63</b>
<b>3.</b>	<b>Patogenicidad de los aislamientos</b>	<b>64</b>
<b>4.</b>	<b><i>Cladorhinum foecundissimum</i></b>	<b>66</b>
<b>4. a.</b>	<b>Aislamiento</b>	<b>66</b>
<b>4.b.</b>	<b>Características morfológicas y patogenicidad de los aislamientos</b>	<b>66</b>
<b>5.</b>	<b>Mecanismos de penetración de <i>Rhizoctonia solani</i> y <i>Cladorhinun foecundissimum</i> en plántulas de algodón</b>	<b>67</b>
.	<b>Métodos de Tinción:</b>	<b>68</b>
<b>6.</b>	<b>Determinación del comportamiento endofítico de <i>Cladorhinum foecundissimun</i></b>	<b>69</b>
<b>7.</b>	<b>Enzimas relacionadas con la degradación de la pared celular</b>	
<b>7.a.</b>	<b>Celulasas</b>	<b>71</b>
<b>7.a.1.</b>	<b>Medios de cultivo</b>	<b>71</b>
<b>7.a.2.</b>	<b>Preparación de inóculos</b>	<b>73</b>
<b>7.b</b>	<b>Determinaciones enzimáticas</b>	<b>74</b>
<b>7.b.1.</b>	<b>Actividad <math>\beta</math>-glucosidasa</b>	<b>74</b>
<b>7.b.2.</b>	<b>Actividad endo- 1, 4 <math>\beta</math>-Glucanasa ( carboximetilcelulasa)</b>	<b>75</b>

7.b.3.. Actividad exo-1-4 $\beta$ Glucanasa (avicelasa)	75
Determinación de azúcares reductores	76
Revelado de la Reacción	76
8. Determinación de la concentración intracelular de 3':5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPcíclico)	77
Extracción del AMP cíclico	77
8.a. Medición del AMP cíclico	78
8.a.1. Preparación de la proteína ligante de AMP cíclico	78
8.a.2. Método de ensayo por competencia por una proteína ligante del AMP cíclico	79
8.b. Preparación de extractos y fracciones intracelulares para la medición de las enzimas del metabolismo del AMPcíclico	80
8.c. Medición de actividades enzimáticas	80
8.c.1. Actividad adenilato ciclasa (AC)	80
8.c. 2. Actividad Fosfodiesterasa de AMP cíclico (A-PDE)	81
8.d. Determinación de proteínas	82
9 Evaluación de la reducción del damping-off a través de <i>C.</i> <i>foecundissimum</i> .	82
10. Evaluación de los mecanismos relacionados con la supresión del "damping-off"	85
10. a. Movilización del fósforo soluble del suelo por acción de <i>C. foecundissimum</i>	85
10. b. Determinación de Fenoles en plántulas de algodón colonizadas con <i>C. foecundissimum</i> .	88
11. Drogas utilizadas	90

## RESULTADOS Y DISCUSION

1.	<b>Relevamiento de <i>Rhizoctonia</i> en la Argentina</b>	<b>92</b>
2.	<b>Características del género <i>Rhizoctonia</i></b>	<b>113</b>
2.a.	<b>Características morfológicas en cultivo</b>	<b>113</b>
2.b.	<b>Reacción de anastomosis</b>	<b>116</b>
2.c.	<b>Patogenicidad de los aislamientos de <i>Rhizoctonia</i></b>	<b>122</b>
3.	<b>Mecanismos de penetración de <i>R. solani</i> en plántulas de algodón.</b>	<b>134</b>
4.	<b>Enzimas relacionadas con la degradación de la pared celular</b>	
	<b>Celulasas de <i>R. solani</i></b>	<b>140</b>
4.a.	<b>Actividad <math>\beta</math>-glucosidasa</b>	<b>140</b>
4.b.	<b>Actividad Endo- 1, 4 <math>\beta</math>-Glucanasa ( carboximetilcelulasa)</b>	<b>141</b>
4.c...	<b>Actividad Exo-1-4 <math>\beta</math>-Glucanasa (avicelasa)</b>	<b>142</b>
5.	<b>Niveles de 3':5' monofosfato cíclico de adenosina intracelular de <i>R. solani</i> y medición de las actividades de fosfodiesterasa de AMP cíclico y adenilato ciclasa</b>	<b>150</b>
6.	<b>Aislamiento de agentes biocontroladores: Género <i>Cladorhinum</i> Sacc. et March.</b>	<b>152</b>
7	<b>Determinación del comportamiento endofítico</b>	<b>159</b>
8.	<b>Enzimas relacionadas con la degradación de la pared celular</b>	
	<b>Celulasas de <i>C. foecundissimum</i></b>	<b>164</b>
8.a.	<b>Actividad <math>\beta</math>-glucosidasa</b>	<b>164</b>
8.b	<b>Actividad Endo- 1, 4 <math>\beta</math>-Glucanasa ( carboximetilcelulasa)</b>	<b>165</b>
8.c.	<b>Actividad Exo-1-4 <math>\beta</math>-Glucanasa (avicelasa)</b>	<b>166</b>
9	<b>Niveles de 3':5' monofosfato cíclico de adenosina intracelular de <i>C. foecundissimum</i> y medición de las</b>	

<b>actividades de fosfodiesterasa de AMP cíclico y adenilato ciclase</b>	<b>172</b>
<b>10. Evaluación de la supresión del "damping-off"</b>	<b>173</b>
<b>11. Evaluación de los mecanismos relacionados con la supresión del "damping-off".</b>	<b>183</b>
<b>11. a. Movilización del fósforo soluble del suelo por acción de <i>C.</i>         <i>foecundissimum</i></b>	<b>183</b>
<b>11. b. Fenoles en plántulas de algodón colonizadas con <i>C.</i>         <i>foecundissimum</i>.</b>	<b>188</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>191</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>196</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>197</b>

## **INTRODUCCION**

## **1. Hongos fitopatógenos del suelo - Enfermedades Radiculares**

Las enfermedades radiculares causadas por organismos fúngicos constituyen un grave problema mundial para los cultivos agrícolas. El conocimiento de los mecanismos determinantes de los variados tipos de ataque de estos organismos, penetración en los tejidos vegetales o de su colonización y posterior desintegración, está estrechamente relacionado con el progreso en los estudios sobre la ecología y patogénesis de hongos colonizadores del suelo, y de la rizosfera.

### **1. a . Ecología de los Hongos de Suelo**

De acuerdo con Waksman (1944), existen dos grupos ecológicos de hongos de suelo : Los denominados " habitantes del suelo" que se presentan con sus estructuras y actividad características en este medio y los "invasores del suelo", que manifiestan limitada actividad y son residentes transitorios del suelo.

Las categorías de " habitantes" e "invasores del suelo", fueron aplicados a los hongos fitopatógenos, por primera vez, por Reinking y Manns (1933), quienes encontraron diferencias en la localización, con respecto al hospedante, de ciertos aislamientos de *Fusarium* sp.. Estas observaciones condujeron a Garrett (1956), a distinguir el comportamiento saprofítico del parasítico y a los estadios de supervivencia en los hongos causantes de infecciones radiculares.

La capacidad saprofítica competitiva de las especies fúngicas fue definida por el último autor citado, como la suma de característica fisiológicas que determinan una colonización exitosa de sustratos orgánicos. Coincidentemente

Griffin (1973) considera la supervivencia de los hongos en el suelo como el resultado de un crecimiento continuo o una alternancia de períodos de actividad con dormancia.

Los hongos patógenos denominados "habitantes del suelo", tradicionalmente se consideraron primitivos, carentes de especialización y capaces de atacar un amplio espectro de hospedantes en estado de plántulas y de tejidos jóvenes (por ejemplo: *Rhizoctonia* y *Pythium*) en tanto que los habitantes de raíces se categorizaron como especializados y poseedores de una mayor especificidad, menor competitividad y en consecuencia una existencia transitoria en el suelo.

La especialización patogénica es considerada incompatible con una existencia saprofítica muy desarrollada. La pérdida de esta capacidad saprofítica se considera inevitable con la evolución de los patógenos y desemboca en el parasitismo obligado como la etapa final en la serie evolutiva. Un amplio rango de hospedantes sería un carácter primitivo en tanto que uno estrecho representaría un estado avanzado en la evolución. *Fusarium oxysporum* Schl., con existencia de subespecies o formas específicas para determinados hospedantes e inclusive, de biotipos para algunos cultivares, es considerado un organismo altamente especializado. En contraste, *R. solani* Kühn se caracterizó como primitivo y poco especializado. En años recientes, sin embargo, a través de profundas investigaciones en este complejo fúngico, se descubrió cierta especialización. Fundamentalmente que su patogenicidad puede ser variable y está asociada con distintos grupos de anastomosis o poblaciones genéticamente independientes, grupos intraespecíficos, diferencias en el contenido de bases de su DNA, etc. (Ogoshi, 1987; Sneh et al., 1991).



## 1. b . Potencial de Inóculo

El término "potencial de inóculo" de un suelo ha sufrido una evolución en su significado desde que Horsfall (1932), origina el término y lo define. Ese concepto, conduce en su momento a la idea de la cantidad de un organismo patogénico presente en el suelo y a la magnitud de su virulencia. Sin embargo se ignoran las condiciones ambientales y el hospedante, que son los factores determinantes del potencial de inóculo. Posteriormente Dimond y Horsfall (1965) establecen que este término representa la cantidad de inóculo y su virulencia, la cantidad de tejido hospedante disponible y su susceptibilidad, además del efecto del medio sobre todo ello.

Garret (1956) consideró más apropiado definir el "potencial de inóculo" en términos de energía y lo expresa como: "La energía de crecimiento de un parásito disponible para la infección del órgano hospedante". El mismo autor aplica esta definición no solamente para el parasitismo sino también para el saprofitismo.

Si bien en la práctica, la energía de crecimiento es imponderable, Camporota (1982), establece que la : Energía patogénica acumulada en el suelo y denominada "potencial infeccioso", se expresa en la planta por medio de focos o puntos de infección y puede ser estimada en suelos infectados con *R. solani* por medio de ensayos biológicos. Estos consisten en confrontar el suelo con un hospedante sensible a fin de obtener una proporción exitosa de infecciones en condiciones estándar.

El mismo autor define la unidad de potencial infeccioso de un suelo como la cantidad de energía patogénica almacenada en el suelo, necesaria y suficiente para inducir un punto de infección sobre el hospedante.

Lockwood (1988), prefiere dividir el concepto de potencial de inóculo en dos partes: una que considere la energía o calidad infectiva del inóculo y otra que contemple la densidad del inóculo. Se puede argumentar que ambas podrían combinarse ya que el incremento en la densidad de inóculo determina un aumento de la fuerza invasora; sin embargo para este autor, la relación entre el incremento en el número de infecciones y el aumento de la densidad de inóculo, normalmente es el resultado de una mayor probabilidad de infecciones por causa de la acción sinérgica entre propágulos.

La concentración energética del sustrato sobre el inóculo fúngico puede afectar significativamente su potencial de inóculo. Weinhold et al. (1969) encuentran que el micelio de *R. solani* desarrollado en medio con elevadas concentraciones de glucosa y asparagina resulta menos dañino para las plántulas de algodón que cuando crece en un medio pobre. Lockwood (1988) sugiere que para la invasión y colonización de los tejidos hospedantes, se requiere un adecuado complemento de hidrolasas, toxinas y otros metabolitos; los que a su vez dependen de la energía que proporcionan los nutrientes.

El número de infecciones o de plantas infectadas frecuentemente está relacionado con el número de propágulos y aparentemente la biomasa de diferentes patógenos en el suelo depende inversamente del tamaño de sus propágulos; por ej. las pequeñas unidades aparecen en mayor número que las grandes (Van der Plank, 1975). En el caso de *R. solani* los resultados obtenidos de ensayos realizados sobre la relación dosaje-respuesta indican que existe un sinergismo en la acción conjunta de muchos propágulos cercanos a la superficie del hospedante (Benson y Baker, 1974). Coincidentemente se ha demostrado una estrecha relación entre la invasión saprofítica del sustrato edáfico por *R. solani* y el "damping-off" de pre-emergencia en rabanito (Martinson, 1963), confirmando la primitiva teoría de Garret (1956) de la

relación directa entre el parasitismo primitivo y la capacidad saprofítica competitiva radicada en una elevada capacidad de crecimiento miceliano.

### 1 . c. Parasitismo y Patogenicidad

El **parasitismo** no debe, sin embargo, confundirse con **patogenismo** ya que son dos fenómenos biológicos diferentes. Bateman (1978) establece que no todos los parásitos son patógenos e inversamente no todos los patógenos son parásitos. Este autor considera dos combinaciones básicas: "hospedante-parásito" y "susceptible-patógeno". La combinación hospedante-patógeno solamente es válida en el caso en que el patógeno también se comporte como parásito. En todos los casos en que está involucrada la enfermedad, la combinación "susceptible-patógeno" es correcta y tiene un significado específico.

En las relaciones "hospedante-parásito", este último aprovecha el sustrato alimentario proporcionado por el hospedante, sin provocar enfermedad. Este tipo de parasitismo se encuentra ejemplificado en la colonización ejercida por algunos endófitos simbiotes y por las bacterias del género *Rhizobium* residentes en los nódulos radiculares de las Leguminosas. En las relaciones "susceptible-patógeno", este último provoca disfunciones en el hospedante que originan la enfermedad y un ejemplo es el "damping-off" ocasionado por *R. solani* y por *Sclerotium rolfsii* Sacc..

La patología incluye asociaciones parasíticas que derivan en enfermedad. El conocimiento de la enfermedad y de sus causas puede o no estar acompañado del conocimiento de los mecanismos del parasitismo, pero el conocimiento de la patogénesis es crítico para la comprensión de la patología. El análisis de las relaciones "hospedante-parásito" que resultan en enfermedad normalmente

revelan que el daño infligido al organismo susceptible resulta principalmente del "mecanismo de ataque" del patógeno (enzimas degradativas, toxinas, etc.), de las reacciones metabólicas adversas inducidas en el organismo susceptible (decompartamentación enzimática, etc) y no solamente de la utilización de sus nutrientes por parte del patógeno (Agrios, 1969).

Según Bateman (1978), la patogenicidad, la susceptibilidad y la resistencia son todos atributos gobernados por características genéticas de los sistemas vivos para el ambiente físico en el que operan. La hipótesis de los componentes múltiples focaliza la atención en la naturaleza de las interacciones del hospedante (susceptible) y del parásito (patógeno) como factores determinantes en las relaciones parasíticas y patogénicas.

Se considera que el habitat parasítico de un parásito y la sensibilidad de un hospedante a un parásito dado es el resultado de la suma de todas las interacciones entre dos sistemas vivos que están influenciados por las condiciones físico-ambientales y el tiempo (Bateman, 1978). Flentje ya en 1965, sugería que el fracaso de algunos organismos fúngicos para penetrar en un hospedante podía resultar de la naturaleza de los nutrientes provistos por el hospedante, de la materia orgánica en descomposición o de una especial localización en la rizosfera. Este autor asumía entonces que si bien, el efecto de los metabolitos tóxicos en el hospedante era importante, su acción resultaba aleatoria en algunas circunstancias.

En conclusión Bateman (1978) considera que la: "Enfermedad en una planta consiste de alteraciones fisiológicas causadas por la irritación continua provocada por uno o más factores primarios".

### 1. d . "Damping-off"

El "damping-off" es una enfermedad que se manifiesta como decaimiento de tejidos principalmente en semillas y plántulas, durante la germinación y antes o después de la emergencia (Agrios, 1969).

Las plantas superiores normalmente cumplen el siguiente ciclo de vida: semilla- germinación - plántula - crecimiento - planta adulta - floración - fructificación.

El tipo de germinación determina el período de exposición de los cotiledones ricos en nutrientes a la invasión de los parásitos. Las plántulas, compuestas de tejido jóvenes de origen meristemático son generalmente más susceptibles al ataque fúngico

Dentro de las infecciones radiculares, el "damping-off" es provocado por un complejo fúngico, en el que prevalecen *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora* y *Sclerotium*. Estos organismos se destacan por ser habitantes comunes del suelo y normalmente el inóculo de los mismos en el suelo aumenta proporcionalmente a la intensidad de cultivo de un hospedante susceptible.

A diferencia de los restantes componentes del complejo, los aislamientos del género *Rhizoctonia* no solamente son causantes de "damping-off", sino también del ataque en plantas adultas. Este género es particularmente complejo en su relación hospedante-parásito debido a las características combinadas de su capacidad saprofítica con su potencialidad letal patogénica (Parmeter, 1970).

Baker (1970) sugiere que los tipos y severidad de la enfermedad producidos por *R. solani* en numerosos cultivos, estarían más relacionados, de acuerdo con

la secuencia arriba mencionada, con la posibilidad de coincidencia de una etapa favorable a la enfermedad y con la duración de la misma y considera:

**a) Podredumbre de semilla:** La semilla es invadida por el micelio del hongo en el suelo infestado en el cual se ha sembrado. En este caso la semilla invadida sirve como sustrato nutritivo y permite al hongo alcanzar las plántulas adyacentes. Es común encontrar plántulas con síntomas de "damping-off" cercanas a semillas con podredumbre.

**b) "Damping-off" en plántulas:** De acuerdo con el estado de desarrollo del hospedante, el "damping-off" puede ser de pre-emergencia y de post-emergencia.

El "damping-off" de pre-emergencia es el determinante de la muerte de plántulas desde las etapas iniciales de la germinación de las semillas hasta el momento de la emergencia por encima de la superficie del suelo. Puede originarse por podredumbre de semilla y la probabilidad de este tipo de ataque es mayor cuando existe un retraso en la germinación por condiciones ambientales desfavorables (temperatura, humedad).

El "damping-off" de post-emergencia puede deberse a la expresión de un efecto prolongado de la infección en pre-emergencia o a una penetración del inóculo desde el suelo. La enfermedad se puede desarrollar en cualquier momento después de la emergencia de la plántula de la superficie del suelo y se caracteriza por una relativamente rápida desintegración y obscurecimiento del tejido cortical del hipocótilo. ( Fig. 1).

Aunque la sintomatología del "damping-off" es similar a la causada por el "stress hídrico", es posible diferenciar la causa de la mortalidad de las plantas

debido a que la desintegración de los tejidos radiculares sin alteración de la pared no es producida por ineficiencia en la absorción de agua (Talboys 1978). Por lo tanto también debe considerarse el ataque enzimático causado por algunos patógenos del complejo. La celulosa cristalina representa un alto porcentaje de la materia seca de las plantas superiores, constituye el armazón estructural de la pared celular, siendo los polímeros de su estructura microfibrilar susceptibles a la degradación enzimática (Bateman, 1969). Coincidentemente Talboys (1978) concluye que los patógenos que causan podredumbre de raíz segregan enzimas líticas (poligalacturonasas, pectinesterasas, celulasas, etc.) que son las que determinarían la pérdida de coherencia de los tejidos, ruptura de la pared celular y muerte del protoplasto





## 2. Complejo "*Rhizoctonia*"

*Rhizoctonia* spp. es un género de hongos imperfectos basidiomicéticos, habitantes de suelo que pueden ser fitopatógenos radiculares y basales aunque también causantes de enfermedades aéreas en algunos cultivos y con un considerable número de aislamientos saprofiticos y micorrícicos (Baker 1970).

Debido al gran rango de hospedantes, amplia distribución geográfica, adaptabilidad al medio y variedad de enfermedades que producen, los miembros del complejo *Rhizoctonia* se encuentran entre los organismos fitopatógenos más importantes.

### 2. a. Características Taxonómicas

El género *Rhizoctonia* fué creado por de Candolle (1815) para los patógenos radiculares carentes de conidios. Los caracteres básicos del género de acuerdo con la descripción realizada por este autor fueron : la producción de esclerocios de textura uniforme con emergencia de hifas y la asociación de su micelio con las raíces de las plantas.

La indeterminación de caracteres específicos condujo posteriormente a la agrupación en este género de una diversidad de especies con un solo carácter en común: la ausencia de conidios (Parmeter y Whitney, 1970).

Actualmente se reconocen dos grupos principales de aislamientos dentro del género *Rhizoctonia*: **Binucleado** y **Multinucleado**, de acuerdo con el criterio citomorfológico del número de núcleos de las células de las hifas jóvenes y del ancho de las hifas en crecimiento.

Las características morfológicas hifales de las especies dentro de estos grupos se resumen en :

a) Aislamientos Binucleados : Dos núcleos en las células de los extremos de hifas jóvenes (raramente 1-3). Ancho de las hifas en crecimiento normalmente menor de 7  $\mu\text{m}$ . Los caracteres miceliares de los anamorfos son similares, no son distinguibles por su patogenicidad y el estado perfecto corresponde en todos los casos al género *Ceratobasidium* (Saksena y Vaartaja, 1960; Parmeter y Whitney, 1970).

b) Aislamientos Multinucleados : Tres o más núcleos en las células de los extremos de hifas jóvenes y ancho hifal mayor de 7  $\mu\text{m}$ .

La especie más estudiada dentro del género es *Rhizoctonia solani* Kühn [teleomorfo *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk] cuya descripción original (Kühn, 1858) fué deficiente. En ausencia de una diagnosis detallada de las características, dentro de este género y especie se encasillaron especies taxonómicas con distitos anamorfos y teleomorfos. Su taxonomía y nomenclatura fue revisada luego por Duggar (1915) y conjuntamente con la descripción de Parmeter y Whitney (1970) y Ogoshi (1987) se establecen las siguientes características morfológicas:

1. Micelio de crecimiento rápido, marrón pálido a oscuro de diámetro relativamente ancho ( 7-10  $\mu\text{m}$ .), con ramificación cercana al septo distal de las células hifales, a menudo muy cerca del ángulo recto en hifas viejas.

2. Constricción de la ramificación hifal en el punto de origen.

3. Formación de un septo cercano al punto de origen de la ramificación.

4. Producción de células monilioides.

5. Producción de esclerocios de textura uniforme y variación en tamaño y forma.
6. Patogenicidad a un amplio rango de hospedantes, resultando en una variedad de síntomas incluyendo damping-off en plántula, podredumbre de raíces, de partes subterráneas, hojas y caída de frutos y semillas.
7. Existencia de un prominente aparato septal (doliporo).
8. Presencia de células multinucleadas en hifas creciendo activamente.

Esta descripción morfológica, con excepción del número de núcleos, coloración de la colonia y diámetro hifal, es común a todas las especies de *Rhizoctonia*.

Las características morfológicas de *R. zae* y *R. oryzae* son similares para las dos especies, como lo indica la existencia de un teleomorfo común (*Waitea circinata*). Las diferencias entre estas dos especies, radican básicamente en la coloración y morfología de sus esclerocios.

La descripción de los caracteres de los anamorfos fue realizada primeramente por Voorhees (1934), luego por Oniki et al. (1985) y Burpee y Martin (1992) y del estado perfecto por Warcup y Talbot (1962).

La anastomosis hifal (ver ítem 2.b. de esta sección) y el número de núcleos por célula son las herramientas que permiten identificar las especies de *Rhizoctonia* adecuadamente (Ogoshi et al., 1979).

La metodología que se requiere para aislar una colección de *Rhizoctonia* spp. de plantas o de suelos bajo prácticas culturales específicas, rotaciones, tipos de suelo etc., es relativamente simple y eficiente (Sneh et al., 1991).

Los miembros del complejo *Rhizoctonia* crecen sobre un amplio rango de medios de cultivo sólidos y líquidos, desde agar-agua hasta medios altamente especializados (Sinclair, 1970)

La variación de los aislamientos de este complejo en su patogenicidad, características fisiológicas y apariencia en los medios de cultivo sugiere que cada especie está constituida por poblaciones o grupos intraespecíficos genéticamente independientes que convergen hacia un mismo estado perfecto (Ogoshi, 1987).

## **2. b. Anastomosis hifal**

El concepto de mayor utilidad desarrollado para el estudio de este complejo es el de anastomosis hifal que se constituye en una importante prueba de afinidad taxonómica. Este agrupamiento de las entidades que lo componen se denomina "grupo de Anastomosis" (AG) y resulta coincidente con sus características ecológicas.

Matsumoto et al., ya en 1932 describen tres tipos de reacciones de anastomosis, según los eventos que se producen al establecerse un contacto físico entre las hifas de aislamientos de *Rhizoctonia* spp.:

**1. Fusión Perfecta:** Se basa en la completa disolución de la pared de las hifas de dos aislamientos y conexión de los protoplasmas. Se produce entre hifas de un mismo aislamiento.

**2. Fusión Imperfecta:** Resulta en la disolución imperfecta de las paredes celulares y en la conexión de los citoplasmas. Normalmente se observa plasmólisis en las células que anastomosan

**3. Fusión de Contacto :** Conduce solamente al contacto entre dos hifas y no se observa disolución de la pared ni conexión citoplasmática.

En 1964 Flentje y Stretton, describen el fenómeno de plasmólisis ("killing reaction") que se produce en las células adyacentes a la fusión hifal en los casos de fusión imperfecta. Los mismos autores observaron que este tipo de fusión ocurría entre hifas de diferentes aislamientos de un mismo grupo de anastomosis o población genética. Anderson (1982) explica este fenómeno como una reacción de incompatibilidad somática o vegetativa, que limitaría el entrecruzamiento y determinaría que la unidad evolucionaria sea la raza en lugar de la especie.

La agrupación por anastomosis hifal fué propuesta por Shultz (1936) y posteriormente por Richter y Schneider (1953) en Alemania, luego por Watanabe y Matsuda (1966) en Japón y por Parmeter et al. (1969) en los EE. UU. En 1975, Tu y Kimbrough realizan un detallado estudio morfológico del micelio de aislamientos representativos de *Rhizoctonia* y de la ontogenia de sus esclerocios para obtener caracteres diagnósticos adicionales; aunque de acuerdo con Flentje et al. (1970), estos caracteres podrían variar según las condiciones ambientales.

En 1984, Kuninaga y Yokosawa, investigan la heterogeneidad del DNA del grupo de anastomosis 4 y su relación con la variable patogenicidad. Ogoshi en 1987, basándose en caracteres fisiológicos y culturales, determina la existencia de grupos intraespecíficos (ISGs) dentro de algunos de los grupos de anastomosis y en 1991 Sneh et al., amplian el conocimiento de los grupos de anastomosis y las interrelaciones de cada uno de ellos.

Hasta el presente, los AG determinados para *R. solani*, dentro de los aislamientos multinucleados, son los siguientes:

AG-1 : Los aislamientos de este grupo provienen de plantas de arroz, leguminosas, remolacha, y de suelos. Se reconocen 3 grupos intraespecíficos (ISGs) , y puede observarse anastomosis entre ellos.

AG-1.IA: produce principalmente el tizón de la vaina del arroz.

AG-1.IB: produce el tizón reticulado en leguminosas.

AG-1.IC: produce daños en la parte aérea principalmente de remolacha.

AG-2: Los aislamientos de este grupo son capaces de fusionarse con miembros de AG-BI y en baja frecuencia con los de AG-8. Causan podredumbre de raíz de crucíferas. Se reconocen los siguientes ISGs:

AG-2.1 : Causan podredumbre de semilla, damping-off y lesiones de raíz en rabanito.

AG-2-2-III B: podredumbre de cuello y cancro en raíces de zanahoria y rabanito.

AG-2-2-IV : podredumbre de raíz de remolacha azucarera.

AG-3: Estos aislamientos pueden fusionarse con miembros del AG-BI y menos frecuentemente con miembros del AG-8. Son principalmente patógenos de papa, causan necrosis, canchales en tallos, lesiones en estolones y esclerocios negros sobre tubérculos.

AG-4: Los miembros de este grupo solamente fusionan entre ellos. Atacan una gran variedad de especies de plantas, principalmente Quenopodiáceas, Leguminosas y Solanáceas. Debido a su amplio rango de hospedantes, son los más frecuentemente aislados.

AG-5: Los miembros de este grupo solamente fusionan entre ellos. Se los encuentra en leguminosas y en suelos cultivados.

AG-6: Son capaces de fusionarse con baja frecuencia con individuos de los AG-8 y AG-BI de *R. solani*, y también con aislamientos pertenecientes a AG-F de los binucleados. Se reconocen dos ISGs:

AG-6-HG-1 y AG-6-GV, que se diferencian por la alta o baja homología en la secuencia de bases del DNA, y provienen de suelos no cultivados.

AG-7: Se fusionan con miembros del mismo grupo. Se los encuentra en suelos cultivados y hasta ahora se han aislado solamente en Japón.

AG-8: Pueden fusionarse en baja frecuencia con miembros de AG-3, AG-6, AG-BI y AG-2. Ataca principalmente gramíneas, y hasta ahora, los individuos de este grupo solamente se han aislado en Australia y en EEUU.

AG-9: Anastomosa sólo con miembros de este grupo. Se lo aisló por primera vez en 1987, de brotes de papa y suelos del mismo cultivo, en Alaska.

AG-10: Es un nuevo grupo. Aún no está bien estudiado, sus miembros fusionan entre ellos y se lo aisló de cebada.

AG-BI: Es un grupo considerado puente, sus individuos tienen la capacidad de anastomosarse con miembros de AG-2, AG-3, AG-6 y en menor frecuencia con los de AG-8. Se lo aisló de suelos no cultivados, en Japón.

Los AG de *R. zeae* y *R. oryzae* se denominan WAG-Z y WAG-O, respectivamente.

Los aislamientos binucleados de *Rhizoctonia* se dividen en los siguientes grupos de anastomosis:

<b>AG</b>	<b>Anamorfo</b>
AG-A (CAG-2)	<i>R. candida</i> ; <i>R. endophytica</i> var <i>endophytica</i> <i>R. fragariae</i> ; <i>R. ramicola</i>
AG-Ba	<i>R. fumigata</i> (= <i>Sclerotium fumigatum</i> )
AB-Bb	<i>R. oryzae-sativae</i> (= <i>Sclerotium oryzae-sativae</i> )
AG-B (o)	
AG-C	<i>R. globularis</i>
AG-D (CAG-1)	<i>R. cerealis</i>
AG-E (CAG-3;6)	<i>R. muneratii</i>
AG-F (CAG-4)	
AG-G	<i>R. fragariae</i>
AG-H	
AG-I	<i>R. fragariae</i>
AG-J	
AG-K	
AG-L	
AG-M	
AG-N	
AG-O	



AG-P

AG-Q

AG-R (CAG-5)

AG-S (CAG-7)

. Los grupos CAG-1 a CAG-7 determinados en EEUU, correspondieron a algunos de los identificados en Japón (Sneh et al.,1991). La patogenicidad de estos aislamientos no está aún bien determinada.

### **2.c. *Rhizoctonia*: Saprofitismo y parasitismo**

Los nutrientes del suelo pueden influir no solamente en la sobrevivencia de los hongos fitopatógenos de suelo sino también en el estado nutricional de sus propágulos (Garret, 1956; Papavizas, 1970). De acuerdo con Durbin (1979), antes de la penetración como patógeno, el organismo en su habitat saprofitico, subsiste con sus reservas y / o con lo que pudiera asimilar del ambiente externo en el cual, a menudo existen desventajas de competencia o limitación de nutrientes.

Las estructuras de reposo, que se producen eventualmente, germinan y crecen previamente a la penetración o ataque al tejido vegetal, en tanto que los propágulos en crecimiento activo (micelio), presumiblemente sólo adquieren mayor crecimiento ( Dodman y Flentje, 1970; Burpee y Martin, 1992). Las hifas, cualquiera sea su origen, crecen sobre el tejido hospedante y algunas se agregan para formar estructuras de infección ("cojines de infección"), apresorios lobados o ambos. Las hifas penetran a través de los estomas en la parte aérea y en ciertos casos, como en los órganos subterráneos, directamente a través del tejido, probablemente debido a una combinación de la acción

mecánica con la de degradación enzimática de la cutícula y de pared celular (Burpee y Martin, 1992).

Los propágulos de *Rhizoctonia* spp. sobreviven en el suelo, asociados con restos de cultivo, a través de estructuras variadas (Boosalis y Scharen, 1959). Estas estructuras de propagación se encuentran principalmente en los 10-15 cm de la capa superficial del suelo (horizonte A).

Poco se conoce sobre las interacciones micoparasíticas en el suelo pero el hecho de que las estructuras de resistencia de muchos patógenos se encuentre invadida, por una variedad de microorganismos micoparásitos en suelos naturales, sugiere que puede ser de importancia la acción de los antagonistas para la regulación de su potencial patogénico en el suelo. En estas observaciones sobre control natural se basan los ensayos de Ichievich-Auster et al., (1985a), Cardoso y Echandi (1987b; Burpee y Goulthy (1984; Sneh et al. (1989 ) sobre la utilización de aislamientos no patogénicos o antagónicos como controladores del "damping-off" inducido por aislamientos patogénicos de *Rhizoctonia*.

Las relaciones de los miembros del complejo *Rhizoctonia* con otros microorganismos del suelo han evolucionado complicadamente en su capacidad para sobrevivir y crecer exitosamente a pesar de las condiciones ambientales adversas y de los antagonistas involucrados (Baker, 1970).

Las determinaciones cualitativas del micelio de *Rhizoctonia* spp. normalmente, se realizan por métodos tradicionales [lavado del órgano atacado con agua de canilla, desinfección con hipoclorito de sodio (1 %) durante 3-4 min., enjuagado con agua destilada estéril y oreado bajo flujo de aire estéril], a partir de muestras de plantas infectadas. Para la estimación cuantitativa de la densidad y/o potencial de inóculo del patógeno en el suelo se utilizan plantas "cebo" o fragmentos de tejidos (Ko y Hora, 1971; Papavizas et al., 1975).

La colonización ejercida por *Rhizoctonia*, según Garret (1956), se manifiesta como un característico crecimiento miceliano amarronado rojizo, tanto en raíces enfermas como en la materia orgánica del suelo. El parásito crece indiscriminadamente, se distribuye en forma irregular e invade raíces susceptibles

Al entrar en la fase parasítica, el patógeno cambia radicalmente a un ambiente diferente, que es el hospedante mismo. Una vez dentro del tejido vegetal, se ve confrontado con un vasto arsenal de nuevos componentes, muchos de los cuales requieren por su parte, la síntesis de nuevas enzimas. Estos cambios ambientales, en lo que respecta a los diferentes tipos celulares de cada órgano vegetal, se modifican a medida que el patógeno penetra y se relacionan diferentemente, desde el punto de vista físico y químico.

Las estrategias utilizadas por el patógeno son claras : 1) Podría catabolizar las sustancias del hospedante e incorporarlas a su propio organismo y/o 2) Podría simultáneamente neutralizar el o, más usualmente, los mecanismos de defensa del hospedante lo más rápidamente posible.

Debe considerarse la influencia del hospedante en cada caso y el papel que juega su metabolismo y morfología en el establecimiento del parásito. Aunque el patógeno obviamente interactúa con el hospedante antes de la penetración, es precisamente durante y después de este evento que se suscitan las más profundas interacciones.

Las interacciones micoparasitarias que se ejercen pueden ser : biotróficas, donde el parásito se nutre de las células vivas del hospedante, con ausencia aparente de daño y necrotroficas, en las que el parásito destruye las células antes o repentinamente luego de la invasión.

Las entidades del complejo *Rhizoctonia* agrupan gran número de cepas, que no pueden distinguirse por su rango de hospedantes o el tipo de ataque o por caracteres fisiológicos o ambientales. El desarrollo de tal variabilidad, estabilización, selección y establecimiento de las cepas en sus nichos ecológicos ha requerido, sin dudas, un largo período de tiempo (Baker, 1970).

Se puede concluir que, evolutivamente, los miembros del complejo *Rhizoctonia* corresponden a especies antiguas. Esta aseveración se basa en que su presencia está comprobada tanto en suelos cultivados como en bosques o en tierras desérticas no cultivables (Ogoshi, 1987).

Se sabe que especies de Agaricales y Polyporales se encuentran como fósiles desde la época del Oligoceno. Por lo que podría deducirse que probablemente *Rhizoctonia* tiene millones de años de antigüedad (Pia, 1927).

### **3. Hongos endofíticos y movilización del fósforo soluble del suelo**

Los hongos endofíticos se encuentran presentes subcuticularmente o dentro de los tejidos de plantas sanas, producen infecciones inaparentes en ciertos órganos y en algunos casos protegen a los hospedantes de sus enemigos naturales. Taxonómicamente con pocas excepciones se clasifican dentro de los Ascomycetes y dentro de ellos incluyen los Loculoascomycetes, Discomycetes y Pyrenomycetes (Petrini, 1986).

Según Carroll (1988), todas las evidencias sugieren que los endofitos han evolucionado directamente de los patógenos y que puede existir una relación taxonómica entre ellos. Las asociaciones hospedante-endófito pueden proveer un excelente modelo para el estudio de la evolución de las simbiosis microbianas y podría postularse que si estos organismos han evolucionado de

los patógenos, sus toxinas y enzimas han sufrido una evolución bioquímica similar .

Si bien la mayor parte de la literatura se refiere a los endófitos, colonizadores de la parte aérea del hospedante, se sabe que existen también organismos fúngicos que colonizan asintóticamente las raíces de las plantas pero no forman estructuras típicas de las micorrizas (Sivasithamparam, 1975). En algunos casos, las hifas del colonizador endófito invaden el lumen de las células corticales y determinan en el hospedante un efecto promotor del crecimiento (Dewan y Sivasithamparam, 1989) e inclusive lo protegen del ataque de ciertos patógenos radiculares como *Gaeumanomyces graminis* (Sacc.) Arx y Oliver (Renwick et al., 1991).

Existen aislamientos hipovirulentos de *Phialophora* sp. y de otros hongos similares que invaden el cilindro central en los cereales, se localizan especialmente en las raíces laterales y estimulan la absorción de nutrientes minerales como lo hacen los hongos micorrícicos (Sivasithamparam, 1975). Otros aislamientos no virulentos de patógenos tales como *R. solani* colonizan las raíces en forma similar a las ectomicorrizas y protegen al hospedante del ataque de los aislamientos virulentos (Sneh et al., 1986). De igual manera la colonización previa con aislamientos no patogénicos de *Endothia parasitica* (Murr.) P.J.y H. W. And. protege al castaño del ataque de los virulentos (Van Alfen, 1982).

Las plantas colonizadas por algunos endófitos fúngicos, a menudo desarrollan más rápidamente y presentan follaje de color verde más intenso. Williams (1985) observa que la colonización dual de ciertos endófitos con especies fúngicas septadas estériles produce mayor rendimiento en las plantas infectadas. Estos fenómenos son respuestas normales en las asociaciones micorrícicas (Sneh et al., 1986); aunque según Read (1993), de acuerdo con los estudios

hasta el presente realizados, el término micorrizas debe evitarse para referirse a cierto tipo de endófitos.

La distribución de los endófitos radiculares en las plantas superiores podría ser tan habitual como la de las micorrizas. Las endomicorrizas y más comunmente las vesículo-arbusculares se encuentran en muchas especies agrícolas y si bien, causan pocos cambios morfológicos en las raíces tienen un gran efecto en la fisiología del hospedante (Linderman, 1991).

Las plantas micorrizadas pueden alterar su estado nutricional, incrementar la velocidad de fotosíntesis, modificar el nivel de sustancias reguladoras de crecimiento, etc... Estos cambios fisiológicos, además de la presencia física y química de las hifas externas del hongo, modifican la composición microbiológica, física y química de la rizosfera., determinando un nuevo equilibrio como resultado de la presión de selección.

Los mecanismos biológicos que se desencadenan a partir de este nuevo equilibrio no están aún completamente esclarecidos.

El factor determinante del incremento del crecimiento en plantas colonizadas endofíticamente, en muchos casos podría deberse a una mejor nutrición del hospedante. Según Cowan (1977) los hongos rizosféricos que penetran en la epidermis radicular pueden incrementar en el hospedante, de la misma manera que los hongos micorrícicos, la absorción de los nutrientes minerales, especialmente de los fosfatos.

Existen múltiples elementos de la simbiosis que contribuyen a una mayor eficiencia en la absorción de nutrientes y particularmente en la de elementos inmóviles del suelo (Grove y Le Tacon, 1993). El ion fosfato en el suelo tiene escasa movilidad, por lo que solamente puede ser incorporado de la zona más cercana a la superficie de absorción. La longitud o la densidad de las raíces de

las plantas pueden facilitar la absorción de fósforo. En las asociaciones micorrícicas, las hifas aumentan la superficie radicular y por lo tanto la absorción de agua y nutrientes (especialmente fosfatos). Por otra parte, la modificación de la rizosfera es un fenómeno fisiológico importante, que puede influir en la absorción de nutrientes por las especies micotróficas. La acidificación de la rizosfera por estas especies, aumenta la solubilidad del fósforo y en consecuencia puede facilitar la absorción de dichos compuestos y elementos por el hospedante (Koide, 1993).

Según Gianinazzi-Pearson y Smith (1993), las micorrizas ericoides ( de Ericaceas y familias afines, restringidas ecológicamente a suelos con bajo contenido en nutrientes, con capacidad saprofítica y desarrollo en el suelo, independientemente del hospedante) solubilizan algunos minerales no disponibles en la rizosfera o excretan sustancias tales como factores de crecimiento , los que a su vez estimulan la absorción de agua y solutos. En algunas plantas el movimiento de los fosfatos desde el hongo hacia el hospedante varía según la localización del micelio. En ciertos casos se produce en la endodermis y en otras ocurre en las células corticales (Kozlowski, 1978)

La posibilidad de la utilización de los nutrientes del suelo por los hongos micorrícicos fue examinada por Read (1993), quien marcó con  $^{32}\text{P}$  y reveló por autoradiografía que el micelio facilita la movilización y el transporte del isótopo desde la zona que rodea a las raíces hacia el hospedante.

El incremento en el tenor de nutrientes en el hospedante determina modificaciones en la predisposición al ataque por ciertos patógenos. Se ha demostrado que la fertilización con N y P resulta efectiva en el control de *Phoma chysanthemicola* Hollos, causante de podredumbre radicular, de manera similar a la acción de hongos micorrícicos (Colhoun, 1979).

## **4. Aspectos moleculares relacionados con la patogenicidad**

### **4.a. Celulasas**

La degradación de los polisacáridos y de otros componentes de las paredes celulares de las plantas por enzimas extracelulares de hongos y bacterias es un aspecto fundamental de la patogénesis (Wood, 1975). Aunque el papel de estas enzimas puede ser secundario en la inducción de síntomas, su producción inicial o continuada puede determinar que la infección tenga lugar o no (Albersheim et al., 1969).

La pared celular de las plantas está formada por una estructura compleja y ordenada que constituye una barrera defensiva contra las invasiones microbianas.

La descomposición de las paredes celulares de las plantas superiores es un rasgo característico del ataque ejercido por algunos organismos. Los hongos fitopatógenos, en el proceso de patogénesis enfrentan un problema fundamental que es el de franquear la superficie externa protectora de la planta y una vez dentro del hospedante determinar si la planta permitirá su crecimiento y reproducción. Estos organismos emplean ciertas estrategias, tales como elaborar estructuras de infección y enzimas (extracelulares y en general, inducibles) para penetrar a través de la epidermis vegetal, producir toxinas y aún hormonas que actúan como mensajeros químicos para determinar si el hospedante es el apropiado. Aunque se mencionan muchas estructuras fúngicas y metabolitos como factores patogénicos, pocos han sido evaluados rigurosamente en su papel determinante de la patogénesis (Yoder y Tourgeon, 1985)



La celulosa y hemicelulosa son los carbohidratos disponibles más abundantes en la biomasa vegetal y utilizadas como sustrato por numerosos microorganismos, que necesitan producir las enzimas correspondientes para su hidrólisis .

El complejo de las celulasas fúngicas se ordena en tres categorías principales: a) celobiohidrolasas (avicelasas) que atacan las moléculas de celulosa y liberan unidades de celobiosa. b) endoglucanasas que clivan los puentes  $\beta$ -glicosídicos al azar en el medio de las moléculas de celulosa y c)  $\beta$ -glucosidasas que hidrolizan la celobiosa y celodextrinas de bajo peso molecular a glucosa.

Las endoglucanasas atacarían la región amorfa de las fibras de celulosa y crearían sitios para la acción de la celobiohidrolasa que actuaría en la región cristalina de la fibra. Las  $\beta$ -glucosidasas llevarían a cabo la última etapa de la hidrólisis y evitarían la síntesis de la celobiosa. (Béguin, 1990). Este mecanismo de acción está descrito en la Figura 2. Todas las celulasas fúngicas estudiadas demuestran contener una multiplicidad de componentes enzimáticos que dependen del sustrato (Wood y García-Campayo, 1990).

En lo que respecta a otras enzimas extracelulares está establecido que las pécticas intervienen en las podredumbres blandas. No se conoce con certeza si las enzimas degradativas de la pared celular constituyen el factor primario determinante de la enfermedad, ni si las celulasas y hemicelulasas son responsables directos de los procesos de patogénesis. Evidencias indirectas sugieren que la secuencia de síntesis enzimática sería un indicador del proceso de alteración que sufre la pared celular y consecuentemente del parasitismo. A su vez la inducción y represión de algunas enzimas puede estar determinada por la disponibilidad de ciertos sustratos celulares (Mount, 1978).

La actividad celulolítica y pectinolítica observada en ciertos hongos micorrícicos ericoides y en algunos ectomicorrícicos estaría relacionada con

una gran capacidad saprofítica . Podría postularse que la posibilidad de utilizar la celulosa y otras fuentes carbonadas les permite un crecimiento independiente en el suelo, lo que los diferencia de otros organismos micorrícicos. (Gianinazzi-Pearson y Smith, 1993).

La importancia del estudio de la actividad celulolítica, en particular en *Rhizoctonia*, reside en el hecho que, según Bateman (1970) esta característica contribuye primariamente a su saprofitismo en el suelo (capacidad propia de los organismos autóctonos) y ocasionalmente, por asociación con diversos hospedantes, a su patogenicidad . Este mismo autor demuestra que la pared celular del hospedante pierde su birrefringencia , particularmente en las partes viejas de las lesiones y que sus extractos tienen actividad de endocelulasa y de celobiasa.

Aunque la alteración y destrucción de la celulosa dentro del hospedante ha sido demostrada en tejidos infectados con *Rhizoctonia*, la acción de las celulasas en la patogénesis de aislamientos de distintos grupos de anastomosis aún no ha sido establecida.

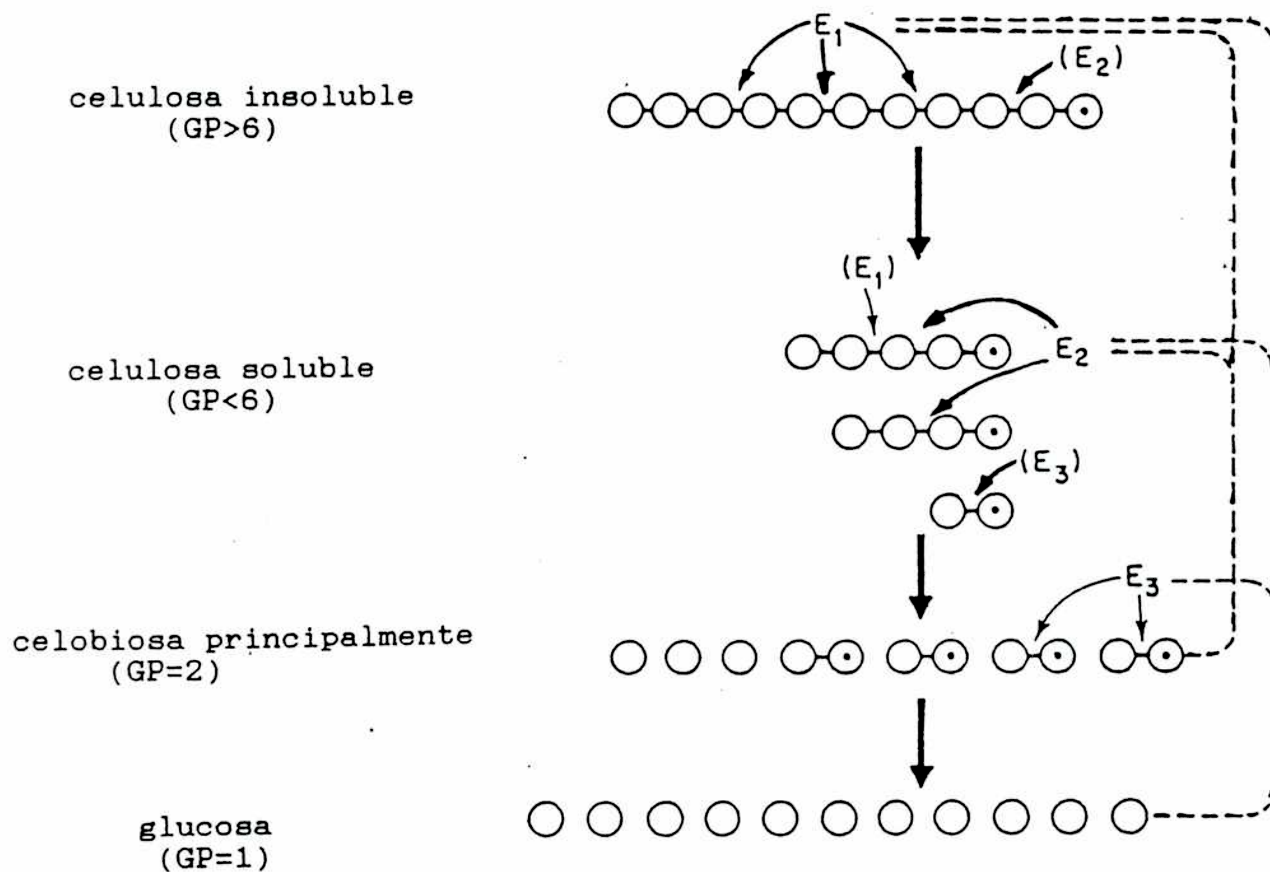


Fig. 2: Modelo propuesto para el mecanismo de acción de las celulasas (Okazaki et al., 1978)

E1: endo-1, 4- $\beta$ -D-glucanasa, endocelulasa o carboximetilcelulasa

E2: exo-1, 4- $\beta$ -D-glucanasa, exocelulasa o avicelasa

E3: celobiasa o  $\beta$ -glucosidasa

#### 4.b. 3':5' Monofosfato cíclico de adenosina (AMP cíclico)

El AMP cíclico, además de su conocido papel como segundo mensajero celular en tejidos de mamíferos superiores hormono-sensibles, ha sido estudiado como un regulador intracelular del metabolismo en una gran variedad de microorganismos.

Aunque los estudios más intensivos se han realizado en animales superiores, en *Escherichia coli* y en otras bacterias Gram negativas relacionadas, en los hongos, se han obtenido evidencias que el nucleótido cíclico controla una variedad de funciones incluyendo la utilización de fuentes de carbono exógenas y endógenas, la conidiación en *Neurospora crassa*, el proceso sexual y el fototropismo en *Phycomyces* (Pall, 1981), el dimorfismo en *Mucor rouxii* (Cantore et al., 1980), la germinación en *Candida albicans* (Egidy et al., 1989) y la morfogénesis.

En las células animales el AMP cíclico juega un importante papel en la estimulación del catabolismo de las reservas de carbono (glicógeno y triglicéridos). Consecuentemente se puede hipotetizar que en los hongos el AMP cíclico también puede estimular este proceso (Pall, 1981). Dentro de los basidiomycetes, en *Coprinus macrorhizus* se ha demostrado que el AMP cíclico se une a la proteína quinasa y estimula la fosforilación de la glicógeno-sintetasa al igual que en las células animales (Pall, 1981).

En el caso del complejo *Rhizoctonia*, los aislamientos patogénicos tienen capacidad de producir esclerocios y este aspecto de la morfogénesis está correlacionado con el nivel de AMP cíclico endógeno (Hashiba, 1987). Estas estructuras de reserva normalmente se forman en el suelo, a partir de masas densas de hifas y de células cortas que se ensanchan lateralmente hasta formar

importante regulador de los niveles de AMP cíclico en muchos organismos. Por lo tanto parece indispensable conocer la actividad de la adenilato ciclasa para determinar el modo de regulación endógeno del nivel del AMP cíclico en cada sistema fúngico. En los hongos y en otros organismos eucariontes inferiores se encuentra localizada en la membrana celular y se han realizado extensos estudios sobre la actividad de la adenilato ciclasa en *Neurospora crassa* por Flawia y Torres (1972; 1973), en *Mucor rouxii* por Paveto et al.(1975) y por Moreno y Passeron.(1980). Hay también descripciones de la actividad de esta enzima en *Coprinus macrorhizus*, *Saccharomyces fragilis* y *Aspergillus nidulans* (Pall, 1981).

El AMP cíclico intracelular es removido por acción de la fosfodiesterasa de AMP cíclico (A-PDE). En los hongos, esta enzima está mayormente asociada a la fracción citosólica, aunque también se encontraría localizada en membrana (Pall, 1981) y se ha demostrado que su actividad puede ser estimulada por ATP-Mg<sup>+2</sup> y procesos dependientes del AMP cíclico, presumiblemente por fosforilación AMP cíclico dependiente, mediante una quinasa de proteína y por proteólisis controlada (Moreno et al., 1982). A diferencia de lo que ocurre con la enzima de mamíferos, las metilxantinas no inhiben mayormente a la enzima fúngica.

Los organismos endofíticos, desde una perspectiva bioquímica, se diferencian ampliamente de otros hongos biótrofos patogénicos, ya que en general han evolucionado hacia un amplio rango de hospedantes, sin embargo no hay información disponible sobre los niveles de AMP cíclico intracelular y su relación con la capacidad de penetración y patogenicidad.

## **5. Métodos de Control**

Hasta el presente el control de las enfermedades que ocasionan los hongos fitopatógenos de suelo se realiza generalmente por medio de fungicidas químicos que son costosos y causan efectos colaterales adversos en el medio y en la salud humana. Ciertas prácticas culturales pueden evitar la dispersión de los fitopatógenos, pero no los eliminan de los suelos agrícolas. El control biológico puede ser una alternativa novedosa que sin producir contaminaciones ambientales, contribuye a atenuar el efecto de los patógenos, reducir su población o suprimir la enfermedad.

### **5. a. Interacciones microbianas con los patógenos**

La protección de plántulas por medio de microorganismos puede ejercerse a través de vías diferentes: Destrucción biológica del patógeno; bioprotección de la superficie de la plántula y protección cruzada /resistencia inducida en el hospedante. Los dos primeros mecanismos se cumplirían por la acción antagónica del agente biocontrolador y el tercero por medio de la activación de un proceso defensivo en el hospedante (Cook y Baker, 1983).

Lockwood (1988) distingue el fenómeno de interacción en el que la población microbiana interfiere directamente con el patógeno de aquel en que la población microbiana o parte de ella afecta la población patogénica por alteración de su sustrato.

Virtualmente todos los patógenos que pasan parte de su ciclo de vida en el suelo, fuera de la protección de su hospedante están sujetos al ataque por predadores e hiperparásitos. Algunos organismos antagónicos ejercen múltiples

modos de acción contra el mismo o diferentes patógenos. Por otra parte diversos mecanismos pueden operar bajo distintas condiciones ambientales (Fravel y Keinath, 1991).

En la rizosfera de las plantas se encuentran numerosos organismos fitopatógenos, que sobreviven por competición en sus demandas nutricionales. y entre ellos se incluyen saprófitos tales como *Pythium* y *Rhizoctonia* (Suzuki, 1980).

El conocimiento de la existencia de interferencias entre los microbios del suelo y los hongos causantes de enfermedades radiculares surge ya en las primeras décadas del siglo como consecuencia de la observación de los fenómenos de competición; antibiosis/ parasitismo y predación. El resultado final de estos efectos puede ser: inhibición del crecimiento micelial, lisis hifal, inhibición de la germinación de las esporas, mantenimiento de la dormancia en las estructuras de resistencia etc. (Suzuki, 1980).

El control de plagas insectiles mediante el empleo de otros organismos se practica desde hace ya más de un siglo y actualmente algunos organismos se encuentran disponibles en el mercado como bioinsecticidas bajo una variedad de marcas registradas (McIntyre y Press, 1991). Por el contrario, en el caso de las interacciones microbianas con hongos fitopatógenos radiculares, los primeros trabajos para el control de los agentes causantes de enfermedades y de nemátodos son incipientes. Recién en 1955 los científicos comenzaron a considerar seriamente el empleo de organismos del suelo para limitar el desarrollo de ciertas enfermedades causadas por *Rhizoctonia* y *Pythium*.

Aunque el conocimiento y experiencia con agentes microbianos ha progresado, la fase de desarrollo y comercialización de biofungicidas requiere aún el estudio de numerosos aspectos

La comprensión de los mecanismos a través de los cuales se lleva a cabo el biocontrol de las enfermedades de las plantas, es una fase crítica para el desarrollo y aplicación de los métodos de biocontrol.

#### **5. b. Procesos defensivos del hospedante - Incremento de fenoles**

En la resistencia de la planta a la enfermedad influyen múltiples mecanismos, por lo que su inducción puede depender o no del reconocimiento molecular de un único componente en el hospedante, directamente del patógeno o de cambios fisiológicos. Estos cambios pueden surgir de la infección con agentes invasores no compatibles o por la síntesis de determinadas sustancias químicas (Kué, 1981).

Los mecanismos que regulan la interacción residen en un fenómeno químico de reconocimiento y rechazo (o inhibición). No está aún dilucidado cómo la planta, potencialmente apta para la resistencia inducida, reconoce y acepta un organismo no patogénico y cómo este último coloniza los órganos vegetales para prevenir el establecimiento del patógeno (Cook y Baker, 1983).

Muchos casos de resistencia inducida por acción de organismos fúngicos están documentados (Matta, 1981; Cardoso y Echandi, 1987b; Mandel y Baker, 1991), sin embargo los mecanismos metabólicos que controlan el fenómeno y su implicancia práctica pueden ser muy diferentes.

La compatibilidad o incompatibilidad entre la planta y su patógeno potencial comienza cuando las células de los dos organismos hacen contacto físico. De acuerdo con Sequeira (1980) la adhesión del patógeno a la superficie del hospedante es la principal evidencia de esta interacción inicial que puede determinar un resultado final exitoso de esta relación.



En interacciones compatibles, la aceptación del organismo por el hospedante es un proceso que conduce al primero a evitar una reacción violenta del hospedante, tal como la muerte de la célula invadida o la formación de barreras químicas o morfológicas a la infección. Solamente los microorganismos que logran sortear la respuesta de resistencia son capaces de multiplicarse en el tejido hospedante. Por esta razón el fenómeno de reconocimiento es definido por Clarke y Knox (1978) como el evento inicial de comunicación célula-célula que induce una respuesta morfológica, bioquímica o fisiológica. Esta definición establece dos conceptos básicos: 1) El reconocimiento depende de la información potencial contenida en las superficies que entran en contacto y 2) una respuesta continua en forma complementaria a la interacción de las moléculas que entran en contacto. La adhesión de los organismos fúngicos en superficies inertes (que se produce ocasionalmente) no implica la transferencia de información que es un componente esencial del fenómeno de reconocimiento.

En el caso de muchos organismos fúngicos el reconocimiento no se establece hasta que se atraviesa la pared celular de la planta y se entra en contacto con el plasmalema. La respuesta con reacción de hipersensibilidad se asocia a menudo con una rápida acumulación de componentes antifúngicos (fitoalexinas) en los tejidos aunque actualmente se sabe que muchos estímulos físicos y químicos pueden determinar su incremento. La comunicación entre las superficies en contacto están determinadas por la información que poseen. Esta información reside en los carbohidratos o materiales conteniendo carbohidratos de sus respectivas superficies: polisacáridos, glicoproteínas (lectinas), glucanos y otros y el reconocimiento está dado por el grado de unión entre las moléculas de una superficie y la otra. Si se compara con un sistema animal análogo como es la acción de la toxina del cólera sobre la membrana intestinal, resultaría que,

probablemente por un mecanismo similar, las lectinas del hospedante se unirían a las glicoproteínas y glucanos de las membranas del organismo fúngico, lo que estimularían la acción de la adenilato ciclasa, que determinaría la regulación de la biosíntesis de fitoalexinas y otros cambios metabólicos en la planta por acción del AMP cíclico (Sequeira, 1978).

El término "compuestos fenólicos" involucra a un amplio rango de sustancias vegetales que poseen en común un anillo aromático con uno o más sustitutos del grupo OH- (Harborne, 1973). Las sustancias fenólicas tienden a ser solubles en agua, ya que muy frecuentemente aparecen combinadas con azúcares y se encuentran generalmente localizadas en las vacuolas de los tejidos meristemáticos. Mientras la función de algunos compuestos fenólicos en la planta está bien establecida, la de otros es sólo especulativa (Reeve, 1950).

Se han realizado numerosas investigaciones sobre la producción y acumulación de compuestos fenólicos en los tejidos de las plantas en respuesta a una infección bacteriana, fúngica o viral, sin embargo la idea de la resistencia vegetal conferida por un compuesto en particular no ha sido completamente aceptada (Kosuge, 1969). Por el contrario Matta (1969) considera que las diferencias en el contenido de fenoles en las interacciones compatibles e incompatibles indican que la resistencia a ciertas enfermedades puede estar dada por un incremento en el contenido de los mismos luego de los primeros días de la inoculación o colonización con el patógeno.

La respuesta del hospedante es, al mismo tiempo, parte del síndrome de enfermedad y expresión de un mecanismo de defensa (Matta, 1981).

Según Kosuge (1969) los compuestos fenólicos pueden poseer potencial para inhibir enzimas esenciales de los fitopatógenos pero no se conoce mucho acerca de la inducción de estos compuestos por organismos no fitopatógenos. La mayor

parte de los trabajos se basa en la relación entre la resistencia y la inducción de fitoalexinas. Cardoso y Echandi (1987b) sugieren que el mecanismo involucrado en la protección del hospedante contra el "damping-off", causado por aislamientos patogénicos de *R. solani* a través de la acción de un aislamiento binucleado, no patogénico de *Rhizoctonia* se debe a un incremento en las fitoalexinas. Gianinazzi-Pearson y Smith (1993) informan que en ciertas asociaciones con aislamientos micorrícicos de *Rhizoctonia*, en condiciones de exceso en la concentración de nitrógeno mineral disponible, estos aislamientos endofíticos se comportan como parásitos en el hecho que inducen en el hospedante una acumulación de fitoalexinas o de compuestos fenólicos que determinan un mecanismo defensivo ante el posible ataque del colonizador.

La dependencia de la resistencia a la enfermedad de cambios fisiológicos (como la acumulación de fenoles) permite suponer, que además de ser inducible puede ser efectiva contra un amplio espectro de patógenos (Kué, 1981).

Si bien la inmunización de las plantas podría no eliminar la necesidad de los fungicidas químicos puede reducir la dependencia del hombre a este método de control y por lo tanto disminuir la presencia de los residuos de pesticidas en los cultivos y el consecuente daño al ecosistema. Sin embargo es necesaria una completa comprensión de los fenómenos que operan en cada interacción microbiana para asegurar que los agentes que restringen el desarrollo de un patógeno o inducen resistencia en las plantas son más seguros que los fungicidas químicos.

## **OBJETIVOS**

1. Determinar la difusión de aislamientos representativos del Complejo *Rhizoctonia* en la Argentina.

Este aspecto implica localizar las regiones con cultivos que manifiestan mayor incidencia de daño en raíces y cuello del hipocótilo en el estado de plántula y de planta adulta. Realizar muestreos que abarquen el hábitat saprofito y el patogénico del organismo.

Determinar la frecuencia de aparición de los aislamientos en regiones y cultivos.

2. Determinar las características morfológicas y grupo de anastomosis de los aislamientos del Complejo *Rhizoctonia*. Se enfatizará este último aspecto en relación con su capacidad potencial patogénica. Para la determinación del grupo de anastomosis, en ciertos casos, deberán compararse los resultados obtenidos de la observación microscópica del apareamiento hifal con las proteínas solubles de los extractos micelianos.

3. Determinar la patogenicidad de los aislamientos sobre las principales familias de hospedantes.

Estudiar el grado de virulencia y el tipo de ataque que produce los aislamientos y su relación con el hospedante.

4. Investigar el mecanismo de acción desarrollado para ejercer la patogenicidad sobre un hospedante determinado (algodón) y los aspectos bioquímicos relacionados. Este aspecto implica el estudio de los fenómenos de invasión y penetración, la detección de estructuras específicas, de enzimas celulolíticas y del papel del AMPcíclico.

5. Aislar del mismo nicho ecológico organismos antagónicos de aislamientos patogénicos de *Rhizoctonia*.

Estudiar las características morfológicas y algunos aspectos fisiológicos (enzimas celulolíticas, AMP cíclico) del biocontrolador.

6. Determinar la eficacia biocontroladora del organismo aislado e investigar los factores relacionados con el mecanismo de biocontrol desarrollado sobre el patógeno y/o sobre el hospedante.

## **MATERIALES Y METODOS**

## **1. Relevamiento del género *Rhizoctonia* como saprófito y como patógeno en la Argentina.**

Se obtuvieron aproximadamente 200 aislamientos presuntamente de *Rhizoctonia* sp. de distintas regiones de suelos cultivados y no cultivados y de diferentes hospedantes de la Argentina. Cada muestra de suelo estuvo constituida en promedio por una mezcla de 4 submuestras, tomadas c/u a 10 cm de profundidad. El número de muestras dependió del tamaño de la parcela con un promedio de 4 muestras por Ha.

El relevamiento de la presencia de *Rhizoctonia* como causante de "damping-off" se efectuó en soja, tomate, pimiento, tabaco, algodón, festuca, remolacha, agropiro, papa, alfalfa, poroto, de suelo de estos cultivos y de yerba mate y maíz, y además de suelos no cultivados de las provincias de Misiones, Salta, Tucumán, San Luis, La Rioja, Santa Fe, Córdoba, Santiago del Estero, Chaco, Buenos Aires, Entre Ríos, Mendoza, Chubut y Tierra del Fuego. Los muestreos de suelo en algunos casos se realizaron en campos con monocultivo con infección natural de *Rhizoctonia* por varios años.

El objetivo de esta colección fue: Obtener aislamientos representativos de amplio rango de orígenes geográficos y hospedantes.

Los aislamientos fúngicos se obtuvieron ya sea a partir de esclerocios, de tejidos vegetales enfermos o bien de suelos, por lo que la variación representó la diversidad de propágulos normalmente encontrada en condiciones de campo.



### 1.a. Métodos de aislamiento del género *Rhizoctonia*

Se utilizaron métodos directos e indirectos para aislar los cultivos del suelo. En el caso de emplear un método indirecto se aplicaron las técnicas de cebo desarrolladas por Ko y Hora (1971) y Papavizas et al (1975) con las siguientes modificaciones: Se colocaron muestras de 40 g del suelo en estudio en cajas de Petri de 9 cm de diámetro, luego se humedeció la tierra con agua destilada estéril y se distribuyó homogéneamente en ella 1 g de glomérulos de *Beta vulgaris* L. var. *cicla*.

Las muestras se incubaron durante 48 horas a 22 °C y posteriormente el contenido de cada caja se pasó a través de un tamiz de 6 y luego por uno de 10 mallas/pulgada. Las semillas, se lavaron con agua corriente durante 2 horas y posteriormente se enjuagaron con agua estéril.

Los glomérulos de acelga ya enjuagados se orearon bajo flujo de aire estéril y se sembraron sobre agar-agua al 2% suplementado con 300 µg/ml de sulfato de estreptomicina y 300 µg/ml de neomicina. Luego de 16 horas de incubación a 22 °C, las hifas con características morfológicas de *Rhizoctonia* desarrolladas sobre los glomérulos de acelga se cortaron y transfirieron a tubos conteniendo el medio de agar-papa glucosado (APG) pH 5.6. Posteriormente los cultivos puros se mantuvieron en medio de conservación a base de suelo y salvado de trigo (Butler, 1980) que se detalla a continuación:

Tierra	96 g
Salvado de trigo	4 g

Se completaron tubos de 16 cm de altura por 16 mm de ancho con esta mezcla hasta 9 cm de altura y se agregaron aproximadamente 3 ml de agua destilada estéril.

Los aislamientos a partir de plantas se realizaron a través de alguna de las dos técnicas siguientes: 1) Se cortaron trozos de raíces dañadas, se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 1% durante 30 min., se enjuagaron con agua destilada estéril y luego se ubicaron en cajas de Petri con APG pH 5.6. 2) Se extrajeron fragmentos de hifas, directamente de los tejidos vegetales y se sembraron sobre agar-agua al 2%, en cajas de Petri de 90 mm de diámetro. En este caso debido a la naturaleza superficial del micelio no se realizó la desinfección con hipoclorito de sodio. A las 16 hs se repicaron los extremos hifales sobre APG pH 5.6 y los cultivos se incubaron a 22°C durante aproximadamente 4 días.

La conservación de estos aislamientos, una vez purificados se realizó igual que en el caso de los aislamientos de suelo.

### **1. b. Características morfológicas del género *Rhizoctonia***

Los distintos aislamientos, obtenidos como se indicó en el ítem 1.a. de esta sección, se sembraron sobre APG pH 5.6, en obscuridad a 22 °C. Las observaciones de las características de las colonias: aparición de esclerocios, velocidad de crecimiento y coloración, se estimaron diariamente hasta que la colonia alcanzó el borde de las cajas de Petri.

Para la determinación del diámetro hifal se realizaron microcultivos a partir de aislamientos jóvenes de aproximadamente 3 días desarrollados sobre APG pH 5.6, según la técnica desarrollada por Parmeter et al. (1969). Para ello un bloque de 0.5 cm de cada aislamiento se ubicó estérilmente sobre una película de agar-agua al 0.5% en un portaobjetos y se incubó en una cámara húmeda durante 24 horas.

La distinción entre las especies multinucleadas y las binucleadas se realizó a través de la observación microscópica a 400 x del número de núcleos y demás caracteres hifales antes mencionados, mediante las técnicas de tinción de Bandoni (1979) o de Tu et al. (1977) y la visualización del aparato septal por la de Martin y Lucas (1984).

Se realizaron entre 12 y 15 mediciones de cada uno de los caracteres y se determinó el rango de diámetro hifal y el número de núcleos por célula.

## **2. Determinación del grupo de anastomosis**

### **2.a. Determinación del grupo de anastomosis por apareamiento hifal.**

Las cepas "testers" de *R. solani*, *R. zaeae* y binucleadas fueron gentilmente proporcionadas por el Dr. Ogoshi (Faculty of Agronomy, Hokkaido University -Sapporo-Japon) y el Dr. Butler (Department of Plant Pathology, California University-California EE.UU.)

La identidad del grupo de anastomosis de cada aislamiento se determinó primeramente por la estimulación de la formación de un heterocarión en la zona de intersección de cultivos duales entre cada aislamiento en estudio con cada uno de los "testers" de referencia de la ATCC de *Rhizoctonia solani* (AG-1 a AG-7 y AG-BI), con los de *R. zaeae* (WAG Z 497 y 504) y con los binucleados del género *Rhizoctonia*. Luego de 72 horas de incubación a 22°C, se recortaron sectores de 0.5 cm de las zonas de intersección de las hifas, se montaron sobre portaobjetos, se tiñeron con azul de anilina al 1% en glicerina (Tu y KImbrough, 1973) y se observaron con microscopio compuesto a 400 x.

Paralelamente se realizaron cultivos sobre un medio de APG pH 5.6 adicionado con carbón activado, para visualizar sobre el fondo oscuro, las hifas blanquecinas de los heterocariones (Butler y Bolkan, 1973).

Las anastomosis que resultaron positivas por los métodos antes mencionados se comprobaron por el de microcultivo (Yokoyama y Ogoshi, 1986) con modificaciones: Se sembraron enfrentados sobre una película delgada de agar-agua al 0,5% extendida sobre un portaobjetos, bloques de 2 mm de micelio de cada aislamiento con cada uno de los patrones de anastomosis, separados entre si por una distancia de 1 cm . Los microcultivos se incubaron luego en cajas de Petri sobre papel de filtro humedecido a 22° C hasta que las hifas se entremezclaron y luego se tiñeron con una solución de glicerina y azul de anilina al 0.5% (Tu et al., 1977).

La anastomosis se observó con una magnificación de 400 x para establecer la presencia de un poro entre las hifas anastomosadas, conexiones citoplasmáticas y muerte de las hifas adjuntas a la anastomosis ("killing reaction").

Los aislamientos con caracteres morfológicos diferentes de *R. solani*, *R. zae* y de los binucleados *Rhizoctonia* se indujeron a fructificar sobre distintos medios (Dinghra y Sinclair, 1985). No obteniéndose resultados positivos, la confirmación de la característica de septados estériles se realizó a través del International Mycological Institute (CAB).

## 2. b. Determinación del grupo de anastomosis por electroforesis en geles de poliacrilamida.

### 2.b.1. Método de cultivo de los aislamientos para electroforesis

Se hicieron crecer aislamientos del género *Rhizoctonia* sobre APG pH 5.6 durante 3 días. Luego se transfirieron bloques de aproximadamente 1 cm de diámetro a Erlenmeyers de 250 ml conteniendo 40 ml de medio líquido MMN (Marx, 1969), cuya composición fue la siguiente:

CaCl <sub>2</sub> :	0,05 g	Sacarosa :	10,0 g
NaCl :	0,025 g	Bacto agar:	15,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :	0,5 g	Agua destilada:	1000 ml
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> :	0,25 g		
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O:	0,15 g		
FeCl <sub>3</sub> al 1%:(w/v):	1,2 ml		
Extracto de malta:	3,0 g		
Tiamina HCl:	100 µg		

Este medio se suplementó con 20 g de glucosa y 2 g de asparagina. Luego de un período de incubación de 5-6 días a 22 °C, en reposo, el micelio se separó por filtración a través de papel de filtro Watman N°1 en un embudo Buchner de 9 cm de diámetro y aplicación de vacío.

### **.2.b.2. Extracción de proteínas y preparación de las muestras.**

Las proteínas solubles de los aislamientos en estudio se extrajeron de acuerdo a una modificación del método acuoso de Reynolds et al. ( 1983) : Se congelaron con nitrógeno líquido aproximadamente 3 g de micelio fresco, se trituraron en mortero de porcelana y se suspendieron en 5 ml de un buffer de extracción compuesto por Tris HCl 50 mM, pH 7.6: 2,5 ml; Mg<sub>2</sub> Cl 1 mM: 12,5 µl ; 2- B

Mercaptoetanol 1 mM: 3,5 µl y como inhibidor de proteasas Cloruro de fenil metil sulfónido 1 mM : 8,71 ml. Luego los extractos se clarificaron por centrifugación a 4 °C, durante 30 minutos a 12.000 x g y los sobrenadantes obtenidos se sometieron a una ultracentrifugación durante 2 horas a 100.000 xg. Las proteínas se precipitaron del sobrenadante clarificado por adición de 8 volúmenes de acetona y las muestras se mantuvieron durante toda la noche a -18° C . Los precipitados se recogieron por centrifugación 20 min a 10.000 xg y se secaron al aire.

Antes de la electroforesis los precipitados (de aproximadamente 4 mg) se suspendieron en 400 µl de una solución buffer conteniendo 0.5 mM de Tris HCl, pH 6,8 : 1,25 ml de H<sub>2</sub>O ; glicerol al 10%, dodecilsulfo de Na (SDS) al 1%, 2- mercaptoetanol al 2% y azul de bromofenol al 0.002% y se calentaron a 100 °C durante 2 minutos. Alrededor de 2 µl de la suspensión (± 20µg de proteína) se sembraron en cada gel por muestra.

### **2.b.3. Electroforesis**

La electroforesis se realizó con un sistema discontinuo (Gil y Powell, 1968), en una plancha de poliacrilamida de 0,6 mm de ancho con 10 cm de longitud para el gel de resolución al 10%, pH 8.9 y 1 cm de gel espaciador, pH 6.7

Cada gel estuvo constituido por dos partes; el gel de poro grueso en la parte superior y el gel de poro fino en el resto.

#### **Gel de poro grueso**

Se mezclaron 2,50 ml de Tris HCl, pH 6.8, 0.5 M con 0,10 ml de SDS (al 10%), 0,06 ml de persulfato amónico (al 10%) y 1,25 ml de Acrilamida (30 %)-Bisacrilamida (10 %) con Temed y se llevaron a 10 ml con agua monodestilada estéril.

#### **Gel de poro fino**

Se mezclaron 12,5 ml de Tris HCl 1.5 M pH 8.8, 0.5 ml de SDS ( al 10%), 0,2 ml de persulfato amónico (al 10%), 16,65 ml de Acrilamida (al 30%)-Bisacrilamida (0.8%) con 26,65  $\mu$ l de Temed y 20 ml de agua monodestilada estéril.

La electroforesis se corrió a 150 V (constante) por 3,5 a 4 horas a 10°C. El buffer de corrida contenía 1,8 g de Tris-Base 0.1 M y 8,65 g de glicina 0.76 M pH 8.2 en 600 ml de agua bidestilada.

A los 300 ml que se colocaron en la parte superior de la cuba se agregaron 0.3 g de SDS .

Una vez concluida la electroforesis se fijaron las proteínas por medio de la introducción del gel en una solución conteniendo: etanol 50% : 125 ml, ácido acético 10-15% : 25 ml y llevada con agua bidestilada a 250 ml, durante aproximadamente 1 hora . Posteriormente el gel se tiñó con un colorante para proteínas compuesto de 30 ml de ácido acético, azul de coomasie, 0,1g en 5 ml de etanol o metanol., durante toda la noche De esta solución se tomaron de 0,5 a 1 ml y se disolvieron en ácido acético 15% (cantidad necesaria para 250-300 ml). Al cabo de este tiempo los geles se destiñeron en agua monodestilada y se observaron.

Las experiencias se repitieron con extractos preparados a partir de diferentes cultivos de los aislamientos.

Los patrones electroforéticos se evaluaron sobre la base del número posible y densidad de cada banda como un porcentaje del movimiento del frente o del curso del teñido.

### **3. Patogenicidad de los aislamientos**

La patogenicidad de los aislamientos se evaluó por medio de la estimulación del potencial patogénico al transferir el inóculo de un medio extremadamente rico a uno pobre. Para ello, cada aislamiento se desarrolló primeramente en el medio de YEDA ( Ichielevich-Auster,1985b) cuya composición es la siguiente:

Extracto de levadura	10 g
Proteosa peptona	5 g
Glucosa	5 g
Agar Oxoid	17 g
Agua destilada	1000 ml



Los aislamientos fúngicos se hicieron crecer sobre el medio de YEDA durante 3 días. Al cabo de ese período se ubicaron bloques de 4 mm de diámetro de cada colonia en el centro de cajas de Petri de 15 cm de diámetro con agar-agua al 2 % y se incubaron a 22 °C hasta que la colonia alcanzara 2,5 cm de radio. Se desinfectaron semillas de los diferentes hospedantes con hipoclorito de sodio al 1 % por 10 min., se enjuagaron con agua destilada estéril, se secaron asépticamente y se sembraron en los bordes del agar-agua contenido en las cajas de Petri con las colonias fúngicas. Las placas se incubaron a 26 °C ± 2°C con un fotoperíodo de 12 horas bajo luz fluorescente durante 7 a 10 días.

Se ensayó la patogenicidad sobre los siguientes hospedantes: Calabaza (*Cucurbita maxima* L.), acelga [*Beta vulgaris* var. *cicla* (L.) Moq.], lechuga (*Lactuca sativa* L.), escarola (*Cichorium endivia* L.), cebolla (*Allium cepa* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), girasol (*Helianthus annuus* Mill.), lino (*Linum usitatissimum* L.), alfalfa (*Medicago sativa* L.), avena (*Avena sativa* L.), pasto ovillo (*Dactylis glomerata* L.), pasto llorón [*Eragrostis curvula* (Schrad.)] soja (*Glycine max* L.), nabo (*Brassica campestris* L.), pimiento (*Capsicum annuum* L.), rabanito (*Raphanus sativus* L.), repollito de Bruselas (*Brassica oleracea* var. *gemmifera* L.) y poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) de acuerdo con Ichielevich et al. (1985b), con ligeras modificaciones

La patogenicidad en soja y poroto se determinó en plántulas de 3 días ya que en estos hospedantes, no es posible evaluar el ataque en semilla.

El índice de severidad de la enfermedad se evaluó de acuerdo a una escala de 0 a 5 basada en el porcentaje del área necrótica del hipocótilo o de la semilla.

0: sana	2: 6	30%	4: 51	80%
1: 1	5%	3: 31	50%	5: 81
				100%

El promedio se realizó sobre 60 plántulas de cada hospedante por aislamiento.

## **4. *Cladorhinum foecundissimum***

### **4.a. Aislamiento**

La forma estéril (anamorfo) de varios aislamientos de *C. foecundissimum* se obtuvo a partir de muestras de suelo de alfalfa (*Medicago sativa*) y de agropiro (*Agropyron hirsutum*) de las provincias de Buenos Aires y de Santa Fe, por los métodos de cebo, utilizados en el curso del relevamiento realizado para la obtención de aislamientos del género *Rhizoctonia*.

### **4.b. Características morfológicas y patogenicidad de los aislamientos**

Las características morfológicas del micelio de los aislamientos se examinaron a 400x en microcultivos realizados de acuerdo a la técnica de Yokoyama y Ogoshi (1986).

La forma conidial de *C. foecundissimum* se obtuvo luego de la siembra del aislamiento en APG pH 5.6 y con exposición a una longitud de onda de 350 nm durante 15 días . El rango de las dimensiones del collarete y conidios se estableció a través de una serie de aproximadamente 25 mediciones.

La determinación del género y especie se realizó por observación microscópica a 400 x, de las características y dimensiones del collarete y conidios.

La clasificación del género y especie fueron confirmados por la CAB.

La patogenicidad de los aislamientos de *Cladorhinum* se estableció en base a ensayos realizados según el diseño establecido para evaluar la patogenicidad de

los aislamientos de *Rhizoctonia* y sobre los mismos hospedantes (Ver ítem 3 de esta sección).

### **5. Mecanismos de penetración de *Rhizoctonia solani* y *Cladorhinun foecundissimun* en plántulas de algodón**

Para la observación de la colonización fúngica radicular, se procedió de acuerdo con el método de Dodman et al. (1968): Se hicieron desarrollar plántulas de algodón en macetas plásticas con arena, en condiciones de humedad ambiental (70%) y temperatura (28°C) controladas, durante 7 días y se regaron con solución nutritiva (Hogland y Arnon, 1950).

Luego de este período las plántulas se removieron de la arena, se lavaron y se cortaron trozos de raíces de aproximadamente 5 cm de largo que se fijaron a una película de agar-agua al 0.5%, extendida sobre un portaobjetos. Explantes de inóculos de 3 x 5 mm, extraídos de cultivos en APG pH 5.6, de 3 días de *R. solani* y *C. foecundissimun* se ubicaron sobre el portaobjetos con agar-agua a unos 3-4 mm de cada trozo de raíz. Los preparados de cada plántula se colocaron inmediatamente en una caja de Petri conteniendo papel de filtro, se incubaron en la obscuridad y se examinaron durante un período de 72 horas.

El modo de penetración de las hifas de los aislamientos en las raíces del hospedante se determinó por observación directa bajo microscopio estereoscópico, facilitada por la remoción de la corteza epidermal de los hipocótilos de las plántulas. Estos fragmentos de raíces colonizadas se montaron en parafina y en resina Epoxy, se cortaron con micrótopo, se tiñeron y se observaron con microscopio óptico.

Se utilizaron diferentes procedimientos de tinción :

### **Métodos de Tinción:**

#### **Safranina-O y "Fast green"**

##### Composición del colorante:

1. 2 g de safranina-O, 100 ml de metil celosolve, 50 ml de etanol 95%, 50 ml de agua, 2 g de acetato de sodio y 4 ml de formalina. Se disolvió la safranina en metil celosolve y luego, en orden, se agregaron etanol, agua, acetato de sodio y formalina.

2. Acido pícrico-etanol: 0.5 g de cristales de acido pícrico en 100 ml de metanol.

3. Etanol amonificado: 4-5 gotas de  $\text{NH}_4\text{OH}$  en 100 ml de etanol 95%.

4. "Fast green" FCF: Se mezclaron 1:1 metil celosolve y etanol absoluto. La mezcla se saturó con "fast green" FCF. Se agregó cantidad suficiente de esta solución a una mezcla de una dilución 1:3 de etanol absoluto (aceite de clavo según la intensidad deseada). Se preparó en una solución con una dilución 1:1 de una mezcla de metil celosolve y etanol absoluto. Se diluyó con aceite de clavo.

Las secciones de parafina fijadas a los portaobjetos se desparafinaron y se llevaron al nivel de hidratación del primer reactivo de tinción. El desparafinado se obtuvo por inmersión de los portaobjetos en xileno durante 5 min. y el proceso se repitió en xileno fresco. La hidratación se produjo en una serie gradual de etanol.

Esta tinción permitió distinguir claramente la necrosis de los elementos xilemáticos en las raíces atacadas por *R. solani*, pero no indicó la ubicación de

las hifas en las raíces colonizadas con *C. foecundissimum*, por lo que se procedió a la descripta a continuación

### **Rojo-Magdala--verde brillante (Dhingra y Sinclair, 1986)**

Esta coloración permitió la tinción de rojo brillante del tejido fúngico y verde intenso del parénquima vegetal.

Composición del colorante:

1. 20 g de rojo Magdala en 100 ml de etanol al 85%
2. 2% de verde claro en aceite de clavo más unas gotas de etanol

Las secciones se extrajeron del etanol 85%, se tiñeron por 5-10 min en rojo Magdala y se removió el exceso de colorante a través del lavado con etanol al 95%. El material se tiñó durante 1 a 3 min. en verde brillante, se lavó con etanol absoluto y se montó en bálsamo. Los tiempos de tinción óptimos se determinaron por observación microscópica mientras se realizaba el proceso de tinción.

## **6. Determinación del comportamiento endofítico de *Cladorhinum foecundissimum***

Los hongos endofíticos en general, se detectan comúnmente a través del cultivo de segmentos de los órganos vegetales esterilizados.

Para la observación y aislamiento de hongos endofíticos radiculares, se procedió de acuerdo con la técnica de Sieber et al. (1988): Las raíces de distintos hospedantes (tomate, algodón, lino, avena etc)., desarrollados en suelo colonizado con *C. foecundissimum* se sumergieron en etanol 96°C durante 60

seg., luego en hipoclorito de sodio diluido 1:5 (2% de cloro activo) durante 3 min. Posteriormente se lavaron nuevamente en etanol durante 30 seg. y finalmente después de dejar secar bajo flujo de aire estéril, se cortaron asépticamente en segmentos de 10-15mm de largo y se transfirieron a cajas de Petri sobre medio de APG pH 5.6, suplementado con 30 mg/l de cloranfenicol y 100 mg/l de sulfato de neomicina. Los cultivos se incubaron durante 24-36 horas, en oscuridad a 22°C.

Luego de este tiempo los micelios emergentes de los segmentos se transfirieron a tubos con APG pH 5.6 y la esporulación se indujo a 20°C, con una longitud de onda de 350 nm y fotoperíodo de 12 horas.

Para facilitar la penetración de un colorante y permitir la tinción de estructuras fúngicas profundas en los tejidos se aplicó la metodología de diafanización de raíces desarrollada por Phillips y Hayman (1970): Se calentaron en KOH al 10%, a 90°C durante aproximadamente 1 hora segmentos radiculares de plántulas de algodón frescas o fijadas en FAA (100 ml de etanol al 50%, 13 ml de formalina y 5 ml de ácido acético glacial). Este tratamiento permitió la remoción del citoplasma del huésped y el cilindro vascular se tornó particularmente visible. Se procedió luego a enjuagar el material en agua y acidificarlo con HCl diluido y teñirlo por inmersión durante 5 min en azul de tripano al 0,01% en lactofenol. El exceso de colorante se removió con lactofenol. Los segmentos radiculares se conservaron temporariamente en lactofenol.

Paralelamente otras raíces de plántulas de algodón se clarificaron y tiñeron de acuerdo con una modificación realizada por Koske y Gemma (1989) para detección de micorrizas vesículo-arbusculares (VA). Aproximadamente 3 g de raíces frescas lavadas o fijadas (conservadas en etanol al 50% o alcohol isopropílico) y enjuagadas con agua, se sumergieron en una solución acuosa de

KOH al 2,5% (w/v) y luego se calentaron a baño de maría de 90°C durante 30 min., se ventilaron y enjuagaron con abundante agua corriente. Luego del tratamiento con KOH las raíces, fuertemente alcalinizadas debieron ser lavadas abundantemente con agua y acidificadas con HCl al 1% . La duración del tratamiento y volúmen de la solución de HCl dependió de la masa radicular tratada. Normalmente se utilizaron 20 ml por recipiente ( volúmen de ácido = 20 o 30 x el volúmen de las raíces) y se mantuvo la muestra inmersa en la solución durante toda la noche.

Luego que el pH se neutralizara con la solución ácida, las raíces se tiñeron en glicerol acidificado (500 ml de glicerol + 450 ml de agua destilada + 50 ml de HCl al 1%) adicionado con 0,05 % de azul de tripano. El material luego se calentó en un baño de maría de 90°C durante 60 min y se destiñó a temperatura ambiente en glicerol acidificado sin colorante.

## **7. Enzimas relacionadas con la degradación de la pared celular del hospedante**

### **7.a. Celulasas**

#### **7.a.1. Medios de cultivo**

La cinética de producción enzimática se evaluó en el medio de Czapeck-Dox modificado por Reyes y Byrde (1973) con la siguiente composición:

Glucosa:	5 g
Xilano:	2,5 g
Pectina de manzana:	2,5 g
Tartrato de amonio:	2 g
KH <sub>2</sub> OPO <sub>4</sub> :	1 g

MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O:	0,5 g
KCl:	0,5 g
Extracto de levadura:	1 g
*Elementos trazas:	1 ml
H <sub>2</sub> O destilada:	1000 ml
*Solución de elementos trazas	
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> .10 H <sub>2</sub> O :	100 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O:	70
FeSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O:	50
CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O:	10
MnSO <sub>4</sub> . 4 H <sub>2</sub> O:	10
Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> . 4 H <sub>2</sub> O:	10.

Las sales se disolvieron en agua destilada con excepción del fosfato monopotásico que se agregó al final de la preparación para evitar precipitaciones. A la solución salina se le agregó la glucosa previamente disuelta en agua destilada y la solución de elementos traza. El medio se tindalizó durante 30 min. tres días consecutivos.

Para la determinación de la eficiencia de distintos inductores de enzimas celulásicas, los aislamientos de *R. solani* (81) y el de *C. foecundissimun* (8) se cultivaron en el medio de Marcus et al (1986) ,cuya composición fue la siguiente:

L-asparagina :	5 g
Avicel y/o Carboximetilcelulosa	
y/o pectina/xilano:	10 g



Extracto de levadura :	1 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O:	2,5 g
CaCl <sub>2</sub> :	1g
FeCl <sub>3</sub> :	0,3 mg
Tiamina HCl:	0,2 mg
Agua destilada	1000 ml

Para la inducción de la actividad enzimática se sustituyó parcialmente la fuente de carbono por distintos inductores: Carboximetilcelulosa (CMC), Avicel (celulosa microcristalina) o la combinación standard de pectina de manzana y xilano según cada caso y las composiciones de los medios fueron:

5 g de glucosa y 5 g de CMC

5 g de glucosa y 5 g de Avicel

5 g de glucosa , 2.5 g de pectina de manzana y 2.5 g de xilano

### 7.a.2 Preparación de inóculos

Se transfirieron cultivos de tres días de *R. solani* y de *C. foecundissimum*, sobre APG pH 5.6, en bloques de 5 mm a los medios de cultivo líquidos. Se utilizaron dos Erlenmeyers 1000 ml, con 250 ml de cada medio y con cada inductor y se incubaron en agitador rotatorio (150 rpm) a 28 °C, en obscuridad durante un período de 30 días.

Para la extracción de las muestras, se tomó estérilmente de cada Erlenmeyer una fracción de cultivo, de aproximadamente 20 ml a los 4, 8, 14, 18, 24 y 30 días y se separó el micelio del medio líquido por filtración con vacío a través de papel Watman N° 1. El resto del cultivo se volvió a incubar en las condiciones antes descriptas.

## **7.b. Determinaciones enzimáticas**

Las determinaciones enzimáticas se llevaron a cabo en el medio de cultivo del cual se pudo separar homogéneamente el micelio

### **7.b.1. Actividad $\beta$ -glucosidasa**

Para la valoración de esta actividad enzimática se utilizó como sustrato p-nitrofenil  $\beta$ -D glucopiranosido (pNPG) a una concentración final de 0.2 mg/ml en buffer acetato 50 mM pH 5.0 .

Para la reacción se incubaron a 50 °C durante 1 hora 0.9 ml de sustrato + 0.1 ml de líquido enzimático y el revelado se efectuó con el agregado de 2ml de buffer borato de Clark Lubs pH 9.4.

La actividad de esta enzima esta dada por la cantidad de p-nitrofenol liberado (Shewale y Sadana, 1978).

Para la cuantificación de la actividad enzimática se interpolaron los valores de densidad óptica obtenidas a 420 nm de las muestras con los valores de la curva patrón realizada con distintas concentraciones de p-nitrofenol desde 20 a 200  $\mu$ moles.

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de p-nitrofenol por minuto en las condiciones de la reacción.

### **7.b.2. Actividad Endo- 1, 4 $\beta$ -Glucanasa ( CMCasa)**

Para valorar la actividad de esta enzima se utilizó como sustrato carboximetilcelulosa a una concentración de 10 mg/ml en buffer acetato 50 mM pH 5.0.

Para la reacción se utilizaron 0,9 ml de sustrato + 0,1 ml de líquido enzimático. Las muestras se incubaron a 50 °C durante 2 horas

La conversión de la absorbancia de las muestras se realizó a través de una curva patrón de glucosa (de 0.05 a 1  $\mu$ mol)

La actividad de esta enzima esta dada por la cantidad de azúcares reductores liberados. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de grupos reductores/min.

### **7.b.3. Actividad Exo-1-4 $\beta$ Glucanasa (Avicelasa)**

Para valorar esta actividad enzimática se utilizó como sustrato avicel (celulosa microcristalina ) a una concentración de 10 mg/ml en buffer acetato 50 mM pH 5.0.

Para la reacción se utilizaron 0,9 ml de sustrato + 0,1 ml de líquido enzimático. Las muestras se incubaron a 50 °C durante 2 horas.

La actividad de la enzima esta dada por la cantidad de azúcares reductores liberados.

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de grupos reductores/min..

### **Determinación de azúcares reductores**

La concentración de azúcares reductores presentes en cada muestra fue determinada de acuerdo al método de Somogyi (1945) en combinación con el de Nelson (1944).

La conversión de la absorbancia de las muestras enzimáticas de *R. solani* y *C. foecundissimum*, en concentración de sustancias reductoras se efectuó según una curva patrón de glucosa de 0.05 a 1  $\mu$ mol de glucosa.

### **Revelado de la Reacción**

A la mezcla de incubación se agregaron 0,2 ml de reactivo de Somogyi, los tubos se agitaron, se hirvieron 15 min. y luego se enfriaron bajo agua. Posteriormente se incorporaron 0,2 ml de reactivo de Nelson, se centrifugó a 1.500 x g durante 5 min y luego se agregaron 2.4 ml de H<sub>2</sub>O.

La reacción se midió colorimétricamente en espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

Para el blanco de sustrato se emplearon : 0,9 ml sustrato + 0,1 ml de H<sub>2</sub>O.

Para el blanco de líquido enzimático: 0,9 ml de sobrenadante + 0,1 ml de H<sub>2</sub>O.

## **8. Determinación de la concentración intracelular de 3':5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMP cíclico)**

### **Extracción del AMP cíclico**

La concentración intracelular de AMPcíclico de *Rhizoctonia solani* AG-4 y *Cladorhinum foecundissimum*, se midió en los aislamientos hasta la fase de crecimiento exponencial, de acuerdo con el método de Cantore et al. (1980). Los inóculos se cultivaron en Erlenmeyers de 250 ml con 40 ml de medio líquido MMN (Marx 1969) y se incubaron durante 5 días a 22°C. Las muestras se filtraron por succión a través de malla de acero inoxidable y los filtros conteniendo el micelio se sumergieron inmediatamente en 2,5 ml de HCl 0.1 N. con 0.2 pmoles de <sup>3</sup>H AMP cíclico como trazador. La operación se realizó en pocos segundos para minimizar la hidrólisis del AMP cíclico durante el proceso de extracción. En otros experimentos se utilizó TCA como agente desnaturante de proteínas y no se encontró diferencia respecto al empleo del HCl.

Las muestras se sometieron a tres ciclos de congelamiento y descongelamiento en hielo seco-etanol y en baño de agua a 37 °C. Se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 min. en una centrífuga refrigerada Beckman modelo 12-21 y se separó el precipitado miceliano para la determinación de las proteínas totales.

Los sobrenadantes se transfirieron a otros tubos para ser evaporados a sequedad bajo presión reducida a temperatura ambiente y los residuos se lavaron varias veces con agua. Las muestras en 400 µl de buffer A (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, EDTA 0.45 mM, teofilina 1 mM. ).

## **8.a. Medición del AMP cíclico**

### **8.a.1. Preparación de la proteína ligante de AMP cíclico.**

Todas las operaciones se llevaron a cabo a 4°C.

La proteína que une AMP cíclico se preparó a partir de corteza de glándulas adrenales de bovino (fuente de la enzima), coleccionadas frescas en un frigorífico, según el método de Tsang modificado (Galvagno et al., 1984).

La corteza de las adrenales se separó de la médula, se cortó y homogeneizó en buffer B (Tris-HCl 100 mM pH 7.5, 0,1 M, sacarosa 0,25 M). Estas muestras se utilizaron para evaluar el contenido de AMP cíclico de las mismas por desplazamiento del  $^3\text{HcAMP}$  en una curva standard elaborada con AMP cíclico auténtico (ver ítem 8.2.a.2. de esta sección).

Luego de homogeneizar con desintegrador de tejidos Ultraturax mod. T-25, durante 2 a 3 min. a máxima velocidad, el homogenato se centrifugó durante 15 min a 1000 x g para clarificarlo y luego el sobrenadante se centrifugó durante 1 hora a 105.000 x g.

El sobrenadante que constituyó la fracción S-100 se sometió a una precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 43%, de saturación. Luego se centrifugó a 10.000 x g durante 20 min y se conservó el precipitado que se resuspendió en un cuarto del volumen original de buffer B y se dializó contra el mismo buffer.

Luego de la diálisis, las proteínas desnaturalizadas se descartaron por centrifugación y la solución dializada conteniendo la proteína ligante se almacenó en alícuotas hasta, al menos seis meses a -70 °C, sin pérdida apreciable de la actividad.

### **8.a.2. Método de ensayo por competencia por una proteína ligante de AMP cíclico**

Se ensayaron alícuotas de las muestras para determinar el contenido de AMP cíclico intracelular por el método competitivo de Gilman modificado (Galvagno et al., 1984). La mezcla de incubación consistió en: 1 mg de proteína ligante de AMP cíclico; 60.000 cpm de AMP cíclico- $H^3$  (2.5 pmoles) y una alícuota adecuada de las muestras a ensayar que se completaron con buffer A a un volumen de 1 ml.

Las muestras se incubaron 30 min a 0 °C con agitación y la reacción se detuvo por el agregado de 0,5 ml de una solución conteniendo: 500 mg de carbón activado, 50 mg de dextrano T 70 y 20 ml de buffer B. Las mezclas se agitaron en Vortex durante 10 segundos y se centrifugaron a 1.500 x g, en una centrífuga clínica durante 5 min. a 4°C. Se evaluó la actividad remanente tomando 0.75 ml del sobrenadante en 10 ml de arkopal-tolueno (mezcla centelleadora: arkopal 1:0,35 v/v). La radioactividad se leyó en un contador de centelleo líquido.

Se construyeron curvas patrón por duplicado con las distintas concentraciones de AMP cíclico auténtico.

El contenido de AMP cíclico de las muestras se obtuvo por interpolación, en la curva patrón de los valores de radioactividad hallados. La actividad se expresó como pmol de AMP cíclico/minuto /mg de proteína.

## **8.b. Preparación de extractos enzimáticos para la medición de las enzimas del metabolismo del AMP cíclico.**

Los aislamientos de *R. solani* y *C. foecundissimum* se cultivaron en medio líquido MMN en condición estática a 22 °C durante 6 días. Al cabo de ese período el micelio se filtró por succión a través de malla de acero y se valoró su peso fresco.

Para la obtención de los extractos crudos, se liofilizaron aproximadamente 5 g de micelio fresco y luego rompieron con nitrógeno líquido o alúmina en mortero de porcelana. Se agregaron al polvo obtenido, dos volúmenes de buffer C (Tris HCl pH 7.4, 1mM EDTA , 4 mM EGTA; 0.5 mM fenil metil sulfonil fluoruro). Esta suspensión se centrifugó durante 5 min. a 12.000 x g y el sobrenadante se utilizó como fuente de la enzima.

## **8.c. Medición de actividades enzimáticas**

### **8.c.1. Actividad adenilato ciclasa (AC)**

Todas las operaciones se llevaron a cabo a 4°C.

La actividad adenilato ciclasa se midió en los extractos crudos preparados en buffer C, utilizando una mezcla de incubación que contenía, para un volumen final de 100 µl: buffer HEPES ( 100 mM pH 6.8, AMPc 1mM, MnCl<sub>2</sub> 5mM, ATP [ $\alpha$  <sup>32</sup>P] actividad específica 40 cpm/pmol ( $4 \times 10^6$  ), para regenerar el ATP [ PEP 1.5 mM, KCl 50 mM, Piruvato quinasa 1 µg ( 0,25 µl/tubo), Adenilato quinasa 0,5 µg (0,25 µl/tubo) ] y proteína enzimática 300 a 400 µg. La mezcla de reacción se incubó 30 min a 30 °C y se detuvo con 100 µl de



solución "stop" conteniendo 100 µl/tubo:  $^3\text{HcAMP}$  1 mM (3.000 cpm/pmol) y ATP 4 mM. Luego se calentó la mezcla 1 min. a 100°C.

Las muestras así tratadas se colocaron sobre columnas de 1,5 ml de resina Dowex AG 50 w (forma  $\text{H}^+$ ), se descartó el eluido, se lavaron con 4 ml de agua y se colocaron sobre respectivas columnas de 1 ml de alumina equilibradas con buffer D (imidazol HCl 50mM pH 7.0). Se eluyó de la columna de Dowex con 5 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ . destilada sobre la alumina, descartándose el eluido. Se lavaron las columnas de alumina con 1 ml de buffer D, se descartó el eluido y finalmente se eluyó con 4 ml del mismo buffer. y se recogieron los eluidos en viales de vidrio.

Una unidad de adenilato ciclasa define a la cantidad de enzima que cataliza la producción de 1pmol de AMPcíclico /min., en las condiciones del ensayo standard.

### **8.c. 2. Actividad Fosfodiesterasa de AMP cíclico (A-PDE)**

La determinación enzimática de fosfodiesterasa de AMP cíclico se realizó según el método de Thompson y Appleman (1971) modificado (Moreno et al., 1982). La mezcla de incubación constó de : buffer Tris HCl 20 mM pH 7.4,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, AMP cíclico 10 µM,  $^3\text{HcAMP}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  (. 25.000 cpm) y la preparación enzimática cruda en un volumen final de 100 µl).

Las mezclas se incubaron a 30 °C con agitación durante 20 min. La reacción se detuvo por calentamiento a 100 °C durante 1 min. Luego de enfriar se agregaron 25 µg de veneno de serpiente (*Ophiophagus hannah*) y se incubó a 30°C durante 10 min., para transformar en  $^3\text{H}$ -adenosina el  $^3\text{H}$ -5'AMP formado por acción de la fosfodiesterasa . Se volvió a incubar a 30 °C durante 15 min sin agitación. La reacción se detuvo con el agregado de 1,1 ml de una suspensión de

resina de intercambio aniónico Dowex AG1-X2 (1:3 de resina en metanol 50% v/v). Luego de centrifugar los tubos se tomaron 0,5 ml del sobrenadante cuya radioactividad se determinó en mezcla centelleadora de Arkopal-tolueno

En todos los casos se ajustaron las condiciones de modo que las reacciones fueran lineales con el tiempo y que el consumo de sustrato no fuera mayor del 20%.

Una unidad de actividad enzimática define a la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de 1 pmol de AMPcíclico/min. en las condiciones del ensayo estandar.

#### **8.d. Determinación de proteínas**

La cantidad de proteína se determinó según Bradford (1976) utilizando sero albúmina bovina como standard. La proteína total de los precipitados celulares se determinó en alícuotas de sobrenadantes de los mismos, luego de hidrolizadas en NaOH 1N durante 30 min. a 100 °C.

### **9. Evaluación de la reducción del damping-off a través de *C. foecundissimum*.**

Los cultivos de los aislamientos virulento de *R. solani* y no patogénicos de *C. foecundissimum* ( 8 y 32) se desarrollaron sobre un medio de crecimiento y conservación (Butler, 1980) durante 10 días a 22 °C. Al cabo de ese tiempo los inóculos de *R. solani* y *C. foecundissimum* se distribuyeron en una concentración de 2 mg de una mezcla de suelo y harina de salvado colonizada

por los aislamientos fúngicos por gramo de suelo estéril en macetas de 8 cm de diámetro.

Para el "control de calidad" del inóculo, una muestra de cada tubo se sembró en placas de Petri sobre APG pH 5.6, antes de cada ensayo.

Se utilizó algodón como hospedante y las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% durante 10 min., se enjuagaron con agua destilada estéril y se secaron asépticamente.

Luego de 72 hs de inoculación del suelo con los aislamientos fúngicos se sembraron las semillas de algodón en los tratamientos.

Se realizaron 3 ensayos con 9, 9 y 12 repeticiones por tratamiento respectivamente .

. Se empleó el siguiente diseño:

- 1) Testigo: Suelo estéril + semillas de algodón
- 2) Suelo estéril + inóculo de *C. foecundissimum* ( aislamiento 8) + semillas de algodón
- 3) Suelo estéril + inóculo de *C. foecundissimum* (aislamiento 32) + semillas de algodón
- 4) Suelo estéril + inóculo de *R. solani* + semillas de algodón
- 5) Suelo estéril + inóculo de *R. solani* + plántulas de algodón previamente desarrolladas durante 5 días en suelo infestado con *C. foecundissimum* (aisl. 8)
- 6) Suelo estéril + inóculo de *R. solani* + plántulas de algodón previamente desarrolladas durante 5 días en suelo infestado con *C. foecundissimum* (aisl. 32)
- 7) Suelo estéril + inóculo de *R. solani* + inóculo de *C. foecundissimum* (aisl. 8)
- 8) Suelo estéril + inóculo de *R. solani* + inóculo de *C. foecundissimum* ( aisl. 32).

El control de los ensayos se realizó diariamente y la evaluación final se llevó a cabo en el momento de la floración (al cabo de 4-5 meses de desarrollo).

Se realizó el análisis de variancia y la comparación de medias de los tratamientos por el test de Tuckey.

El porcentaje de protección fue determinado de acuerdo a la ecuación propuesta por Ichielevich et al (1985 a):

$$(C - B) (A - B)^{-1} \times 100$$

Donde A: Número de plantas sin síntomas en el control sin infectar.

B: Número de plantas sin síntomas en suelo infestado con un aislamiento virulento.

C: Número de plantas sin síntomas en suelo infestado con un aislamiento no patogénico y luego transplantadas a suelo infestado con un aislamiento virulento.

Esporádicamente durante todo el período de crecimiento del cultivo se tomaron muestras de suelo de cada tratamiento y se sembraron sobre APG pH 5.6 para comprobar la viabilidad de *R. solani* en el suelo.

Al finalizar el ensayo las raíces de las plantas desarrolladas en suelo infectado con *C. foecundissimun* y transplantadas a suelo infectado con *R. solani*, así como las desarrolladas en suelo estéril sin colonización fúngica, se clarificaron por los métodos antes mencionados y se determinó la presencia o ausencia de hifas en ellas.

El porcentaje de colonización intra-radicular se determinó por la distribución al azar, en una grilla con divisiones de 1 mm<sup>2</sup> de las raíces teñidas y el examen de secciones de 100 . 1 mm<sup>2</sup> del tejido radicular (Mosse, 1973)

## **10. Evaluación de los mecanismos relacionados con la supresión del "damping-off".**

### **10. a. Movilización del fósforo soluble del suelo por acción de *C. foecundissimum***

Para la determinación del fósforo soluble del suelo se realizaron dos ensayos en invernadero. Se empleó un suelo argiudol ( serie Los Reseros) cuyas características se detallan en la tabla 1

**a. I.** En este primer ensayo el dosaje de fósforo se efectuó sobre las plantas de los tratamientos correspondientes al ensayo 1, indicado en el ítem 9 de esta sección y diseñado para evaluar la supresión del "damping-off" provocado por *R. solani*.

El suelo empleado se esterilizó durante 1 hora a 1 atm. Los cultivos de los aislamientos virulento de *R. solani* y no patogénico de *C. foecundissimum* se desarrollaron sobre la mezcla de suelo y harina de salvado, durante 10 días a 22 °C. Al cabo de ese tiempo los inóculos de *R. solani* y *C. foecundissimum* se distribuyeron en concentración de 2 mg por gramo de suelo estéril (autoclavado) en macetas de 8 cm de diámetro.

Se utilizó algodón como hospedante, cuyas semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% durante 10 min., se enjuagaron con agua destilada estéril y se secaron asépticamente. Luego de 72 hs de inoculación del suelo con los aislamientos fúngicos se sembraron las semillas de algodón en los diferentes tratamientos.

El corte de las plantas de algodón se realizó en el momento de la floración (al cabo de 4-5 meses de desarrollo). La materia seca (MS) se evaluó por pesada, luego de llevar a peso constante en estufa a 70°C. El análisis químico de las plantas se llevó a cabo mediante mineralización con HNO<sub>3</sub> y la metodología empleada para los análisis de fósforo, carbono orgánico y nitrógeno total se indica en la Tabla 1. El fósforo se analizó mediante la colorimetría del complejo amarillo vanado-fosfomolibdico., calcio y magnesio por espectrofotometría de absorción atómica, potasio y sodio por espectrofotometría de emisión y nitrógeno por el método de Kjeldhal.

**a. II.** Para este segundo ensayo se utilizó un suelo de la misma serie aunque con una concentración de fósforo asimilable de 19.0 mg kg<sup>-1</sup>. El suelo se esterilizó durante 1 hora a 1 atm.; la mitad del mismo se inoculó con el aislamiento no patogénico de *C. foecundissimun* y se dejó colonizar durante 10 días, el resto se reservó para el tratamiento testigo. Cada tratamiento se realizó por cuadruplicado. El suelo colonizado con el biocontrolador y el testigo se marcó con <sup>32</sup>P (0.074 MBq /100 g de suelo) y se mantuvo 20 días en bolsas de plástico cerradas para permitir el intercambio con el <sup>31</sup>P. Al cabo de este período el suelo se distribuyó en macetas de 500 ml de capacidad y se sembraron 6 semillas de algodón, desinfectadas con hipoclorito de sodio (1%) en cada una. Una vez germinadas, se conservaron 4 plántulas por maceta. El riego se efectuó con H<sub>2</sub>O destilada estéril y el suelo se mantuvo a capacidad de campo. A los 25 días se realizó el corte de la parte aérea de las plantas y se evaluó la cantidad de materia seca por pesada. El <sup>32</sup>P se midió por espectrometría de centelleo líquido, en solución acuosa. La relación isotópica se determinó en base a los resultados obtenidos de <sup>31</sup>P - <sup>32</sup>P en plantas y suelos (valor L) (Larsen, 1952).

La evaluación de los resultados se efectuó por análisis estadístico (ANOVA)

**Tabla 1: Características de un suelo argiudol (serie Los Reseros)**

<b>P asimilable</b> <sup>1</sup>	<b>C org.</b> <sup>2</sup>	<b>N· total</b> <sup>3</sup>	<b>pH</b>
<b>mg.Kg<sup>-1</sup></b>	<b>g%</b>	<b>g%</b>	<b>en agua 1:2,5</b>
<b>4,9</b>	<b>1,4</b>	<b>0,076</b>	<b>6,5</b>
<b>S cationes</b>	<b>Total- Bases</b>		
<b>meq.%</b>	<b>meq.%</b>		
<b>8,9</b>	<b>9,9</b>		
<b>Ca<sup>+</sup></b>	<b>Mg<sup>++</sup></b>	<b>K<sup>+</sup></b>	<b>Na<sup>+</sup></b>
<b>5,6</b>	<b>2,2</b>	<b>0,5</b>	<b>0,6</b>

1. Método de Bray y Kurtz (1945)

2. Método de Walkley (1934)

3. Método de Black (1965)

#### **10. b. Determinación de fenoles en plántulas de algodón colonizadas con *C. foecundissimum*.**

Los aislamientos de *C. foecundissimum* y *R. solani* se inocularon en suelo esterilizado (autoclavado), contenido en macetas. La colonización con cada uno de los hongos, se realizó en condiciones de aproximadamente 26°C y 70% de humedad ambientales

Por otra parte, se sembraron semillas de algodón deslintadas y desinfectadas con hipoclorito de sodio ( 1% ) sobre papel de filtro en cajas de Petri de 15 cm de diámetro. Una vez germinadas se transplantaron a las macetas con suelo colonizado fúngicamente y se mantuvieron durante 14 días. La comprobación de la calidad de la colonización fúngica se realizó mediante la siembra de muestras del suelo sobre APG pH 5.6.

Los ensayos se efectuaron por duplicado, con 4 repeticiones por tratamiento y triplicados. para cada concentración con cada método empleado.

Las determinaciones de fenoles se realizaron en plantas de 14 días de desarrollo en suelo infectado con *C. foecundissimum* y en suelo testigo. Al cabo de ese período se descalzaron las plántulas, se lavaron superficialmente las raíces con agua de canilla, se enjuagaron con agua destilada y se cortaron en trozos. Un gramo de tejido radicular fresco se homogeneizó con 50 ml de etanol 96% en un desintegrador de tejidos, con vaso de 125 ml., durante 10 min. y se filtró la suspensión a través de fibra de vidrio. El filtro de fibra se lavó dos veces , cada vez con 100 ml de etanol en ebullición. para evitar la pérdida de los fenoles totales por oxidación enzimática debido a las fenolasas presentes en todas las plantas. Los extractos se concentraron en evaporador rotatorio a sequedad a 35 °C. El material se recogió con 20 ml de H<sub>2</sub>O . La mezcla se



extrajo con 3 volúmenes de hexano para remover los lípidos, se centrifugó a 40.000 g durante 90 min., se filtró el sobrenadante por filtro de Millipore o nitrocelulosa con malla de 0.2  $\mu\text{m}$  y se conservó el filtrado a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

El dosaje de fenoles se realizó en todos los casos mediante acción oxidativa, a través de dos métodos y se compararon los resultados:

I) Según una modificación (Sneh et al., 1989) de la técnica clásica de lectura de la densidad óptica del complejo verde intenso, formado por el agregado de cloruro férrico a las soluciones:

A una alícuota de 0,5 ml de cada extracto se agregaron 2 ml de un reactivo A [0,1% de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  en  $\text{H}_2\text{O}$ ] y 2 ml de un reactivo B (2,1 % de  $\text{FeCl}_3$  en  $\text{H}_2\text{O}$ ). Luego de 5 min de incubación a temperatura ambiente la reacción se detuvo con el agregado de 0,5 ml de  $\text{HCl}$  0.5 N que mantuvo insoluble el precipitado azul de Prusia formado con los contaminantes  $\text{Fe}^{++}$  del ferricianuro.

Los reactivos A y B reaccionaron con los fenoles para dar el complejo verde oscuro. La densidad óptica se determinó en un espectrofotómetro Beckman mod. 25 a una longitud de onda de 600 nm. y se comparó con una curva standard.

Para la curva standard se utilizaron soluciones de 50, 100 y 200  $\mu\text{g/ml}$  de catecol.

Los compuestos ensayados mostraron relación lineal entre absorbancia y el logaritmo de la concentración.

II) Según una modificación del método de Swain y Hillis (1959), por la acción oxidativa del reactivo de Folin-Ciocalteu: Una alícuota de 0.5 ml de cada extracto se diluyó en agua bidestilada hasta obtener un volumen final de 7

ml en un tubo graduado de 10 ml. El contenido se agitó vigorosamente, se agregaron 0.50 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu y se agitó nuevamente. Exactamente 3 min. más tarde se agregó 1 ml de una solución saturada de NaCO<sub>3</sub> con lo cual la mezcla alcanzó 10 ml y se agitó enérgicamente. Al cabo de una hora en reposo, se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro Beckman mod. 25. a una longitud de onda de 725 nm con respecto a un blanco de una mezcla de agua y reactivo solamente.

En los casos en que se formaron precipitados, los extractos se filtraron o centrifugaron antes de la lectura.

Para la curva standard se utilizaron soluciones de 0 a 10 µg / ml de catecol.

Los compuestos fenólicos ensayados mostraron relación lineal entre absorbancia y el logaritmo de la concentración.

Las concentraciones se expresaron en mg de ácido clorogénico por gramo de tejido fresco.

## **11. Drogas Utilizadas**

Todas las drogas utilizadas fueron del mejor grado analítico que se pudo obtener.

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

## 1. Relevamiento de *Rhizoctonia* en la Argentina

Se comenzó este trabajo con el relevamiento del género *Rhizoctonia* en la Argentina.

La evaluación de las muestras de suelo y de tejidos vegetales determinó un número de 83 aislamientos de *Rhizoctonia* y de algunos micelios septados estériles, con características similares a *Rhizoctonia* ( identificación confirmada por la CAB), que se ordenaron según su procedencia (origen geográfico) y hospedantes como se puede observar en la Tabla 2.

De acuerdo con esta clasificación se determinó el porcentaje de aislamientos de *Rhizoctonia* sp., de *R. solani*, *R. zae*, . binucleados y de los micelios estériles, por provincia, por hospedante correspondiente a cultivo intensivo o extensivo y por región ecológica (Figuras 3 a .16.).

El 57,8 % de los aislamientos fúngicos correspondieron a la región Pampeana, 11,3 % a la del Noroeste, 19,3 % a la del Noreste, 9,3 % a la Cuyana, mientras que a la Patagónica sólo correspondió un 2,3 % .

Independientemente de la región geográfica estudiada, se encontró una estrecha correlación entre la distribución del género *Rhizoctonia* y la de hospedantes susceptibles.

El mayor porcentaje de aislamientos fúngicos detectado en la zona Pampeana coincidió con una mayor densidad de siembra de cultivos susceptibles de presentar "damping-off" de pre y post emergencia y/o podredumbre radicular.

En los últimos años se ha incrementado el conocimiento disponible sobre la ecología del género *Rhizoctonia* y la epidemiología de las enfermedades causadas por las especies patógenas. El crecimiento, comportamiento saprofítico y supervivencia de *R. solani* en el suelo ha sido estudiado

extensivamente (Papavizas et al, 1975; Parmeter y Whitney, 1970; Ogoshi, 1987) así como la variabilidad del género, virulencia y fisiología del parasitismo (Flentje et al., 1969). Sin embargo con muy pocas excepciones las investigaciones se han llevado a cabo en laboratorio o en invernadero y aunque los estudios con modelos matemáticos pueden a veces ser extrapolables a condiciones de campo, los efectos en esas condiciones, no siempre reflejan las situaciones naturales y estresantes a las cuales el patógeno está sujeto en su habitat.

Según Boosalis y Scharen, (1959) y Benson y Baker (1974) las especies patógenas de *Rhizoctonia* aparentemente, pueden sobrevivir en el suelo en forma de esclerocios o de propágulos de paredes gruesas, asociados con el rastrojo de los cultivos susceptibles. Este sustrato constituye una fuente potencial de inóculo para el desarrollo de enfermedades radiculares de origen fúngico, por lo que los métodos de detección y aislamiento de estos organismos deben incluir los restos vegetales en las muestras del suelo.

Los aislamientos del género *Rhizoctonia* obtenidos de plantas enfermas o de suelos que correspondieron a un determinado grupo de anastomosis compartieron atributos ecológicos y culturales, aunque en ciertos casos difirieron en patogenicidad (ver ítem 2.b. de esta sección). Estas observaciones serían, en ese sentido, coincidentes con las afirmaciones de Ploetz et al. (1985) y de Ogoshi (1987).

A través del relevamiento realizado fue posible determinar un elevado porcentaje de aislamientos de *R. solani* AG-4 en tejidos vegetales y en suelos bajo cultivo (cultivos intensivos 25,3 % y cultivos extensivos 71,3%) y 3,4 % en suelos no cultivados (Fig.17). Los resultados aquí obtenidos concordarían con las determinaciones realizadas por Ploetz et al. (1985) y Baird et al. (1993), sobre la presencia de un mayor número de aislamientos AG-4, recuperados de

suelos cultivados con hospedantes susceptibles, capaces de producir, posteriormente estructuras infectivas causantes del "damping-off" en plántula.

Es posible relacionar el saprofitismo, que se manifiesta en su máxima densidad en la población de aislamientos de *R. solani* AG-4 con la patogenicidad (potencial) de los mismos en el suelo, luego de cultivos susceptibles tales como ocurre con el de soja.

Se puede suponer que el saprofitismo de *R. solani* en determinadas áreas estaría restringido a la posibilidad que el hongo pueda alternar como parásito.

La ausencia en este relevamiento de aislamientos AG-1 que, según las estadísticas se manifiesta con similar frecuencia a los de AG-4 en América del Norte y Europa (Parmeter et al., 1969), fue también observada por Neate y Warcup, (1985) y Rovira et al. (1986) en Australia.

**Tabla 2: Identidad de los aislamientos fúngicos por provincia y según su origen**

<b>LOCALIDAD</b>	<b>Nº</b>	<b>ORIGEN</b>	<b> AISLAMIENTO</b>
Entre Rios	96	Alfalfa	<i>R.solani AG-2 2IIIB</i>
Entre Rios	163	Lino	<i>R. solani</i>
Entre Rios	164	Lino	<i>R. solani AG-4</i>
Entre Rios	169	Soja	<i>R. zea WAGZ</i>
Entre Rios	54	Alfalfa	<i>R. solani AG-2 2IIIB</i>
Entre Rios	55	Alfalfa	<i>R. solani AG-2 2IIIB</i>
Entre Rios	56	Suelo de lino	<i>R. solani AG-4</i>
Entre Rios	57	Suelo de lino	<i>R. solani AG-4</i>
Salta	75	Poroto	<i>R. solani AG-4</i>
Salta	76	Tabaco	<i>R. solani AG-4</i>
Salta	79	Tabaco	<i>R. solani AG-4</i>
Salta	126	Suelo de soja	<i>Septado esteril</i>
Salta	132	Suelo de soja	<i>Septado esteril</i>
Tucuman	78	Soja	<i>R. solani AG-4</i>
Tucuman	80	Soja	<i>R. solani AG-4</i>
Tucuman	81	Soja	<i>R. solani AG-4</i>
Tucuman	184	Cyperus	<i>R. binucleada AG-D</i>
Bs Aires	2	Suelo alfalfa	<i>R. solani AG-4</i>
Bs Aires	3	Suelo papa	<i>R. solani</i>
Bs Aires	4	Suelo alfalfa	<i>R. solani AG-4</i>
Bs Aires	6	Poroto	<i>R. solani AG-4</i>
Bs Aires	11	Suelo alfalfa	<i>R. solani AG-4</i>
Bs Aires	29	Suelo alfalfa	<i>R. solani AG-4</i>
Bs Aires	53	Remolacha	<i>R. solani AG-4</i>
Bs Aires	86	Poroto	<i>R. solani AG-4</i>
Bs Aires	118	Suelo de soja	<i>R. solani AG-4</i>
Bs Aires	119	Poroto	<i>R. solani AG-4</i>
Bs Aires	124	Suelo alfalfa	<i>R. solani AG-4</i>

Bs Aires	135	Suelo de soja	<i>R. zea</i> WAGZ
Bs Aires	137	Soja	<i>R. solani</i> AG-2 2IIIB
Bs Aires	138	Suelo de soja	<i>R. solani</i>
Bs Aires	146	Suelo de soja	<i>R. solani</i> AG-2 2IIIB
Bs Aires	147	Suelo de soja	<i>R. solani</i>
Bs Aires	151	Papa	<i>R. solani</i> AG-4
Bs Aires	53	Papa	<i>R. solani</i> AG-4
Bs Aires	183	Pino	<i>R. solani</i> AG-4
Corrientes	41	Frutilla	<i>R. solani</i> AG-4
Corrientes	46	Pimiento	<i>R. solani</i> AG-4
Cordoba	45	Poroto	<i>R. solani</i> AG-4
Cordoba	134	Suelo de soja	<i>R. solani</i> AG-4
Santa Fe	89	Suelo de soja	<i>R. binucleada</i> AG-A
Santa Fe	90	Suelo de soja	<i>Septada esteril</i>
Santa Fe	100	Suelo de soja	<i>R. solani</i> AG-4
Santa Fe	109	Suelo de soja	<i>R. solani</i> AG-4
Santa Fe	110	Suelo de soja	<i>R. solani</i> AG-2IIIB
Santa Fe	115	Suelo de soja	<i>R. solani</i> AG-4
Santa Fe	117	Suelo de soja	<i>R. solani</i> AG-4
Santa Fe	120	Suelo de soja	<i>R. solani</i> AG-4
Santa Fe	123	Suelo de soja	<i>R. solani</i>
Santa Fe	128	Suelo de soja	<i>R. solani</i> AG-4
Santa Fe	143	Suelo de soja	<i>R. solani</i>
Santa Fe	144	Suelo de soja	<i>R. solani</i> AG-4
Santa Fe	148	Suelo de soja	<i>Septado esteril</i>
Santa Fe	149	Suelo de soja	<i>R. solani</i> AG-4
Santa Fe	155	Soja	<i>R. zea</i> WAG-Z
Santa Fe	158	Suelo de soja	<i>R. solani</i> AG-4
Santa Fe	159	Suelo de soja	<i>Rhizoctonia</i> sp
Santa Fe	160	Suelo de soja	<i>R. zea</i> WAG-Z
Santa Fe	171	Suelo de soja	<i>Rhizoctonia</i> sp
Sgo Estero	129	Suelo de soja	<i>Septado esteril</i>



Sgo Estero	130	Suelo de soja	<i>R. zeae</i> WAG-Z
Sgo Estero	131	Suelo de soja	<i>Septado esteril</i>
Mendoza	72	Tomate	<i>R. solani</i> AG-4
Mendoza	73	Poroto	<i>R. solani</i> AG-4
Mendoza	74	Lenteja	<i>R. solani</i> AG-4
Mendoza	105	Remolacha	<i>R. solani</i>
Mendoza	180	Papa	<i>R. solani</i> AG-3
San Luis	82	Suelo no cult	<i>Septado esteril</i>
San Luis	84	Suelo de maiz	<i>R. solani</i>
San Luis	85	Suelo de maiz	<i>R. solani</i>
La Rioja	83	Suelo tomate	<i>Septado esteril</i>
La Rioja	97	Suelo de vid	<i>Septado esteril</i>
La Rioja	98	Suelo de vid	<i>Septado esteril</i>
Misiones	111	Suelo y.mate	<i>Rhizoctonia sp</i>
Patagonia	139	Suelo no cult	<i>Rhizoctonia sp</i>
Patagonia	140	Suelo no cult	<i>Rhizoctonia sp</i>
Chaco	161	Algodon	<i>R. solani</i> AG-4
Chaco	162	Algodon	<i>R. solani</i> AG-4

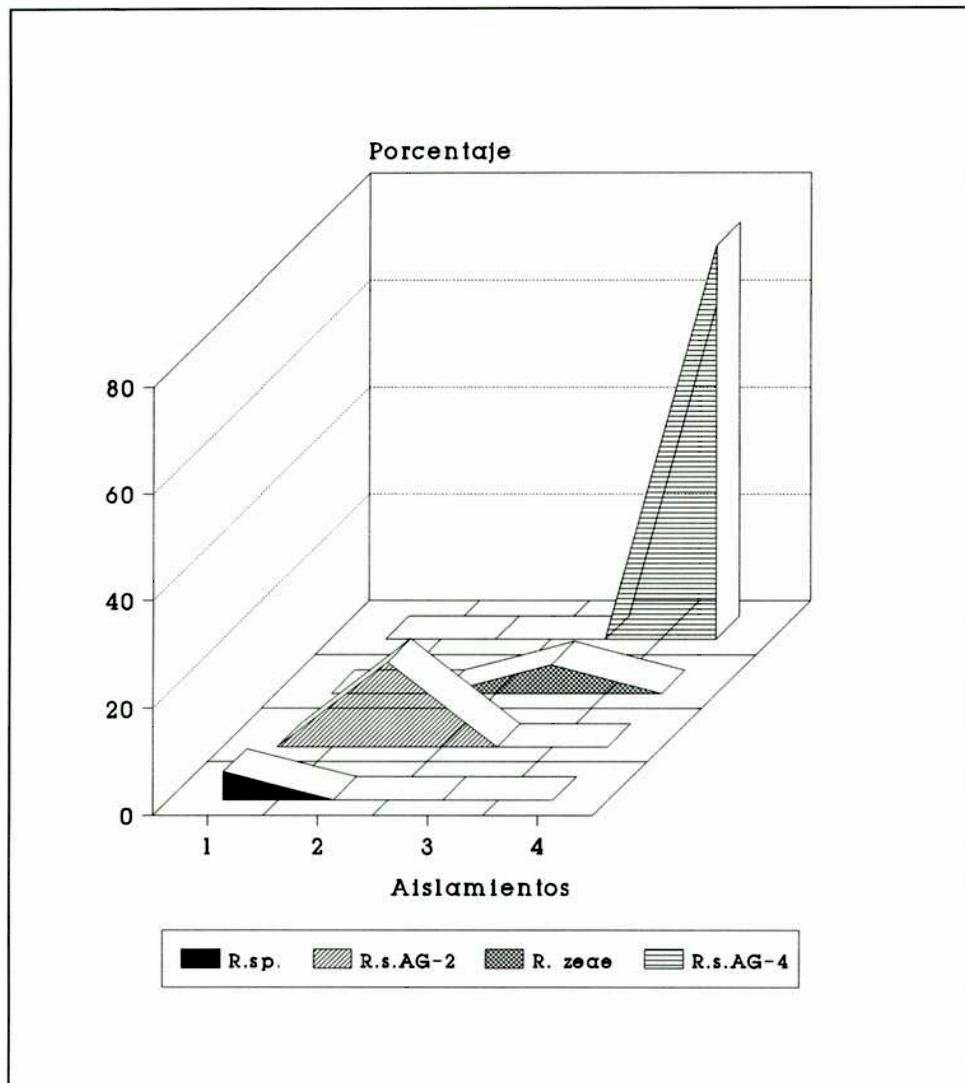


Fig. 3: Relevamiento de *Rhizoctonia* spp. en la Región Pampeana (Buenos Aires). Los triángulos representan los porcentajes de los distintos aislamientos del complejo *Rhizoctonia*.

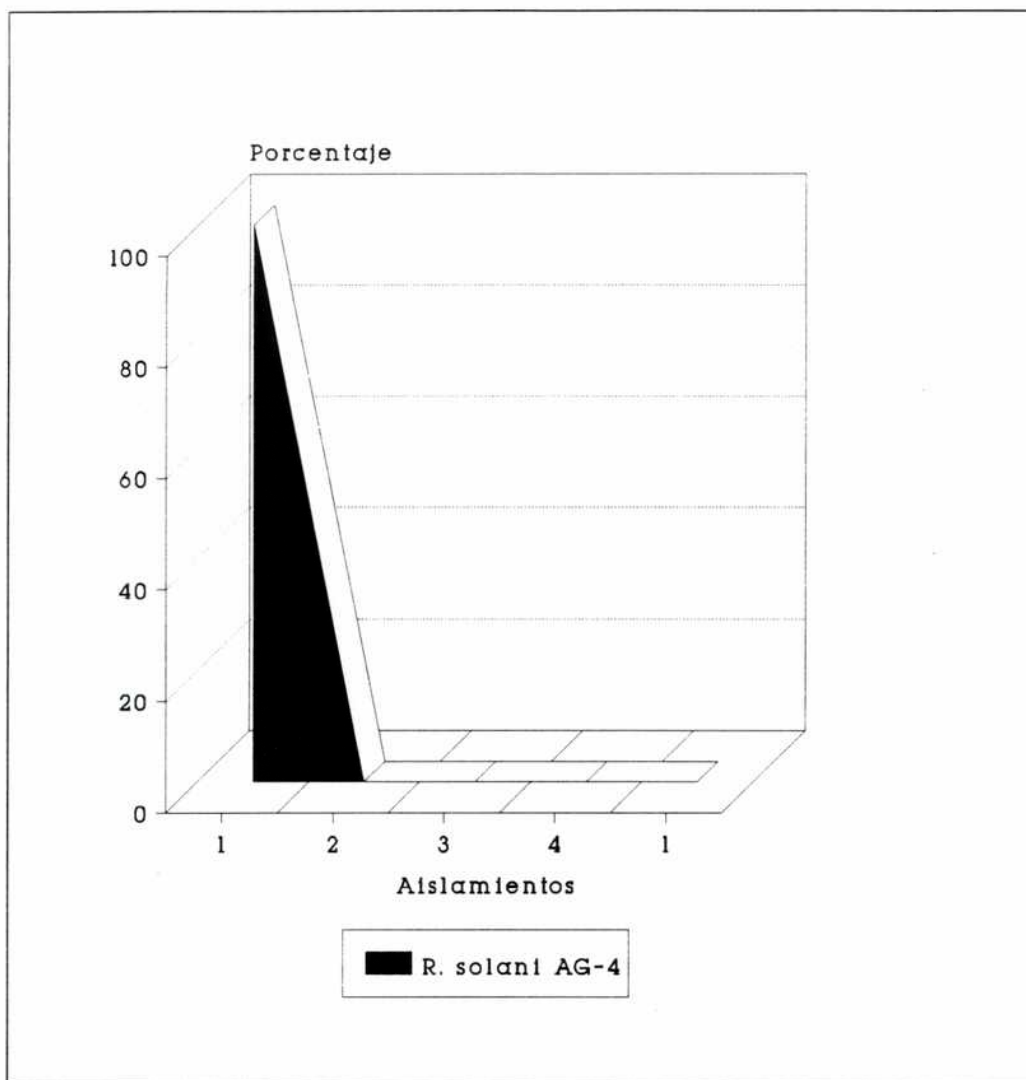


Fig. 4: Relevamiento de *Rhizoctonia* spp. en la Región Pampeana (Córdoba). Los triángulos representan los porcentajes de los distintos aislamientos del complejo *Rhizoctonia*.

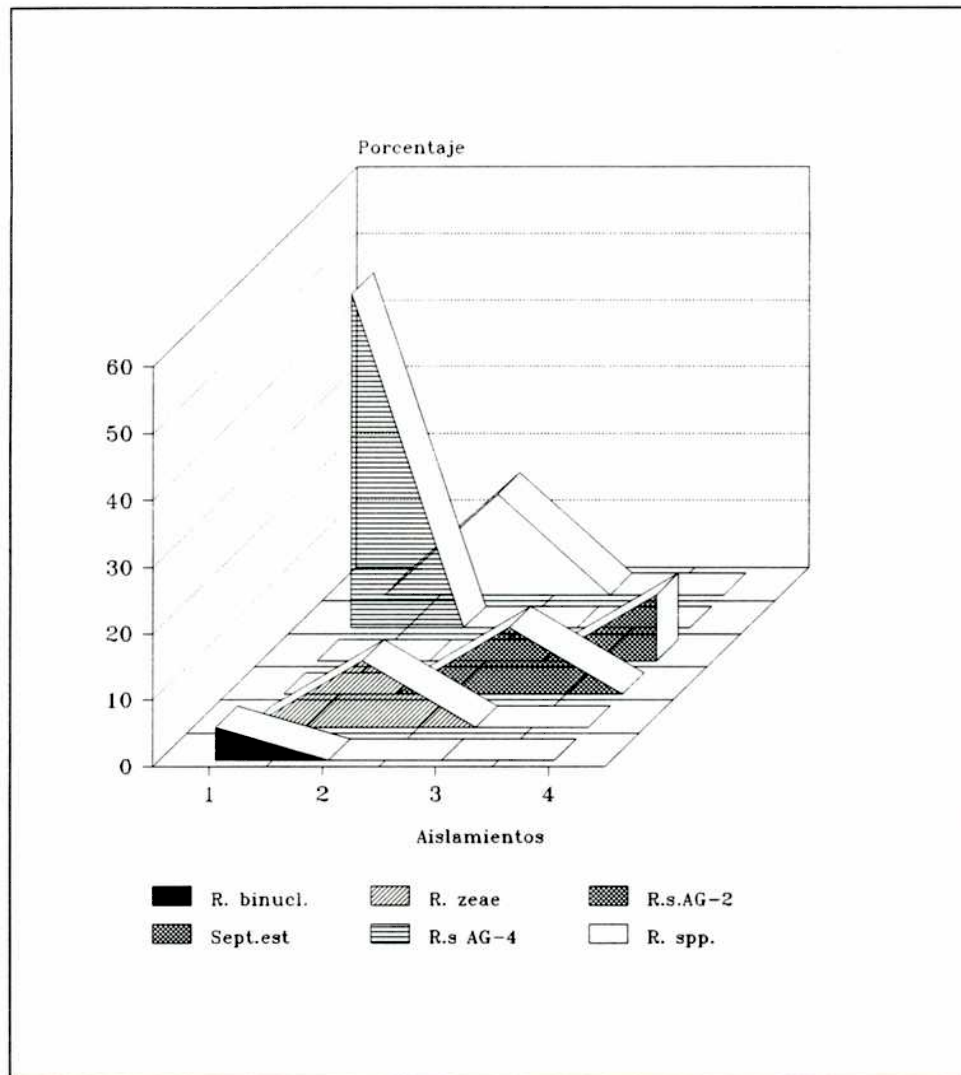


Fig. 5: Relevamiento de *Rhizoctonia* spp. en la Región Pampeana (Santa Fe). Los triángulos representan los porcentajes de los distintos aislamientos del complejo *Rhizoctonia*.

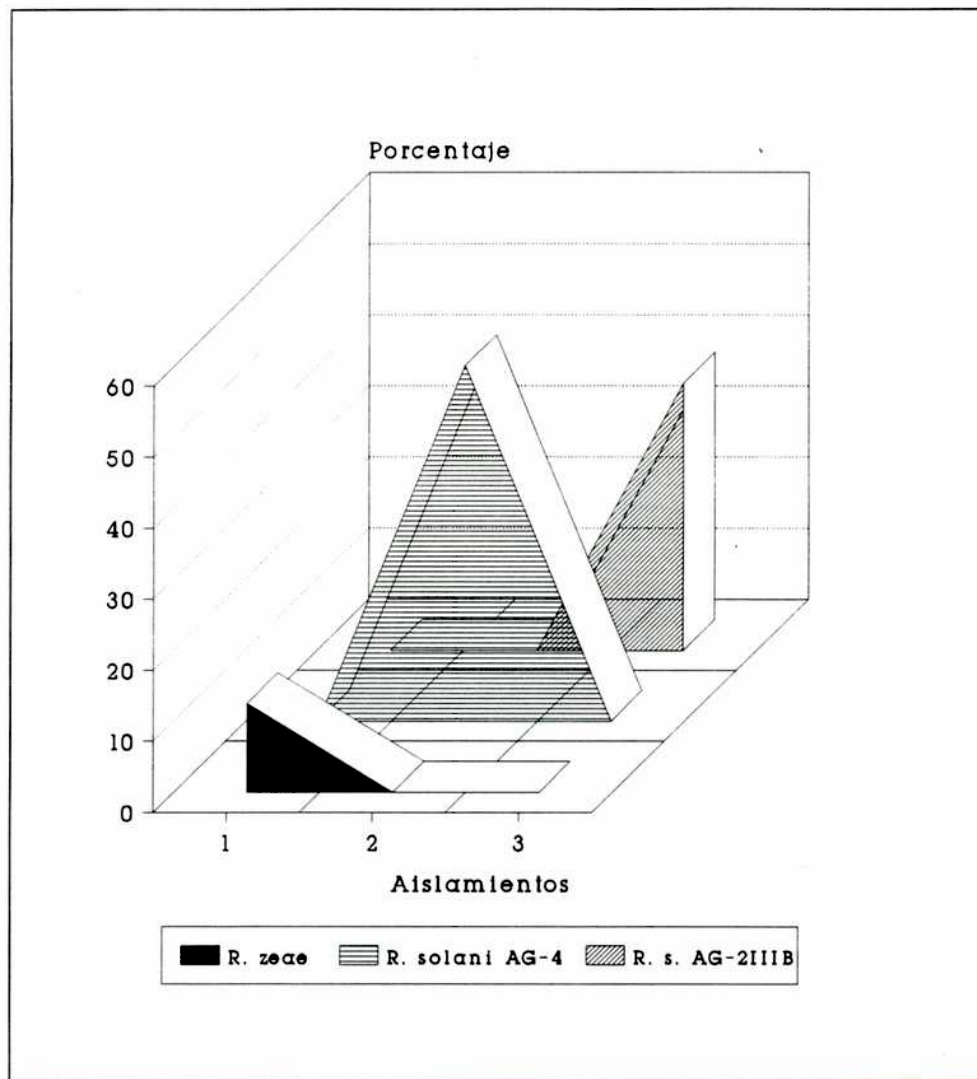


Fig. 6: Relevamiento de *Rhizoctonia* spp. en la Región Pampeana (Entre Ríos). Los triángulos representan los porcentajes de los distintos aislamientos del complejo *Rhizoctonia*.

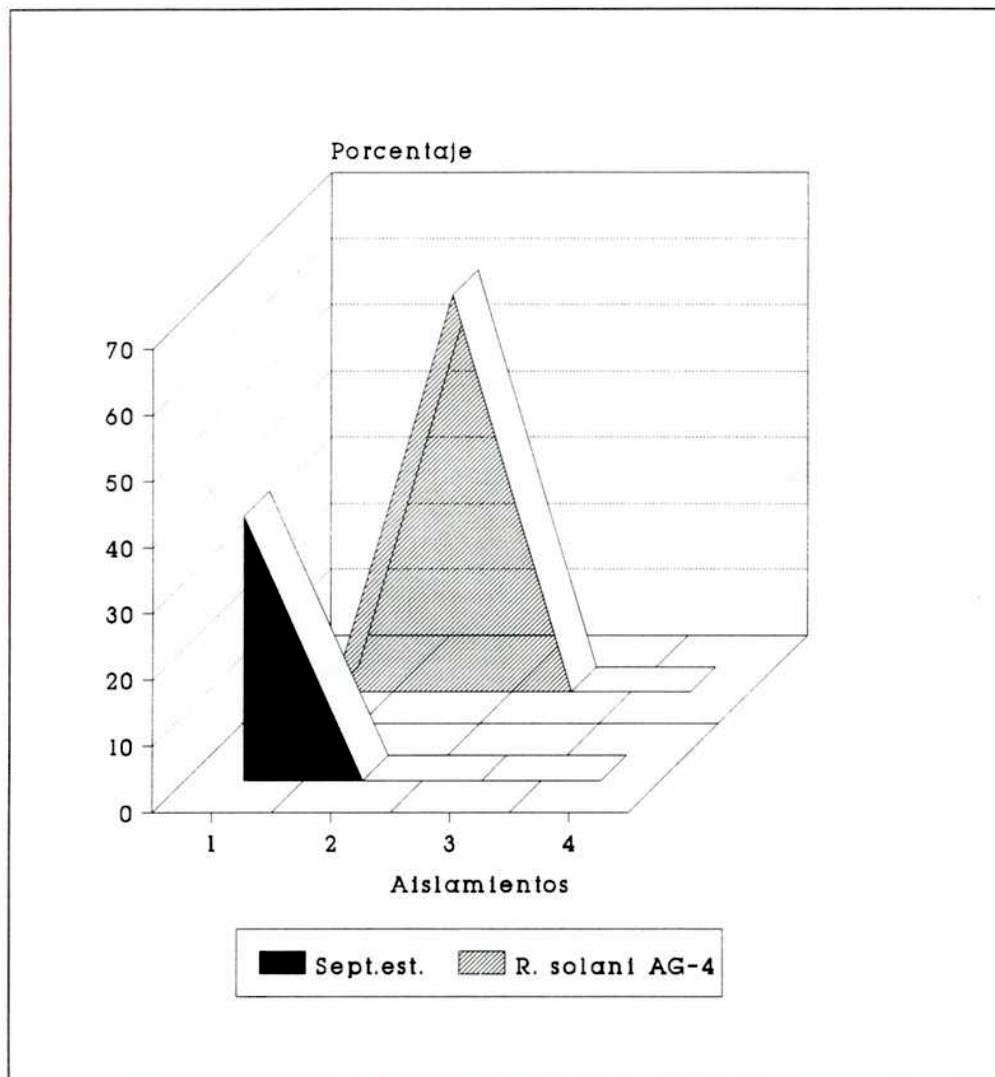


Fig. 7: Relevamiento de *Rhizoctonia* spp. en la Región Pampeana (Salta). Los triángulos representan los porcentajes de los distintos aislamientos del complejo *Rhizoctonia*.

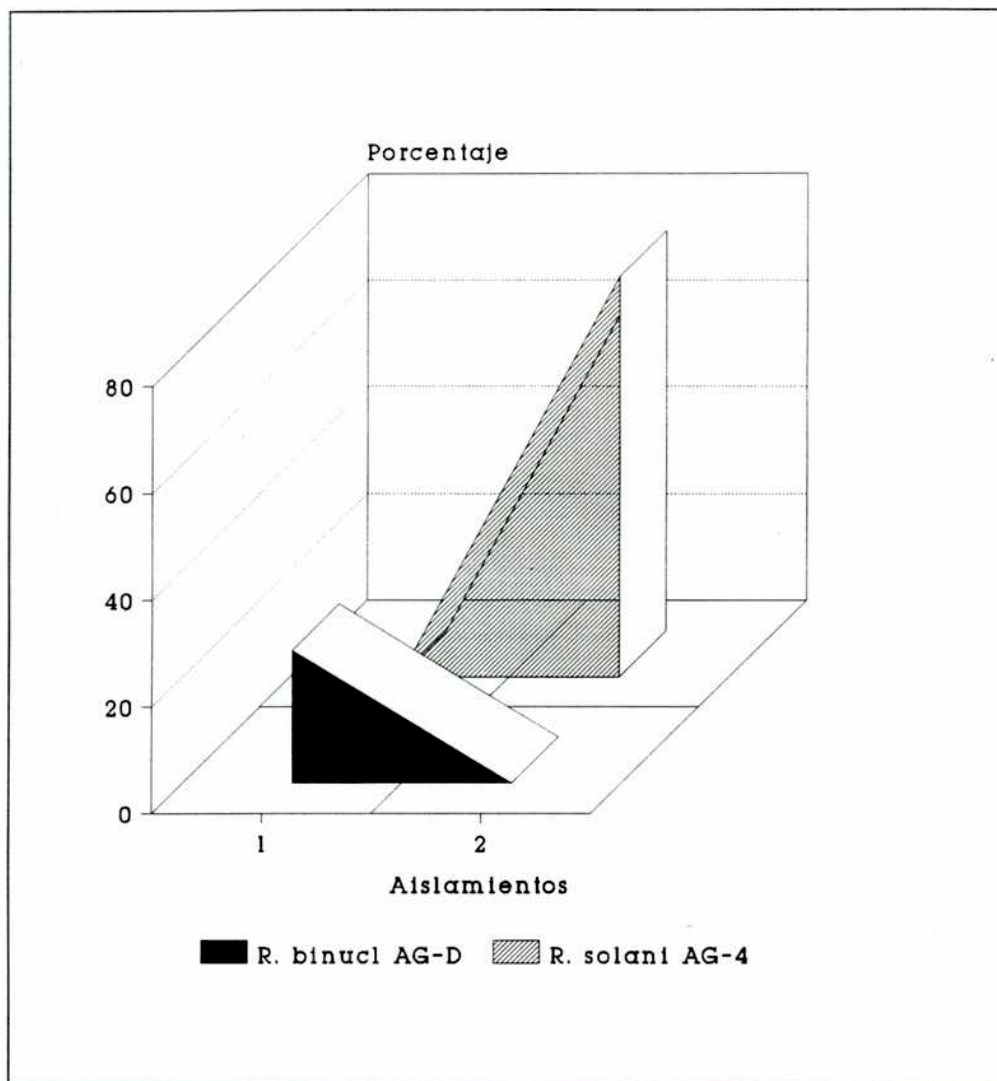


Fig. 8: Relevamiento de *Rhizoctonia* spp. en la Región Noroeste (Tucumán). Los triángulos representan los porcentajes de los distintos aislamientos del complejo *Rhizoctonia*..

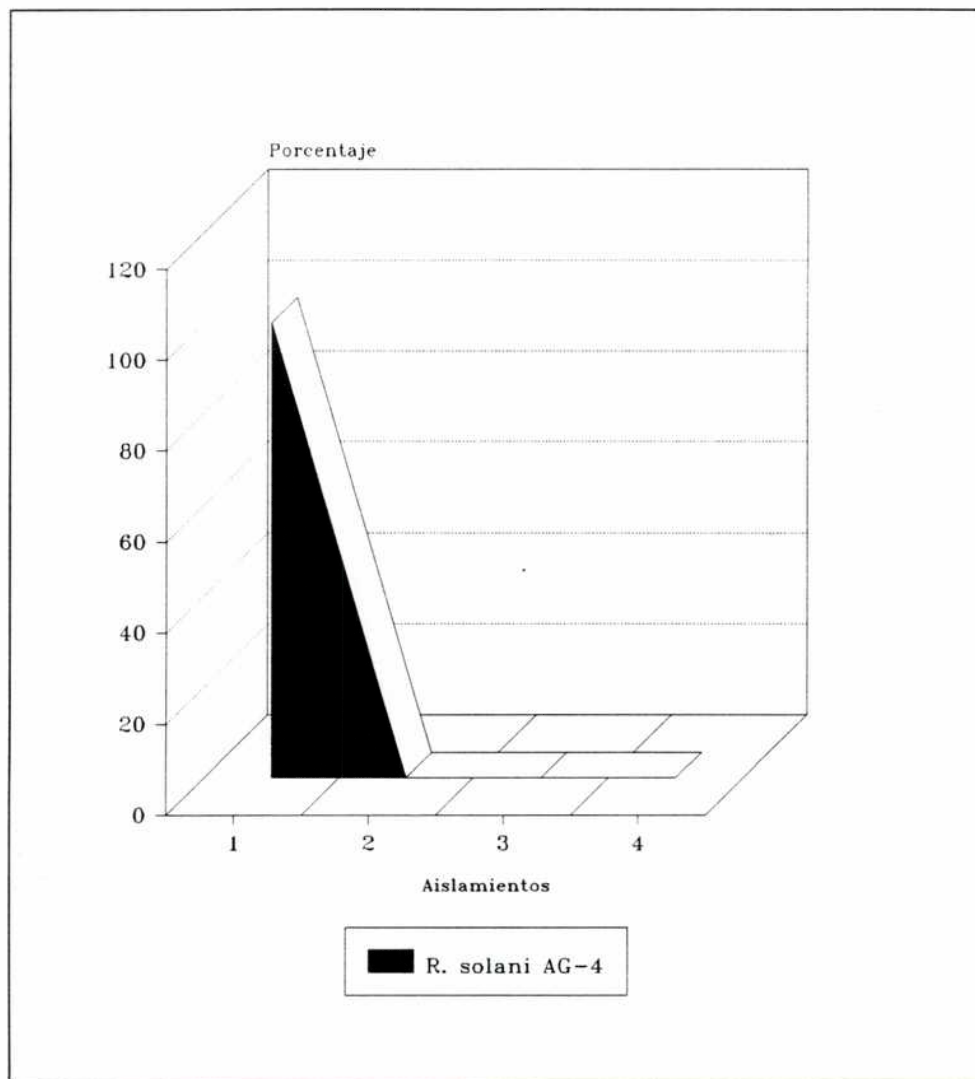


Fig. 9: Relevamiento de *Rhizoctonia* spp. en la Región Noreste (Chaco). Los triángulos representan los porcentajes de los distintos aislamientos del complejo *Rhizoctonia*.



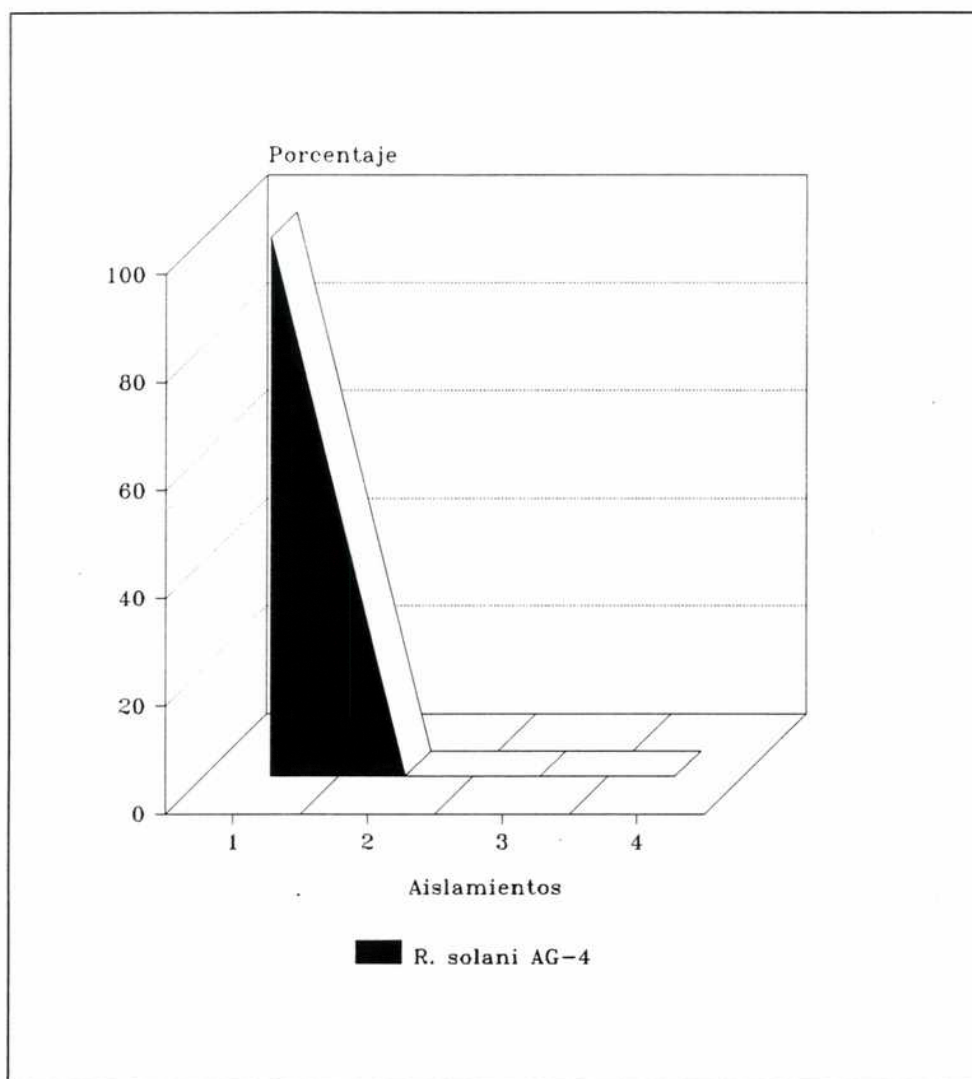


Fig. 10: Relevamiento de *Rhizoctonia* spp. en la Región Noreste (Corrientes). Los triángulos representan los porcentajes de los distintos aislamientos del complejo *Rhizoctonia*.

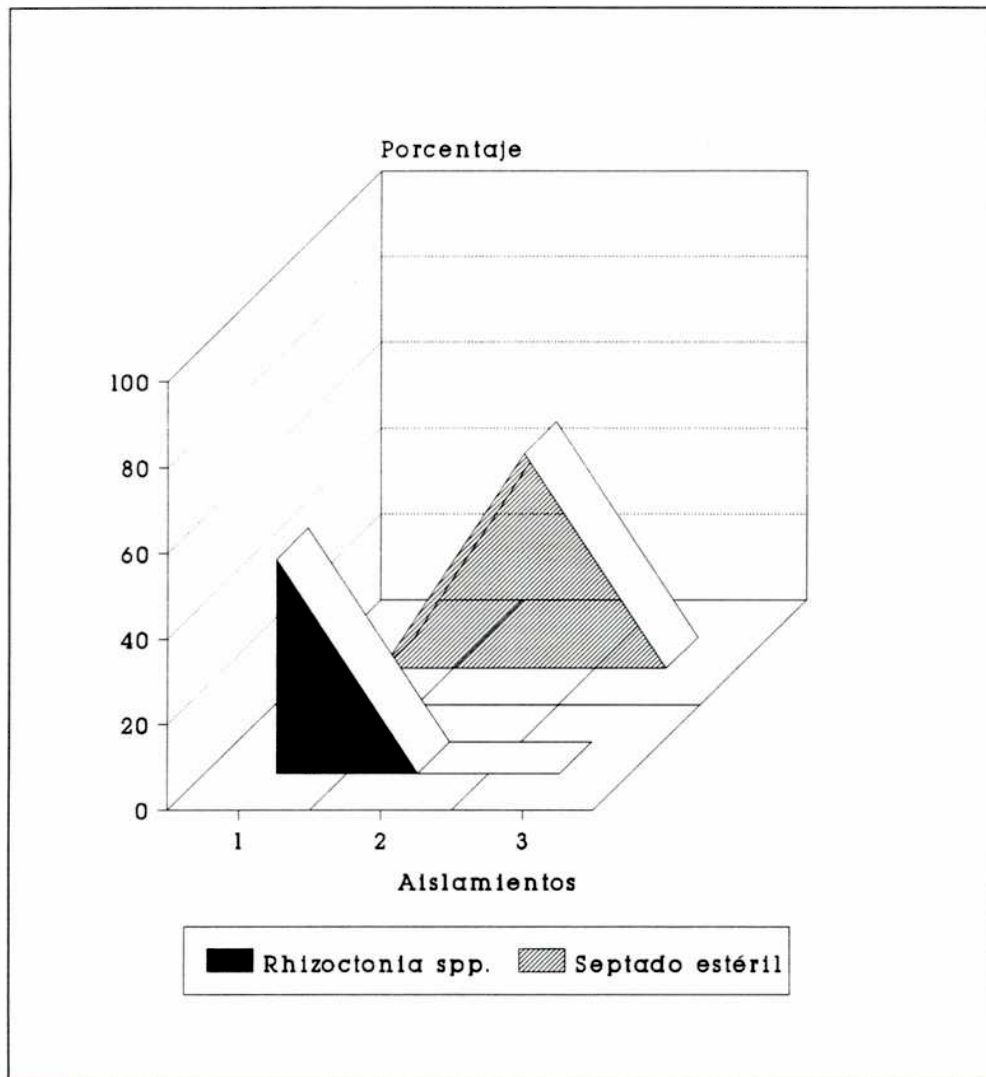


Fig. 11: Relevamiento de *Rhizoctonia* spp. en la Región Noreste (Misiones). Los triángulos representan los porcentajes de los distintos aislamientos del complejo *Rhizoctonia*.

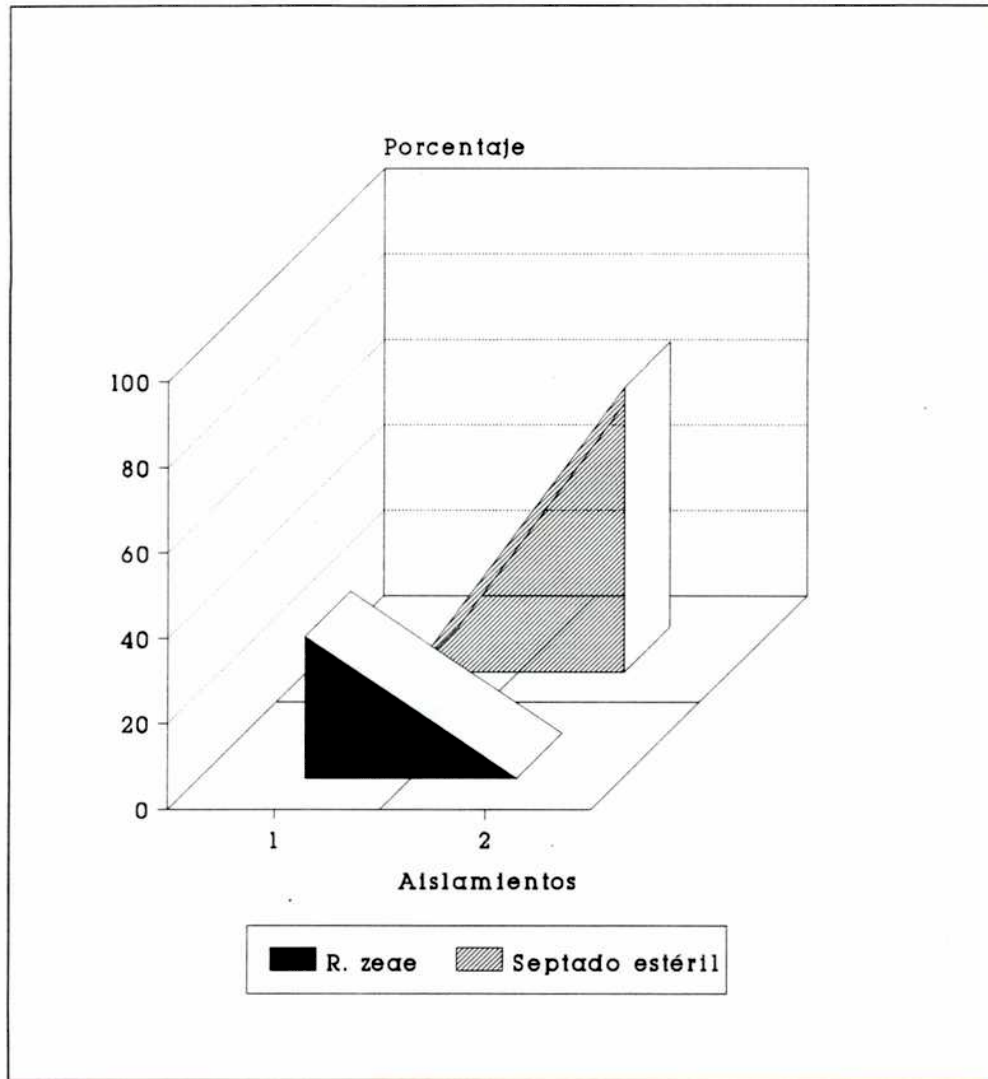


Fig. 12: Relevamiento de *Rhizoctonia* spp. en la Región Noreste (Santiago del Estero). Los triángulos representan los porcentajes de los distintos aislamientos del complejo *Rhizoctonia*.

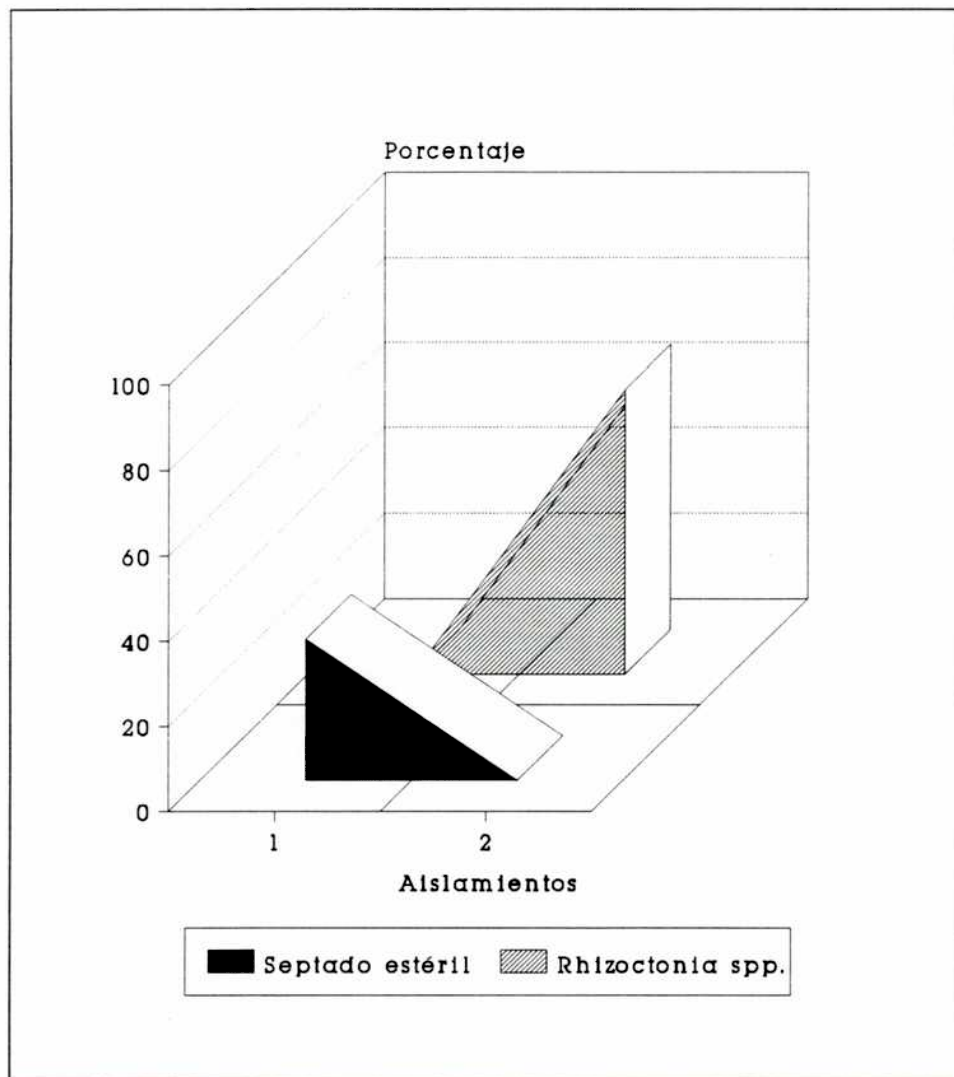


Fig. 13: Relevamiento de *Rhizoctonia* spp. en la Región Cuyana (San Luis). Los triángulos representan los porcentajes de los distintos aislamientos del complejo *Rhizoctonia*.

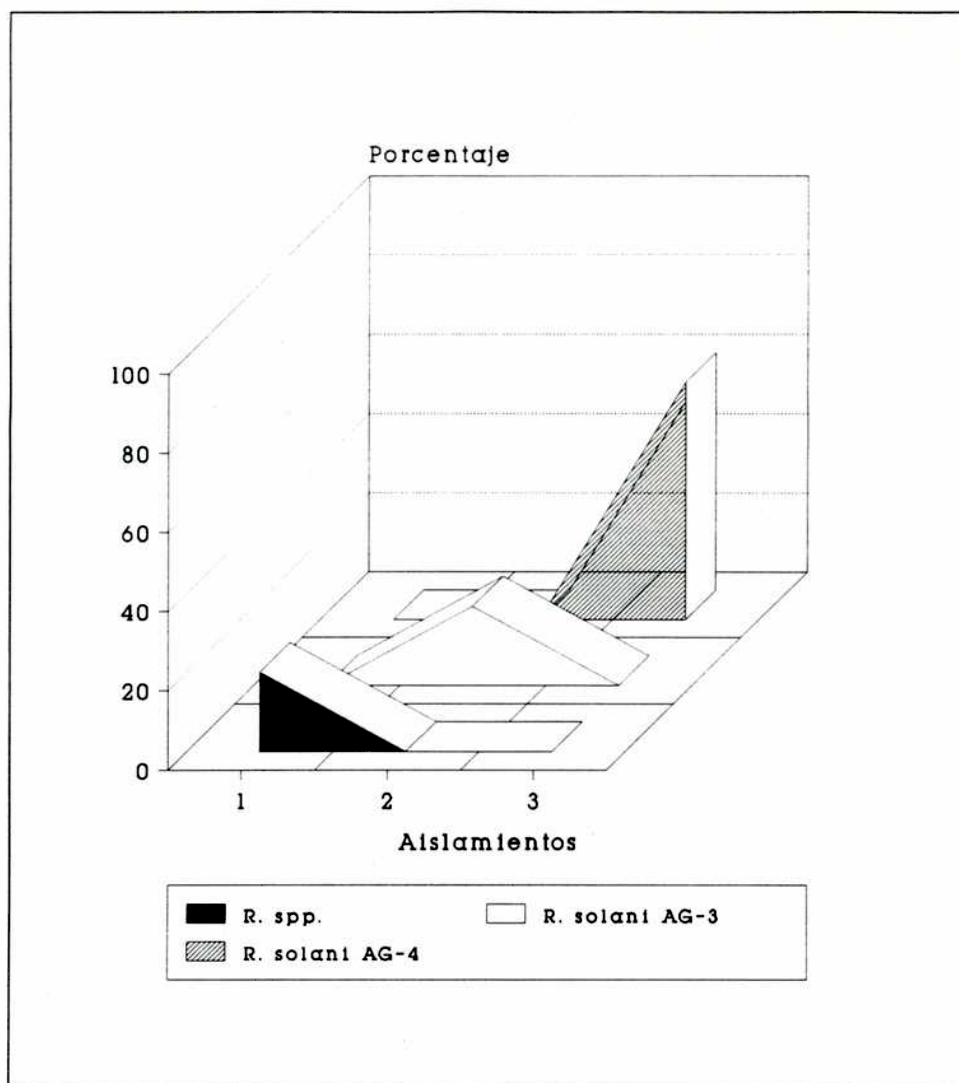


Fig. 14: Relevamiento de *Rhizoctonia* spp. en la Región Cuyana (Mendoza). Los triángulos representan los porcentajes de los distintos aislamientos del complejo *Rhizoctonia*.

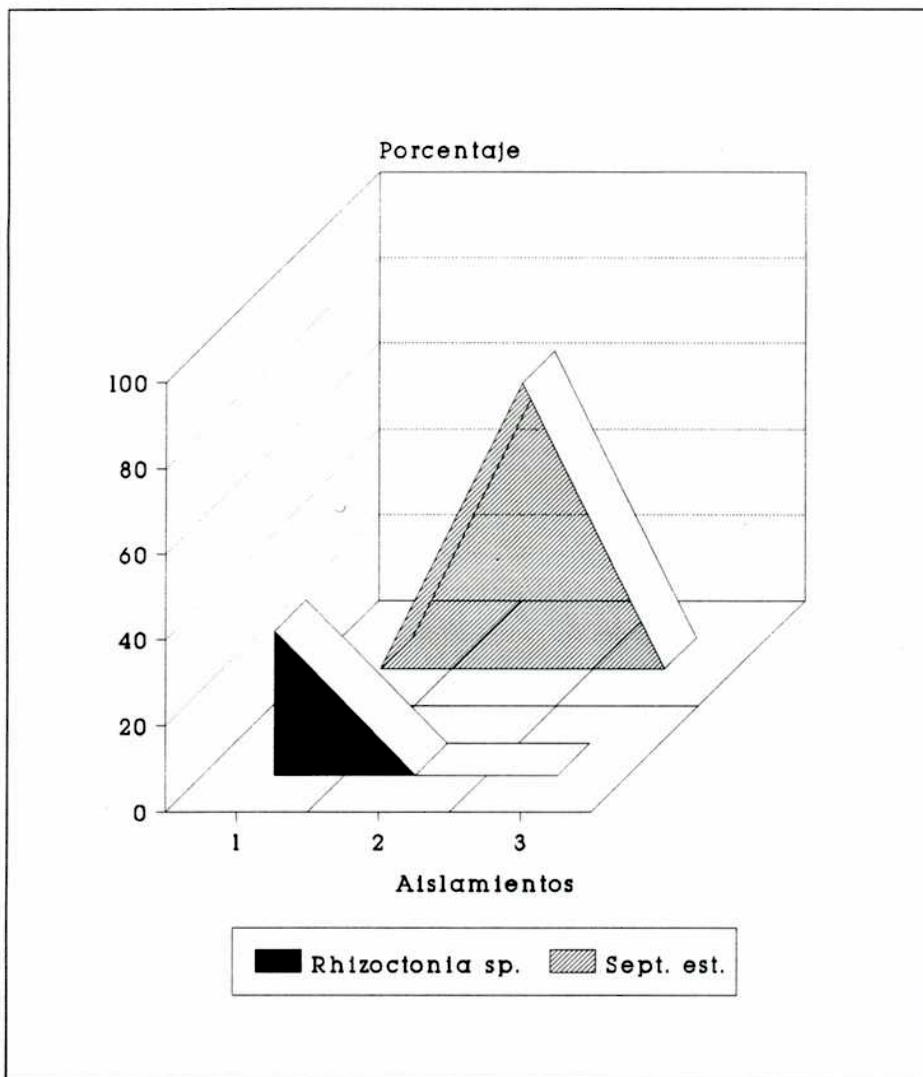


Fig. 15: Relevamiento de *Rhizoctonia* spp. en la Región Cuyana (La Rioja). Los triángulos representan los porcentajes de los distintos aislamientos del complejo *Rhizoctonia*.

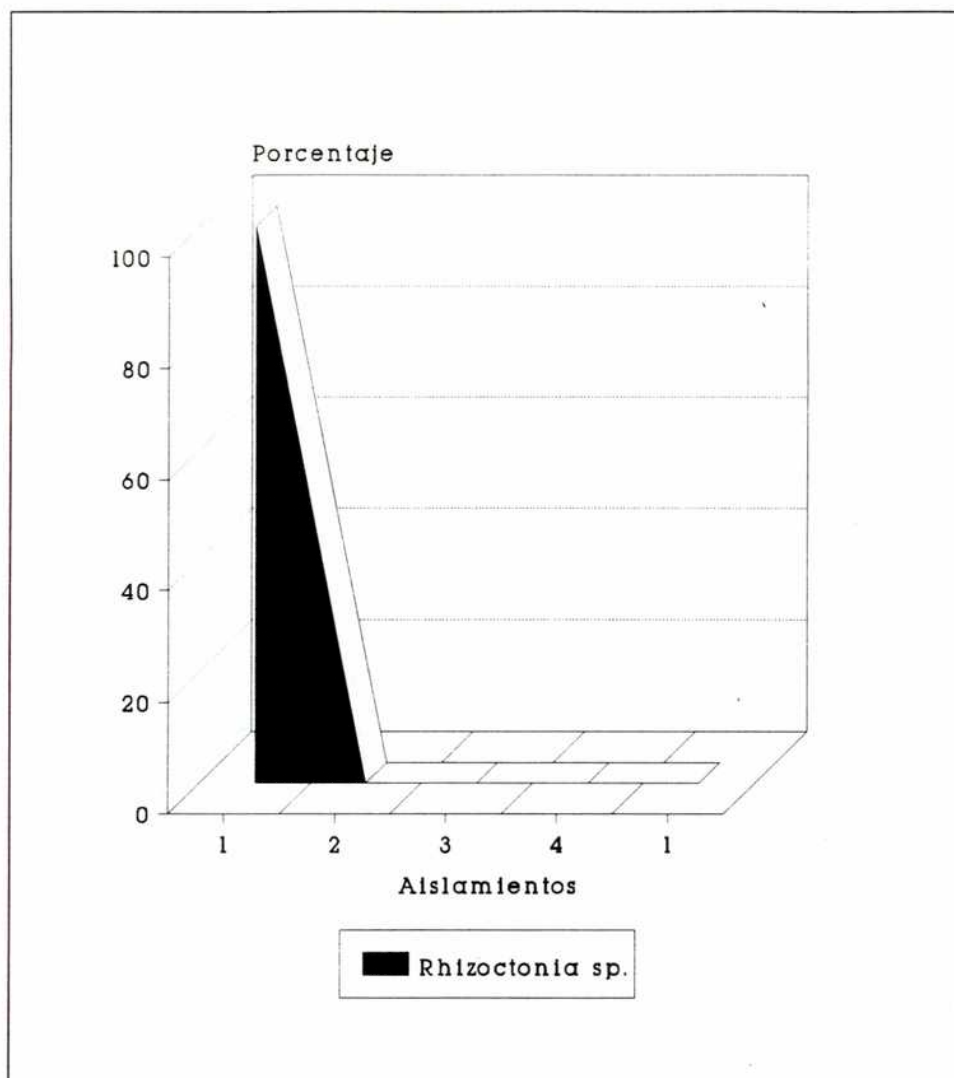


Fig. 16: Relevamiento de *Rhizoctonia* spp. en la Región Patagónica. Los triángulos representan los porcentajes de los distintos aislamientos del complejo *Rhizoctonia*.

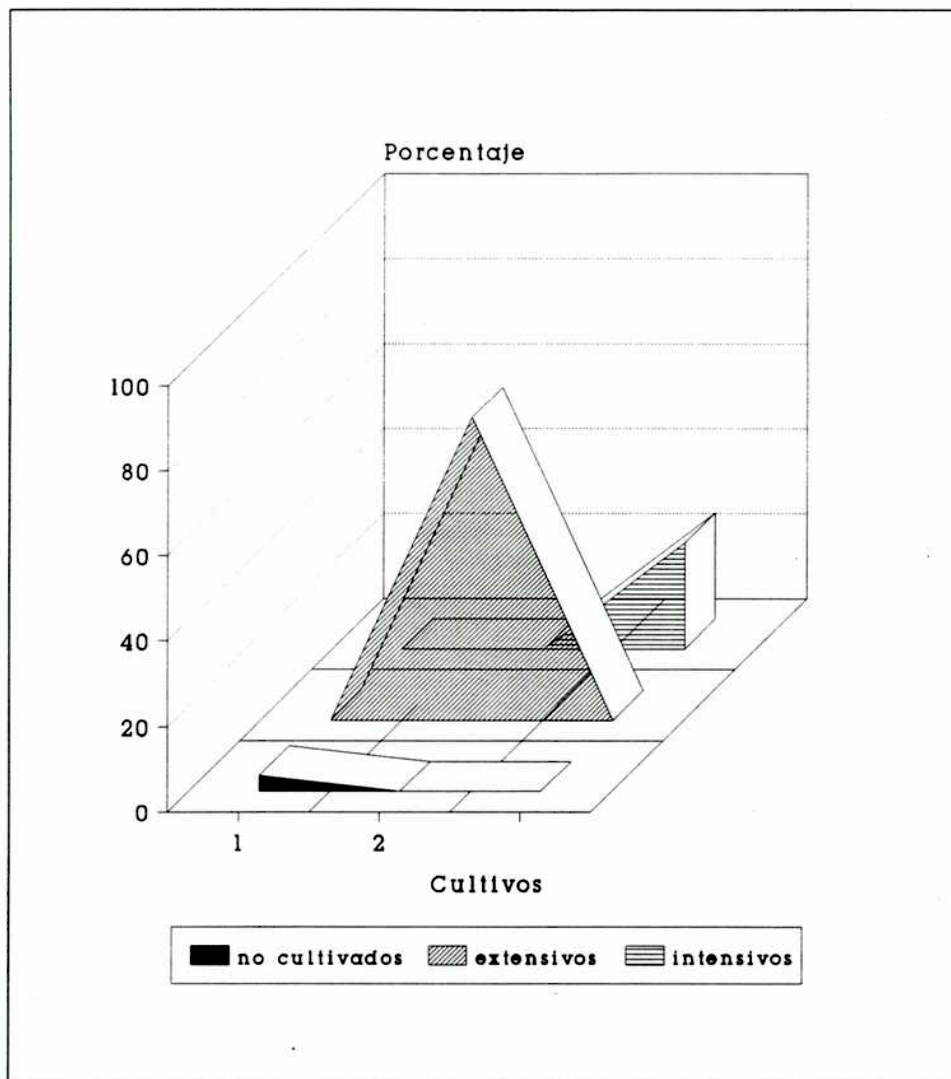


Fig. 17: Relevamiento de *Rhizoctonia* spp. en cultivos extensivos, intensivos y en suelos no cultivados. Los triángulos representan los porcentajes de los distintos aislamientos del complejo *Rhizoctonia*.



Los aislamientos de *R. zae* fueron infrecuentes comparativamente a los de *R. solani*, pero en los ensayos de patogenicidad manifestaron similar virulencia que éstos últimos, al igual que lo observado por Martin y Lucas (1984). Por el contrario Summer y Bell (1982) encontraron que los aislamientos de *R. zae* en maíz fueron menos virulentos y más ampliamente distribuidos.

A través de estos estudios, resulta difícil discernir el papel que juegan las especies fúngicas estériles, no determinadas que comparten el mismo nicho ecológico que las de *Rhizoctonia*, aunque podría considerarse la posibilidad que estos aislamientos utilicen como hospedantes potenciales a las malezas y que colonicen no patogénicamente a otras especies cultivadas.

## **2. Características del género *Rhizoctonia***

### **2.a.. Características morfológicas en cultivo**

Los aislamientos de *Rhizoctonia*, de acuerdo con el concepto adoptado por Parmeter y Whitney (1970); Ogoshi (1987) y Sneh et al. (1991), se dividieron según su citología y morfología en dos grupos:

**Multinucleados:** Dentro de ellos se identificaron aislamientos correspondientes a *R. solani* y *R. oryzae* y *R. zae*.

**Binucleados:** Dentro de ellos se identificaron aislamientos correspondientes a AG-D y a AG-A

Las dificultades encontradas en la identificación de los aislamientos del género *Rhizoctonia* surgieron de la complejidad concerniente a la similar morfología de las especies.

Si bien se realizó una identificación preliminar en función de las características de las hifas superficiales y aéreas desarrolladas sobre muestras de suelo, tejido hospedante o sobre otros sustratos (rastrojo, etc.), el diagnóstico final se efectuó sobre el micelio de cultivos puros de tres días, desarrollados a partir de extremos hifales, homocarióticos, en los que se determinaron:

- a) presencia de una ramificación cercana al septo distal en las hifas vegetativas.
- b) constricción de la ramificación cercana al punto de origen
- c) formación de un septo en la ramificación cercana al punto de origen
- d) presencia de aparato septal en forma de doliporo
- e) presencia o ausencia de fibulas
- f) presencia o ausencia de conidios, formación de células moniloides
- g) esclerocios no diferenciados en corteza y médula
- y h) presencia o ausencia de rizomorfos.

Los aislamientos de *Rhizoctonia* de acuerdo con los conceptos indicados en el ítem 1.b. de la sección Materiales y Métodos, se dividieron en los siguientes grupos:

1) *R. solani* : las hifas presentaron células multinucleadas, con tres a ocho núcleos por célula. Los núcleos y parentesomas se tiñeron de azul oscuro permaneciendo el doliporo hialino. El diámetro hifal se mantuvo en un rango de 7 a 10  $\mu\text{m}$ , aunque uno de los aislamientos (55) asignado al grupo de anastomosis 2, grupo intraespecífico 2 III B presentó hifas con un diámetro hifal de 9 a 12  $\mu\text{m}$ .

Las colonias de *R. solani* fueron ralas y superficiales o densas y algodonosas, con hifas hialinas y marrones de doble pared, crecimiento radial y claramente diferenciadas de las de otro hongo septado, con masas de células moniloides y a veces esclerocios. Las hifas jóvenes (de tres días) de la periferia de la colonia fueron hialinas y las maduras ( de más de 8 días) marrones o amarillentas. El cultivo sobre medio APG pH 5.6 a 24°C, determinó un crecimiento miceliano

de velocidad variable aunque cubrió la superficie de una caja de Petri de 9 mm de diámetro en aproximadamente tres días.

Las células moniloides presentaron tamaño variable, que osciló en un rango de 22-25  $\mu\text{m}$ .

Los esclerocios jóvenes mostraron una estructura compacta de hifas hialinas que se tornaron marrón oscuro y de estructura laxa en la madurez (luego de 8 días). El tamaño de los mismos fue variable y en cultivo osciló en un rango de 260 a 1530  $\mu\text{m}$ .

**2) *R. zae*:** El micelio de estos aislamientos presentó hifas hialinas con células multinucleadas, diámetro hifal en un rango de 4 a 9  $\mu\text{m}$  y esclerocios superficiales o sumergidos en cultivo, aislados, de color naranja-rojizo, de aproximadamente 1 mm de diámetro y duros en la madurez ( a los 8-10 días).

El micelio de estos aislamientos se mantuvo hialino hasta la madurez en que se tornó ligeramente crema.. Cultivado sobre medio APG pH 5.6 a 24°C, creció rápidamente y cubrió la superficie de una caja de Petri de 9 mm de diámetro en tres días.

Todos los aislamientos correspondieron al grupo de anastomosis WAG Z y anastomosaron con las dos cepas (497 Y 504) de este grupo excepto uno de los aislamientos el 155, que anastomosó con la cepa 497 solamente.

**3) Aislamientos binucleados:** Se obtuvieron tres aislamientos que correspondieron a los grupos de anastomosis A y D según los patrones de referencia de ATCC con la nomenclatura determinada por Japón.

El micelio presentó hifas con las características morfológicas descritas para el género. El diámetro hifal fue de 4 a 7  $\mu\text{m}$  y en las células hifales se observaron dos núcleos.

## 2.b. Reacción de Anastomosis

Las características morfológicas de las distintas especies de *Rhizoctonia* constituyeron un indicador limitado para la diferenciación de los aislamientos estrechamente relacionados. La anastomosis hifal permitió asignar la mayoría de los aislamientos a los patrones representativos de los distintos grupos de las especies, de acuerdo a la clasificación adjunta (Sneh et al, 1991)

Cada aislamiento de un determinado grupo de anastomosis puede reconocer y por lo tanto fusionarse solamente con miembros del mismo grupo.

Los aislamientos de campo se aparearon con los patrones de referencia de acuerdo a la metodología indicada en el ítem 2 de Materiales y Métodos.

El mecanismo de fusión se determinó por: 1 ) Atracción hifal, a veces con modificación de la dirección de crecimiento de una hifa hacia otra . 2.) Contacto entre las hifas oponentes. 3.) Cesación del crecimiento. 4.) Disolución de la pared celular en el punto de contacto. 5.) Conexión de protoplasmas y muerte de las células adyacentes al punto de contacto (Figura 18 ).

La conexión citoplasmática se estableció cuando se observó un poro en el área de fusión de las hifas (Fig.18.a.). La reacción de muerte celular (Fig. 19.b.) a menudo se presentó como una zona de hifas vacuoladas y más claras en la zona próxima a la unión.

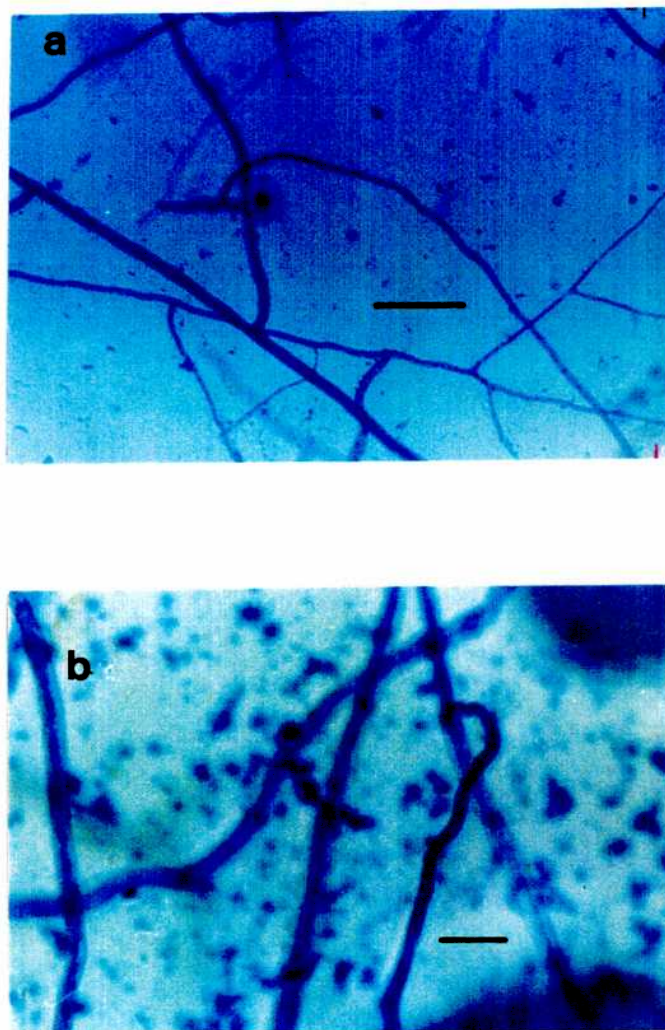


Fig.18. Anastomosis hifal entre aislamientos del mismo grupo. Se observa en a) Atracción hifal. Barra = 100  $\mu$ . b) Contacto entre hifas oponentes. Barra = 50  $\mu$ .

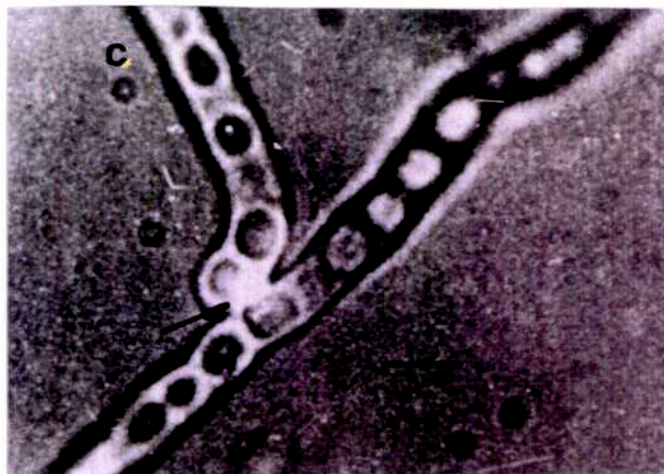


Fig.19. Anastomosis hifal entre aislamientos del mismo grupo. Se observa en c) disolución de la pared . La flecha indica el poro de contacto . Barra = 10  $\mu$ . d) reacción de muerte celular. La flecha indica la plasmólisis celular. Barra = 50  $\mu$ .

Cuando la anastomosis y la similitud morfológica no fueron netas como para asignar algún aislamiento a un grupo determinado se utilizó el método de electroforesis en gel de poliacrilamida de las proteínas fúngicas de un extracto en el que se compararon las proteínas solubles de los aislamientos con los de los patrones de referencia. Este método permite relacionar los aislamientos, taxonómicamente dentro de cada grupo de anastomosis, cuando otras características no son evidentes.

En el caso de los aislamientos AG-4 provenientes de distintas regiones geográficas se pudo observar considerable variación en la disposición de las bandas. Los aislamientos 78, 80 y 81 causantes de necrosis en soja y provenientes de Tucumán presentaron patrones electroforéticos idénticos, en tanto que los aislamientos 128 y 134, procedentes de suelo de cultivo de soja de distintas zonas de la provincia de Santa Fe tuvieron poca homología con los patrones de bandas de los otros aislamientos y con el de referencia de la ATCC. Sin embargo las bandas "m" y "h", características de AG-4, fueron constantes aunque hubo diferencias en la intensidad del tñido de las mismas. El aislamiento 128 que manifestó patogenicidad variable y de menor grado que los otros, mostró una banda intensamente tñida a una distancia de  $61 \text{ mm} \pm 2 \text{ mm}$  de la banda de referencia "m" (Fig. 20).

Para determinar si la variabilidad de las bandas observadas en los geles fue el resultado de una variabilidad intrínseca del sistema de electroforesis, se repitieron varias veces los ensayos de desarrollo, extracción y corrida de las proteínas solubles de los aislamientos elegidos y se encontró que la disposición de las bandas fue constante para cada aislamiento.

En lugar de medir la distancia de migración desde el frente del gel coloreado con azul de Coomasie, se consideró la posición de las bandas en relación a la

"m" la que tuvo un PM de aproximadamente 22.000 Dalton y una movilidad que la ubicó a una distancia de  $16 \text{ mm} \pm 1 \text{ mm}$  del frente de la corrida.

La distancia de las otras bandas con respecto a la de referencia fue: "h":  $41.5 \text{ mm} \pm 1 \text{ mm}$  "i":  $39 \text{ mm} \pm 1 \text{ mm}$  "j":  $29 \text{ mm} \pm 1 \text{ mm}$  "k":  $24 \text{ mm} \pm 1 \text{ mm}$  "l":  $18 \text{ mm} \pm 1 \text{ mm}$ . Estos resultados fueron coincidentes con los obtenidos por Reynolds et al.(1983).



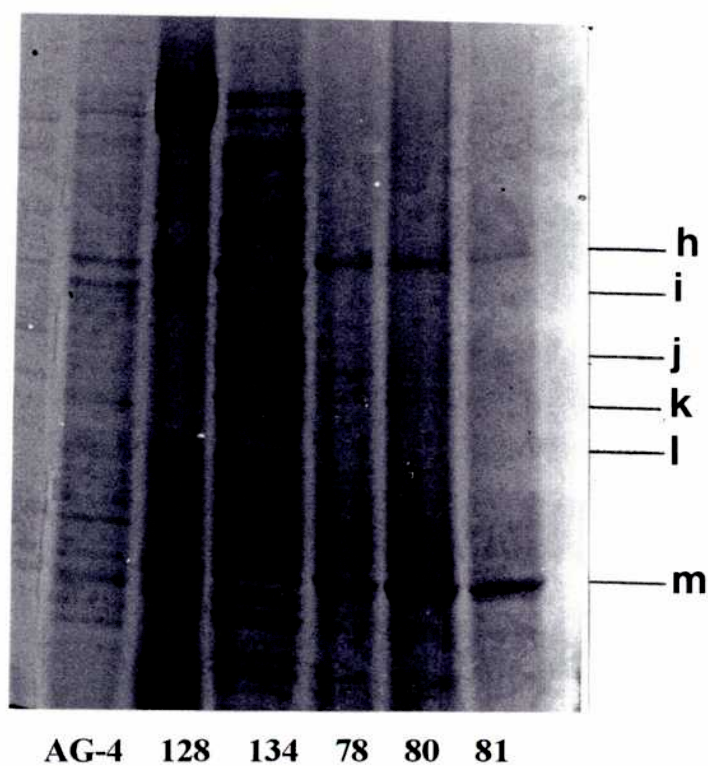


Fig. 20: Electroforesis en gel de poliacrilamida (10%) de las proteínas solubles de aislamientos correspondientes a AG-4. La electroforesis se desarrolló de acuerdo a la metodología indicada en el ítem 2.c. de la sección Materiales y Métodos. En el primer carril se observan las bandas proteicas del "tester" AG-4, en los siguientes las de los aislamientos cuyos números se indican.

### 2.c. Patogenicidad de los aislamientos de *Rhizoctonia*

La patogenicidad de los aislamientos representativos del género sobre un rango de hospedante susceptibles se observa en la tabla 3.

El tipo de ataque de los patógenos dependió en la mayoría de los casos de la energía germinativa del hospedante. La cebolla mostró "damping-off" de pre-emergencia mientras que el nabo sufrió en casi todos los ensayos podredumbre en plántula.

A pesar de la relación de los aislamientos de suelo con su capacidad saprofítica, la mayor parte de ellos resultaron patógenos.

Es de destacar la variable patogenicidad de los aislamientos de *R. solani*. Entre ellos puede mencionarse que el aislamiento 53, aunque corresponde al grupo de anastomosis 4 indujo menor daño en Solanaceas y el aislamiento 45, dentro de la misma familia atacó en menor grado al pimiento. El aislamiento 55 que pertenece al grupo de anastomosis 2, grupo intraespecífico 2IIIB, resultó avirulento sobre todos los hospedantes testados con excepción del repollito de Bruselas en el que indujo daño de grado menor.

Uno de los primeros síntomas de daño causado por los aislamientos patogénicos de *R. solani* fue el amarronamiento de las paredes celulares del hospedante (Fig. 22). La infección por el patógeno desarrolló rápidamente y casi simultáneamente con la penetración hifal se produjo el colapso de las células invadidas en el hospedante.

Los aislamientos de *R. zeae* fueron muy virulentos o avirulentos sobre la mayor parte de los hospedantes ensayados, excepcionalmente en pocos de ellos provocaron grados intermedios de la escala de patogenicidad, mientras que los

aislamientos binucleados del grupo de anastomosis A de *Rhizoctonia* resultaron completamente avirulentos.

La virulencia de los aislamientos del género *Rhizoctonia* relevados en el país permite inferir la potencialidad patogénica de este género como saprófito de suelo.

El grado de ataque y la sintomatología provocado por los aislamientos se indica en la Tabla 3.

**Tabla 3: Grado de ataque y sintomatología provocada por aislamientos del complejo *Rhizoctonia* en distintos hospedantes.**

HOSPEDANTE	Nº	IDENTIDAD	GRADO	SINTOMAS
Acelga	89	<i>R. binucleada</i>	0	
Lechuga	89	<i>R. binucleada</i>	0	
Escarola	89	<i>R. binucleada</i>	0	
Girasol	89	<i>R. binucleada</i>	0	
Lino	89	<i>R. binucleada</i>	0	
Avena	89	<i>R. binucleada</i>	0	
Soja	89	<i>R. binucleada</i>	0	
Nabo	89	<i>R. binucleada</i>	0	
Calabaza	143	<i>R. solani</i>	5	A
Acelga	143	<i>R. solani</i>	5	A
Lechuga	143	<i>R. solani</i>	5	A
Escarola	143	<i>R. solani</i>	5	A
Cebolla	143	<i>R. solani</i>	5	A
Tomate	143	<i>R. solani</i>	5	A
Lino	143	<i>R. solani</i>	5	A
Alfalfa	143	<i>R. solani</i>	5	A
Avena	143	<i>R. solani</i>	5	A
Soja	143	<i>R. solani</i>	2	A
Nabo	143	<i>R. solani</i>	5	A

Calabaza	147	<i>R. solani</i>	2	A
Acelga	147	<i>R. solani</i>	0	
Lechuga	147	<i>R. solani</i>	0	
Escarola	147	<i>R. solani</i>	0	
Cebolla	147	<i>R. solani</i>	0	
Tomate	147	<i>R. solani</i>	0	
Lino	147	<i>R. Solani</i>	0	
Alfalfa	147	<i>R. solani</i>	0	
Avena	147	<i>R. solani</i>	0	
Soja	147	<i>R. Solani</i>	0	
Nabo	147	<i>R. solani</i>	0	
Lechuga	106	<i>R. solani</i>	4	A
Escarola	106	<i>R. solani</i>	5	A
Cebolla	106	<i>R. solani</i>	2	A
Lino	106	<i>R. Solani</i>	0	
Alfalfa	106	<i>R. solani</i>	5	A
Pasto ovilla	106	<i>R. solani</i>	0	
Pasto lloron	106	<i>R. solani</i>	3	A
Soja	106	<i>R. solani</i>	0	
Calabaza	2	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Acelga	2	<i>R. solani AG-4</i>	5	
B				
Lechuga	2	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Escarola	2	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Cebolla	2	<i>R. solani AG-4</i>	5	B

Tomate	2	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Pimiento	2	<i>R. solani AG-4</i>	4	B
Girasol	2	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Lino	2	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Alfalfa	2	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Avena	2	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Pasto ovilla	2	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Pasto lloron	2	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Agropiro	2	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Soja	2	<i>R. solani AG-4</i>	2	B
Calabaza	11	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Acelga	11	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Lechuga	11	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Escarola	11	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Cebolla	11	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Tomate	11	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Pimiento	11	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Girasol	11	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Lino	11	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Alfalfa	11	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Avena	11	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Pasto ovilla	11	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Pasto lloron	11	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Agropiro	11	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Soja	11	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Nabo	11	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
R.de bruselas	11	<i>R. solani AG-4</i>	5	B

Rabanito	11	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Calabaza	45	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Acelga	45	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Lechuga	45	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Escarola	45	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Cebolla	45	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Tomate	45	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Pimiento	45	<i>R. solani AG-4</i>	4	B
Girasol	45	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Lino	45	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Alfalfa	45	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Avena	45	<i>R. solani AG-4</i>	4	B
Pasto lloron	45	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Agropiro	45	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Nabo	45	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
R.de bruselas	45	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Rabanito	45	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Calabaza	53	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Acelga	53	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Lechuga	53	<i>R. solani AG-4</i>	4	B
Escarola	53	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Cebolla	53	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Tomate	53	<i>R. solani AG-4</i>	2	B
Pimiento	53	<i>R. solani AG-4</i>	0	
Girasol	53	<i>R. solani AG-4</i>	2	B
Lino	53	<i>R. solani AG-4</i>	5	B

Alfalfa	53	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Avena	53	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Pasto ovilla	53	<i>R. solani AG-4</i>	2	B
Pasto lloron	53	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Agropiro	53	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Soja	53	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Nabo	53	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
R.de bruselas	53	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Rabanito	53	<i>R. solani AG-4</i>	4	B
Calabaza	55	<i>R. solani AG-4</i>	0	
Acelga	55	<i>R. solani AG-4</i>	0	
Lechuga	55	<i>R. solani AG-4</i>	0	
Escarola	55	<i>R. solani AG-4</i>	1	B
Cebolla	55	<i>R. solani AG-4</i>	0	
Tomate	55	<i>R. solani AG-4</i>	0	
Pimiento	55	<i>R. solani AG-4</i>	0	
Girasol	55	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Lino	55	<i>R. solani AG-4</i>	1	B
Alfalfa	55	<i>R. solani AG-4</i>	0	
Avena	55	<i>R. solani AG-4</i>	0	
Pasto ovilla	55	<i>R. solani AG-4</i>	0	
Pasto lloron	55	<i>R. solani AG-4</i>	0	
Agropiro	55	<i>R. solani AG-4</i>	0	
Soja	55	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Nabo	55	<i>R. solani AG-4</i>	0	
R.de bruselas	55	<i>R. solani AG-4</i>	2	B
Rabanito	55	<i>R. solani AG-4</i>	0	



Calabaza	56	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Acelga	56	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Lechuga	56	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Escarola	56	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Cebolla	56	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Tomate	56	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Pimiento	56	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Girasol	56	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Lino	56	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Alfalfa	56	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Avena	56	<i>R. solani AG-4</i>	3	B
Pasto ovilla	56	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Pasto lloron	56	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Agropiro	56	<i>R. solani AG-4</i>	4	B
Soja	56	<i>R. solani AG-4</i>	4	B
Nabo	56	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
R.de bruselas	56	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Rabanito	56	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Calabaza	57	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Acelga	57	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Lechuga	57	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Escarola	57	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Cebolla	57	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Tomate	57	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Girasol	57	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Lino	57	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Alfalfa	57	<i>R. solani AG-4</i>	5	B

Avena	57	<i>R. solani</i> AG-4	5	B
Pasto ovillo	57	<i>R. solani</i> AG-4	5	B
Pasto lloron	57	<i>R. solani</i> AG-4	5	B
Soja	57	<i>R. solani</i> AG-4	5	B
Nabo	57	<i>R. solani</i> AG-4	5	B
Calabaza	144	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Acelga	144	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Lechuga	144	<i>R. solani</i> AG-4	5	B
Escarola	144	<i>R. solani</i> AG-4	5	B
Cebolla	144	<i>R. solani</i> AG-4	5	C
Tomate	144	<i>R. solani</i> AG-4	5	B
Girasol	144	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Lino	144	<i>R. solani</i> AG-4	5	B
Alfalfa	144	<i>R. solani</i> AG-4	5	C
Avena	144	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Pasto lloron	144	<i>R. solani</i> AG-4	5	B
Soja	144	<i>R. solani</i> AG-4	5	B
Nabo	144	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Calabaza	145	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Acelga	145	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Lechuga	145	<i>R. solani</i> AG-4	5	C
Escarola	145	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Cebolla	145	<i>R. solani</i> AG-4	5	C
Tomate	145	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Girasol	145	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Lino	145	<i>R. solani</i> AG-4	5	C
Alfalfa	145	<i>R. solani</i> AG-4	5	B

Avena	145	<i>R. solani</i> AG-4	4	D
Pasto lloron	145	<i>R. solani</i> AG-4	5	B
Calabaza	146	<i>R. solani</i> AG-4	4	A
Acelga	146	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Lechuga	146	<i>R. solani</i> AG-4	5	B
Escarola	146	<i>R. solani</i> AG-4	5	B
Cebolla	146	<i>R. solani</i> AG-4	4	A
Tomate	146	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Girasol	146	<i>R. Solani</i> AG-4	5	A
Lino	146	<i>R. solani</i> AG-4	5	B
Alfalfa	146	<i>R. solani</i> AG-4	4	B
Avena	146	<i>R. solani</i> AG-4	3	A
Pasto lloron	146	<i>R. solani</i> AG-4	4	A
Soja	146	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Nabo	146	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Calabaza	149	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Acelga	149	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Lechuga	149	<i>R. solani</i> AG-4	5	C
Escarola	149	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Cebolla	149	<i>R. solani</i> AG-4	5	C
Tomate	149	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Girasol	149	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Lino	149	<i>R. solani</i> AG-4	5	C
Alfalfa	149	<i>R. solani</i> AG-4	5	B
Avena	149	<i>R. solani</i> AG-4	5	D
Pasto lloron	149	<i>R. solani</i> AG-4	5	C
Soja	149	<i>R. solani</i> AG-4	5	A

Nabo	149	<i>R. solani AG-4</i>	5	A
Calabaza	4	<i>R. solani AG-4</i>	5	A
Acelga	4	<i>R. solani AG-4</i>	5	A
Lechuga	4	<i>R. solani AG-4</i>	5	A
Escarola	4	<i>R. solani AG-4</i>	5	A
Cebolla	4	<i>R. solani AG-4</i>	5	A
Tomate	4	<i>R. solani AG-4</i>	5	A
Girasol	4	<i>R. solani AG-4</i>	5	A
Calabaza	78	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Acelga	78	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Lechuga	78	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Escarola	78	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Cebolla	78	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Tomate	78	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Girasol	78	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Lino	78	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Alfalfa	78	<i>R. solani AG-4</i>	5	A
Avena	78	<i>R. solani AG-4</i>	4	E
Pasto lloron	78	<i>R. solani AG-4</i>	5	C
Nabo	78	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Calabaza	80	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Acelga	80	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Lechuga	80	<i>R. solani AG-4</i>	5	A
Escarola	80	<i>R. solani AG-4</i>	5	A
Cebolla	80	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Tomate	80	<i>R. solani AG-4</i>	5	
Girasol	80	<i>R. solani AG-4</i>	5	B

Lino	80	<i>R. solani AG-4</i>	5	A
Alfalfa	80	<i>R. solani AG-4</i>	5	A
Avena	80	<i>R. solani AG-4</i>	3	E
Pasto lloron	80	<i>R. solani AG-4</i>	5	
Nabo	80	<i>R. solani AG-4</i>	5	A
Calabaza	81	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Acelga	81	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Lechuga	81	<i>R. solani AG-4</i>	5	A
Escarola	81	<i>R. solani AG-4</i>	5	A
Cebolla	81	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Tomate	81	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Girasol	81	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Lino	81	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Alfalfa	81	<i>R. solani AG-4</i>	5	A
Avena	81	<i>R. solani AG-4</i>	3	E
Pasto lloron	81	<i>R. solani AG-4</i>	5	E
Soja	81	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Nabo	81	<i>R. solani AG-4</i>	5	A
Calabaza	128	<i>R. solani AG-4</i>	5	A
Acelga	128	<i>R. solani AG-4</i>	5	B
Lechuga	128	<i>R. solani AG-4</i>	1	
Escarola	128	<i>R. solani AG-4</i>	5	A
Cebolla	128	<i>R. solani AG-4</i>	5	
Tomate	128	<i>R. solani AG-4</i>	2	A
Girasol	128	<i>R. solani AG-4</i>	2	
Lino	128	<i>R. solani AG-4</i>	5	A
Alfalfa	128	<i>R. solani AG-4</i>	2	E

Avena	128	<i>R. solani</i> AG-4	0	
Pasto lloron	128	<i>R. solani</i> AG-4	1	
Soja	128	<i>R. solani</i> AG-4	3	A
Nabo	128	<i>R. solani</i> AG-4	1	
Calabaza	134	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Acelga	134	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Lechuga	134	<i>R. solani</i> AG-4	4	A
Escarola	134	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Cebolla	134	<i>R. solani</i> AG-4	5	B
Tomate	134	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Girasol	134	<i>R. solani</i> AG-4	5	E
Lino	134	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Alfalfa	134	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Avena	134	<i>R. solani</i> AG-4	0	
Pasto lloron	134	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Soja	134	<i>R. solani</i> AG-4	5	C
Nabo	134	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Lechuga	79	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Escarola	79	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Cebolla	79	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Lino	79	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Alfalfa	79	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Pasto ovilla	79	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Pasto lloron	79	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Acelga	158	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Escarola	158	<i>R. solani</i> AG-4	5	A
Tomate	158	<i>R. solani</i> AG-4	5	A

Lino	158	<i>R. solani AG-4</i>	5	A
Avena	158	<i>R. solani AG-4</i>	5	A
Nabo	158	<i>R. solani AG-4</i>	5	A
Calabaza	130	<i>R. zaeae</i>	5	A
Acelga	130	<i>R. zaeae</i>	5	A
Lechuga	130	<i>R. zaeae</i>	5	A
Escarola	130	<i>R. zaeae</i>	5	A
Cebolla	130	<i>R. zaeae</i>	5	B
Tomate	130	<i>R. zaeae</i>	5	B
Girasol	130	<i>R. zaeae</i>	5	E
Lino	130	<i>R. zaeae</i>	5	A
Alfalfa	130	<i>R. zaeae</i>	0	
Avena	130	<i>R. zaeae</i>	4	E
Pasto lloron`	130	<i>R. zaeae</i>	5	A
Soja	130	<i>R. zaeae</i>	5	C
Nabo	130	<i>R. zaeae</i>	0	
Calabaza	155	<i>R. zaeae</i>	5	A
Acelga	155	<i>R. zaeae</i>	5	A
Lechuga	155	<i>R. zaeae</i>	5	A
Escarola	155	<i>R. zaeae</i>	3	A
Cebolla	155	<i>R. zaeae</i>	5	A
Tomate	155	<i>R. zaeae</i>	5	A
Lino	155	<i>R. zaeae</i>	5	A
Alfalfa	155	<i>R. zaeae</i>	3	A
Avena	155	<i>R. zaeae</i>	5	A
Soja	155	<i>R. zaeae</i>	5	
Nabo	155	<i>R. zaeae</i>	5	A

Calabaza	160	<i>R. zaeae</i>	2	A
Acelga	160	<i>R. zaeae</i>	5	A
Lechuga	160	<i>R. zaeae</i>	5	A
Escarola	160	<i>R. zaeae</i>	0	
Cebolla	160	<i>R. zaeae</i>	3	A
Tomate	160	<i>R. zaeae</i>	5	A
Girasol	160	<i>R. zaeae</i>	5	A
Lino	160	<i>R. zaeae</i>	5	A
Alfalfa	160	<i>R. zaeae</i>	0	
Avena	160	<i>R. zaeae</i>	0	
Soja	160	<i>R. zaeae</i>	0	
Nabo	160	<i>R. zaeae</i>	0	
Calabaza	169	<i>R. zaeae</i>	0	
Acelga	169	<i>R. zaeae</i>	5	A
Lechuga	169	<i>R. zaeae</i>	0	
Escarola	169	<i>R. zaeae</i>	5	A
Cebolla	169	<i>R. zaeae</i>	0	
Tomate	169	<i>R. zaeae</i>	4	A
Lino	169	<i>R. zaeae</i>	5	A
Alfalfa	169	<i>R. zaeae</i>	0	
Avena	169	<i>R. zaeae</i>	5	A
Soja	169	<i>R. zaeae</i>	0	
Nabo	169	<i>R. zaeae</i>	5	A
Calabaza	159	<i>Rhizoctonia sp</i>	0	
Acelga	159	<i>Rhizoctonia sp</i>	0	
Lechuga	159	<i>Rhizoctonia sp</i>	0	
Escarola	159	<i>Rhizoctonia sp</i>	0	



Cebolla	159	<i>Rhizoctonia sp</i>	0
Tomate	159	<i>Rhizoctonia sp</i>	0
Lino	159	<i>Rhizoctonia sp</i>	0
Alfalfa	159	<i>Rhizoctonia sp</i>	0
Avena	159	<i>Rhizoctonia sp</i>	0
Soja	159	<i>Rhizoctonia sp</i>	0
Nabo	159	<i>Rhizoctonia sp</i>	0
Acelga	171	<i>Rhizoctonia sp</i>	0
Lechuga	171	<i>Rhizoctonia sp</i>	0
Escarola	171	<i>Rhizoctonia sp</i>	0
Tomate	171	<i>Rhizoctonia sp</i>	0
Girasol	171	<i>Rhizoctonia sp</i>	0
Lino	171	<i>Rhizoctonia sp</i>	0
Alfalfa	171	<i>Rhizoctonia sp</i>	0
Avena	171	<i>Rhizoctonia sp</i>	0
Nabo	171	<i>Rhizoctonia sp</i>	0
Acelga	90	<i>Septado esteril</i>	0
Lechuga	90	<i>Septado esteril</i>	0
Escarola	90	<i>Septado esteril</i>	0
Cebolla	90	<i>Septado esteril</i>	0
Tomate	90	<i>Septado esteril</i>	0
Girasol	90	<i>Septado esteril</i>	0
Lino	90	<i>Septado esteril</i>	0
Alfalfa	90	<i>Septado esteril</i>	0
Avena	90	<i>Septado esteril</i>	0
Soja	90	<i>Septado esteril</i>	0
Nabo	90	<i>Septado esteril</i>	0

Calabaza	129	<i>Septado esteril</i>	0	
Acelga	129	<i>Septado esteril</i>	1	B
Lechuga	129	<i>Septado esteril</i>	0	
Escarola	129	<i>Septado esteril</i>	0	
Cebolla	129	<i>Septado esteril</i>	0	
Tomate	129	<i>Septado esteril</i>	1	B
Girasol	129	<i>Septado esteril</i>	1	
Lino	129	<i>Septado esteril</i>	0	
Alfalfa	129	<i>Septado esteril</i>	0	
Pasto lloron	129	<i>Septado esteril</i>	0	
Soja	129	<i>Septado esteril</i>	1	
Nabo	129	<i>Septado esteril</i>	0	
Calabaza	131	<i>Septado esteril</i>	0	
Acelga	131	<i>Septado esteril</i>	1	B
Lechuga	131	<i>Septado esteril</i>	0	
Escarola	131	<i>Septado esteril</i>	0	
Cebolla	131	<i>Septado esteril</i>	0	
Girasol	131	<i>Septado esteril</i>	0	
Lino	131	<i>Septado esteril</i>	0	
Alfalfa	131	<i>Septado esteril</i>	0	
Avena	131	<i>Septado esteril</i>	0	
Pasto lloron	131	<i>Septado esteril</i>	0	
Nabo	131	<i>Septado esteril</i>	0	
Calabaza	132	<i>Septado esteril</i>	0	
Acelga	132	<i>Septado esteril</i>	1	
Lechuga	132	<i>Septado esteril</i>	0	
Escarola	132	<i>Septado esteril</i>	0	

Cebolla	132	<i>Septado esteril</i>	0	
Tomate	132	<i>Septado esteril</i>	0	
Girasol	132	<i>Septado esteril</i>	1	
Lino	132	<i>Septado esteril</i>	0	
Alfalfa	132	<i>Septado esteril</i>	0	
Avena	132	<i>Septado esteril</i>	0	
Pasto lloron	132	<i>Septado esteril</i>	0	
Soja	132	<i>Septado esteril</i>	1	
Nabo	132	<i>Septado esteril</i>	0	
Acelga	126	<i>Septado esteril</i>	0	
Lechuga	126	<i>Septado esteril</i>	0	
Escarola	126	<i>Septado esteril</i>	0	
Cebolla	126	<i>Septado esteril</i>	0	
Tomate	126	<i>Septado esteril</i>	0	
Girasol	126	<i>Septado esteril</i>	0	
Lino	126	<i>Septado esteril</i>	0	
Alfalfa	126	<i>Septado esteril</i>	0	
Avena	126	<i>Septado esteril</i>	0	
Soja	126	<i>Septado esteril</i>	0	
Nabo	126	<i>Septado esteril</i>	0	
Calabaza	148	<i>Septado esteril</i>	0	
Acelga	148	<i>Septado esteril</i>	2	A
Lechuga	148	<i>Septado esteril</i>	3	A
Escarola	148	<i>Septado esteril</i>	3	C
Cebolla	148	<i>Septado esteril</i>	4	A
Tomate	148	<i>Septado esteril</i>	2	A
Lino	148	<i>Septado esteril</i>	1	A

Alfalfa	148	<i>Septado esteril</i>	1	A
Avena	148	<i>Septado esteril</i>	0	
Pasto lloron	148	<i>Septado esteril</i>	3	A
Soja	148	<i>Septado esteril</i>	5	A

**Grado de ataque:**

<b>0 planta sana</b>	<b>1 de 6 a 20% de necrosis</b>
<b>2 de 21 a 40% de necrosis</b>	<b>3 de 41 a 60% de necrosis</b>
<b>4 de 61 a 80% de necrosis</b>	<b>5 de 81 a 100% de necrosis</b>

**Sintomas:**

**A: damping off de post emergencia**

**B: podredumbre de radícula**

**C: damping off de pre emergencia**

**D: podredumbre de hojas trifoliadas (leguminosas)**

**E: ataque de hipocotile y partes aéreas**

### **3. Mecanismo de penetración de *R. solani* en plántulas de algodón.**

Determinados factores fueron indicadores de la interacción hospedante-patógeno, sobre todo durante las primeras etapas iniciales de la infección.

El período entre la inoculación y la aparición de síntomas fue de 5 días y la acción del patógeno sobre el hospedante se presentó con la siguiente secuencia: 1) Contacto de las hifas de *R. solani* con el hospedante 2) Ramificación del micelio sobre la superficie de la raíz y tendencia de las hifas a seguir las líneas de unión de las paredes anticlinales de las células hospedantes subyacentes 3) Formación de los puntos de infección y 4) Aparición de las lesiones o regiones amarronadas. Esta secuencia de infección se ajustó a la descrita por Weinhold y Motta (1973).

En la Figura 21 se observa la colonización radicular ejercida por el aislamiento 81 de *R. solani* AG-4. En los procesos iniciales de la formación de la lesión la penetración del patógeno en el tejido hospedante fue superficial y no se detectó una estructura de infección en forma de domo o almohadilla sobre la epidermis de las raíces de algodón. El movimiento hifal fue intercelular y se detuvo luego que las capas externas de las células corticales fueron colonizadas

Las hifas secundarias se orientaron sobre la superficie radicular, ya sea por elongarse a lo largo de la unión de las paredes celulares epidérmicas o por crecer en dirección oblicua o transversal sobre estas células. Las ramificaciones formadas de las primeras hifas se hicieron finalmente indistinguibles debido a que la distancia entre ellas disminuyó al incrementarse su número y formar apresorios complejos. Cada estructura de este tipo se produjo como

consecuencia de la interrupción de la elongación de una ramificación lateral y proliferación de hifas cercanas. El estrecho contacto con las células epidermales de la cutícula hospedante permitió inferir que la penetración se produjo a través de la superficie vegetal intacta por medio de finos "pegs". No se observó invasión de la endodermis y del tejido vascular.

Según Christou (1962) este fue también el tipo de crecimiento de *R. solani* en raíces de poroto. Sin embargo, de acuerdo con Dodman y Flentje (1970), el esquema de crecimiento podría estar influenciado por la naturaleza de la superficie del órgano vegetal. Flentje et al. (1963) sugieren que la adherencia de los extremos hifales es necesaria para determinar el crecimiento direccional y estos fenómenos observados, normalmente juntos, pueden presentarse, en ausencia de los exudados vegetales, en trozos epidermales y en la cutícula aislada. Por otra parte, Flentje (1957) encontró que la fijación - crecimiento direccional se produjo en combinaciones compatibles y que diferentes aislamientos de *R. solani* distinguieron entre la superficie radicular y la del tallo. Wynn y Stapples (1981) concluyen que la relación fijación hifal-crecimiento direccional responde a un tropismo de contacto inducido por la interacción entre la superficie hospedante y el aislamiento fúngico. Los autores sugieren que el "reconocimiento" de la superficie hospedante podría ser importante en la determinación de la especificidad.

La invasión a través de la cutícula intacta y de la epidermis por *R. solani* ha sido informada ya por muchos investigadores, pero en muy pocos casos se ha realizado un estudio detallado sobre el mecanismo de entrada empleado por el patógeno (Dodman y Flentje, 1970). Según estos autores en algunos hospedantes podría realizarse a través de aberturas naturales en la planta. En tubérculos de papa el ingreso se produce vía lenticelar, sin formación de estructuras de infección (Ramsey, 1917). Kerr y Flentje (1957) consideran que

la fijación a la superficie del órgano vegetal es la primera etapa en el proceso de infección de un hongo patógeno y la penetración y consecuente infección sólo se producen a través de una estructura específica ("infection cushion"). Wynn y Stapples (1981) suponen que la relación fijación hifal-crecimiento direccional es un tropismo independiente de la formación de los apresorios, que resultan a su vez de la fijación y que dependerían de diferentes estímulos. Para estos autores la estrecha adherencia con la superficie de contacto es el pre-requisito para la apropiada respuesta al estímulo de contacto que controla el desarrollo de la preinfección.

La sección transversal de las raíces de plántulas de algodón analizadas en este trabajo, indicó la alteración celular en la región correspondiente al cilindro central y un marcado obscurecimiento de la zona, indicador de la necrosis celular. (Fig. 22).

Estos resultados coinciden con las observaciones realizadas por Wheeler (1975), quien considera que si la penetración del patógeno se produce antes de la destrucción del protoplasto, no es sorprendente que una de las primeras respuestas del hospedante sean el cambio de coloración en la superficie interna de las paredes celulares.

Según Talboys (1978) los hongos patógenos que causan podredumbre de raíz se caracterizan por la secreción de enzimas líticas (poligalacturonasas, pectinesterasas, celulasas, etc.) que causan la pérdida de coherencia de los tejidos, ruptura de la pared celular y eventualmente la muerte del protoplasto. La desintegración de los tejidos radiculares normalmente incrementa la absorción de agua y según el mismo autor, posiblemente se produce la ruptura de los compartimientos de membrana y consecuentemente la mezcla de enzimas y sustratos que causarían el amarronamiento celular ("browning reaction") por oxidación de compuestos fenólicos. Según Gagnon (1967) el

papel que juegan los compuestos fenólicos en la patogénesis es muy importante ya que probablemente contribuyen a la desnaturalización de las proteínas y a la coagulación del protoplasma de las células parenquimáticas. De acuerdo con Chi y Childers (1964) el amarronamiento tisular es característico de la colonización epidermal. Bateman (1969) considera que la desintegración celular se produce antes de la penetración. Bateman (1970) y Sherwood (1970) sugieren que las toxinas producidas por *R. solani* podrían ingresar a través de la superficie hospedante intacta y en este caso no sería indispensable la formación de estructuras de infección para la penetración del patógeno y causar la necrosis celular.

Por el contrario Yoder y Tourgeon (1985) consideran que son necesarios cambios morfológicos particulares para la penetración fúngica en la planta y suponen que en algunos casos está involucrada la acción de enzimas extracelulares. De acuerdo a estos autores la secuencia de acción del patógeno es, primero a través de la formación de estructuras de infección, luego a la acción de enzimas y finalmente a la actividad de toxinas.





Fig. 21: Colonización radicular por *Rhizoctonia solani* AG-4. En un fragmento de raíz de algodón se observa el micelio adherido. Tinción: azul de algodón (0,05%). Barra = 0,2 mm.

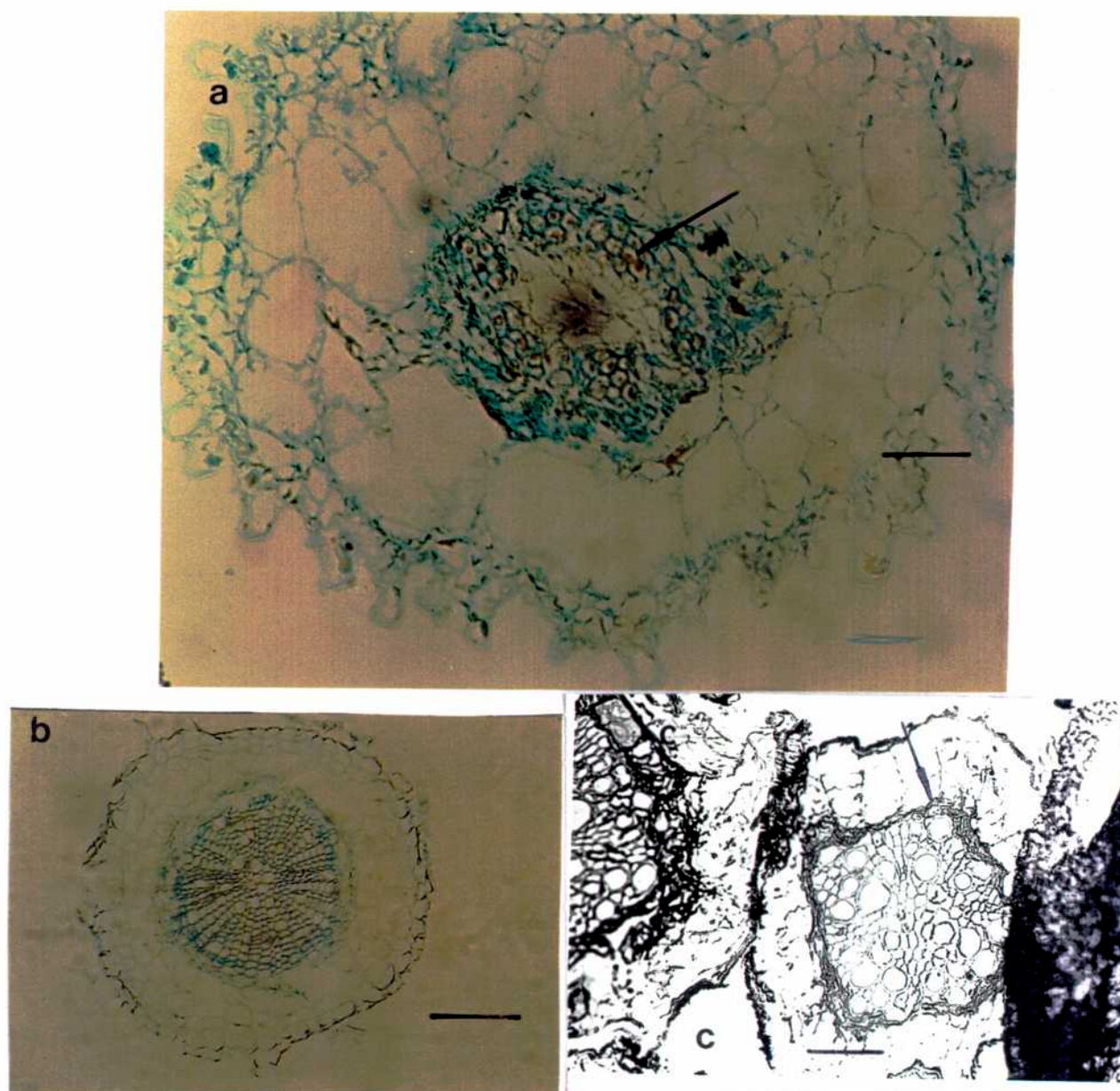


Fig. 22 : Secciones transversales de raíces de algodón en plantas testigo y en plantas colonizadas por *Rhizoctonia solani* o *Cladorhinum foecundissimum*. a) Necrosis celular en raíces atacadas por *R. solani*. La flecha indica el "amarronamiento" celular en los elementos xilemáticos. Barra = 20  $\mu$ . b) Raíces de algodón normales (Testigo). Barra = 50  $\mu$ . c) Raíces de algodón colonizadas con *C. foecundissimum*. No se observa alteración celular. La flecha indica las hifas. Tinción diferencial : Rojo Magdala-Verde Brillante. Barra = 50  $\mu$ .

## 4. Enzimas relacionadas con la degradación de la pared celular

### Celulasas de *R. solani*

El género *Rhizoctonia* se caracteriza por agrupar especies "habitantes de suelo", predominantemente saprofitas y ocasionalmente patógenas. La supervivencia y actividad de estos colonizadores del suelo depende de su capacidad de producir celulasas (Griffin, 1973). Al igual que en otros organismos fúngicos, componentes del complejo causante de "damping-off", podría existir, además relación de la actividad celulolítica con la patogénesis. Por lo tanto se investigó la actividad celulolítica en un aislamiento patógeno de *R. solani* AG-4.

#### 4.a. Actividad $\beta$ -glucosidasa

La actividad de  $\beta$ -glucosidasa, producida durante el crecimiento vegetativo de *R. solani* se determinó en el sobrenadante del medio de cultivo especificado en la sección Materiales y Métodos, en presencia del inductor standard pectina/xilano.

El peso seco máximo del micelio, en el medio de cultivo indicado, se alcanzó al 4° día (398 mg/ ml de medio de cultivo ), momento a partir del cual el cultivo entró en la etapa de autólisis, que se observó como una disminución del mismo.

En la Figura 23, se observa que la actividad enzimática alcanzó su máximo valor en el día 8 y se mantuvo en esos niveles hasta el día 14, momento a partir

del cual disminuyó, hasta la finalización del período estudiado que fué de 32 días..

A continuación se evaluó la efectividad de distintos inductores, comúnmente utilizados para este tipo de estudios, sobre la producción de  $\beta$ -glucosidasas.

La efectividad de avicel, carboximetilcelulosa y de la combinación pectina/xilano como inductores de la enzima. se valoró al cabo de 14 días del crecimiento vegetativo de *R. solani*, en el medio de cultivo especificado en la sección Materiales y Métodos

La actividad  $\beta$ -glucosidasa con los inductores pectina/xilano y CMC fue similar, obteniendo, a los 14 días de incubación valores de 3.0 U/ml y 3.6 U/ml respectivamente (20% de diferencia), en tanto que con el agregado de avicel al medio de cultivo se duplicaron prácticamente dichos valores, registrándose 6.2 U/ml luego del mismo período de incubación (Fig. 24.).

#### **4.b. Actividad endo 1-4 $\beta$ -glucanasa (carboximetilcelulasa )**

La actividad de carboximetilcelulasa, producida durante el crecimiento vegetativo de *R. solani* se determinó en el sobrenadante del medio de cultivo especificado en la sección Materiales y Métodos, en presencia del inductor standard pectina/xilano.

En la Figura 23, se observa que la actividad enzimática aumentó progresivamente hasta el día 14, momento a partir del cual disminuyó hasta hacerse indetectable en el día 24.

La efectividad de avicel, carboximetilcelulosa y de la combinación pectina/xilano como inductores de la carboximetilcelulasa, valorada al cabo de 14 días del crecimiento vegetativo de *R. solani*, indicó mayor actividad en el

medio de cultivo con CMC como inductor (7.65 mU/ml) que con pectina/xilano (6.41 mU/ml) (20% de diferencia), en tanto que con avicel sólo se obtuvieron 4.08 mU/ml (Fig. 25).

#### **4.c. Actividad exo 1-4 $\beta$ -glucanasa (avicelasa)**

La actividad de avicelasa, producida durante el crecimiento vegetativo de *R. solani* se determinó en el sobrenadante del medio de cultivo especificado en la sección Materiales y Métodos, en presencia del inductor standard pectina/xilano.

En la Figura 23, se observa que la actividad enzimática aumentó progresivamente hasta el día 14, momento a partir del cual disminuyó. Al igual que la actividad carboximetilcelulasa, se hizo indetectable a partir del día 24 hasta la finalización del experimento (día 32).

La efectividad de avicel, carboximetilcelulosa y de la combinación pectina/xilano como inductores de la avicelasa, valorada al cabo de 14 días del crecimiento vegetativo de *R. solani*, indicó mayor actividad en el medio de cultivo con inductor CMC (7.65 mU/ml que con pectina/xilano (5.46 mU/ml) (40% de diferencia), en tanto que con avicel se detectó actividad mínima (0.66 mU/ml) (Fig. 26).

La comparación de las actividades  $\beta$ -glucosidasa, carboximetilcelulasa y avicelasa del aislamiento patogénico de *R. solani*, inducidas por la combinación pectina /xilano (Fig. 23) indica que las  $\beta$ -glucosidasas se produjeron antes que las carboximetilcelulasas y avicelasas en el ciclo de este patógeno. Este

resultado coincidiría con el papel vital que juega esta enzima en la conversión de la celobiosa en glucosa.

Los valores de las celulasas medidos en este aislamiento patogénico de *R. solani* fueron inferiores a los detectados en *Fusarium oxysporum* (otro componente del complejo "damping-off") por Nelson (1981). Asimismo Alconada (1992) encontró en *Fusarium oxysporum* f.sp *melonis* actividad celulásica superior a la registrada con el aislamiento patogénico de *R. solani* empleado ..

De acuerdo con los resultados obtenidos, se produjo un aumento en la producción de las celulasas en la fase de autólisis de *R. solani*, probablemente debido a la localización intracelular de las enzimas, que luego de la lisis celular liberarían las proteínas celulares al medio de cultivo y determinarían la producción de enzimas de nueva síntesis. Por el contrario en *Trichoderma reesei*, otro saprófito, colonizador de suelo, la baja producción de  $\beta$ -glucosidasa se debe a que esta enzima se encuentra asociada a los polisacáridos de la pared celular y no se liberaría por autólisis (Woodward et. al., 1982).

Sin bien Garret (1976), confirma el importante papel que juegan las enzimas celulolíticas en la supervivencia saprofítica de algunos patógenos radiculares, no subestima la presencia de otros sustratos carbonados en la composición de la pared celular vegetal y en consecuencia la posibilidad de absorción directa de compuestos simples o la acción de otras enzimas descomponedoras para una eficiente colonización saprofítica. Según Van Etten et al. (1967) en algunos aislamientos de *R. solani* se detecta escasa actividad celulásica y este autor sugiere que otras enzimas degradadoras tales como arabanasa, xilanasa y pectato liasa podrían intervenir en la desintegración de la pared celular del hospedante y en el mecanismo de invasión de este patógeno.

De acuerdo con la secuencia de invasión establecida por Bateman, (1964) para *R. solani*, luego del crecimiento intercelular del micelio en el tejido hospedante, facilitado por la secreción de enzimas pécticas, sigue la penetración intracelular y el colapso de las células invadidas que terminaría finalmente con las lesiones del hipocótilo, lo que sugiere una escasa necesidad de actividad celulásica. Según Gagnon (1967), la decoloración vascular, en algunos casos puede ser debida a la oxidación de algunos compuestos fenólicos que resultan de la acción de las  $\beta$ -glucosidasas sobre los glicósidos. Coincidentemente con los resultados aquí obtenidos, Bateman (1964), concluye que la acción de las celulasas sería secundaria, en la sintomatología ocasionada por *R. solani* en poroto. Pearson (1974) y Boothby y Magreola (1984) indican que en otros organismos fuertemente patogénicos como *Gaeumanomyces graminis*, con mecanismo de invasión similar al de *R. solani*, las enzimas celulolíticas no son el principal componente de la patogénesis. Por el contrario en *Sclerotium rolfsii*, otro patógeno de suelo causante de podredumbre basal en diversos hospedantes, se ha comprobado que estas enzimas juegan un papel importante en su acción degradativa (Bateman, 1969).

Es sabido que muchos microorganismos producen enzimas en respuesta a la presencia de determinados metabolitos en el medio de crecimiento, por lo tanto no es sorprendente que la fuente de hidrato de carbono puede influir en la producción enzimática y en consecuencia con determinados sustratos pueden no detectarse inicialmente las endocelulasas (Boothby y Magreola, 1984). Según Jones et al. (1972), las enzimas podrían producirse secuencialmente de acuerdo a la naturaleza del polisacárido encontrado en la pared celular vegetal. Bateman (1964), considera que *R. solani* produce enzimas celulolíticas en cultivo solamente cuando aparece una apropiada fuente de carbono.

De los resultados obtenidos se deduce que el aislamiento patogénico de *R. solani* empleado, en las condiciones de los ensayos, creció y liberó celulasas en el medio de cultivo líquido, en forma diferencial, según las fuentes de carbono utilizadas como inductor. No obstante otras enzimas tales como pectinasas o hemicelulasas podrían resultar igualmente importantes que las celulasas para su supervivencia saprofítica.



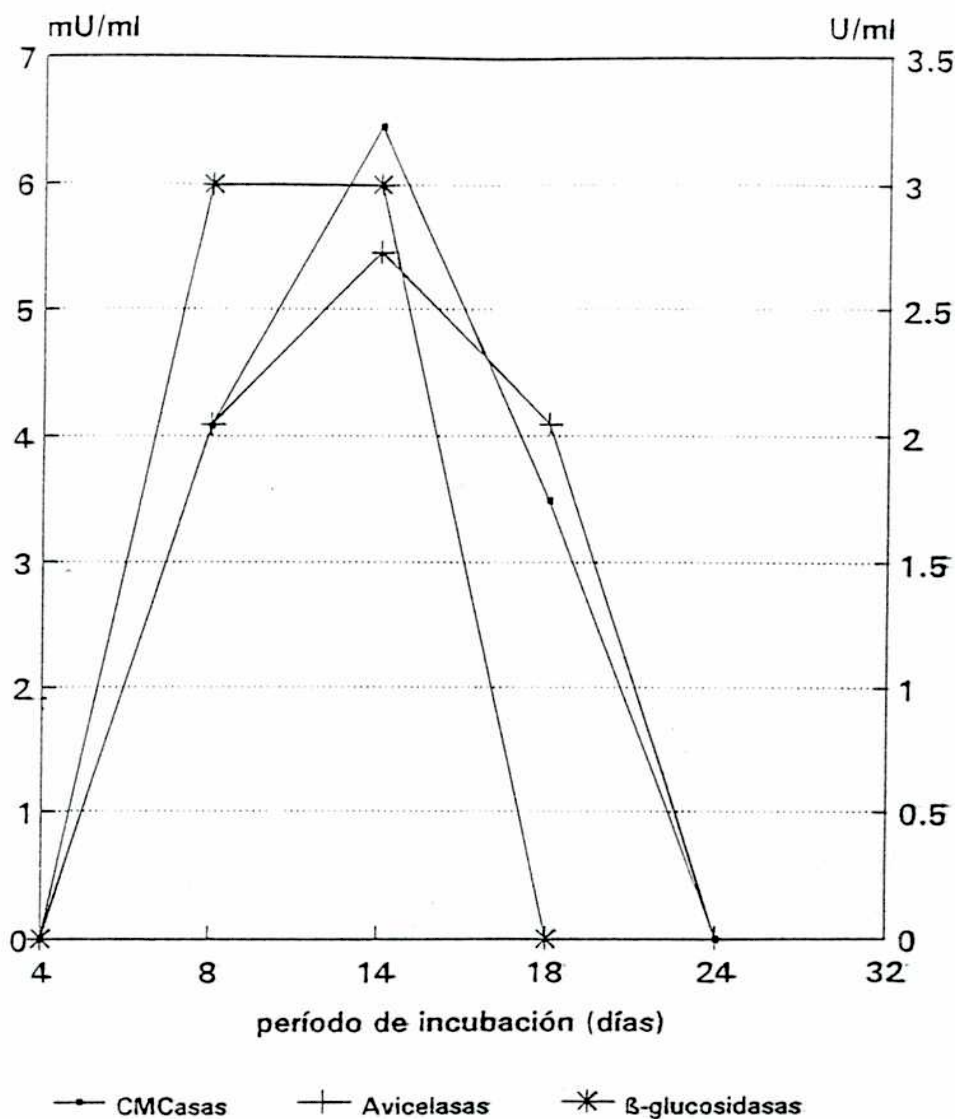


Fig. 23 : Valoración de las actividades  $\beta$ -glucosidasa, endo 1-4  $\beta$ -glucanasa (CMCasa) y exo 1-4  $\beta$ -glucanasa (avicelasa) durante el crecimiento vegetativo de *Rhizoctonia solani*, en el medio extracelular. El organismo se inoculó en el medio de cultivo especificado con inductor pect./xilano. En los períodos indicados se procesaron las muestras como se describe en la sección Materiales y Métodos.

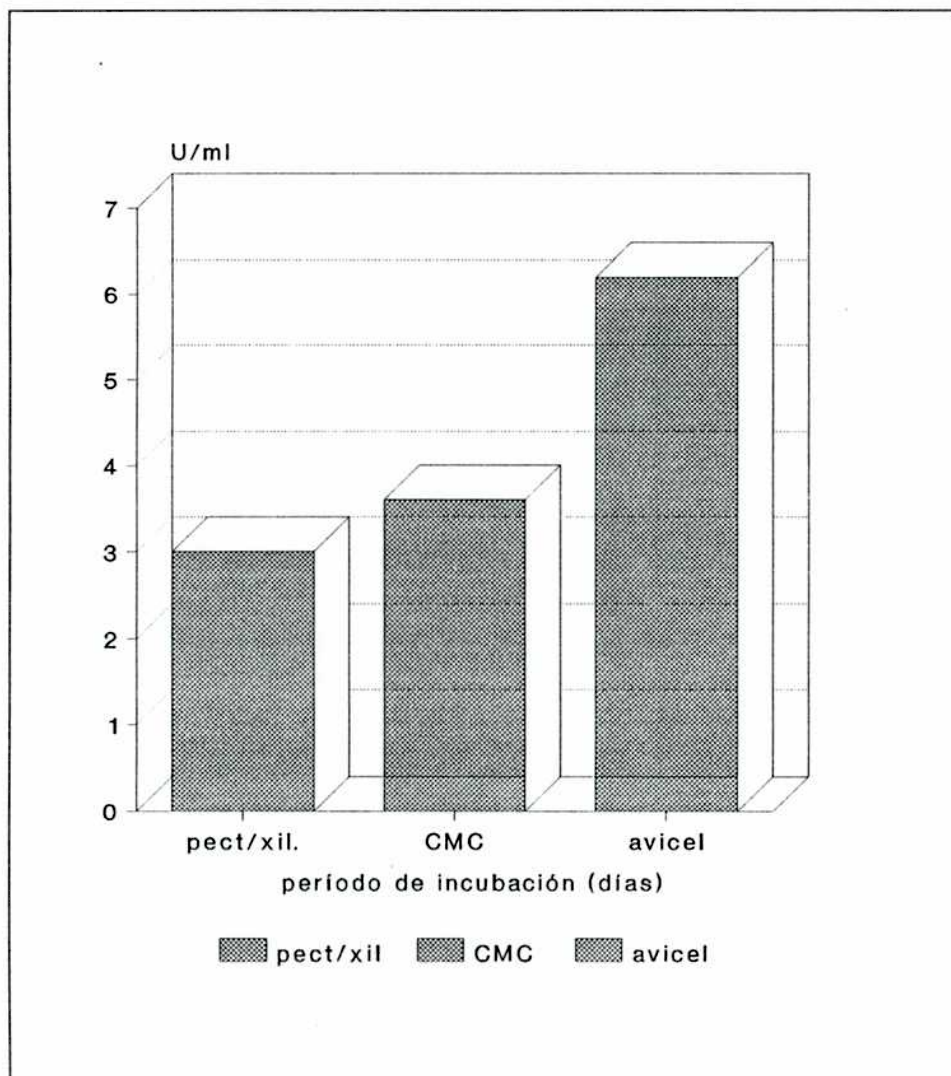


Fig. 24 Valoración de la actividad  $\beta$ -glucosidasa de *Rhizoctonia solani* en el medio extracelular, en presencia de distintos inductores. El organismo se inoculó en el medio de cultivo especificado con los inductores pect./xilano, CMC y Avicel. En el día 14 se procesaron las muestras como se describe en la sección Materiales y Métodos y se determinó la actividad  $\beta$ -glucosidasa.

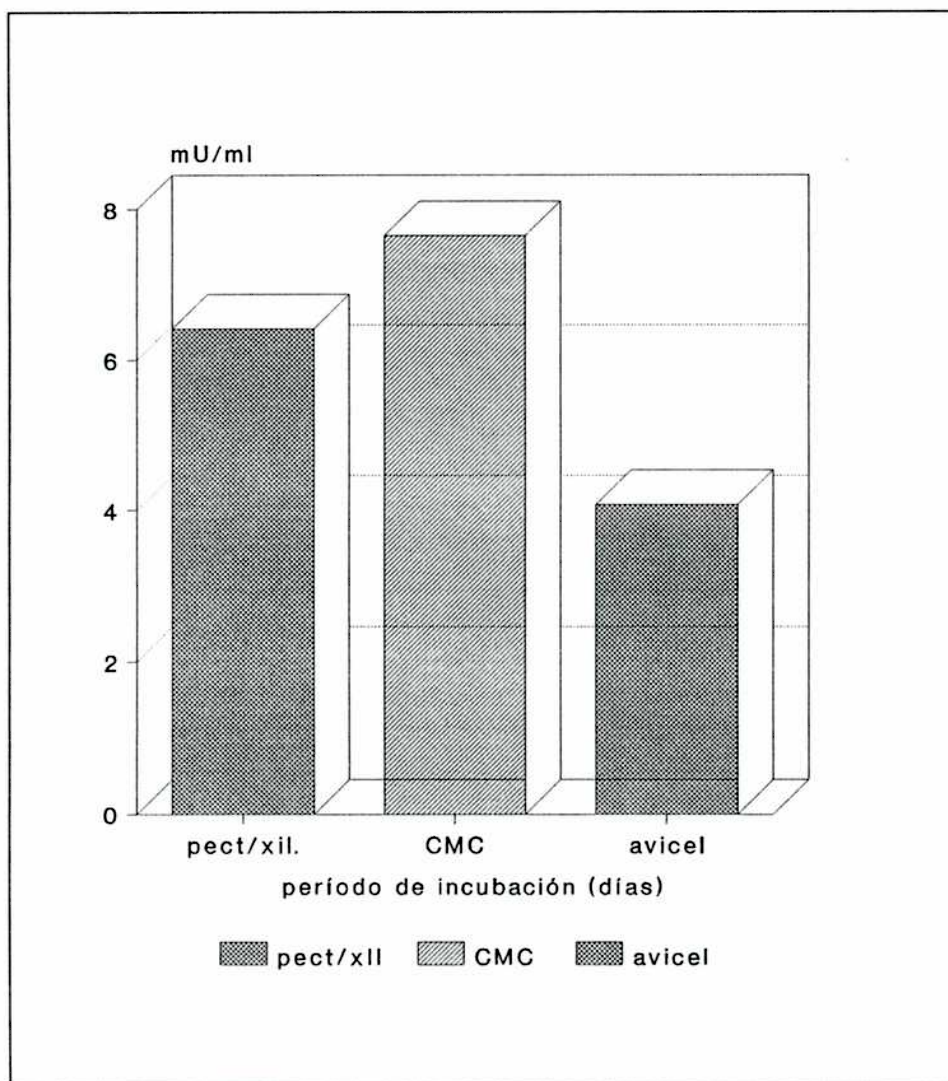


Fig. 25 : Valoración de la actividad endo 1-4  $\beta$ -glucanasa (CMCasa) de *Rhizoctonia solani* en el medio extracelular, en presencia de distintos inductores. El organismo se inoculó en el medio de cultivo especificado con los inductores pect./xilano, CMC y Avicel. En el día 14 se procesaron las muestras como se describe en la sección Materiales y Métodos y se determinó la actividad CMCasa.

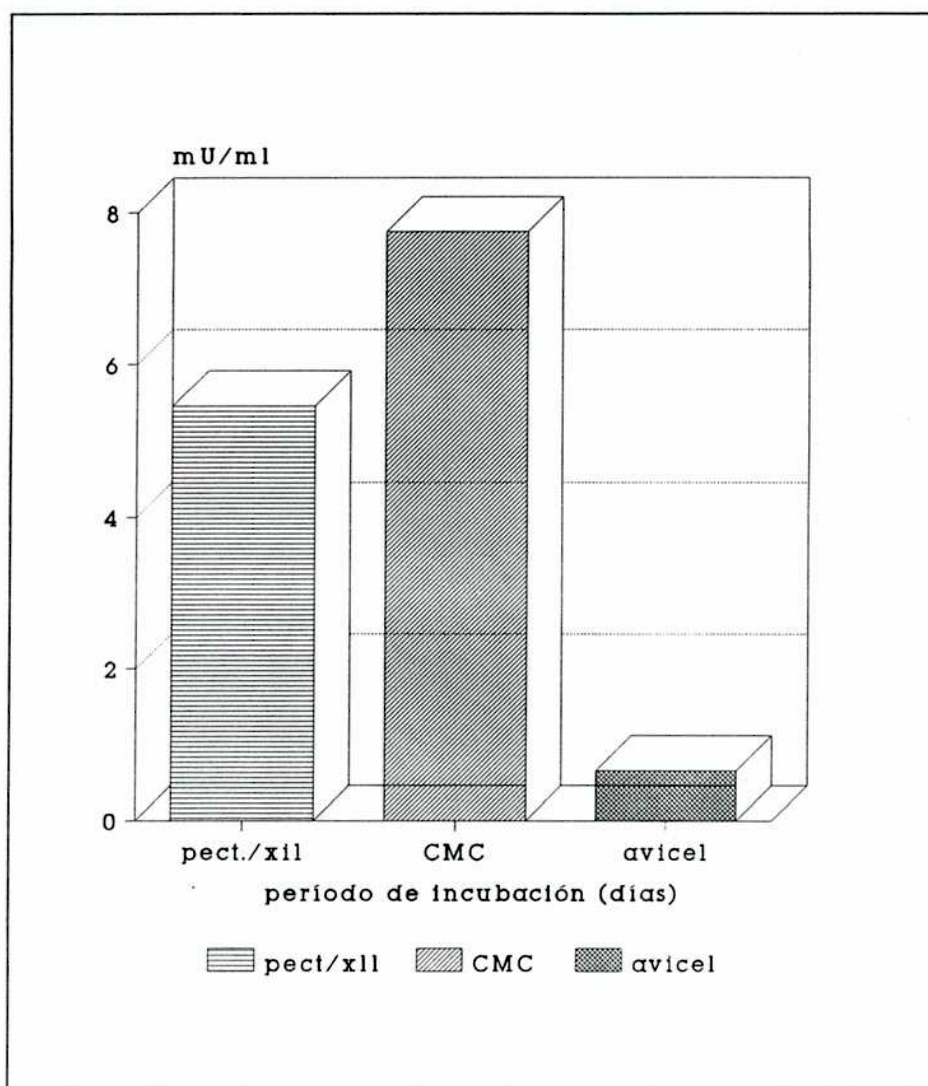


Fig. 26: Valoración de la actividad exo 1-4  $\beta$ -glucanasa (Avicelasa) de *Rhizoctonia solani* en el medio extracelular, en presencia de distintos inductores. El organismo se inoculó en el medio de cultivo especificado con los inductores pect./xilano, CMC y Avicel. En el día 14 se procesaron las muestras como se describe en la sección Materiales y Métodos y se determinó la actividad Avicelasa.

## 5. Niveles de AMPcíclico intracelular de *R. solani* y medición de las actividades de Fosfodiesterasa de AMP cíclico y Adenilato ciclasa

El aislamiento patogénico de *R. solani* 81 se caracterizó por formar esclerocios en cultivo sobre medio de APG pH 5.6 y sobre medio MMN.

Los mecanismos que regulan el proceso de inducción esclerocial en los hongos filamentosos son desconocidos. Brandt (1964), sugiere la existencia de factor (es) morfogenético (s) determinantes de la inducción de microesclerocios en un aislamiento de *Verticillium albo-atrum*. Chet y Henis (1975) concluyen que el micelio, en *Sclerotium rolfsii*, proporcionaría factores no determinados para el desarrollo de esclerocios. Hashiba e Ishikawa (1978) indican que la producción de esclerocios en *R. solani* estaría regulada por factores genéticos, ambientales y AMP cíclico como sustancia inductora. Más recientemente Hashiba (1987) demuestra la relación existente entre la patogenia de los aislamientos de *R. solani*, la producción de esclerocios y los niveles elevados de AMP cíclico y de adenilato ciclasa.

De acuerdo con Uno et al. (1985) y Hashiba (1987), los aislamientos de *R. solani* que no desarrollan esclerocios en cultivo, se manifiestan como débilmente patogénicos sobre los hospedantes ensayados, en tanto que los que los forman resultan altamente patogénicos. Estos autores también observan correlación positiva entre estas características morfofisiológicas y niveles de concentración de AMPcíclico intracelular.

Con el propósito de encontrar correlación entre la patogenicidad de *R. solani* y el metabolismo del nucleótido cíclico, se midió el nivel de AMPcíclico endógeno en los extractos crudos de micelio, obtenidos de los cultivos de *R.*

*solani* (incluyendo esclerocios) en su fase de crecimiento, cuando el peso seco alcanzó su máximo (.398 mg/ml). Consecutivamente se determinó la relación de este nucleótido con las enzimas que lo sintetizan (adenilato ciclasa) y degradan (fosfodiesterasa de AMP cíclico) respectivamente, debido a que en un determinado momento los niveles endógenos del nucleótido cíclico pueden relacionarse con los niveles de las actividades de las enzimas de su metabolismo.

Los valores obtenidos fueron :

AMPcíclico = 132.4 pmoles/mg proteína

Adenilato ciclasa = 15 pmoles de AMPc-H<sup>3</sup> producido/mg proteína/minuto

Fosfodiesterasa de AMP cíclico = 19 pmoles de AMPc-H<sup>3</sup> hidrolizado/mg de proteína/minuto

Estos resultados en principio, podrían relacionarse más con una alta actividad relativa de adenilato ciclasa más que con una baja actividad de fosfodiesterasa. (Ver ítem.8. de Resultados y Discusion).

La producción de esclerocios en el aislamiento patogénico 81 dependió de la edad del micelio. Aunque en el micelio viejo se observó mayor concentración de esclerocios no se determinó si la concentración de sustancias inductoras de estos propágulos se incrementó correlativamente, como podría esperarse.

Los resultados hallados se corresponden cualitativamente con lo informado por Uno et al. (1985) para aislamientos de *R. solani* altamente patogénicos, con elevados niveles de AMPcíclico endógeno y capacidad de producir esclerocios. Se puede suponer por los resultados obtenidos, que en los aislamientos patogénicos de *R. solani*, el AMP cíclico, al igual que en organismos eucariontes superiores, se une con la proteína quinasa-AMPcíclico

dependiente y estimula la fosforilación de ciertas proteínas celulares, con la consiguiente influencia del metabolismo del organismo relacionado con su diferenciación morfológica. Esta observación apoyaría la hipótesis de la acción del AMPcíclico como sustancia catalizadora de la formación de esclerocios.

Sin embargo, de acuerdo con Hubbard et al. (1978) no hay evidencias conclusivas de la incidencia directa de este nucleótido en la regulación de la interacción del patógeno con el hospedante .

## **6. Aislamiento de agentes biocontroladores: Género**

### ***Cladorhinum* Sacc. et March.**

El análisis de muestras de suelo de alfalfa (*Medicago sativa*) y de agropiro (*Agropyron* sp.) a través de los métodos descritos en el ítem 4 de la sección. Materiales y Métodos, determinó la presencia de micelio hialino, aéreo, con hifas de 3-4  $\mu\text{m}$  de ancho de paredes delgadas, irregularmente septadas sin conexiones en hebilla, disminuyendo hacia el ápice y con células multinucleadas (Fig. 27 c). Los aislamientos desarrollaron colonias de color verde-amarillento a rosado sobre medio semisintético de APG, pH 5.6, a 22°C y en obscuridad no produjeron conidios. En las hifas expuestas a una longitud de onda de 350 nm, luego de 15 días se formaron collaretes en posición lateral a cada célula hifal y se liberaron conidios unicelulares, hialinos y mucilaginosos (Fig. 27 a y b).

Los conidios de forma globosa a ovalada midieron entre 2.5 a 3.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, se agruparon en masas debido al mucílago de la pared y no germinaron sobre APG pH 5.6, a 22 °C en obscuridad o bajo luz UV de 350 nm (Fig. 27 d y e). No se observaron esclerocios verdaderos.

Los aislamientos 8, 32, 34, 36, 156 y 167 presentaron estas características morfológicas y anastomosaron positivamente entre ellos. Según las mediciones realizadas sobre el aislamiento 8 y confirmadas por la CAB todas estas cepas correspondieron a la especie *C. foecundissimum* Sacc. et March.

En la Tabla 4 se muestran el origen, la procedencia geográfica y patogenicidad de los aislamientos de esta especie. Los restantes aislamientos, si bien presentaron similares caracteres morfológicos no anastomosaron con los mencionados anteriormente, por lo que se los consideró no perteniente a la especie *C. foecundissimum*.

Esta especie fúngica se menciona como abundante en suelos agrícolas y fácilmente detectable por métodos trampa de partículas de suelo. Según Domsch y Gams (1968) se encuentra con mayor frecuencia y capacidad antagónica luego de un cultivo de colza (Cruciferae) que después de uno de trigo (Graminae) o de arvejas (Leguminosae). En el relevamiento realizado en la Argentina este género se encontró en abundancia en suelos agrícolas con cultivos de gramíneas y leguminosas. Los muestreos en suelos con crucíferas fueron escasos y no se obtuvieron aislamientos de *Cladorhinum* sp.



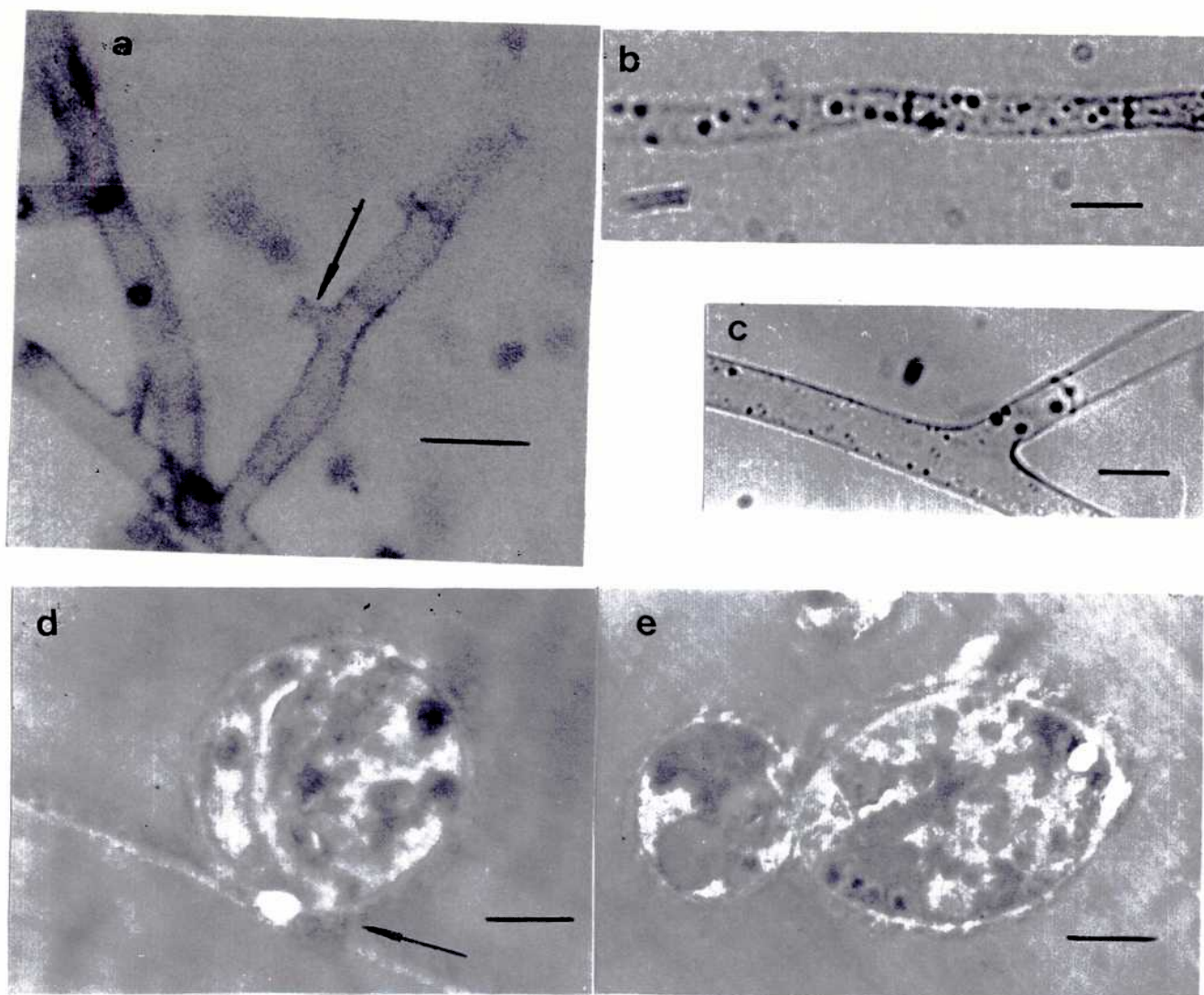


Fig. 27: Características morfológicas de *Cladorhinum foecundissimum* en cultivos sobre APG pH 5.6, luego de incubar 15 días a una longitud de onda de 350 nm. Se observa en a) Micelio y collarete. La flecha indica el collarete. Barra = 10  $\mu$ . b) Células multinucleadas. Barra = 10  $\mu$ . c) Ramificación hifal. Barra = 10  $\mu$ . d) Conidio. La flecha indica el conidio adherido al collarete. Barra = 1  $\mu$ . e) Conidios aglutinados por el mucílago. Barra = 1  $\mu$ .

**Tabla 4: Patogenicidad de los aislamientos del género *Cladorhizum***

<b>Hospedante</b>	<b>Nº</b>	<b>Aislamiento</b>	<b>Grado ataque</b>
Calabaza	8	<i>C. foecundissimum</i>	0
Acelga	8	<i>C. foecundissimum</i>	0
Lechuga	8	<i>C. foecundissimum</i>	0
Escarola	8	<i>C. foecundissimum</i>	0
Cebolla	8	<i>C. foecundissimum</i>	0
Tomate	8	<i>C. foecundissimum</i>	0
Pimiento	8	<i>C. foecundissimum</i>	0
Grasol	8	<i>C. foecundissimum</i>	0
Lino	8	<i>C. foecundissimum</i>	0
Alfalfa	8	<i>C. foecundissimum</i>	0
Avena	8	<i>C. foecundissimum</i>	0
Pasto ovillo	8	<i>C. foecundissimum</i>	0
Pasto lloron	8	<i>C. foecundissimum</i>	0
Agropiro	8	<i>C. foecundissimum</i>	0
Soja	8	<i>C. foecundissimum</i>	0
Nabo	8	<i>C. foecundissimum</i>	0
R. Bruselas	8	<i>C. foecundissimum</i>	1
Rabanito	8	<i>C. foecundissimum</i>	0
Calabaza	32	<i>C. foecundissimum</i>	0
Acelga	32	<i>C. foecundissimum</i>	1
Lechuga	32	<i>C. foecundissimum</i>	0

Escarola	32	<i>C. foecundissimum</i>	0
Cebolla	32	<i>C. foecundissimum</i>	0
Tomate	32	<i>C. foecundissimum</i>	1
Pimienta	32	<i>C. foecundissimum</i>	0
Glirasol	32	<i>C. foecundissimum</i>	0
Lino	32	<i>C. foecundissimum</i>	0
Alfalfa	32	<i>C. foecundissimum</i>	0
Avena	32	<i>C. foecundissimum</i>	0
Pasto ovillo	32	<i>C. foecundissimum</i>	0
Pasto lloron	32	<i>C. foecundissimum</i>	0
Agropiro	32	<i>C. foecundissimum</i>	0
Soja	32	<i>C. foecundissimum</i>	0
Nabo	32	<i>C. foecundissimum</i>	0
R. Bruselas	32	<i>C. foecundissimum</i>	1
Rabanito	32	<i>C. foecundissimum</i>	0
Calabaza	156	<i>C. foecundissimum</i>	0
Acelga	156	<i>C. foecundissimum</i>	0
Lechuga	156	<i>C. foecundissimum</i>	0
Escarola	156	<i>C. foecundissimum</i>	0
Cebolla	156	<i>C. foecundissimum</i>	0
Tomate	156	<i>C. foecundissimum</i>	0
Lino	156	<i>C. foecundissimum</i>	0
Alfalfa	156	<i>C. foecundissimum</i>	2
Avena	156	<i>C. foecundissimum</i>	0
Soja	156	<i>C. foecundissimum</i>	0
Nabo	156	<i>C. foecundissimum</i>	0
Acelga	167	<i>C. foecundissimum</i>	0

<b>Lechuga</b>	<b>167</b>	<b><i>C. foecundtssimum</i></b>	<b>0</b>
<b>Escarola</b>	<b>167</b>	<b><i>C. foecundtssimum</i></b>	<b>0</b>
<b>Cebolla</b>	<b>167</b>	<b><i>C. foecundtssimum</i></b>	<b>0</b>
<b>Tomate</b>	<b>167</b>	<b><i>C. foecundtssimum</i></b>	<b>0</b>
<b>Girasol</b>	<b>167</b>	<b><i>C. foecundtssimum</i></b>	<b>0</b>
<b>Lino</b>	<b>167</b>	<b><i>C. foecundtssimum</i></b>	<b>0</b>
<b>Alfalfa</b>	<b>167</b>	<b><i>C. foecundtssimum</i></b>	<b>0</b>
<b>Avena</b>	<b>167</b>	<b><i>C. foecundtssimum</i></b>	<b>0</b>
<b>Soja</b>	<b>167</b>	<b><i>C. foecundtssimum</i></b>	<b>0</b>
<b>Nabo</b>	<b>167</b>	<b><i>C. foecundtssimum</i></b>	<b>0</b>
<b>Calabaza</b>	<b>170</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Acelga</b>	<b>170</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Lechuga</b>	<b>170</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Escarola</b>	<b>170</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Cebolla</b>	<b>170</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Tomate</b>	<b>170</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Lino</b>	<b>170</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Alfalfa</b>	<b>170</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Avena</b>	<b>170</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Soja</b>	<b>170</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Nabo</b>	<b>170</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Acelga</b>	<b>168</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Lechuga</b>	<b>168</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Escarola</b>	<b>168</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Cebolla</b>	<b>168</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Girasol</b>	<b>168</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>

<b>Lino</b>	<b>168</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Alfalfa</b>	<b>163</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Avena</b>	<b>168</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Soja</b>	<b>168</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Nabo</b>	<b>168</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Calabaza</b>	<b>157</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Acelga</b>	<b>157</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Lechuga</b>	<b>157</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Escarola</b>	<b>157</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Cebolla</b>	<b>157</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Tomate</b>	<b>157</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>2</b>
<b>Lino</b>	<b>157</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Alfalfa</b>	<b>157</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Avena</b>	<b>157</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>3</b>
<b>Soja</b>	<b>157</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Nabo</b>	<b>157</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Calabaza</b>	<b>7</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Acelga</b>	<b>7</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Lechuga</b>	<b>7</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Escarola</b>	<b>7</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Cebolla</b>	<b>7</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Tomate</b>	<b>7</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Grasol</b>	<b>7</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Lino</b>	<b>7</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Alfalfa</b>	<b>7</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Avena</b>	<b>7</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>
<b>Pasto ovillo</b>	<b>7</b>	<b><i>Cladorhinum sp.</i></b>	<b>0</b>

Pasto lloron	7	<i>Cladorhinum sp.</i>	0
Soja	7	<i>Cladorhinum sp.</i>	0
Nabo	7	<i>Cladorhinum sp.</i>	0
R. Bruselas	7	<i>Cladorhinum sp.</i>	0
Rabanito	7	<i>Cladorhinum sp.</i>	0
Calabaza	13	<i>Cladorhinum sp.</i>	0
Acelga	13	<i>Cladorhinum sp.</i>	0
Lechuga	13	<i>Cladorhinum sp.</i>	0
Escarola	13	<i>Cladorhinum sp.</i>	0
Cebolla	13	<i>Cladorhinum sp.</i>	0
Tomate	13	<i>Cladorhinum sp.</i>	0
Girasol	13	<i>Cladorhinum sp.</i>	0,
Lino	13	<i>Cladorhinum sp.</i>	0
R. Bruselas	13	<i>Cladorhinum sp.</i>	0
Rabanito	13	<i>Cladorhinum sp.</i>	0
Calabaza	17	<i>Cladorhinum sp.</i>	0
Acelga	17	<i>Cladorhinum sp.</i>	0
Lechuga	17	<i>Cladorhinum sp.</i>	0
Escarola	17	<i>Cladorhinum sp.</i>	0
Cebolla	17	<i>Cladorhinum sp.</i>	0
Tomate	17	<i>Cladorhinum sp.</i>	0
Girasol	17	<i>Cladorhinum sp.</i>	0

## 7. Determinación del comportamiento endofítico

Se investigó la posibilidad que las hifas de *C. foecundissimum* tuvieran un comportamiento endofítico.

La inspección de trozos de raíces sanas, provenientes de plántulas desarrolladas en suelos colonizados con *C. foecundissimum*, desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1 % e incubados sobre agar-agua, suplementado con 300 µg/ ml de streptomina permitió determinar la presencia de hifas septadas y delgadas emergiendo de los fragmentos radiculares. Se comprobó que las infecciones fúngicas fueron completamente asintomáticas, como lo indicaron los ensayos de patogenicidad. llevados a cabo sobre los distintos hospedantes.

El micelio, una vez transferido a APG pH 5.6 y establecido el cultivo puro demostró caracteres morfológicos y culturales del género *Cladorhinum*.

En raíces de plántulas de algodón de 7 días, fijadas y puestas en contacto con el inóculo de *C. foecundissimum* se observó una colonización epidérmica laxa, fácilmente desprendible, con formación de apresorios esporádicos (Fig.28). La diafanización, montaje y seccionalización de trozos radiculares de diferentes hospedantes indicó la existencia de hifas creciendo intercelularmente, rodeando los elementos xilemáticos o invadiendo los pelos radicales (Fig 29 y 30).

La invasión de las células corticales en raíces de algodón se observó 5 días luego de la germinación y se determinó un 20 % de colonización en este órgano vegetal.

El desarrollo de plantas colonizadas con *Cladorhinum* fue uniformemente mayor que en las no colonizadas. En plantas adultas ( en el momento de floración), de avena, algodón, pasto llorón y lino se estimó un incremento en

altura en un rango de 37,3 a 44,5% con respecto al control. Las determinaciones

se realizaron sobre un promedio de 30 plantas. El promedio de la longitud y peso de las raíces en todos los hospedantes se mantuvo igual que en los testigos.

En la Figura 31 se observa el incremento en altura promovido por los aislamientos 8 y 32 de *C. foecundissimum* en plantas adultas de algodón.

Infecciones fúngicas completamente asintomáticas existen en una gran diversidad de plantas. Sivasithamparam, (1975) indica que especies de *Phialophora* que invaden el xilema de cereales son generalmente no patogénicas. Recientes estudios basadas en el cultivo de trozos de órganos vegetales desinfectados han revelado una sorprendente cantidad de especies de hongos que crecen subcuticularmente o dentro de los tejidos de plantas completamente sanas (Carroll, 1988). Según Petrini y Fischer, (1990) y Fischer y Petrini, (1990) los hongos endofíticos son bastante selectivos y pueden colonizar solamente uno o pocos hospedantes estrechamente relacionados, sin embargo Fischer et al. (1991), informan que las comunidades de endófitos radiculares pueden no ser específicas de un hospedante y estar influenciadas por el medio.

Según Pearson y Read (1975), los hongos endofíticos de Ericaceas requieren, para su cultivo, un pH óptimo de aproximadamente 6.6, considerablemente superior al normal del suelo de esa comunidad vegetal., aunque similar al pH intracelular de las raíces. Estos resultados serían coincidentes con la ausencia de una eficiente colonización endofítica de *C. foecundissimum* en algodón y consiguiente falta de control en la aparición de los síntomas de "damping-off", en ensayos desarrollados sobre una mezcla de suelo y turba y menor pH..



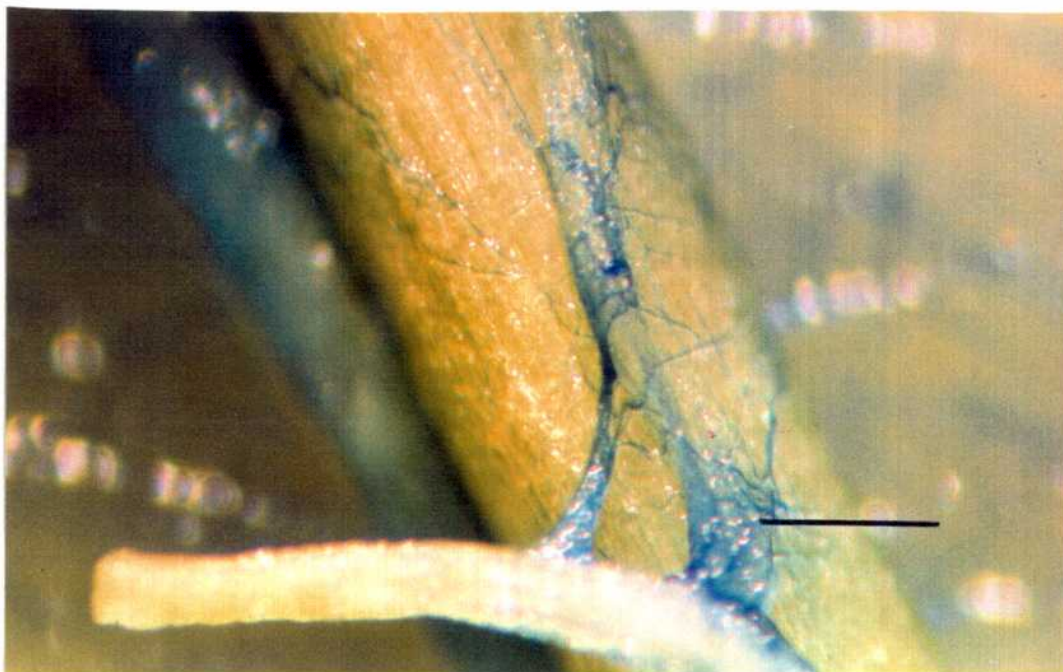


Fig.28: Colonización radicular por *Cladorhinum foecundissimum* en plántulas de algodón. En un fragmento de raíz se observa el micelio adherido. Tinción: azul de algodón (0,05%). Barra = 1 mm.

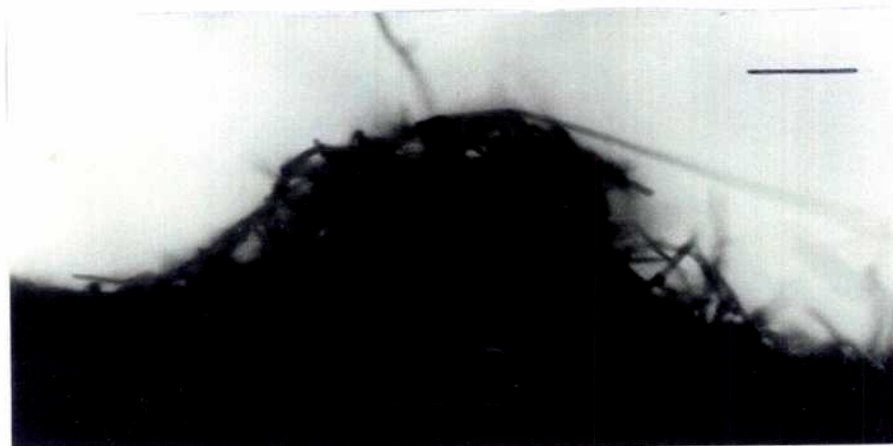


Fig. 29: Colonización epidérmica de *Cladorhinum foecundissimum* en raíces de algodón. Se observa un micelio laxo. Barra = 50  $\mu$ .

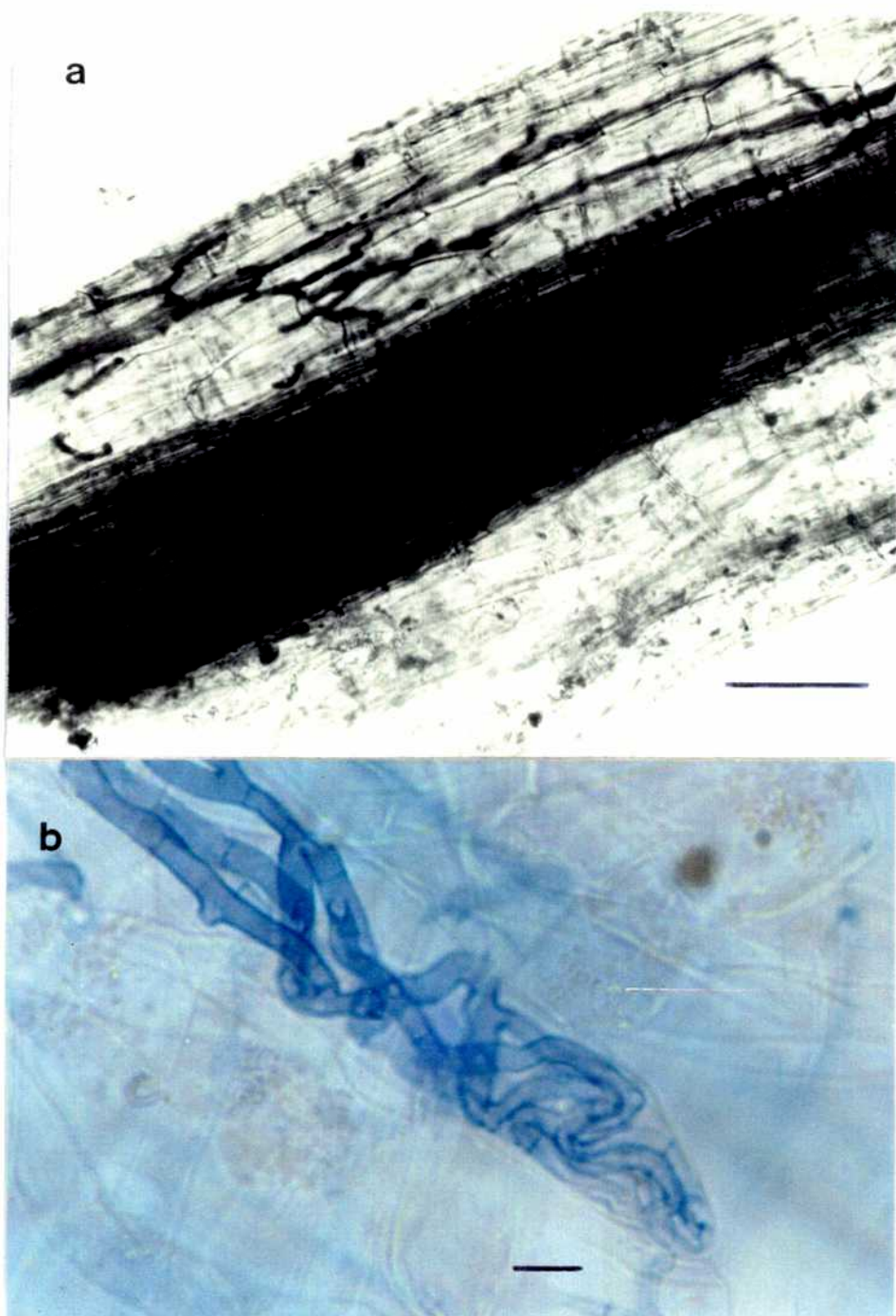


Fig.30: Colonización intra-radicular con *Cladorhinum foecundissimum* en plántulas de algodón. Se observa en a) Hifas dispuestas intercelularmente alrededor del cilindro central (método de Phillips y Hayman). Barra = 50  $\mu$ . b) Colonización de un pelo radical. Barra = 20  $\mu$ .



Fig. 31: Promoción del crecimiento en plantas de algodón inducida por los aislamientos 8 y 32 de *Cladorhinum foecundissimum*. En el frente de las macetas se indican los números de los aislamientos y la T correspondiente a los testigos.

## 8. Enzimas relacionadas con la degradación de la pared celular

### Celulasas de *C. foecundissimum*

El género *Cladorhinum* agrupa especies saprofitas, "habitantes de suelo".

El aislamiento empleado en este trabajo de Tesis demostró un comportamiento endofítico, por lo que resultó importante evaluar la actividad celulolítica en relación a su capacidad de penetración.

#### 8.a. Actividad $\beta$ -glucosidasa

La actividad de  $\beta$ -glucosidasa, producida durante el crecimiento vegetativo de *C. foecundissimum* se determinó en el sobrenadante del medio de cultivo especificado en la sección Materiales y Métodos, en presencia del inductor standard pectina/xilano.

El peso seco máximo del micelio, en el medio de cultivo indicado, se alcanzó al 4º día (1,31 mg/ ml de medio), momento a partir del cual el cultivo entró en la etapa de autólisis, que se observó como una disminución del mismo.

En la Figura 32 se observa que la actividad de esta enzima aumentó gradualmente, alcanzando su máximo valor registrado en el día 14, momento a partir del cual disminuyó, hasta hacerse indetectable a partir del día 24.

A continuación se evaluó la efectividad de distintos inductores, comúnmente utilizados para este tipo de estudios, sobre la producción de  $\beta$ -glucosidasas.

La efectividad de avicel, carboximetilcelulosa y de la combinación pectina/xilano como inductores de la enzima se valoró al cabo de 14 días del

crecimiento vegetativo de *C. foecundissimum*, en el medio de cultivo especificado en la sección de Materiales y Métodos

La actividad  $\beta$ -glucosidasa producida en presencia de los inductores pectina/xilano, CMC y avicel fue muy diferente, registrándose con pectina/xilano y avicel, a los 14 días de incubación valores de 8.2 U/ml y 13.6 U/ml respectivamente, en tanto que con el agregado de CMC al medio de cultivo solamente se obtuvieron 1.13 U/ml (Fig.33).

#### **8.b. Actividad Endo- 1, 4 $\beta$ -Glucanasa (carboximetilcelulasa)**

La actividad de carboximetilcelulasa, producida durante el crecimiento vegetativo de *C. foecundissimum* se determinó en el sobrenadante del medio de cultivo especificado en la sección Materiales y Métodos, en presencia del inductor standard pectina/xilano.

En la Figura 32 se observa que la actividad de esta enzima alcanzó su máximo valor en el día 8 y comenzó a decrecer hacia el día 18, hasta hacerse indetectable a partir del día 24.

La efectividad de avicel, carboximetilcelulosa y de la combinación pectina/xilano como inductores de la enzima, valorada al cabo de 14 días del crecimiento vegetativo de *C. foecundissimum* (período en el cual se considera una autólisis total), indicó mayor actividad carboximetilcelulasa en el medio de cultivo con pectina/xilano como inductor (10.49 mU/ml) que con CMC (8.75 mU/ml), en tanto que con avicel sólo se obtuvieron 3.36 mU/ml (Fig.34).

### 8.c. . Actividad Exo-1-4 $\beta$ Glucanasa (avicelasa)

La actividad de avicelasa, producida durante el crecimiento vegetativo de *C. foecundissimum* se determinó en el sobrenadante del medio de cultivo especificado en la sección Materiales y Métodos, en presencia del inductor standard pectina/xilano.

En la Figura 32 se observa que la actividad de esta enzima alcanzó su máximo valor en el día 8 y disminuyó rápidamente hacia el día 14 y 18, hasta hacerse indetectable a partir del día 24.

La efectividad de avicel, carboximetilcelulosa y de la combinación pectina/xilano como inductores de la enzima, valorada al cabo de 14 días del crecimiento vegetativo de *C. foecundissimum*, indicó mayor actividad en el medio de cultivo con inductor pectina/xilano (5.85 mU/ml) que con CMC (4.52 mU/ml) en tanto que con avicel sólo se detectó una actividad de 1.16 mU/ml (Fig.35).

La comparación de las actividades  $\beta$ -glucosidasa, CMCasa y avicelasa en el aislamiento no patogénico de *C. foecundissimum* indica que las carboximetilcelulasas y avicelasas se produjeron antes que las  $\beta$ -glucosidasas en el ciclo de este colonizador endófito (Fig. 32).

Domsch y Gams (1969) informan que *C. foecundissimum* produce enzimas celulolíticas con capacidad para descomponer CMC y que no existe para esta especie así como para otros habitantes comunes del suelo, especificidad por un sustrato sino una preferencia.

Los aislamientos de *C. foecundissimum* que mostraron capacidad endofítica presentaron además, una gran habilidad saprofítica y fueron ecológicamente independientes del hospedante. Probablemente su capacidad de competitividad saprofítica con respecto a la utilización de la celulosa fue suficiente para permitir su supervivencia en el suelo. De manera similar los hongos endofíticos de Ericaceas manifiestan capacidad saprofítica e inclusive en ciertos casos pueden también, fructificar en cultivos puros separadamente del hospedante (Gianinazzi-Pearson y Smith, 1993).

Pearson y Read (1975) indican que ciertos hongos endofíticos presentan suficiente actividad celulásica como para llevar a cabo la penetración en el hospedante, pero una vez dentro del mismo, la nutrición carbonada se realizaría a través de los fotosíntatos del autotrófo, no ejerciendo, en consecuencia, una acción patogénica.

Recientemente, Gianinazzi-Pearson (1993), sugieren que los hongos capaces de micorrizar y que además pueden crecer independientemente en el suelo, incrementan sus posibilidades de supervivencia y de éxito en la infección. De igual modo la capacidad de degradar polímeros tales como celulosa y pectina pueden ser importantes para facilitar la penetración del tejido hospedante.

Kinden y Brown (1975) y García-Romera et al., (1990) consideran que en algunos hongos endomicorrícicos, tanto celulasas como pectinasas deben estar sujetas a la represión del producto final por relativamente altas concentraciones de carbohidratos solubles en el tejido hospedante. Un excesivo desarrollo de estas enzimas destructivas dentro de los procesos de simbiosis no resultaría adecuado, ya que se liberarían fragmentos de pared celular que operarían desencadenando mecanismos defensivos en el hospedante, reacciones que no ocurren en las asociaciones micorrícicas.

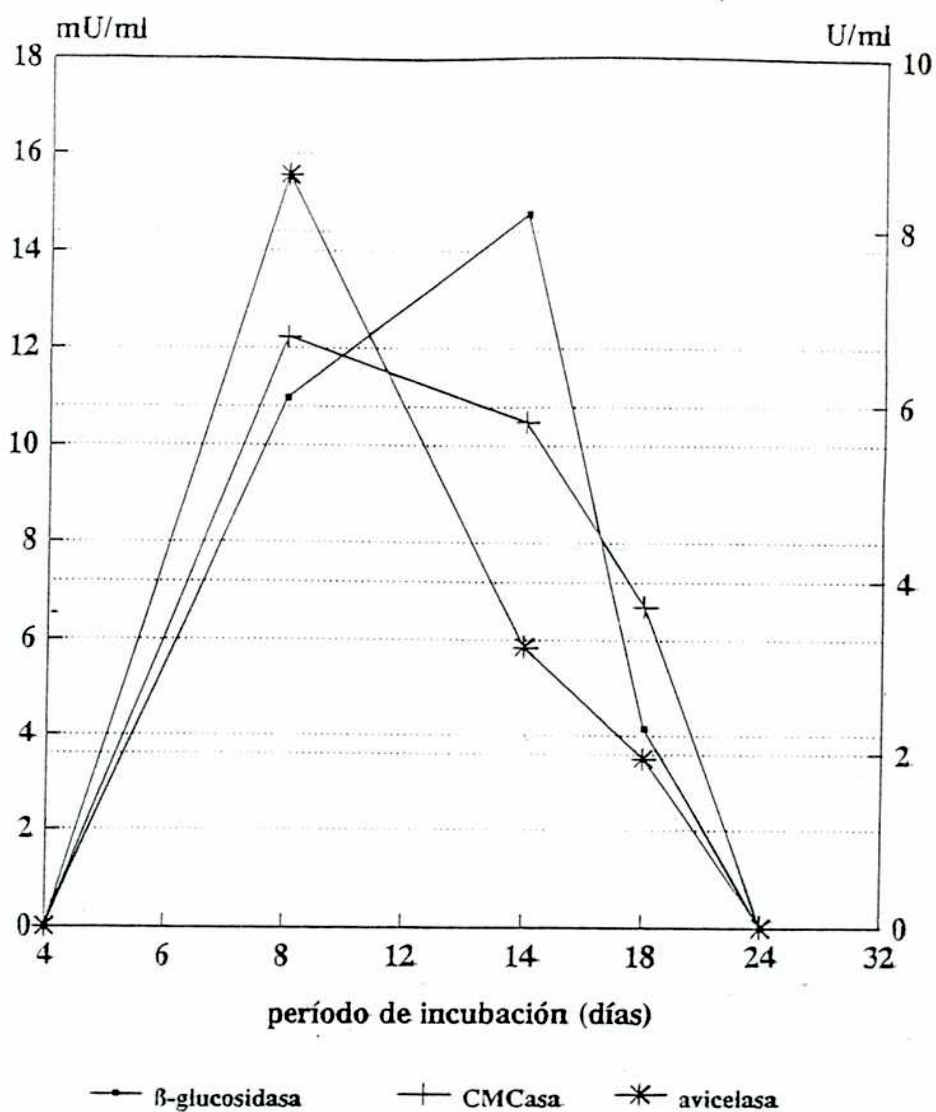


Fig. 32 : Valoración de las actividades  $\beta$ -glucosidasa, endo 1-4  $\beta$ -glucanasa (CMCasa) y exo 1-4  $\beta$ -glucanasa (avicelasa) durante el crecimiento vegetativo de *Cladorhinum foecundissimum*, en el medio extracelular. El organismo se inoculó en el medio de cultivo especificado con inductor pect./xilano. En los períodos indicados se procesaron las muestras como se describe en la sección Materiales y Métodos.



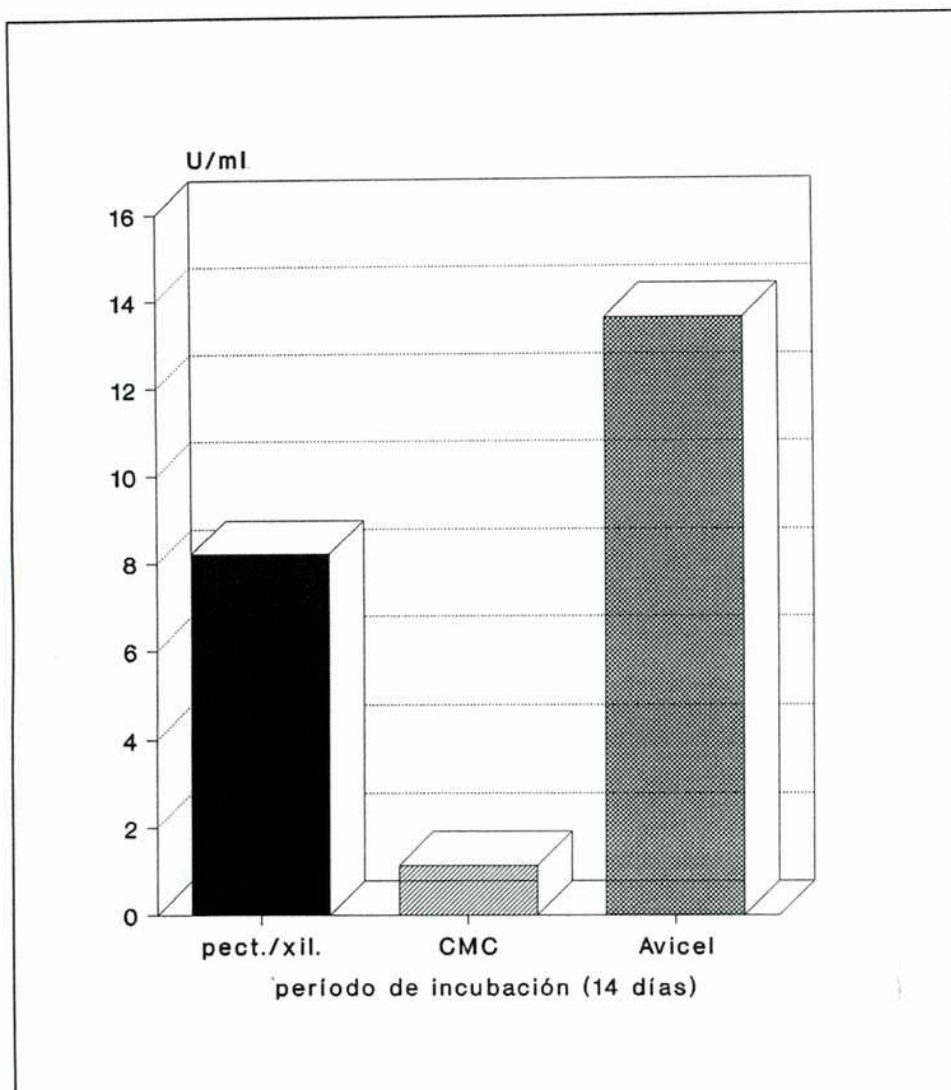


Fig. 33 Valoración de la actividad  $\beta$ -glucosidasa de *Cladorhinum foecundissimum* en el medio extracelular, en presencia de distintos inductores. El organismo se inoculó en el medio de cultivo especificado con los inductores pect./xilano, CMC y Avicel. En el día 14 se procesaron las muestras como se describe en la sección Materiales y Métodos y se determinó la actividad  $\beta$ -glucosidasa.

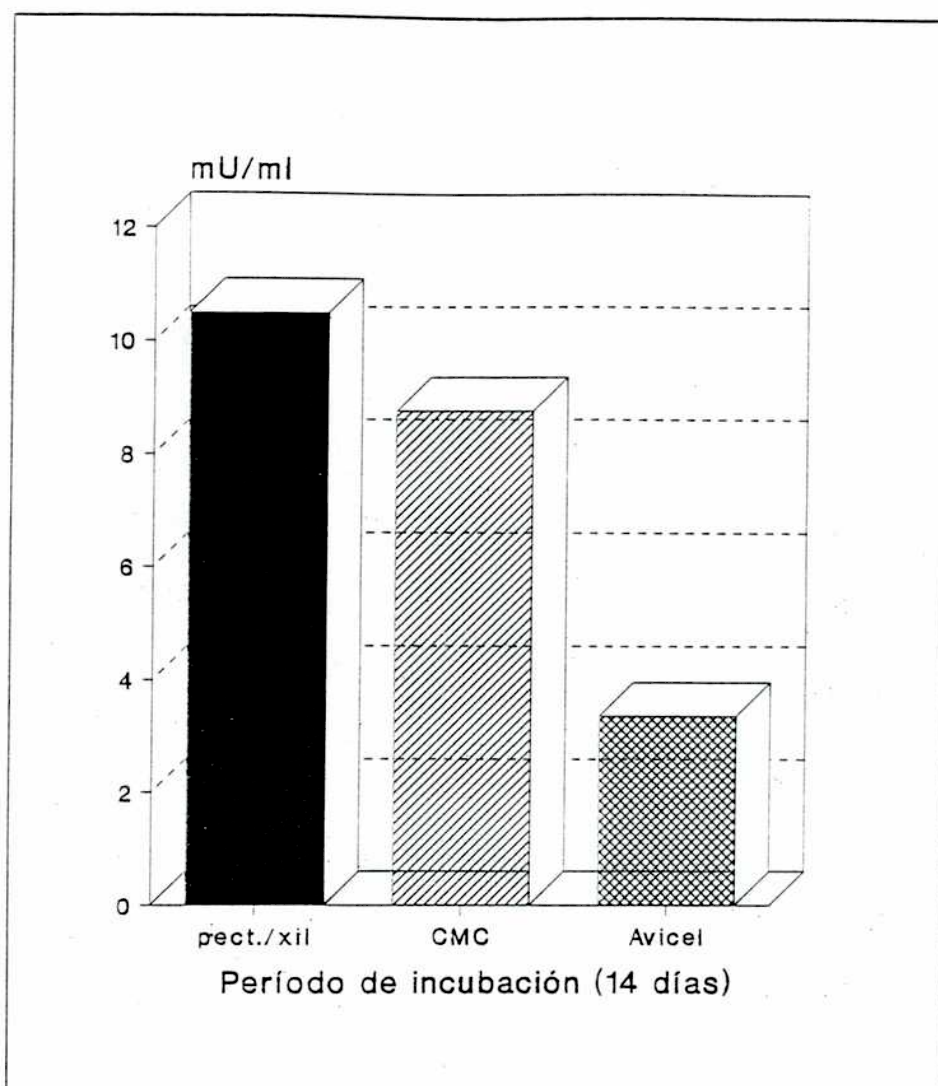


Fig 34. Valoración de la actividad endo 1-4  $\beta$ -glucanasa (CMCasa) de *Cladorhinum foecundissimum* en el medio extracelular, en presencia de distintos inductores. El organismo se inoculó en el medio de cultivo especificado con los inductores pect./xilano, CMC y avicel. En el día 14 se procesaron las muestras como se describe en la sección Materiales y Métodos y se determinó la actividad CMCasa.

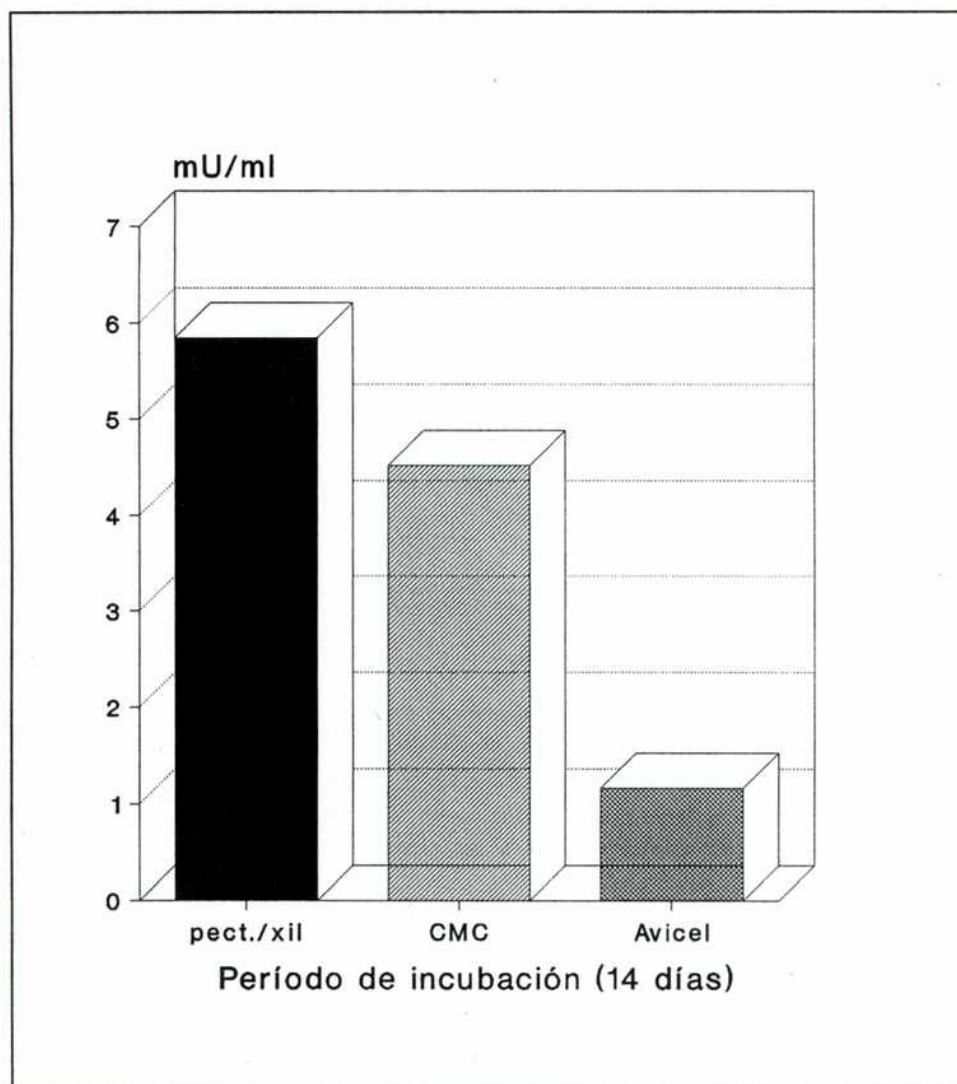


Fig. 35: Valoración de la actividad exo 1-4  $\beta$ -glucanasa (avicelasa) de *Cladorhinum foecundissimum* en el medio extracelular en presencia de distintos inductores. El organismo se inoculó en el medio de cultivo especificado con los inductores pect./xilano, CMC y Avicel. En el día 14 se procesaron las muestras como se describe en la sección Materiales y Métodos y se determinó la actividad avicelasa.

## 9. Niveles de AMPcíclico intracelular de *C. foecundissimum* y medición de las actividades de Fosfodiesterasa de AMP cíclico y Adenilato ciclasa

Los aislamientos no patogénicos de *C. foecundissimum* se caracterizaron por no formar esclerocios en cultivo sobre medio de APG pH 5.6 y sobre medio MMN. Por otra parte y como prueba adicional la incorporación de teofilina (metilxantina, inhibidora de la fosfodiesterasa de AMP cíclico) al medio, no produjo modificaciones morfológicas en este organismo en cultivo.

Con el propósito de estudiar algunos aspectos moleculares de un aislamiento no patogénico de *C. foecundissimum*, en comparación con el patogénico de *R. solani*, se midió el nivel de AMPcíclico endógeno en los extractos crudos micelianos obtenidos de los cultivos de este organismo en su fase de crecimiento cuando el peso seco alcanzó su máximo (1,31 mg/ ml). Consecutivamente se determinó la relación del nucleótido con las enzimas que lo sintetizan (adenilato ciclasa) y degradan (fosfodiesterasa de AMP cíclico) respectivamente.

Los valores obtenidos fueron :

AMPcíclico = 72,3 pmoles/mg proteína

Adenilato ciclasa = 7,63 pmoles de AMPc-H<sup>3</sup> producido/mg proteína/minuto

Fosfodiesterasa de AMP cíclico = 14 pmoles de AMPc-H<sup>3</sup> hidrolizado/mg de proteína/minuto

Comparativamente a los resultados obtenidos en este trabajo, para un aislamiento patogénico de *R. solani*, el nivel de nucleótido cíclico fue 45.4 % inferior y coincidió con una disminución cuantitativa en la actividad de la

adenilato ciclasa. La actividad específica de fosfodiesterasa de AMP cíclico fue similar para ambas especies estudiadas.

## 10. Evaluación de la supresión del "damping-off"

La evaluación de 3 ensayos realizada en el momento de floración del algodón, al cabo de 4-5 meses de desarrollo indicaron que los aislamientos de *C. foecundissimum* proveyeron protección contra el "damping-off" ocasionado por un aislamiento patogénico de *R. solani* AG-4.

El análisis combinado de variancia de los ensayos (Tabla 5) determinó la existencia de diferencia significativa entre los tratamientos. La comparación de las medias en el ensayo I, indicó que los tratamientos 1, 2 y 3 fueron significativamente diferentes a los restantes y que en los tratamientos 5 y 6 se manifestó una diferencia significativa en la reducción del damping-off con respecto a los tratamientos 4, 7 y 8.

El porcentaje de protección contra el ataque de *R. solani* AG-4 en plántulas colonizadas con los aislamientos de *C. foecundissimum* en este ensayo fue de 41,3 % en los tratamientos 5 y 6 .

En la Tabla 6 se observa que en el ensayo II, el damping-off de pre y post-emergencia fue significativamente superior en los tratamientos 4, 7 y 8. Sin embargo la comparación de medias indicó que el tratamiento 8 manifestó similitud con el tratamiento 6 en la reducción del damping-off. Por otra parte al igual que en el ensayo I, los tratamientos 5 y 6 presentaron diferencias significativas en el porcentaje de supervivencia de plántulas colonizadas con *C. foecundissimum* con respecto a los tratamientos 4, 7 y 8. Los tratamientos 1,2 y 3 fueron significativamente diferentes a los restantes.

El porcentaje de protección en este ensayo fue de 44,4% para el tratamiento 5 y 30,5 % para el tratamiento 6.

El "damping-off" de pre y post-emergencia en el ensayo III (Tabla 7), fue significativamente superior en los tratamientos 4 y 8. En los tratamientos 6 y 7, se observó un aumento en el porcentaje de supervivencia de las plántulas y en los tratamientos 5 y 6., la podredumbre radicular se redujo significativamente. Al igual que en los ensayos anteriores los tratamientos 1, 2 y 3 fueron significativamente diferentes a los restantes..

El porcentaje de protección en este caso . fue de 58,4 % para el tratamiento 5 y de 41,5 % para el tratamiento 6.

Luego de la finalización de los ensayos, se resembró en los mismos suelos y se observó que la germinación de las semillas de algodón fue normal en los suelos correspondientes a los tratamientos de inoculación con *C. foecundissimum*, mientras que la emergencia, en el caso de los tratamientos con suelo que había sido inoculado con *R. solani*, fue completamente afectada.

**Tabla 5: Evaluación de la supresión del "damping-off" en plantas de algodón colonizadas con *Cladorhinum foecundissimum* (Anova Ensayo I)**

**Variable 3: Supervivencia.**

**TABLA DE ANALISIS DE VARIANCIA**

	<b>Grados de Libertad</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>F</b>	<b>Prob.</b>
<b>Entre</b>	<b>7</b>	<b>201.778</b>	<b>28.825</b>	<b>83.856</b>	<b>0.0000</b>
<b>Dentro</b>	<b>64</b>	<b>22.000</b>	<b>0.344</b>		
<b>Total</b>	<b>71</b>	<b>223.778</b>			

**Coefficiente de Variación = 28.52%**

**Var. VARIABLE No. 3**

<b>2</b>	<b>Número</b>	<b>Suma</b>	<b>Promedio</b>	<b>DS</b>	<b>ES</b>
<b>1</b>	<b>9.00</b>	<b>36.000</b>	<b>4.000</b>	<b>0.00</b>	<b>0.20</b>
<b>2</b>	<b>9.00</b>	<b>36.000</b>	<b>4.000</b>	<b>0.00</b>	<b>0.20</b>
<b>3</b>	<b>9.00</b>	<b>36.000</b>	<b>4.000</b>	<b>0.00</b>	<b>0.20</b>
<b>4</b>	<b>9.00</b>	<b>4.000</b>	<b>0.444</b>	<b>1.01</b>	<b>0.20</b>
<b>5</b>	<b>9.00</b>	<b>19.000</b>	<b>2.111</b>	<b>0.93</b>	<b>0.20</b>
<b>6</b>	<b>9.00</b>	<b>17.000</b>	<b>1.889</b>	<b>0.93</b>	<b>0.20</b>
<b>7</b>	<b>9.00</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.00</b>	<b>0.20</b>

8	9.00	0.000	0.000	0.00	0.20
-----					
Total	72.00	148.000	2.056	1.78	0.21
Dentro				0.59	

**Función: Rango**

**Error del Cuadrado Medio = 0.3440**

**Error Grados de libertad = 64**

**No. de observaciones para calcular la media = 9**

**Test de diferencia significativa de Tukey.**

**$s_ = 0.1955$  para alfa = 0.05**

**x**

**Orden Original**

**Orden Rankeado**

<b>Media 1 = 4.000 A</b>	<b>Media 1 = 4.000 A</b>
<b>Media 2 = 4.000 A</b>	<b>Media 2 = 4.000 A</b>
<b>Media 3 = 4.000 A</b>	<b>Media 3 = 4.000 A</b>
<b>Media 4 = 0.4440 C</b>	<b>Media 5 = 2.111 B</b>
<b>Media 5 = 2.111 B</b>	<b>Media 6 = 1.889 B</b>
<b>Media 6 = 1.889 B</b>	<b>Media 7 = 0.4440 C</b>
<b>Media 7 = 0.000 C</b>	<b>Media 4 = 0.0000 C</b>
<b>Media 8 = 0.0000 C</b>	<b>Media 8 = 0.0000 C</b>



**Tabla 6: Evaluación de la supresión del "damping-off" en plantas de algodón colonizadas con *Cladorhinum foecundissimum* (Anova Ensayo II)**

**Variable 3: Supervivencia.**

**TABLA DE ANALISIS DE VARIANCIA**

	<b>Grados de Libertad</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>F</b>	<b>Prob.</b>
<b>Entre</b>	<b>7</b>	<b>204.444</b>	<b>29.206</b>	<b>87.619</b>	<b>0.0000</b>
<b>Dentro</b>	<b>64</b>	<b>21.333</b>	<b>0.333</b>		
<b>Total</b>	<b>71</b>	<b>225.778</b>			

**Coefficiente de Variación = 29.69%**

**Var. VARIABLE No. 3**

<b>2</b>	<b>Número</b>	<b>Suma</b>	<b>Promedio</b>	<b>DS</b>	<b>ES</b>
<b>1</b>	<b>9.00</b>	<b>36.000</b>	<b>4.000</b>	<b>0.00</b>	<b>0.19</b>
<b>2</b>	<b>9.00</b>	<b>36.000</b>	<b>4.000</b>	<b>0.00</b>	<b>0.19</b>
<b>3</b>	<b>9.00</b>	<b>36.000</b>	<b>4.000</b>	<b>0.00</b>	<b>0.19</b>
<b>4</b>	<b>9.00</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.00</b>	<b>0.19</b>
<b>5</b>	<b>9.00</b>	<b>16.000</b>	<b>1.778</b>	<b>0.67</b>	<b>0.19</b>
<b>6</b>	<b>9.00</b>	<b>11.000</b>	<b>1.222</b>	<b>1.20</b>	<b>0.19</b>
<b>7</b>	<b>9.00</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.00</b>	<b>0.19</b>

<b>8</b>	<b>9.00</b>	<b>5.000</b>	<b>0.556</b>	<b>0.88</b>	<b>0.19</b>
<b>Total</b>	<b>72.00</b>	<b>140.000</b>	<b>1.944</b>	<b>1.78</b>	<b>0.21</b>
<b>Dentro</b>				<b>0.58</b>	

**Función: Rango**

**Error del Cuadrado Medio = 0.3330**

**Error Grados de libertad = 64**

**No. de observaciones para calcular la media = 9**

**Test de diferencia significativa de Tukey.**

**$s_{\alpha} = 0.1924$  para alfa = 0.05**

**x**

<b>Orden Original</b>		<b>Orden Rankeado</b>	
<b>Media 1 = 4.000</b>	<b>A</b>	<b>Media 1 = 4.000</b>	<b>A</b>
<b>Media 2 = 4.000</b>	<b>A</b>	<b>Media 2 = 4.000</b>	<b>A</b>
<b>Media 3 = 4.000</b>	<b>A</b>	<b>Media 3 = 4.000</b>	<b>A</b>
<b>Media 4 = 0.0000</b>	<b>D</b>	<b>Media 5 = 1.778</b>	<b>B</b>
<b>Media 5 = 1.778</b>	<b>B</b>	<b>Media 6 = 1.222</b>	<b>BC</b>
<b>Media 6 = 1.222</b>	<b>BC</b>	<b>Media 7 = 0.5560</b>	<b>CD</b>
<b>Media 7 = 0.0000</b>	<b>D</b>	<b>Media 4 = 0.0000</b>	<b>D</b>
<b>Media 8 = 0.5560</b>	<b>CD</b>	<b>Media 8 = 0.0000</b>	<b>D</b>

**Tabla 7: Evaluación de la supresión del 'damping-off' en plantas de algodón colonizadas con *Cladorhinum foecundissimum* (Anova Ensayo III)**

**Variable 3: Supervivencia.**

**TABLA DE ANALISIS DE VARIAN CIA**

	<b>Grados de Libertad</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>F</b>	<b>Prob.</b>
<b>Entre</b>	<b>7</b>	<b>309.292</b>	<b>44.185</b>	<b>49.427</b>	<b>0.0000</b>
<b>Dentro</b>	<b>88</b>	<b>78.667</b>	<b>0.894</b>		
<b>Total</b>	<b>95</b>	<b>387.958</b>			

**Coefficiente de Variación = 31.74%**

**Var. VARIABLE No. 3**

<b>2</b>	<b>Número</b>	<b>Suma</b>	<b>Promedio</b>	<b>DS</b>	<b>ES</b>
<b>1</b>	<b>12.00</b>	<b>60.000</b>	<b>5.000</b>	<b>0.00</b>	<b>0.27</b>
<b>2</b>	<b>12.00</b>	<b>60.000</b>	<b>5.000</b>	<b>0.00</b>	<b>0.27</b>
<b>3</b>	<b>12.00</b>	<b>60.000</b>	<b>5.000</b>	<b>0.00</b>	<b>0.27</b>
<b>4</b>	<b>12.00</b>	<b>7.000</b>	<b>0.583</b>	<b>1.00</b>	<b>0.27</b>
<b>5</b>	<b>12.00</b>	<b>41.000</b>	<b>3.417</b>	<b>0.90</b>	<b>0.27</b>
<b>6</b>	<b>12.00</b>	<b>29.000</b>	<b>2.417</b>	<b>1.44</b>	<b>0.27</b>
<b>7</b>	<b>12.00</b>	<b>23.000</b>	<b>1.917</b>	<b>1.51</b>	<b>0.27</b>

<b>8</b>	<b>12.00</b>	<b>6.000</b>	<b>0.500</b>	<b>1.00</b>	<b>0.27</b>
<b>Total</b>	<b>96.00</b>	<b>286.000</b>	<b>2.979</b>	<b>2.02</b>	<b>0.21</b>
<b>Dentro</b>				<b>0.95</b>	

**Función: Rango**

**Error del Cuadrado Medio = 0.894**

**Error Grados de libertad = 88**

**No. de observaciones para calcular la media = 12**

**Test de diferencia significativa de Tukey.**

**$s_{\alpha} = 0.2729$  para alfa = 0.05**

**x**

<b>Orden Original</b>		<b>Orden Rankeado</b>	
<b>Media 1 = 5.000</b>	<b>A</b>	<b>Media 1 = 5.000</b>	<b>A</b>
<b>Media 2 = 5.000</b>	<b>A</b>	<b>Media 2 = 5.000</b>	<b>A</b>
<b>Media 3 = 5.000</b>	<b>A</b>	<b>Media 3 = 5.000</b>	<b>A</b>
<b>Media 4 = 0.583</b>	<b>D</b>	<b>Media 5 = 3.417</b>	<b>B</b>
<b>Media 5 = 3.417</b>	<b>B</b>	<b>Media 6 = 2.417</b>	<b>BC</b>
<b>Media 6 = 2.417</b>	<b>BC</b>	<b>Media 7 = 1.917</b>	<b>C</b>
<b>Media 7 = 1.917</b>	<b>C</b>	<b>Media 4 = 0.583</b>	<b>D</b>
<b>Media 8 = 0.5000</b>	<b>D</b>	<b>Media 8 = 0.500</b>	<b>D</b>

Los ensayos realizados indicaron que *C. foecundissimum* es un antagonista de *R. solani* en el suelo, en las condiciones establecidas.

El aislamiento avirulento de *C. foecundissimum* no produjo sustancias antibióticas ni ejerció hiperparasitismo sobre el patógeno *R. solani*.

El examen microscópico de los organismos contactados determinó la ausencia de interacción hifal. En cultivos duales "in vitro", con desarrollo de ambos aislamientos sobre agar-agua o APG pH 5.6, el crecimiento de las colonias se detuvo en el lugar del encuentro, pero no se observó efecto adverso sobre las hifas.

Según Cook y Baker, 1983 ciertos grupos de hongos son candidatos especialmente promisorios para ser empleados como agentes potenciales de biocontrol. Aislamientos de los saprófitos *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Penicillium* y *Aspergillus* se caracterizan por ser los primeros colonizadores de suelos pasteurizados, fumigados o desinfectados con calor y se destacan por ser fácilmente aislables del suelo, crecer sobre una gran variedad de medios de cultivos, producir abundantes conidios, colonizar y atacar hongos fitopatógenos en cultivo y en suelos tratados. Sin embargo, Lewis y Papavizas (1988), y los mismos autores (1991), consideran que gran parte de la microflora del suelo, con potencialidad biocontroladora, es ignorada por dificultades de identificación, de esporulación o estrictos requerimientos nutricionales. Para estos autores los géneros *Cladorhinum*, *Dendrostibella*, *Coniothyrium* etc., entre otros normalmente no aislables de diluciones de suelo, se manifiestan como eficaces controladores del "damping-off", causado por *R. solani* en remolacha azucarera y algodón. El crecimiento de *R. solani*, según estos autores puede ser inhibido en un rango de 50-70% por la acción de estos nuevos agentes de biocontrol. Estas observaciones son coincidentes con el registro realizado por Domsch y Gams (1968), sobre las modificaciones

ejercidas en la microflora patógena del suelo por acción de determinados antagonistas, tales como *C. foecundissimum* y el efecto de los mismos en una sucesión tradicional de cultivos.

El control de un hongo fitopatógeno puede llevarse a cabo por diferentes vías: Destrucción biológica del patógeno, formación de barrera protectora en el hospedante, competencia por el mismo sitio de infección o resistencia inducida en el hospedante.

El análisis de los ensayos realizados indica que en este caso el control del patógeno *R. solani* por el no patogénico *C. foecundissimum* estuvo probablemente mediado por el hospedante, a través de uno o más mecanismos relativamente no específicos. De manera similar Ichievich-Auster et al.(1985a) informan sobre la existencia de un mecanismo de protección inducido en plántulas de algodón, rabanito y trigo contra *R. solani* a través de un aislamiento avirulento del mismo género. Los autores concluyen que en este caso el fenómeno de protección se manifiesta cuando las plántulas se desarrollan en suelo colonizado con el aislamiento no patogénico y son luego transferidas a suelo infestado con el patógeno.

Los resultados de los exámenes microscópicos y de los cultivos de raíces colonizadas indican que el aislamiento no patogénico en los tratamientos 2, 3, 5 y 6 invadió los espacios intercelulares y los pelos radiculares del hospedante y la protección inducida por *C. foecundissimum* se manifestó cuando las plántulas de algodón con un porcentaje de colonización intra-radicular de aproximadamente 20 % del aislamiento no patogénico, se transfirieron a suelo infestado con el patógeno *R. solani*. Con resultados similares Burpee y Goulty (1984) y Cardoso y Echandi ( 1987 b) informan sobre la posibilidad de protección de plántulas en almácigos con un aislamiento binucleado de

*Rhizoctonia* contra uno virulento de *R. solani*. No obstante Cardoso y Echandi ( 1987 a ) observaron que aunque este aislamiento binucleado de *Rhizoctonia* colonizó la superficie de las raíces y de los tallos , no penetró en los tallos , lo que indicaría la existencia de un mecanismo de protección diferente al observado en este caso con los aislamientos de *C. foecundissimum*.

Dewan y Sivasithamparam (1988) determinaron que un hongo rojo estéril puede colonizar las células corticales de la raíz y proteger plantas de trigo y de "rye-grass" de la infección causada por *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* cuando ambos hongos fueron inoculados simultáneamente en el suelo .

En estos ensayos por el contrario, cuando el agente de biocontrol se incorporó al suelo simultáneamente con el patógeno (tratamientos 6 y 7 ) no se obtuvo un porcentaje de protección relevante y en algunos casos el "damping-off" de pre y post-emergencia fue similar al obtenido en los tratamientos en que el suelo se inoculó solamente el patógeno (tratamiento 4).

La recuperación del aislamiento no patogénico de los suelos de almácigo de los tratamientos que fueron inoculados con este aislamiento indicó que *C. foecundissimum* puede sobrevivir en el suelo al menos 5 meses (período de duración de los ensayos ), en las condiciones ambientales descritas. Coincidentemente Renwick et al, 1991 asumen que para llevar a cabo un efectivo control de los patógenos de suelo, los antagonistas deben ser activos colonizadores. del suelo o de las semillas. Sin embargo, según Campbell (1990) algunas cepas biocontroladoras pueden colonizar mejor un hospedante que otros debido a características inherentes al aislamiento y esta particularidad podría plantearse como un problema o como una ventaja.

Los aislamientos de *R. solani* y *C. foecundissimum* se reaislaron también de los suelos correspondientes a los tratamientos de coinfección con el patógeno y el avirulento al cabo de aproximadamente 5 meses (cosecha y finalización de

los ensayos) y aún luego de soportar condiciones de stress hídrico y altas temperaturas. Por el contrario, Castanho y Butler (1978) observaron que un aislamiento hipovirulento de *R. solani* (*Rhizoctonia* decline) con actividad controladora sobre aislamientos virulentos de *R. solani* no se recuperaba de muestreos de suelo al cabo de un mes de su incorporación al mismo.

La colonización radicular por *C. foecundissimum* determinó un incremento en la altura de las plantas en un rango de 37,3 a 44,5% (Fig. 36).

El mecanismo por el cual algunos microorganismos determinan un incremento en la altura de las plantas no está aún dilucidado. Hasta el presente la mayor información sobre este tipo de efecto se refiere a las asociaciones micorrícicas. Las hifas de estos hongos aumentan considerablemente la superficie de los pelos radiculares y consecuentemente la absorción de agua y otros solutos del suelo. (Sneh et al., 1986)

La estimulación del desarrollo de plantas por acción de otros hongos ha sido mencionada por Baker et al. (1984) quienes informan que aislamientos del género *Trichoderma* pueden incidir en un efecto de este tipo aunque según Baker y Cook, 1974 este saprófito coloniza preferentemente el suelo y no las raíces.

Con un comportamiento similar al observado para *C. foecundissimum*, Dewan y Sivasithamparam (1989) encuentran que un hongo septado estéril puede colonizar endofíticamente raíces de trigo y "rye-grass", determinar un incremento en la altura de las plantas y protegerlas del ataque de *G. graminis*. y Godman y Burpee, 1991, informan sobre la influencia en la disminución de la intensidad de la enfermedad causada por *R. solani* y *Sclerotinia sclerotiorum* a través de un aislamiento emparentado con el endofítico *Aureobasidium pullulans* que colonizaría la superficie de las hojas de *Agrostis palustris* Huds.





Fig.36: Supervivencia e incremento en la altura de plantas de algodón. Las inscripciones 81/8 y 81/32 indican a los tratamientos correspondientes a plantas colonizadas con los aislamientos 8 y 32 de *Cladorhinum foecundissimum* y repicadas a suelo infectado con el aislamiento 81 de *Rhizoctonia solani* AG-4. Las plantas fueron transferidas a suelo infectado con el patógeno a los 5 y 30 días de desarrollo en suelo colonizado con el no patogénico.

## 11. Evaluación de los mecanismos relacionados con la supresión del "damping-off"

### 11. a. Movilización del fósforo soluble del suelo por acción de *C. foecundissimum*

La concentración de fósforo en las plantas correspondientes al tratamiento testigo ( $1.6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MS}$ ) del ensayo I fue inferior a la detectada en las desarrolladas en los suelos inoculados con *C. foecundissimum* ( $2.0 \cdot \text{g}^{-1} \text{ MS}$ ). El tenor de este elemento determinado en las plantas de los respectivos tratamientos de este ensayo, respecto a los niveles normales (Chapman y Pratt, 1961; Malavolta, 1987), podría deberse a la baja concentración de fósforo en el suelo empleado (Tabla 8).

**Tabla 8 : Determinación de la concentración de fósforo en algodón mediante análisis foliar**

Tratamientos	P mg/g de plantas
1	1.6
2	2.0
3	2.0
4	ND *-
5	2.0
6	2.0

\* En este tratamiento las semillas no germinaron

- 1) Testigo: Suelo estéril + semillas de algodón
- 2) Suelo estéril + inóculo de *C. foecundissimum* (aislamiento 8) + semillas de algodón
- 3) Suelo estéril + inóculo de *C. foecundissimum* (aislamiento 32) + semillas de algodón
- 4) Suelo estéril + inóculo de *R solani* (aislamiento 81) + semillas de algodón
- 5) Suelo estéril + inóculo de *R solani* (aislamiento 81) + plántulas de algodón previamente desarrolladas durante 5 días en suelo infectado con *C. foecundissimum* (aisl. 8)
- 6) Suelo estéril + inóculo de *R. solani* (aislamiento 81) + plántulas de algodón previamente desarrolladas durante 5 días en suelo infectado con *C. foecundissimum* (aisl. 32)

Estos resultados indicarían la acción de *C. foecundissimum* como solubilizador de fósforo del suelo. Hasta el presente, de acuerdo con la bibliografía existente, se desconocía esta característica del saprófito mencionado, sin embargo en ensayos previos, realizados en suelos similares, con un nivel bajo de fósforo asimilable ( $4,9 \text{ mg. kg}^{-1}$  suelo), sobre lino, se determinó un incremento del 23.3 % en la concentración de fósforo respecto del testigo.

El empleo de  $^{32}\text{P}$  como marcador en el ensayo II, permitió determinar una concentración de fósforo isotópicamente intercambiable (valor Larsen) 28,73 % mayor en las plantas desarrolladas en suelo colonizado con el endófito (Tabla 9).

Aunque en plántulas de 20 días la diferencia de MS / maceta entre ambos tratamientos no fue significativa, la utilización de un marcador isotópico permitió reconocer un mayor contenido de fósforo, probablemente por un

incremento en la movilización de este elemento en el suelo colonizado con el biocontrolador.

Comparativamente, si bien Stribley et al. (1980), consideran que la ausencia de micorrización puede indicar menor eficiencia en la utilización del fósforo para la producción de materia seca, Koide (1993) sugiere que la absorción de fósforo es independiente de la producción de M S. Hartley (1969) informa que el 90% de los fosfatos absorbidos permanecen en la pared fúngica, sin mezclarse con los fosfatos existentes y son liberados gradualmente en la planta. Bolan et al (1984) indican que algunos fosfastos del suelo son solamente accesibles a través de  $P^{32}$  o de ciertas asociaciones micorrícicas .

De acuerdo con los resultados de los ensayos, posiblemente la significativa reducción en la aparición del "damping-off" en las plantas desarrolladas en suelo colonizado con *C. foecundissimum* podría deberse a una mayor incorporación de fósforo respecto del testigo, antes del ataque del patógeno. Similar disminución de la incidencia de *Gaeumannomyces graminis* ("pietin") obtuvieron Graham and Menge (1982) con la utilización de micorrizas vesículo-arbusculares en plantas de trigo. En este caso las micorrizas parecieron contrarrestar el efecto del "pietin" en plantas que crecieron en suelos deficientes en fósforo.

Por otra parte el incremento en el crecimiento y altura de las plantas colonizadas con *C. foecundissimum* podría ser resultado, de acuerdo con lo observado por Grove y Le Tacon (1993) con la acción de micorrizas vesículo-arbusculares, de una mayor eficiencia en la adquisición de nutrientes y particularmente de aquellos poco móviles en el suelo. Este mismo autor sugiere también que cuando la disponibilidad es adecuada, por el contrario, el crecimiento puede ser disminuido con el agregado de nutrientes.

Según Pearson y Read (1975), los endofitos ericoides requieren, para su cultivo, un pH óptimo considerablemente superior al normal del suelo de la comunidad vegetal, aproximadamente 6.6 que es, sin embargo similar al pH intracelular de las raíces. No obstante, se desconoce la extensión que tiene el pH intracelular a la rizosfera y como influye en la colonización del endófito en esa área. Esto estaría en coincidencia con la ausencia de una eficiente colonización del suelo en los ensayos con *C. foecundissimum*, realizados sobre una mezcla de suelo a la que se le incorporó turba y consecuentemente disminuyó su pH.

Recientes estudios (Read, 1993), indican que los hongos micorrícicos ericoides son capaces de romper las estructuras anulares fenólicas de la lignina así como asimilar la principal unidad estructural de la quitina o la quitina pura. y un rango de compuestos fenólicos simples y compuestos. Tales atributos les permiten acceder a las fuentes de carbono y disponer de las de nitrógeno orgánico y fósforo que le son, de otra manera inaccesibles.

Debe también considerarse que en algunos hospedantes no micorrizables, determinados factores pueden ser conducentes de la imposibilidad de la micorrización, como la acumulación de fenoles y consecuente muerte celular del tejido fúngico (Koide1993).

**Tabla 9 : Movilización del fósforo soluble del suelo por acción de *C. foecundissimum***

<b>Tratam</b>	<b>MS/ maceta</b>	$\bar{X}$	<b>mgP/g MS</b>	$\bar{X}$	<b>Valor L</b>	$\bar{X}$
<b>Testigo</b>	<b>0,5859</b>		<b>3,44</b>		<b>27,05</b>	
	<b>0,4800</b>		<b>4,21</b>		<b>29,49</b>	
	<b>0,5700</b>		<b>3,61</b>		<b>27,52</b>	
	<b>0,5428</b>	<b>0,5447</b>	<b>3,74</b>	<b>3,75</b>	<b>29,84</b>	<b>28,47</b>
<b>Biocont.</b>	<b>0,5400</b>		<b>3,98</b>		<b>35,07</b>	
	<b>0,5745</b>		<b>4,20</b>		<b>37,69</b>	
	<b>0,5636</b>		<b>3,89</b>		<b>35,69</b>	
	<b>0,4928</b>	<b>0,5427</b>	<b>3,98</b>	<b>4,01</b>	<b>38,17</b>	<b>36,65</b>

### 11. b. Fenoles en plántulas de algodón colonizadas con *C. foecundissimum*.

La estimación cuantitativa de los fenoles totales, utilizando el método I indicó que, en plantas de 14 días desarrolladas en suelo colonizado con el endófito la concentración fue de 0,80 mg de ácido clorogénico/ gramo de tejido fresco, en tanto que en las correspondientes al testigo se detectaron 0,40 mg de ácido clorogénico/ gramo de tejido fresco.

Con el agregado del reactivo de Folin al extracto, de acuerdo con el método II, la concentración de fenoles detectada en las muestras de 14 días, colonizadas con el endófito, fue de 1,48 mg de ácido clorogénico /gramo de tejido fresco mientras que en las correspondientes al tratamiento testigo se detectaron 0,80 mg de ácido clorogénico/gramo de tejido fresco. Es decir que, independientemente del método utilizado se registró un mayor contenido de fenoles en las plantas colonizadas con el endófito al cabo de 14 días de desarrollo.

A través de numerosas experiencias se ha llegado a la conclusión que existe correlación entre el grado de resistencia de las plantas y el nivel de fenoles (Goodman ,1967)

Una de las primeras respuestas del tejido vegetal a la infección por microorganismos es un gran incremento en la síntesis de determinados compuestos fenólicos. Esta es presumiblemente una respuesta de protección a la invasión aunque no de prevención al establecimiento del organismo en el tejido hospedante (Harborne, 1973). Pridham (1960) alude a los taninos y al ácido clorogénico como conocidos factores de resistencia a las enfermedades.

El mismo autor considera que la invasión de los tejidos vegetales por algunos microorganismos puede determinar la liberación de glicosidasas por rotura de las células y estas enzimas liberar fenoles u otros compuestos tóxicos para el invasor y limitar así la infección.

Coincidentemente con los resultados aquí obtenidos Matta et al.(1969), establecen que el contenido de fenoles, como indicador de la resistencia a enfermedades vasculares, en combinaciones compatibles e incompatibles, se caracteriza por un marcado incremento postinfeccional dentro de los primeros días posteriores a la inoculación. Tales incrementos parecen ser particularmente significativos sobre todo si se considera la localización de estos compuestos en los tejidos que rodean los vasos o en las células reservorio de los mismos.

Matta (1981) indica que la predisposición de ciertos patógenos a atacar determinados órganos de la planta, puede ser prevenida por la preinoculación con hongos o bacterias no patogénicos. En estos casos los invasores avirulentos pueden inducir resistencia por la estimulación de la formación de barreras defensivas que preceden a la infección con patógenos, tales como los fenoles o de sustancias antimicrobianas, como tilosas o gomas en los vasos conductores. Por el contrario, en el caso de agentes bioprotectores de localización externa, su preinoculación no induce una acumulación de compuestos fenólicos de acción inhibitoria (Sneh et al., 1989).

Aunque es aún incierto el efecto antibiótico de los fenoles, la correlación con los resultados obtenidos sugiere que la resistencia adquirida en las plantas de algodón podría depender de un incremento de las sustancias fenólicas que actuarían: a) inhibiendo al patógeno directamente o por medio de sus productos de oxidación y/o b) incitando cambios metabólicos más complejos tales como acumulación de sustancias de crecimiento (auxinas) o formando barreras



defensivas en los vasos xilemáticos (tilosas) que los volverían menos accesible al ataque enzimático por los patógenos.

Goodman , ya en 1967 sugiere que los fenoles y sus productos de oxidación desempeñan un importante papel en el metabolismo de las auxinas. Aunque en este estudio no se hicieron determinaciones de los reguladores de crecimiento en las plantas colonizadas con *C. foecundissimum*, podría asociarse el incremento en la altura de estas plantas, en estado adulto, registrado en los ensayos, con una modificación en el metabolismo de los mismos y la síntesis de ciertos reguladores de crecimiento.

## **CONCLUSIONES**

De los resultados de este trabajo de tesis se pueden inferir las siguientes conclusiones :

1. Los aislamientos del complejo *Rhizoctonia* en las áreas relevadas de la Argentina tuvieron una distribución coincidente con una mayor densidad de siembra de cultivos susceptibles al "damping-off" de pre y post-emergencia y/o podredumbre radicular. De estos aislamientos el mayor porcentaje detectado en tejidos vegetales y en suelos bajo cultivo correspondió a *R. solani* AG-4.

La ausencia de aislamientos en zonas no cultivadas permite inferir que la variabilidad del inóculo está relacionada con la introducción de los cultivos

2. Los aislamientos del género *Rhizoctonia* detectados en las zonas relevadas correspondieron a *R. solani* AG-4, AG-2 y AG-3; a *R. zae* WAG Z 497 y/o 504 y a especies binucleadas de AG-A y AG-D.

Las reacciones de anastomosis hifal presentaron: 1.) Atracción hifal. 2.) Contacto entre las hifas oponentes. 3.) Cesación del crecimiento. 4.) Disolución de la pared celular en el punto de contacto. 5.) Conexión de protoplasmas y muerte de las células adyacentes al punto de contacto

Los aislamientos AG-4 provenientes de distintas regiones geográficas presentaron variación en la disposición de las bandas de las proteínas solubles en electroforesis en geles de poliacrilamida aunque las bandas de referencia "m" y "h" fueron constantes.

3. La mayoría de los aislamientos de suelo manifestaron alto grado de virulencia lo que permite inferir la potencialidad patogénica de este complejo como habitante de suelo.

Los factores indicadores de la interacción hospedante-patógeno en las etapas iniciales de la infección fueron: 1) Contacto de las hifas de *R. solani* con el hospedante. 2) Ramificación del micelio sobre la superficie de la raíz y tendencia de las hifas a seguir las líneas de unión de las paredes anticlinales de las células hospedantes subyacentes. 3) Formación de los puntos de infección y 4) Aparición de las lesiones o regiones amarronadas.

La relación fijación hifal-crecimiento direccional respondió a un tropismo de contacto inducido por la interacción entre la superficie hospedante y el aislamiento fúngico.

4. El aislamiento patogénico de *R. solani* empleado, en las condiciones de los ensayos, produjo y liberó celulasas en el medio de cultivo líquido, con las fuentes de carbono utilizadas como inductores. Las  $\beta$ -glucosidasas se produjeron antes que las carboximetilcelulasas y avicelasas en el cultivo de este patógeno. La producción de celulasas fue superior en la fase de autólisis de *R. solani*.

La escasa actividad celulásica permite inferir que las enzimas celulolíticas no son el principal componente de la patogénesis en el aislamiento de *R. solani* estudiado.

5. *Cladorhinum foecundissimum* fue aislado de muestras de suelo de alfalfa y agropiro compartiendo el mismo nicho ecológico que los aislamientos de *Rhizoctonia*.

En ensayos bajo condiciones controladas esta especie manifestó un comportamiento endofítico-simbionte, invadiendo los espacios intercelulares en las raíces de plantas de algodón. El micelio formó apresorios esporádicos y las hifas crecieron intercelularmente rodeando los elementos xilemáticos. Las

plantas colonizadas con *Cladorhinum* incrementaron su altura en un rango de 37,3 a 44,5% con respecto al control.

6. El aislamiento de *C. foecundissimum* (no patogénico) empleado, en las condiciones de los ensayos, produjo y liberó celulasas en el medio de cultivo líquido, con las fuentes de carbono utilizadas como inductor. Al igual que para *R. solani* la producción de celulasas fue mayor en la fase de autólisis. Las carboximetilcelulasas y avicelulasas se produjeron antes que las  $\beta$ -glucosidasas en el cultivo de este endófito. La capacidad de utilizar la celulosa por parte de esta especie, probablemente tiene relación con su capacidad saprofítica y su independencia ecológica del hospedante.

Por lo tanto se puede inferir que la rápida producción de enzimas celulolíticas y sus altos niveles estarían más relacionados con la capacidad de penetración que con la patogénesis, como lo demuestran los resultados obtenidos con el aislamiento de *R. solani* empleado.

7. *C. foecundissimum* ejerció un efecto protector en plántulas de algodón en los ensayos realizados para evaluar la supresión del "damping-off" causado por el patógeno *R. solani*. El fenómeno de protección se manifestó cuando las plántulas se desarrollaron en suelo colonizado con el aislamiento no patogénico y fueron luego transferidas a suelo infestado con el patógeno. La recuperación del aislamiento no patogénico de los suelos de almácigo indicó que *C. foecundissimum* puede sobrevivir en el suelo al menos 5 meses, en las condiciones ambientales descritas.

8. De los resultados obtenidos, en cuanto a los niveles de AMP cíclico endógeno y de las enzimas de su metabolismo, se puede inferir que en *R.*

*solani* existe una relación entre morfogénesis (formación de esclerocios), patogénesis y niveles elevados del nucleótido cíclico. Comparativamente con el aislamiento no patogénico de *C.foecundissimum*, los niveles hallados de AMP cíclico fueron menores que los determinados en *R. solani*. Esta concentración diferencial de AMP cíclico se explica, en principio por una diferencia en la actividad de adenilato ciclasa de ambas especies.-

9. La utilización de un marcador isotópico permitió reconocer un mayor contenido de fósforo en el suelo colonizado on el biocontrolador.

La significativa reducción en la aparición del "damping-off" en la plantas desarrolladas en suelo colonizado con *C. foecundissimum* podría deberse a una mayor incorporación de fósforo, respecto del testigo antes del ataque del patógeno.

10. La concentración de fenoles en plántulas de 14 días, colonizadas con *C. foecundissimum* fue 50 % mayor respecto del testigo.

Existe correlación entre la respuesta de protección por *C. foecundissimum* al "damping-off" causado por *R. solani* y el nivel de fenoles.

El colonizador avirulento puede inducir resistencia por la estimulación de la formación de barreras defensivas (fenoles o de sustancias antimicrobianas) que preceden a la infección con patógenos.

Las sustancias fenólicas inhibirían al patógeno directamente o por medio de sus productos de oxidación y /o provocarían cambios metabólicos más complejos tales como acumulación de sustancias de crecimiento (auxinas) o formando barreras defensivas en los vasos xilemáticos. (tilosas) que los volverían menos accesible al ataque enzimático por los patógenos.

## ABREVIATURAS

AC: Adenilato ciclasa

AG: Grupo de anstomosis

AMPc: 3':5' monofosfato cíclico de adenosina

A-PDE: Fosfodiesterasa de AMP cíclico

APG: Agar papa glucosado

ATCC: American Type Culture Collection

CAB: International Mycological Institute

CMC: Carboximetilcelulosa

CMCasa: Carboximetilcelulasa

EDTA: Acido Etilendiamino tetracético

EGTA: Acido Etilenglicol-Bis ( $\beta$  aminoetileter) tetracético.

FAA: Formalina-ácido acético-alcohol

HEPES: Acido (N-[2-hidroetil] piperazina-N'- 2- etanosulfónico)

MMN: Medio Mínimo Nutritivo

mU: Miliunidades

SDS : Dodecil sulfato de sodio

TCA: Acido tricloroacético

TRIS: 2-amino-(hidrometil)1,3 propanodiol

TEMED: N, N, N'N'Tetrametiletildiamina

U: Unidades

WAG: Grupo de anastomosis del género *Waitea*

YEDA: Extracto de Levadura, dextrosa y agar

## **BIBLIOGRAFIA**



**Agrios, G. N.** 1969. Plant Pathology. Academic Press. Inc. N. York y Londres. 629 p.

**Albersheim, P.; Jones, T. M. y English, Patricia D.** 1969. Biochemistry of the cell wall in relation to infective processes. Ann. Rev. Phytopathol. 7:171-194.

**Alconada, Teresa.** 1993. Enzimas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* involucradas en la degradación de la pared celular de las plantas superiores. Tesis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. 231p.

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

**Baird, R. E.; Bell, D. K. ; Summer, D. R.; Mullinix, B. G. and Culbreath, A. K.** 1993. Survival of *Rhizoctonia solani* AG-4 in residual peanut shells in soil. Plant Disease 77 :973-975.

**Baker, K.** 1970. Types of *Rhizoctonia* diseases and their occurrence. In *Rhizoctonia solani*: Biology and Pathology. Parmeter, Jr. Berkeley. pp 125-148. University of California Press. Los Angeles. Ca.

**Baker, K. y Cook, J.** 1974. Biological control of plant pathogens. W.H. Freeman and Company. 433 p.

**Baker, R.; Elad, Y. y Chet, I.** 1984. The controlled experiment in the scientific method with special emphasis on biological control. *Phytopathology*, **74**:1019-1021.

**Bandoni, R. J.** 1971. Safranin O as a rapid nuclear stain for fungi. *Mycologia* **71** :873-874.

**Bateman, D. F.** 1964. Cellulase and *Rhizoctonia* disease of bean. *Phytopathology* **54** : 1372-1377.

**Bateman, D. F.** 1969. Some characteristics of the cellulase system produced by *Sclerotium rolfii* Sacc.. *Phytopathology* **59** :37-42.

**Bateman, D. F.** 1970. Pathogenesis and disease **In** *Rhizoctonia solani*, Biology and Pathology. Ed. by Parmeter, J. R. Jr., pp 161-171. University of California Press. Los Angeles. Ca..

**Bateman, D. F.** 1978 The dynamic nature of disease. **In** Plant Disease - An Advance Treatise. Vol III Horsfall J. y Cowling E. Capítulo **3**: 53-83. Academic Press. N. Y.

**Béguin, P.** 1990 Molecular biology of cellulose degradation. *Ann.. Rev. Microbiol.* **44**:219-248.

**Benson, D. M. and Baker, R.** 1974. Epidemiology of *Rhizoctonia solani* preemergence damping-off of radish: Inoculum potential and disease potential interaction. *Phytopathology* **64**: 957-962.

**Black, C. A.** 1965. Methods of soil analysis. Agronomy 9 (Part I, II) Am. Soc. Agr., Inc., Publisher, Madison, Wisconsin, USA.

**Bolan, N.S., Robson, A.D., Barrow, N. J. and Aylmore, L. A. G.** 1984. Specific activity of phosphorus in mycorrhizal and non-mycorrhizal plants in relation to the availability of phosphorus to plants. Soil Biol. Biochem. 16 :299-304.

**Boosalis, M. C. y Scharen, A. L.** 1959. Methods for microscopic detection of *Aphanomyces euteiches* and *Rhizoctonia solani* associated with plant debris. Phytopathology 49:192-198.

**Boothby, D. y N.O., Magreola,** 1984 Production of polysaccharide degrading enzymes by *Cochliobolus sativus* and *Fusarium culmorum* grown in liquid culture. Trans. Br. mycol Soc. 83 :275-280.

**Bradford, M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72:248-254.

**Brandt, W. H.** 1964. Morphogenesis in *Verticillium*: effect of light and ultraviolet radiation on microsclerotia and melanin. Can. J. Botany. 42:1017-1023.

**Bray, R. H. y Kurtz, L. T.** 1945. Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soils. Soil Sci. 59:39-45.

**Burpee, L. L y Goulthy, L.G.** 1984. Suppression of brown patch disease of creeping bentgrass by isolates of nonpathogenic *Rhizoctonia* spp. *Phytopathology* 74:692-694.

**Burpee, L and Martin, B.** 1992. Biology of *Rhizoctonia* species associated with turfgrasses. *Plant Disease* 76: 112-117.

**Butler, E. E.** 1980. A method for long time culture storage of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70 : 820-821.

**Butler, E. E. and Bolkan, H.** 1973. A medium for heterokaryon formation in *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 63: 540-543.

**Campbell, R.** 1990. Biological control of soil-borne diseases. **In** Proceedings of Brighton Crop Protection Conference. Pests and Diseases : 607-615.

**Camporota, P.** 1982. Recherches sur l'écologie des champignons parasites dans le sol. XVII. - Mesure du potentiel infectieux de sols et substrats infestés par *Rhizoctonia solani* Kühn, agent de fontes de semis. *Agronomie* 2 :437-442.

**Cantore, María Leonor; Galvagno, M. A. y Passeron, Susana.** 1980. Variations in the levels of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate and in the activities of adenylate cyclase and cyclic adenosine 3':5' monophosphate phosphodiesterase during aerobic morphogenesis of *Mucor rouxii*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 199. :312-320.

**Cardoso, J.E. y Echandi, E.** 1987a. Biological control of *Rhizoctonia* root rot of snap bean with binucleate *Rhizoctonia*-like fungi. *Plant Disease*. 71:167-170.

**Cardoso, J.E. y Echandi, E.** 1987b. Nature of protection of bean seedlings from *Rhizoctonia* root rot by a binucleate *Rhizoctonia*-like fungus. *Phytopathology*. 77:1548-1551.

**Carroll, G.** 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: From latent pathogens to mutualistic symbiont. *Ecology* 69 : 2-9.

**Castanho, B. E. y Butler, E. E.** 1978. *Rhizoctonia* decline: studies on hypovirulence and potential use in biological control. *Phytopathology* 68:1511-1514.

**Chapman, H. D. y Pratt, D.** 1961. *Methods of analysis for soil plants and waters*. University of California. Div. Agric. Sci. Berkeley . 309 p.

**Chet, I y Henis, Y.** 1975. Sclerotial morphogenesis in fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.* 13 :169-192.

**Chi, C.C. y Childers, W. R.** 1964. Penetration and infection in alfalfa and red clover by *Pellicularia filamentosa*. *Phytopathology* 54:750-754.

**Christou, T.** 1962. Penetration and host-parasite relationships of the *Rhizoctonia solani* in the bean plant. *Phytopathology* 52:381-389.

**Clarke, A. E. y Knox, R. B.** 1978 . Cell recognition in flowering plants. Q. Rev. Biol. **53**:3-28. citado por **Sequeira, L.** 1978. Defenses triggered by the invader: Recognition and compatibility phenomena. In Plant Disease - An Advance Treatise. Vol V. Horsfall J. y Cowling E. Capítulo **10**:179-200. Academic Press. N. Y.

**Colhoun, J.** 1979 Predisposition by the environment. In Plant Disease - An Advance Treatise. Vol III. Horsfall J. y Cowling E. Capítulo 4: 75-96. Academic Press. N. Y.

**Cook, R. J. y Baker, K.** 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. The American Phytopathological Society. St. Paul Minnesota. 539 p.

**Cowan,, I. R.** 1977. citado por **Koide, R.,** 1993. Physiology of the mycorrhizal plant. In Advances in plant pathology Ed. by D S Ingram y P.H. Williams. Capítulo. 2:33-54. Academic Press. N. Y.

**De Candolle, A. P.** 1815. Mémoire sur les rhizoctones, nouveau genre de champignons qui attaque les racines, des plantes et en particulier celle de la luzerne cultivée. Mem. Mus. d'Hist. Nat. **2**:209-216. citado por **Sneh, B.;** **Burpee, L.** and **Ogoshi, A.** 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota. USA .133 p.

**Dewan M.,M. and Sivasithamparam.** 1988 . A plant-growth promoting sterile fungus from wheat and rye grass roots with potential for suppressing take-all. Trans. Br. mycol. Soc. **91**:687-717.

**Dewan M., M. and Sivasithamparam.** 1989 . Growth promotion and rotation crop species by a sterile fungus from wheat and effect of soil temperature and water potential on its suppression of take-all.. Mycol. Res. **93**: 156-160.

**Dhingra, O. D. y Sinclair, J. B.** 1985. Basic Plant Pathology Methods. CRC Press Inc. Florida .355 p.

**Dimond, A. E. y Horsfall, J. G.** 1965. The theory of inoculum. In Ecology of soil borne plant pathogens - Prelude to biological control. Baker, K. y Snyder, W. Berkeley. Los Angeles. pp 404-415. University of California Press. Ca.

**Dodman, R. L.; Barker, K. R. y Walker, J. C.** 1968. Modes of penetration by different isolates of *Rhizoctonia solani*. Phytopathology **58**: 31-33.

**Dodman, R. L. y Flentje, N. T.** 1970. The mechanism and physiology of plant penetration by *Rhizoctonia solani*. In *Rhizoctonia solani*, Biology and Pathology. Parmeter, J. R. Jr. pp 149-160. University of California Press. Los Angeles. Ca..

**Domsch, K. H. y Gams, W.** 1968. Die Bedeutung vorfruchtabh angiger verschiebungen in der Bodenmikroflora. 2. Antagonistische einfluesse auf Pathogene Bodenpilze. Phytopath. Z. **63**: 165-176..

**Domsch, K. H. y Gams, W.** 1969. Variability and potential of soil fungus population to descompose pectin, xylan and carboxymethyl-cellulose. Soil Biol. Biochem **1**:29-36.

**Duggar, B. M.** 1915. citado por **Ogoshi, A.** 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. Ann. Rev. Phytopathol. **25** : 125-143.

**Durbin, R. D.** 1979. How the beachhead is widened. **In** Plant Disease - An Advance Treatise. Vol IV Horsfall J. y Cowling E. Capítulo 8: 155-162. Academic Press. N. Y.

**Egidy, Giorigia; Paveto María C.; Passeron, Susana y Galvagno M. A.** 1989. Relationship between cyclic adenosine 3':5' monophosphate and germination in *Candida albicans*. Experimental Mycology **13**:428-432.

**Fischer, P. J. y Petrini, O.** 1990. A comparative study of fungal endophytes in xylem and bark of *Alnus* species in England and Switzerland. Mycol Res. **94**: 313-319.

**Fischer, P. J. ; Petrini, O. y Petrini, L. E.** 1991. Endophytic ascomycetes and deuteromycetes in roots of *Pinus sylvestris*. Nova Hedwigia **52**:11-15.

**Flawia, M. M. y Torres, H. N.** 1972. Activation of membrane-bound adenylate cyclase by glucagon in *Neurospora crassa*. citado por **Pall, M.** 1981. Adenosine 3', 5' phosphate in fungi. Microbiological Reviews. **45**:462-480.

**Flawia, M. M. y Torres, H. N.** .1973. Insulin inhibition of membrane-bound adenylate cyclase in *Neurospora crassa*. citado por **Pall, M.**. 1981. Adenosine 3', 5' phosphate in fungi. Microbiological Reviews. **45**:462-480.



**Flentje, N. T.** 1957. Studies on *Pillicularia filamentosa* (Pat.) Rogers. III Host penetration and resistance, and strain specialization . Trans. Br. mycol. Soc. **40**:322-336.

**Flentje, N. T., Dodman, R. L. y Kerr, A.** 1963. The mechanism of host penetration by *Thanatephorus cucumeris*. Aust. J. Biol.Sci. **16**: 784-799.

**Flentje, N. T. y Stretton, Helena.** 1964. Mechanism of variation in *Thantephorus cucumeris* and *T. praticolus* . Aus. J. Biol. Sci. **17**:686-704.

**Flentje, N. T.** 1965. Pathogenesis by soil fungi. **In** Ecology of soil borne plant pathogens. Prelude to biological control. Ed. by K. Baker y W. Snyder. pp 253-268. University of California Berkeley. Los Angeles: Ca.

**Flentje, N. T. ; Stretton, Helena y McKenzie, A.R.** 1970. Mechanism of variation in *Rhizoctonia solani*. **In** *Rhizoctonia solani*, Biology and Pathology. Parmeter, J. R. Jr.. pp 52-65. University of California Press. Los Angeles. Ca.

**Fravel, D. R. y Keinath, A. P.** 1991. Biocontrol of soil borne pathogens with fungi. **In** The rhizosphere and plant growth. pp 237-243. Kluwer Academic Publishers. Holanda.

**Gagnon, Camilien.** 1967. Polyphenols and discoloration in the elm disease investigated by histochemical techniques. Can. J. Botany. **45**: 2129-2124.

**Galvagno, M. A.; Moreno, S. ; Cantore, M. L. y Passeron, Susana.** 1979. Cyclic adenosine 3', 5' monophosphate phosphodiesterase from *Mucor rouxii*: regulation of enzyme activity by phosphorylation and dephosphorylation. citado por **Pall, M.** 1981. Adenosine 3', 5' phosphate in fungi. Microbiological Reviews. **45**:462-480.

**Galvagno, M. A.; Porchiassin, F.; Cantore, M.L. y Passeron, S.** 1984. The effect of light on fruiting body formation and cyclic metabolism in *Saccobolus platensis*. Experimental Mycology **3**:334-341.

**García-Romera, I; García-Garrido, J. M. ; Martínez-Molina, E. y Ocampo, J.A.** 1990. Possible influence of hydrolytic enzymes on vesicular-arbuscular mycorrhizal infection of alfalfa. Soil Biol. Biochem **22**:149-152.

**Garret, S. D.,** 1956. Biology of root - infecting fungi . Cambridge University Press. 293 p.

**Garret, S. D.,** 1976. Influence of nitrogen on cellulolysis rate and saprophytic survival in soil of some cereal foot-rot fungi. Soil Biology and Biochemistry **8**: 229-234.

**Gianinazzi-Pearson y Smith, S. E.** 1993. Physiological and mycorrhizal mycelia In Advances in plant pathology. D S Ingram y PH Williams. Capítulo **3**:55-82

**Gill, H. S. y Powell, D.** 1968. The use of polyacrylamide gel disc electrophoresis in delimiting three species of *Phytophthora*. *Phytopathol Z* **58**:722-723.

**Goodman, R. N.** 1967. Protection of apple stem tissue against *Erwinia amylovora* infection by avirulent strains and three other bacterial species . *Phytopathology* **57**: 22-24.

**Goodman, D. M. y Burpee, L. L.** 1991. Biological control of dollar spot disease of creeping bentgrass. *Phytopathology* **81**:1438-1446.

**Graham, J. H. y J. A. Menge,** 1982. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil phosphorus on take-all diseases of wheat. *Phytopathology* **72**: 95-98

**Griffin, D. M.** 1973. Ecology of soil fungi. Chapman y Hall. Londres. 193p.

**Grove, T. S. y Le Tacon, F.** 1993 Mycorrhiza in plantation forestry **In** *Advances in plant pathology*. D S Ingram y P.H. Williams. Capítulo 9: 191-227. Academic Press. N. Y.

**Harborne, J. B.** 1973. Phytochemical methods : 33-88. Chapman y Hall. Londres.

**Harley, J. L.,** 1969. citado por **Kozlowski, T. T.** 1978. How healthy plants grow. **In** *Plant Disease - An Advance Treatise*. Vol III.. Horsfall J. y Cowling E. Capítulo 2 :19-51.

**Hashiba, T.** 1987. Plasmids responsible for pathogenicity and morphology in *Rhizoctonia solani*. Molecular determinants of plant diseases. pp 157-170. Nishimura et al. Japan Sci. Soc. Press. Tokyo/Springer-Verlag. Berlin..

**Hashiba, T. e Ishikawa, T.** 1978. Effect of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate on induction of sclerotia in *Rhizoctonia solani*. Phytopathology **68**:1723-1727.

**Hoagland, D. R. y Arnon, D. I.** 1950. The water culture method for growing plants without soil. California Agr. Exp. Cir. 347

**Horsfall, J. G.** 1932. Dustin tomato seed with copper sulfate monohydrate for combating damping-off. N Y : State Agr. Exp. Sta. Tech. Bull. N° 198:1-34. citado por **Van der Plank, J. E.** 1975. Principles of plant infection. Academic Press. 216 p.

**Hubbard, J. P., Williams, J. D., Niles, R. M. y Mount, M. S.** . 1978 The relation between glucose repression of endo-polygalacturonate trans-eliminase and adenosine 3'5'-cyclic monophosphate levels in *Erwinia carotovora* . Phytopathology **68**: 95-99.

**Ichielevich-Auster, M.; Sneh, B; Koltin, Y. y Barash, I.** 1985a. Suppression of damping-off caused by *Rhizoctonia* species by a nonpathogenic isolate of *R. solani*. Phytopathology **75**: 1080-1084.

**Ichielevich-Auster, M.; Sneh, B; Koltin, Y. y Barash, I.** 1985b. Pathogenicity, host specificity and anastomosis groups of *Rhizoctonia* spp. isolates from soils in Israel. *Phytoparasitica* **13**:103-112.

**Jones, T. M.; Anderson, A. J. y Albersheim, P.** 1972. Host-pathogen interaction. IV. studies on the polysaccharide-degrading enzymes secreted by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiological Plant Pathology* **2**:153-166.

**Kerr, A. y Flentje, T.** 1957. Host infection of *Pellicularia filamentosa* controlled by chemical stimuli. *Nature*. **179**:204-205.

**Kinden, D. A y Brown, M. F.** 1975. Electron microscopy of vesicular-arbuscular mycorrhizae of yellow poplar. II. Intracellular hyphae and vesicles. *Can. J. Microbiol.* **21**:1768-1780.

**Koide, R.**, 1993. Physiology of the mycorrhizal plant. **In** *Advances in plant pathology* Ed. by D S Ingram y P.H. Williams. Capítulo. **2**:33-54. Academic Press. N. Y.

**Ko, W. y Hora, F. K.** 1971. A selective medium for the quantitative determination of *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology* **61** : 707-710.

**Koske, R. E. y Gemma, J. N.** 1989. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycol. Res.* **92**: 486-505.

**Kosuge, T.** 1969. The role of phenolics in host response to infection. *Ann. Rev. Phytopathol* 7: 195-222.

**Kozlowski, T. T.** 1978. How healthy plants grow. **In** *Plant Disease - An Advance Treatise*. Vol III. Horsfall J. y Cowling E. Capítulo 2 :19-51. Academic press. N. Y.

**Kué, J.** 1981. Multiple mechanisms, reaction rates, and induced resistance in plants. **In** *Plant Disease Control*. Staples, R. C. y Toenniessen, G. H. pp 259-272. N. Y.

**Kühn, J.** 1858. citado por **Ogoshi, A.** 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25 : 125-143.

**Kuninaga, S y Yokosawa, R.** 1984. DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kühn. IV Genetic relatedness within AG-4. *Annals Phytopathological Society.* 50 :322-330.

**Larsen, S** 1952. The use of P-32 in studies on the uptake of phosphorus by plants. *Plant and Soil* 4 : 1-10

**Lewis, J.A. y Papavizas, G. C.** 1988. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* (Rs) by some novel soil fungi. *Phytopathology* 78: 862.

**Lewis, J. A. y G. C. Papavizas,** 1991. Biocontrol of plant diseases: The approach for tomorrow. *Crop Protection* 10: 95:105.

**Linderman, R. G.** 1991. Mycorrhizal interactions in the rhizosphere **in** The rhizosphere and plant grow. D. L. Keister y P.B. Cregan.. pp 343-348. Kluwer Academic Publishers. Holanda.

**Lockwood, J. L.** 1988. Evolution of concepts associated with soil borne plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol* **26** : 93-121.

**Malavolta, E.** 1987. Manual de calagem e adubação das principais culturas. Associação Brasileira para Pesquisa da potassa e do fosfato, Piracicaba, Brasil 157 p.

**Mandeel, Q. y Baker, R.** 1991. Mechanisms involved in biological control of *Fusarium* wilt of *Cucumber* with strains of nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* **81**:462-469.

**Marcus, L.; Barash, I.; Sneh, B.; Koltin, Y. y Finkler, A.** 1986. Purification and characterization of pectolytic enzymes produced by virulent and hypovirulent isolates of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **29**:325-336.

**Martin, S. B. y Lucas, L. T.** 1984. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. and binucleate *Rhizoctonia*-like fungi from turfgrasses in North Carolina. *Phytopathology* **74**: 170-175.

**Martinson, C. A.** 1963. Inoculum potential relationships of *Rhizoctonia solani* measured with soil microbiological sampling tubes. *Phytopathology* **53**: 634-638.

**Marx, D.** 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* **59**:153-163.

**Matsumoto, T.; Yamamoto, W. e Hirane, S.** 1932. citado por **Ogoshi, A.** 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Ann. Rev. Phytopathol.* **25** : 125-143.

**Matta, A.; Irene Gentile e Isa Giai.** 1969. Accumulation of phenols in tomato Plants infected by Different Formas of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* **59**:512-513.

**Matta, A.** 1981. Nonphytoalexyn host responses in vascular diseases of plants. In *Plant Diseases Control*. pp 179-192. Staples y Toenniessen.. N. Y.

**McIntyre, J. L. y Press, L. S.** 1991. Formulation, delivery systems and marketing of biocontrol agents and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) In *The rhizosphere and plant growth*. Kluwer Academic Publishers. Holanda.:289-295.

**Moreno, S. y Passeron, S.** 1980. Further studies on cyclic adenosine 3', 5' monophosphate protein kinase from dimorphic fungus *Mucor rouxii*. citado



por **Pall, Martin**. 1981. Adenosine 3', 5' Phosphate in Fungi. Microbiological Reviews. **45**:462-480.

**Moreno, S.; Galvagno, M. A. y Passeron, S.** 1982. Control de *Mucor rouxii* adenosine 3':5' monophosphate by phosphorylation dephosphorylation and proteolysis. Arch. Biochem. Biophys **214**:573-580.

**Mosse, B.** 1973. Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. Ann. Rev. Phytopathol. **11** :171-196.

**Mount M S** 1978 Plant diseases In Advance Treatise. Vol III. J.G.Horsfall y Cowling . Capítulo 13: 279-297. Academic Press. N. Y.

**Neate, S. M. y Warcup, J. H.** 1985. Anastomosis grouping of some isolates of *Thantephorus cucumeris* from agricultural soils in South Australia. Trans. Br. mycol. Soc. **85** : 615-620.

**Nelson, N.** 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. Journal of Biological Chemistry **153**:375-380.

**Nelson, P. E.**(1981). Lyfe Cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. In Fungal wilt diseases of plants. Mace, M.E.; Bell, A. A. y Beckman. Academic Press. Capítulo **3**: 51-80.

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

**Ogoshi, A. ; Oniki, M. ; Sakai, R. y Ui, T.** 1979. Anastomosis grouping among isolates of binucleate *Rhizoctonia*. *Trans. mycol. Soc. Japan.* **20**: 33-39.

**Okazaki, M. Y.** 1978. In Filamentous fungi. *Fungal Technology*. Edward Arlold.

**Oniki, M. ; Ogoshi, A.; Araki, T. ; Sakai, R. and Tanaka, S.** 1985. The perfect state of *Rhizoctonia oryzae* and *R. zaeae*, and the anastomosis groups of *Waitea circinata*. *Trans. mycol. Soc. Japan* **26**:189-198.

**Pall, M.** 1981. Adenosine 3', 5' phosphate in fungi. *Microbiological Reviews.* **45**:462-480.

**Papavizas, G.C.** 1970. Colonization and growth of *Rhizoctonia solani* in soil In *Rhizoctonia solani*, *Biology and Pathology*. Ed. by Parmeter, J. R. Jr.. pp 108-122. University of California Press. Los Angeles. Ca. .

**Papavizas, G.C., Adams, P.B., Lumsdem, R. D., Lewis, J. A., Dow, R. L., Ayers, W.A.. y Kantzes, J. C.** 1975. Ecology and epidemiology of *Rhizoctonia solani* in field soil. *Phytopathology* **65**: 871-877.

**Parmeter, J. R.; Sherwood, R. T. Jr. and Platt, W. D.** 1969. Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology* **59**: 1270-1278.

**Parmeter, J. R. and Witney, H. S.** 1970. Taxonomy and nomenclature of the imperfect state. **In** *Rhizoctonia solani*, Biology and Pathology. Parmeter, J. R. Jr., pp 7-19. University of California Press. Los Angeles. Ca..

**Paveto, C.; Epstein, A. y Passeron, S.** 1975. Studies of cyclic 3', 5' monophosphate levels adenylate cyclase and phosphodiesterase activities in the dimorphic fungus *Mucor rouxii*. citado por **Pall, M.** 1981. Adenosine 3', 5' Phosphate in Fungi. Microbiological Reviews. **45**:462-480.

**Pearson, V. and D. J. Read** 1975 The physiology of the mycorrhizal endophyte of *Calluna vulgaris*. Trans.Br. mycol. Soc. **64** : 1- 7.

**Pearson, Vivienne,** 1974. Virulence and cellulolytic enzyme activity of isolates of *Gaeumannomyces graminis*. Trans. Br. mycol. Soc. **63** : 199-202.

**Petrini, O. y Fischer, P. J.** 1990 Ocurrance of fungal endophytes in twigs of *Salix fragalis* and *Quercus robur*. Mycol. Res. **94** : 1077-1080.

**Petrini, O.** 1986 Taxonomy of endophytic fungi in aerial plant tissues. citado por **Carroll, G.** 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogens to mutualistic symbiont. Ecology **69** : 2-9.

**Phillips, J. M. y Hayman, D. S.** 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. Br. mycol.Soc. **55**:158-161.

**Pia, J.** 1927. Thallophyta. In M. Hirmer (ed.). Handbuch der Palio-Botanik, I: 31-136. R. Oldembourg, Berlin. **In** *Rhizoctonia solani*, Biology and Pathology. Ed. by Parmeter, J. R. Jr.. pp 125-148. University of California Press. Los Angeles. Ca.

**Ploetz, R. C., Mitchel, D. J. y Gallaher, R. N.** 1985. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* species from a reduced-tillage experiment multicropped to rye and soybean in Florida. *Phytopathology* 75: 833-839.

**Pridham, J. B.** 1960. Phenolics in plants in health and disease. pp 9-15 Pergamon Press . Londres.

**Ramsey, G. B.** 1917. A form of potato disease produced by *Rhizoctonia* **In** *Rhizoctonia solani*, Biology and Pathology. Parmeter, J. R. Jr.. pp 7-19. University of California Press. Los Angeles. Ca. .

**Read, D. J.** 1993. Mycorrhiza in plant communities **In** Advances in plant pathology. D S Ingram y PH Williams. Capítulo 1:1-31.

**Reeve, R. M.** 1950. Histochemical tests for polyphenols in plant tissues. *Stain Technology* 26: 91-96.

**Reynolds, Monica; Weinhold, A. R. y Morris, T. J.** 1983. Comparison of anastomosis grouping of *Rhizoctonia solani* by polyacrylamide gel electrophoresis of soluble proteins. *Phytopathology* 73 :903-906.

**Reinking, O. A. y Manns, M. M.** 1933 citado por **Lockwood, J. L.** 1988. Evolution of concepts associated with soil borne plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol* **26** : 93-121.

**Renwick, A.; Campbell, R. y S. Coe.** 1991 Assessment of *in vivo* screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Pathology* **40**: 524-532.

**Reyes, F. y Byrde, R. J. W.** 1973. Partial purification and properties of a  $\beta$ -N-acetylglucosamina from the fungus *Sclerotinia fructigena*. *Biochem J.* **131**:381-388.

**Richter, H. y Schneider, R.** 1953. Untersuchungen zur morphologischen und biologischen differenzierung von *Rhizoctonia solani*. *K. Phytopath. Z.* **20**:167-226. (Resumen *Rev. Applied mycol.* **33**: 109. 1954).

**Rohm y Haas Company.** 1959. Compendium of plant diseases. Rohm y Haas Company. Filadelfia, PA. 264 p.

**Rovira, A. D.; Ogoshi, A. y McDonald, H. J.** 1986. Characterization of isolates of *Rhizoctonia solani* from cereal roots in South Australia and New South Wales. *Phytopathology* **76**: 1245-1248.

**Sacksena, H. K. and Vaartaja, O.** 1960. Descriptions of new species of *Rhizoctonia*. *Can J. Botany* **38**: 931-943.

**Schultz, H. 1936.** citado por **Ogoshi, A. 1987.** Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. Ann. Rev. Phytopathol. **25** : 125-143.

**Sequeira, L. 1978.** Defenses triggered by the invader: Recognition and compatibility phenomena. in Plant Disease - An Advance Treatise. Vol V. Horsfall J. y Cowling E. Capítulo **10**:179-200. Academic Press. N. Y.

**Shewale, J. G. y Sadana, J. C. 1978.** Cellulase and  $\beta$ -glucosidase production by a basidiomycete species. Can. J. microbiol **24**: 1204-1216.

**Sherwood, R. T. 1970.** Physiology of *Rhizoctonia solani*. In *Rhizoctonia solani*, Biology and Pathology. Ed. by Parmeter, J. R. Jr.. pp 69-92. University of California Press. Los Angeles. Ca. .

**Sieber, T.; Riesen, T.K.; Müller y Fried, P.M. 1988.** Endophytic fungi in four winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) differing in resistance against *Stagonospora nodorum* (Berk) Cast. and Germ. = *Septoria nodorum* (Berk). Berk. J. J. Phytopathology **122**:289-306.

**Sinclair, J. B., 1970.** *Rhizoctonia solani*: Special methods of study In *Rhizoctonia solani*, Biology and Pathology. Parmeter, J. R. Jr. pp 199-217 University of California Press. Los Angeles. Ca.

**Sivasithamparam, K. 1975.** *Phialophora* and *Phialophora* like-fungi occurring in the root region of wheat. Aust. J. Botany **23**: 193-212.

**Sneh, B.; Burpee, L. y Ogoshi, A.** 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. APS Press St. Paul, Minnesota. USA. 133 p.

**Sneh, B.; Ichielevich-Auster, M y Plaut, Z.** 1989. Mechanisms of seedling protection by a hypovirulent isolate of *Rhizoctonia solani*. Can. J. Botany **67** : 2135-2141.

**Sneh, B., Zeidan, M. ; Ichielevich-Auster, M., Barash, I y Koltin, Y. .** 1986. Increased growth responses induced by a nonpathogenic *Rhizoctonia solani*. Can. J. Botany **64** :2372-2378.

**Somogyi, M.** 1945. A new reagent for the determination of sugars. J. B. Biol. Chem. **160**:61-73.

**Stribley, D. P. y Read, D. J.** 1974. citado por **Read, D. J.** 1993. Mycorrhiza in plant communities. In Advances in Plant Pathology. D S Ingram y PH Williams. pp 1-31. Academic Press. Londres.

**Stribley, D. P..** 1980. citado por **Read, D. J.** 1993. Mycorrhiza in plant communities. In Advances in Plant Pathology. D S Ingram y PH Williams. pp 1-31. Academic Press. Londres.

**Summer, D. R. y Bell, D. K.** 1982. Root disease induced in corn by *Rhizoctonia solani* and *Rhizoctonia zae*. Phytopathology **72**:86-91.

**Suzuki, H.** 1980. Defenses triggered by previous invader. **In** Plant Disease - An Advance Treatise. Vol V. Horsfall J. y Cowling E. Capítulo 17: 319-332. Academic press. N. Y.

**Swain, T. y W. E. Hillis.** 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I- The quantitative Analysis of Phenolic Constituents. J. Sci. Food Agric. : 63- 68.

**Talboys, P. W.** 1978. Dysfunction of the water system **In** Plant Disease - An Advance Treatise. Vol III. Horsfall J. y Cowling E. Capítulo 6:141-162. Academic Press. N. Y.

**Tu, C. C. y Kimbrough, J. W.** 1973. A rapid staining technique for *Rhizoctonia solani*. Can. J. Botany. 67:2135-2141.

**Tu, C. C. y Kimbrough, J. W.** 1975. Morphology, development and cytochemistry of hyphae and sclerotia of species in the *Rhizoctonia* complex. Can. J. Botany 53:2282-2296.

**Tu, C. C.; Kimbrough, J. H. y Aldrich, H. C.** 1977. Cytology and ultrastructure of *Thanatephorus cucumeris* and related taxa of the *Rhizoctonia* complex. Can. J. Botany 55: 2419-2436.

**Tu, C. C. y Kimbrough, J. W.** 1978. Systematics and phylogeny of fungi in the *Rhizoctonia* complex. Botanical Gazette 139 :454-466.



**Uno, I.; Ishikawa, T. y Hashiba, T.** 1985. Detection of cyclic AMP levels and cyclic AMP-receptor protein in mycelia of *Rhizoctonia solani* forming sclerotia. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **51**:183-189.

**Van Alfen, N.** 1982. Biology and potential for disease control of hypovirulence of *Endothia parasitica*. *Ann. Rev. Phytopathol.* **20**: 349-362.

**Van Etten, H. D.; Maxwell, D. P. y Bateman, D. F.** 1967. Lesion maturation, fungal development and distribution of endopolygalacturonase and cellulase in *Rhizoctonia*-infected bean hypocotyl tissues. *Phytopathology* **57**:121-126.

**Van der Plank, J. E.** 1975. Principles of plant infection. Academic Press. 216 p.

**Voorhees, R. K.** 1934. Sclerotial rot of corn caused by *Rhizoctonia zae* n. sp. *Phytopathology* **24**: 1290-1303.

**Walkley, A and I. A. Black,** 1934. An examination of the Degjareff method for determining soil organic matter and proposed modification of the chromic acid titration method. *J. Am. Soc. Agron.* **24**: 256-275.

**Watanabe, B. y Matsuda, A.** 1966. citado por **Ogoshi, A.** 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Ann. Rev. Phytopathol.* **25** : 125-143.

**Warcup, J. H. y Talbot, P. H. B.** 1962. Ecology and identity of mycelia isolated from soil. *Trans. Br. mycol. Soc.* **45**: 427-435.

- Waskman, S. A.** 1944. Three decades with soil fungi. *Soil Sci.* **58**:89-115.
- Weinhold, A. R. y Motta, J.** 1973. Initial host responses in cotton to infection by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* **63** : 157-162.
- Weinhold, A. R.; Bowman, Tully y Dodman, R. L.** 1969. Virulence of *Rhizoctonia solani* as affected by nutrition of the pathogen. *Phytopathology* **59**:1601-1605.
- Wheeler H..** 1975. *Plant Pathogenesis* . Springer-Verlag. Berlin :106 p.
- Williams, P.G.** 1985. Orquidaceous Rhizoctonias in pot cultures of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Can. J. Botany* **63**: 1329-1333.
- Wood, T. M.** 1975. Properties and mode of action of cellulases. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **5**:111-137.
- Wood, T. y García-Campayo, Vicenta.** 1990 Enzymology of cellulose degradation. *Biodegradation* **1**:147-161.
- Woodward, J. y Wiseman, A.** 1982. Fungal and other  $\beta$ -D-glucosidasas-their properties and applications. *Enzyme Microb. Technol.* **4**:73-79.
- Wynn W. K. and Stapples, R.** 1981. Tropisms of fungi in host recognition. In *Plant Disease Control*. pp 45-69. Stapples y Toenniessen.. John Wiley and sons. N. Y.

**FE DE ERRATAS****En páginas:**

10 ítem 10.b.

12 ítem 11.b.

82 ítem 9

88 ítem 10.b.

139 leyenda Fig 22

161 leyenda Fig 29

162 leyenda Fig 30

164 ítem 8

172 ítem 9

188 ítem 11.b.

**Léase *Cladorhinum foecundissimum***

En tabla 3, 5º página, léase 55 *R. solani* AG-2

En tabla 3, 8º página, léase 146 *R. solani* AG-2

En página 170, leyenda Fig 34, léase inoculó

Yoder, O. C. y Turgeon, Gillian. 1985. Molecular bases of fungal pathogenicity to plants. In Gene Manipulations of Fungi. J. W. Bennett y Linda L. Lasure. pp 417-448. Academic Press. Inc..

Yokoyama, K. y Ogoshi, A.. 1986. Studies on Hyphal Anastomosis of *Rhizoctonia solani* IV. Observation of Imperfect Fusion by Light Electron Microscopy. Trans. mycol. Soc. Japan 27: 399-413.

FGE y N BIBLIOTECA

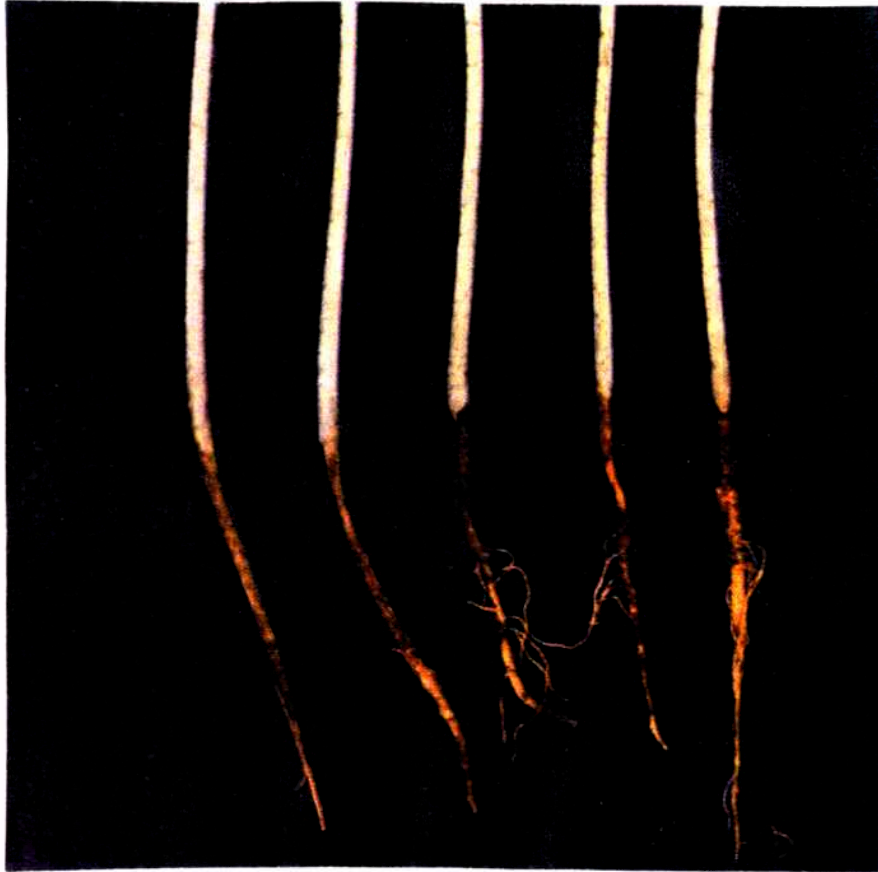


Fig 1: Plántulas de algodón con típicas lesiones por "damping-off", causado por *Rhizoctonia solani*. Se observa estrangulamiento en el tallo cerca de la línea del suelo y muchas raicillas destruidas ( Rohm y Hass Company, 1959).

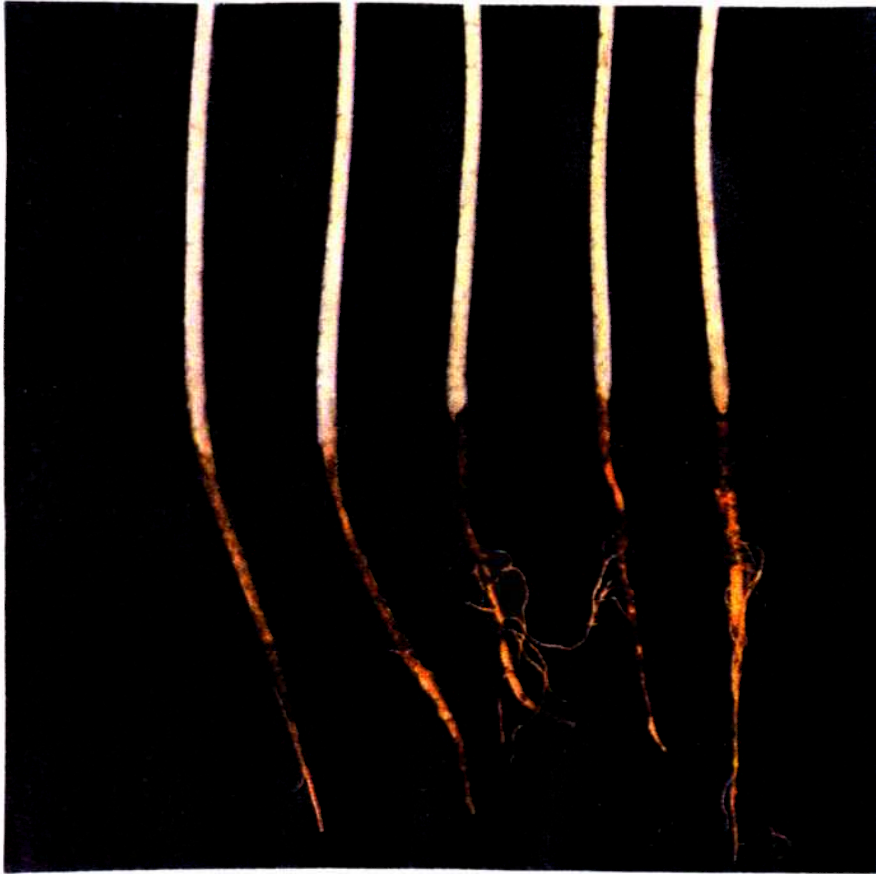


Fig 1: Plántulas de algodón con típicas lesiones por "damping-off", causado por *Rhizoctonia solani*. Se observa estrangulamiento en el tallo cerca de la línea del suelo y muchas raicillas destruidas ( Rohm y Hass Company, 1959).