



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
UNIDAD SINALOA

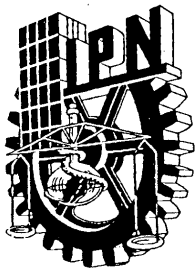
“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE GRUPOS
ANASTOMÓSICOS DE *Rhizoctonia solani* ASOCIADOS A LA
COSTRA NEGRA Y CANCRO DEL TALLO EN EL CULTIVO
DE PAPA EN SINALOA.”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN
RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE

PRESENTA:
LUZ ARACELY FERNÁNDEZ LÓPEZ

GUASAVE, SINALOA, MEXICO. DICIEMBRE DE 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa el día 08 del mes Diciembre del año 2011, el (la) que suscribe Luz Aracely Fernández López alumno (a) del Programa de Maestría en recursos naturales y medio ambiente con número de registro B091648, adscrito a CIIDIR-Sinaloa, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Norma Elena Leyva López y Dr. Miguel Ángel Apodaca Sánchez y cede los derechos del trabajo intitulado “Identificación molecular de grupos anastomósicos de *Rhizoctonia solani* asociados a la costra negra y cancro del tallo en el cultivo de papa en Sinaloa.”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección luzarak@yahoo.com, neleyval@ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Luz Aracely Fernández López
Nombre y firma



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa siendo las 9 horas del día 08 del mes de Diciembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-SINALOA para examinar la tesis titulada:

“Identificación molecular de grupos anastomósicos de *Rhizoctonia solani* asociados a la costra negra y cancro del tallo en el cultivo de papa en Sinaloa.”

Presentada por el alumno:

<u>Fernández</u> Apellido paterno	<u>López</u> Apellido materno	<u>Luz Aracely</u> Nombre(s)							
		Con registro:							
		<table border="1"> <tr> <td style="width: 20px;">B</td> <td style="width: 20px;">0</td> <td style="width: 20px;">9</td> <td style="width: 20px;">1</td> <td style="width: 20px;">6</td> <td style="width: 20px;">4</td> <td style="width: 20px;">8</td> </tr> </table>	B	0	9	1	6	4	8
B	0	9	1	6	4	8			

aspirante de: **MAESTRÍA EN RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Norma Eleña Leyva López

Dr. Miguel Angel Appadaca Sánchez

Dr. Jesús Méndez Lozano

Dr. Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza

Dr. Antonia Luna González

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Jorge Montiel Montoya



CIIDIR - IPN
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA NACIONAL
DIRECCIÓN

El trabajo de tesis se desarrolló en el Departamento de Biotecnología Agrícola del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Sinaloa del Instituto Politécnico Nacional (IPN). El presente trabajo fue apoyado económicamente a través del Proyecto FPS_903. El alumno/a Luz Aracely Fernandez fue apoyado con una beca CONACYT con clave 321615, así como a PIFI-IPN por el apoyo otorgado.

Índice

Índice de Figuras	I
Índice de cuadros	I
Glosario	II
Resumen	VI
Abstract	VII
II. Introducción	1
III. Antecedentes	2
1. El cultivo de papa (<i>Solanum tuberosum</i>)	2
1.1. Situación actual del cultivo de la papa en México	2
1.2. Principales problemas del cultivo de papa	3
2. <i>Rhizoctonia Solani</i>	3
2.1. Taxonomía de <i>Rhizoctonia solani</i>	4
2.2. Costra negra de la papa	8
2.2.1. Síntomas y signos	8
2.2.2. Ciclo de la enfermedad	11
2.2.3. Control de la costra negra	12
IV. Justificación	14
V. Hipótesis	15
VI. Objetivo	15
A. Objetivo general	15
B. Objetivos específicos	15
VII. Materiales y Métodos	16
1. Colecta y manejo de las muestras	16

2. Aislamiento y preservación de <i>Rhizoctonia solani</i>	17
2.1. Obtención de aislados de <i>R. solani</i>	18
2.2. Identificación morfológica	18
2.3. Almacenamiento y preservación de aislados fúngicos	19
3. Análisis Moleculares	19
3.1. Extracción de DNA de tejido vegetal	19
3.2. Extracción de DNA de aislados fúngicos	19
3.3. Electroforesis	20
3.4. Identificación molecular	20
3.4.1. Amplificación por PCR de regiones conservadas de eucariontes	20
3.4.1.1. Purificación de producto de PCR	21
3.4.1.2. Cuantificación de DNA por fluorometría	22
3.4.1.3. Secuenciación y análisis	23
3.4.1.4. Análisis filogenético	23
3.4.2. PCR específico para AG1 y AG2 de <i>R. solani</i>	24
3.4.3. PCR específico para AG3 de <i>R. solani</i>	24
3.4.4. Diseño de primers específicos para AG4	24
3.4.5. PCR específico para AG4 de <i>R. solani</i>	25
3.4.6. Electroforesis de producto de PCR	26
4. Pruebas de anastomosis	26
VIII. Resultados	28
1. Colecta y manejo de las muestras	28
2. Obtención e identificación morfológica de aislados de <i>R. solani</i>	30
3. Análisis moleculares	33
3.1. Extracción de DNA de aislados fúngicos	33

3.2. Identificación molecular	33
3.2.1. Amplificación por PCR de regiones conservadas de eucariontes	33
3.2.3. Análisis de secuencias de aislados fúngicos	34
3.2.4. Análisis filogenético	36
3.2.5. PCR específico para AG1 y AG2 de <i>R. solani</i>	39
3.2.6. PCR específico para AG3 de <i>R. solani</i>	39
3.2.7. PCR específico para AG4 de <i>R. solani</i>	40
4. Pruebas de anastomosis	42
IX. Discusión	44
X. Conclusiones	50
X. Bibliografía	51

Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo de la enfermedad cancro del tallo y costra negra de la papa causadas por <i>Rhizoctonia solani</i> .	12
Figura 2. Localidades visitadas para la obtención de muestras.	16
Figura 3. Síntomas observados en plantas del cultivo de papa de Sinaloa.	17
Figura 4. Aislados identificados morfológicamente como <i>Rhizoctonia</i> observados al microscopio óptico a 400X.	32
Figura 5. DNA genómico total extraído de aislados de hongos por el método de CTAB.	33
Figura 6. Productos amplificados por PCR de aislados fúngicos obtenidos a partir de tallo y tubérculo con primers generalistas para eucariontes ITS1-ITS4.	33
Figura 7. Similitud de secuencias de rDNA-ITS entre grupos anastomósicos de <i>Rhizoctonia solani</i> y 2 <i>Rhizoctonias</i> binucleadas (RBN).	37
Figura 8. Árbol filogenético de la región ITS de rDNA de aislados de <i>R. solani</i> pertenecientes a diferentes grupos anastomósicos.	38
Figura 9. Amplificación por PCR de fragmentos de 500 pb de la región ITS de rDNA con los primers Sr1F2-Sr2R1 de aislados fúngicos.	40
Figura 10. Electroforesis de productos de PCR corrido en un gel de agarosa al 1%.	41

Índice de cuadros

Cuadro 1. Grupos anastomóticos de <i>R. solani</i> y las enfermedades que causan en diferentes especies de plantas cultivadas (Ceresini, 1999).	8
Cuadro 2. Primers utilizados para la identificación molecular por PCR a <i>Rhizoctonia solani</i> y de sus grupos anastomóticos AG1, AG2 y AG3.	20
Cuadro 3. Secuencias seleccionadas para ser utilizadas como primers específicos para la reacción por PCR de <i>R. solani</i> AG4, temperatura de alineación de los primers (Tm) y tamaño de fragmento que amplifican.	25
Cuadro 4. Muestreo realizado el 03 de noviembre del 2010 en los campos de cultivo de papa en el Norte de Sinaloa.	28
Cuadro 5. Descripción de muestras y localidades del segundo muestreo realizado el 14 de Diciembre del 2010.	29
Cuadro 6. Descripción de muestras y localidades del tercer muestreo realizado el 29 de enero del 2011.	30
Cuadro 7. Aislados identificados morfológicamente como <i>Rhizoctonia</i> , muestra de la que se obtuvieron, localidad y fecha de muestreo.	31
Cuadro 8. Hongos identificados por comparación de secuencias amplificadas con los primers ITS1-ITS4 con secuencias reportadas en la base de datos del NCBI.	34
Cuadro 9. Categoría de anastomosis de los aislados obtenidos, basada en observación microscópica.	43

Glosario

DNA (por sus siglas en inglés): ácido Desoxirribonucleico: ácido nucleico formado por nucleótidos en los que el azúcar es desoxirribosa y las bases nitrogenadas son adenina, timina, citosina y guanina.

Agar: sustancia de consistencia gelatinosa que se obtiene de algas marinas y que se utiliza para preparar medios de cultivo sólidos, con el objeto de estudiar y cultivar los microorganismos.

Aislamiento: separación de un patógeno de su hospedante y su cultivo en un medio nutritivo.

Anastomosis: unión de una hifa o un vaso con otros de la que resulta la intercomunicación de sus contenidos.

Basidiomycotina: grupo de hongos que producen sus esporas sexuales, o basidiosporas sobre los basidios.

Basidiospora: espora producida de manera sexual y localizada sobre un basidio.

Cancro: lesión necrótica y con frecuencia profunda que se produce en el tallo, ramas o ramitas de una planta.

Clorosis: amarillamiento de los tejidos normalmente verdes, debido a la destrucción de la clorofila o a la imposibilidad de sintetizarla.

Cultivo: crecimiento artificial de microorganismos en un medio de nutritivo preparado; colonia de microorganismos mantenidos artificialmente en dicho medio de nutritivo.

Esclerocio: masa compacta de hifas, por lo general con una cubierta oscura y capaz de sobrevivir bajo condiciones ambientales desfavorables.

Espora: unidad reproductiva de los hongos, constituida por una o varias células.

Estado imperfecto: parte del ciclo de vida de un hongo en el cual no se producen esporas sexuales.

Estado perfecto: fase sexual en el ciclo biológico de un hongo.

Fitopatógeno: término que se aplica a los microorganismos que producen enfermedades en las plantas.

Hifa: ramificación simple de un micelio.

Infección: establecimiento de un parásito dentro de una planta hospedante.

Micelio: hifa o masas de hifas que constituyen el cuerpo de un hongo.

Patogenicidad: capacidad relativa que tiene un patógeno para producir enfermedad.

Patógeno: entidad que produce enfermedad.

PCR (Por sus siglas en ingles reacción en cadena de polimerasa): técnica de análisis del genoma mediante la amplificación ilimitada de porciones específicas del DNA, aunque sean minúsculas.

Primers u oligonucleotidos: los iniciadores de la PCR, también denominados cebadores o primers, son oligonucleótidos sintéticos que hibridan con la región, complementaria al DNA molde, que se desea amplificar y propician el inicio de la reacción de elongación por la TaqDNA polimerasa.

Pústula: pequeña elevación formada por la aglomeración de esporas, que sobresalen del tejido epidérmico.

Saprófito: organismo que obtiene sus nutrientes a partir de materia orgánica muerta.

Secuencia de DNA: orden de encadenamiento de las bases nitrogenadas de los nucleótidos que constituyen el DNA y que cifra toda la información genética.

Cuando es codificante (exón), define el orden de los aminoácidos que forman la proteína correspondiente.

Septo: paredes transversales de las hifas o esporas.

Signo: patógeno o sus partes o productos que se observan sobre una planta hospedante.

Síntoma: reacciones o alteraciones internas o externas que sufre una planta como resultado de su enfermedad.

Resumen

La papa es el cuarto alimento más importante del mundo. En México, este cultivo es de gran importancia ya que se siembra en casi todo el territorio nacional, encontrándose Sinaloa entre los principales estados productores. Las enfermedades costra negra y cancro del tallo causadas por el hongo *Rhizoctonia solani* afectan al cultivo de la papa en todo el mundo, disminuyen la calidad de los tubérculos y el rendimiento del cultivo hasta en un 30%. *R. solani* se divide en grupos anastomóticos (AGs) con base a la capacidad de las hifas de diferentes aislados para fusionarse. Los AGs AG1, AG2, AG3, AG4, AG5 y AG7 se han asociado con la enfermedad de la costra negra de la papa y cancro del tallo, causando necrosis de los brotes, estrangulamiento de los estolones, deformación de los tubérculos y formación de esclerocios sobre los mismos, siendo los AGs más comunes y agresivos AG3 y AG4. El objetivo del presente trabajo fue identificar molecularmente grupos anastomóticos de *R. solani* asociados a la costra negra y cancro del tallo en el cultivo de papa en Sinaloa. Se colectó tubérculos y plantas sintomáticas en plantaciones de papa en el norte de Sinaloa. Los aislados obtenidos de *R. solani* se mantuvieron en medio dextrosa de papa (PDA). La identificación molecular de los AGs se realizó por PCR con primers generalistas ITS1 e ITS4, secuenciación de los fragmentos amplificados y posteriormente por PCR con primers específicos para los grupos anastomóticos AG1, AG2, AG3, y AG4. Se obtuvieron 27 aislados con morfología típica de *Rhizoctonia*, de los cuales, mediante análisis de secuencias de los fragmentos amplificados por PCR se caracterizó como *Rhizoctonia* binucleada (2 aislados), *R. solani* AG4 (5 aislados) y *R. solani* AG3 (18 aislados). Los primers específicos utilizados para AG3 y AG4 mostraron baja especificidad con los aislados identificados en este estudio.

Abstract

The potato is the fourth most important food in the world. In Mexico, this is very important crop and is grown almost everywhere in the country, being Sinaloa among the states with the highest production. Black scurf and stem canker diseases caused by the fungus *Rhizoctonia solani* affects potato cultivation worldwide, decreasing tuber quality and causing yield losses up to 30%. *R. solani* has divided into anastomosis groups (AGs), in which isolates are categorized according to the ability of their hyphae to anastomose (fuse) with another. The AGs AG1, AG2, AG3, AG4, AG5 and AG7 have been associated with black scurf disease of potato, causing necrosis of shoots, stem canker, strangulation of stolons, tubers deformation, and formation of sclerotia on them, being the most common and aggressive AG3 and AG4. The aim of this study was the molecular identification of anastomosis groups of *R. solani* associated to black scurf and stem canker of potato in Sinaloa crops. Symptomatic plants and tubers were collected from potato crops in Sinaloa. The isolates obtained from *R. solani* were maintained on PDA medium. Molecular identification of AGs was made by PCR using ITS1/ITS4 primers and AG1, AG2 and AG3 group specific primers, sequencing of amplified PCR fragments and new AG4 designed primers. PCR fragment sequences of 27 putative *Rhizoctonia* isolates allowed us to identify *Rhizoctonia binucleate* (two isolates), *R. solani* AG4 (five isolates) y *R. solani* AG3 (18 isolates). Specific PCR primers for AG3 and AG4 showed low specificity for the amplification of the isolates from this study.

I. Introducción

La papa (*Solanum tuberosum*) es considerada como el cuarto alimento más importante del mundo. En México la papa se cultiva durante todo el año agrícola, en más de 22 estados en más de 55 mil hectáreas. El estado de Sinaloa se ha ubicado entre los principales productores de papa en México, sin embargo la producción se ve afectada por diversos factores entre los que destaca el efecto de plagas y enfermedades.

El hongo *Rhizoctonia solani* Khün que afecta a una gran variedad de cultivos en todo el mundo, es el patógeno causal de la enfermedad conocida como costra negra de la papa, la cual disminuye la calidad de los tubérculos y el rendimiento del cultivo hasta en un 30%. Para la clasificación de *R. solani* en grupos homogéneos se han utilizado comúnmente los criterios de anastomosis, los cuales consisten en la capacidad de hifas de diferentes aislado para fusionarse. Hasta la fecha se han reportado 14 grupos anastomóticos que van desde el AG1 al AG13 y el grupo AGBI. Los grupos anastomóticos AG1, AG2, AG3, AG4, AG5 y AG7 se han relacionado con la costra negra de la papa, reportándose como los grupos más comunes y agresivos a AG3 y AG4. Estos grupos se caracterizan por provocar necrosis de los brotes, cancro del tallo, estrangulamiento de los estolones, deformación de los tubérculos y la formación de esclerocios sobre los tubérculos, lo que disminuye se calidad y valor comercial.

A pesar de que *R. solani* es un patógeno muy común en el cultivo de papa y llega a causar una gran reducción en el rendimiento y calidad del cultivo, no existen reportes sobre la diversidad de grupos anastomóticos que se encuentran presentes en el cultivo de papa en Sinaloa. Además, existen pocos estudios de identificación molecular de este hongo en México y los métodos tradicionales de identificación son tardados, laboriosos y, en algunas ocasiones, no del todo confiables. El objetivo principal del presente trabajo fue Identificar molecularmente los diferentes grupos anastomóticos de *R. solani* en tubérculos y tallo en el cultivo de papa en Sinaloa.

II. Antecedentes

1. El cultivo de papa (*Solanum tuberosum*)

La papa es originaria de América, específicamente, de la región sur, en donde se ubica la zona andina, que comprende los países de Perú, Ecuador, Bolivia y Chile, aunque también se ha podido demostrar que algunas variedades silvestres son originarias de México (Perera *et al.*, 1998).

Esta hortaliza tiene importancia debido a su alto valor nutritivo y por ser fuente generadora de empleos (ITSM, 2005). Hoy en día, la papa se cultiva en 23 entidades estatales del territorio mexicano, siendo uno de los productos con tradición en México.

1.1. Situación actual del cultivo de la papa en México

En México, la papa se cultiva en casi todo el territorio nacional tanto en el ciclo Otoño-Invierno, como en el de Primavera-Verano. En 2009 la producción nacional de papa fue de 1.5 millones de toneladas, cosechadas en una superficie de 54 mil hectáreas (siap.sagarpa.gob.mx). Actualmente, Sinaloa ocupa el segundo lugar en producción nacional con 313,533 toneladas obtenidas en una superficie de 12,473 hectáreas. Mientras que la producción de papa en Sonora supera a la de Sinaloa, con 350,000 toneladas obtenidas en una superficie sembrada de aproximadamente 10,000 hectáreas (siap.sagarpa.gob.mx, 2009).

1.2. Principales problemas del cultivo de papa

A pesar de su importancia económica, este cultivo presenta una variedad de problemas, destacando la escasa disponibilidad de semilla tubérculo de calidad fitosanitaria (se requieren de 1 a 2 toneladas por hectárea), por lo que es necesario importar volúmenes considerables, ya que la que se produce en México no es suficiente. Así también la alta incidencia de plagas y enfermedades dificulta la movilización de la semilla, situación que se agrava por el manejo deficiente del cultivo en la mayoría de las zonas productivas (INIFAP, 2007).

Las principales enfermedades del cultivo de la papa son causadas por bacterias que incluyen a: *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia* spp., *Clavibacter michiganensis* y *Streptomyces scabies*; hongos como: *Spongospora subterranea*, *Synchytrium endobioticum*, *Phytophthora infestans*, *Phytophthora erythroseptica*, *Alternaria solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Rosellinia* spp., *R. solani* y *Fusarium* spp.; virus entre los cuales se encuentran: el virus del enrollamiento de la hoja (PLRV), virus del mosaico severo (PVY), virus del mosaico latente (PVX) y el virus S de la papa (PVS), así como los fitoplasmas causantes del amarillamiento del áster, "stolbur" y "haywire" (Rubio *et al.*, 2000).

Entre los principales patógenos que causan enfermedades al cultivo de la papa se encuentra *R. solani*, el cual es objeto de este estudio, ya que a pesar de ser un patógeno muy común en el cultivo de papa y llegar a causar una gran reducción en el rendimiento y calidad del cultivo, no existen reportes sobre la diversidad de grupos anastomóticos que se encuentran presentes en el cultivo de papa en Sinaloa. Además, existen pocos estudios de identificación molecular de este hongo en México y los métodos tradicionales de identificación son tardados, laboriosos y, en algunas ocasiones, no del todo confiables.

2. *R. solani*

Hace más de 100 años, Julius Khün observó un hongo en tubérculos de papa enfermos y lo nombró *Rhizoctonia solani* (Parmeter, 1970). *R. solani* Khün (Teleomorfo: *Thanatephorus cucumeris* [Frank]) es la especie más importante de *Rhizoctonia* ya que afecta a una gran variedad de cultivos en todo el mundo (Pascual, 2000).

R. solani, pertenece a la Clase Hyphomycetes, en la fase asexual y se caracteriza porque no produce conidios en condiciones naturales ni en medio de cultivo, por lo que las características del micelio son básicas para su identificación (Machín, 1991). Solo ocasionalmente produce esporas sexuales conocidas como basidiosporas, lo cual ubica a *T. cucumeris* en la Clase Basidiomycetes (Torres, 2002), ubicada actualmente como el phylum Basidiomycota.

El micelio de *R. solani* está conformado por hifas de color marrón oscuro, las células son multinucleadas y la base de la célula que da origen a una ramificación tiene una constricción. En la naturaleza, *R. solani* se reproduce asexualmente como micelio vegetativo y/o esclerocio (Ceresini, 1999).

Actualmente este hongo se encuentra disperso en el mundo en suelos no cultivados y cultivados, en donde sobrevive de forma saprófita o como esclerocio (estructura de resistencia). Ciertos aislados de *R. solani* pueden depender del parasitismo para su sobrevivencia, aunque existen evidencias de que *R. solani* persiste en el suelo primeramente como saprófita en tejidos infectados o por colonización saprófita en plantas muertas en las cuales puede permanecer en latencia o activo por un largo periodo (Ulacio *et al.*, 2002). Esta combinación de habilidad de saprófita competitivo con potencial patogénico letal y un rango de hospedantes casi ilimitado, ha convertido a *R. solani* en un patógeno con una enorme importancia económica.

2.1. Taxonomía de *R. solani*

R. solani ha sido objeto de múltiples estudios de tipo ecológico, patológico y de control biológico; sin embargo, su taxonomía todavía es confusa y controversial debido a que su morfología es sencilla y los rasgos fisiológicos y patológicos que se usan en su clasificación varían mucho, lo cual dificulta la delimitación taxonómica del grupo (González, 2002).

Con base en número de núcleos en cada célula de las hifas jóvenes, la población de *Rhizoctonia* está dividida en tres grandes grupos: mono, bi y/o multinucleado. *R. solani* pertenece al grupo multinucleado y es una especie heterogénea compuesta de un gran número de poblaciones independientes (Nejad *et al.*, 2007). Desde el punto de vista práctico, la clasificación de *R. solani* permitiría generar un marco previsible para el manejo de este hongo (González, 2002)

Los criterios de anastomosis de hifas han sido usados extensivamente para colocar a los aislados de *Rhizoctonia* en distintos grupos taxonómicos. La agrupación de los aislados por anastomosis, se asigna bajo la premisa de que sólo las hifas pertenecientes al mismo grupo pueden fusionarse (Lees *et al.*, 2002). Así, la anastomosis de las hifas es una manifestación de la compatibilidad somática o vegetativa entre aislados (Carling y Leiner, 1990).

En la práctica, la anastomosis de hifas se puede determinar de varias formas; la más comúnmente empleada involucra el apareamiento de dos aislados de *Rhizoctonia* en una lámina de vidrio, permitiéndolos crecer juntos. El área de interacción de las hifas se tiñe y se examina microscópicamente para observar la interacción resultante entre las hifas (Ceresini, 1999). La interacción de las hifas se asigna a una de cuatro categorías de acuerdo con lo descrito por MacNish *et al.* (1997). Estas categorías son: C0= no se observa reconocimiento entre las hifas; C1= hay un contacto de hifas y una conexión de las paredes pero sin contacto de membrana a membrana; C2= ocurre una fusión de hifas resultando en la muerte de las células fusionadas y las adyacentes; C3= fusión de paredes y membranas sin evidencia de muerte celular (Lees *et al.*, 2007).

Estas categorías toman en consideración, además de la reacción, los cambios citológicos que se llevan a cabo en la zona de anastomosis entre las dos hifas (MacNish *et al.*, 1993; Carling, 1996). La reacción C2 representa una incompatibilidad somática entre individuos genéticamente distintos, mientras que la reacción C3 (fusión perfecta) entre dos aislados, es indicativa de identidad genética o identidad cercana.

La primera subdivisión natural de *R. solani* fue hecha por Schultz (1936), quien dividió la especie en grupos, de acuerdo a la anastomosis de hifas y cuyos estudios fueron seguidos por los estudios de Richter y Schneider (1953). Parmeter *et al.* (1969) y Ogoshi (1987) reconocieron cuatro grupos anastomóticos (AG 1, 2, 3 y 4). El grupo AG-5 fue reconocido por Ogoshi en aislados provenientes de campos de Japón; éste podría corresponder al grupo B de Richert y Schneider (Adams y Butler, 1978).

Hasta mediados de los años 80 la clasificación de *R. solani* se basaba en rasgos morfológicos, número de núcleos, la apariencia de los cultivos, patología y sobre todo la anastomosis de hifas (Parmer, 1970). No obstante, el agrupamiento por reacción de anastomosis, no es completamente satisfactorio, debido a que en ocasiones un aislamiento se anastomosa, total o parcialmente, con aislados de más de un grupo anastomósico (González, 2002).

Sin embargo, los grupos anastomósicos de *R. solani* pueden también definirse usando muchos otros métodos, incluyendo análisis de cultivo y variaciones en patogénesis (Less *et al.*, 2002). Recientemente los enfoques para agrupar los distintos aislados de *R. solani*, incorporan nuevos caracteres que se obtienen a través de técnicas bioquímicas y moleculares (González, 2002).

Cuadro 1. Algunos grupos anastomósicos de *R. solani* y las enfermedades que causan en diferentes especies de plantas cultivadas (Ceresini, 1999).

Grupo de anastomosis	Enfermedad	Hospedante
AG1-1 ^a	Marchités de la vaina, mancha de la vaina	Arroz
	Esclerocios, tizón de la hoja	Maíz
	Tizón de la hoja	Sorgo
	Tizón del sur	Soya
	Mancha marrón	Plántulas de alcanfor Césped
AG1-IB	Mustia	Frijol
	Putrefacción	Calabaza
	Pudrición de pie	Lechuga
AG1-IC	Ahogamiento y corona de la raíz	Soya Zanahoria
AG2-1	Ahogamiento	Crucíferas
	Pudrición del cogollo	Fresas
	Tizón de la hoja	Tulipanes
AG2-2 IIIB	Falso tizón de la vaina	Arroz
	Tizón de la vaina	Maíz
	Costra negra	Remolacha
	Parche marrón	Pasto
	Pudrición	
AG2-2 IV	Ahogamiento	
	Pudrición de la raíz y tizón de la hoja	Remolacha
AG 3	Parche largo	Pasto
	Costra negra y cancro del tallo/stolones	Papa
	“Target spot”	Tabaco
	Tizón de la hoja	Tomate
AG 4 (HGI, HGII y HGIII)	Mancha café	Berenjena
	Pudrición del fruto	Tomate
	Pudrición del tallo	Chícharo
	Ahogamiento y cancro del tallo	Papa
	Ahogamiento y pudrición de la raíz	Soya, , cacahuete
AG5	Pudrición de la vaina	Habichuela cebolla, algodón
	Costra negra	Papa
	Parche marrón	Pasto
AG 6	Pudrición de raíz	Frijol, soya
	Grupo no patogénico	
	Grupo no patogénico	
AG8	Manchones desnudos	Cereales
	Pudrición de raíz	Papa
AG 9	Patógeno débil	Crucíferas

2.2. Costra negra de la papa

R. solani causa la enfermedad conocida como costra negra o rizoctoniasis de la papa, y es muy común encontrarlo en cualquier zona de cultivo. El grupo AG-3 de *R. solani* ha sido identificados como el principal agente causal de la costra negra de la papa (Carling y Leiner, 1990; Bains y Bisht, 1995; Belali *et al.*, 1995; Rauf *et al.*, 2000; Virgen *et al.*, 2000; Yanar *et al.*, 2005; Farrokhi *et al.*, 2007); sin embargo, existen reportes indicando que otros grupos AGs, incluyendo AG1-IA (Raur *et al.*, 2000), AG2-I (Chand y Logan, 1983; Rauf *et al.*, 2000; Petkowski *et al.*, 2003), AG-2-2 (Petkowski *et al.*, 2003), AG-4 (Belali *et al.*, 1995; Rauf *et al.*, 2000; Petkowski *et al.*, 2003) AG-5 (Abe y Tsuboki, 1978; Belali *et al.*, 1995; Petkowski *et al.*, 2003; Truter y Wehner, 2004), AG-6 (Rauf *et al.*, 2000) y AG-7 (Carling *et al.*, 1998; Rauf *et al.*, 2000) también pueden estar involucrados en la enfermedad.

El patógeno ataca los órganos subterráneos de la planta de papa incluyendo raíces, estolones y tubérculos (Torres, 2002; Farrokhi *et al.*, 2007). *R solani* afecta el crecimiento y el desarrollo de la planta, rendimiento y calidad de los tubérculos, debido a las lesiones en los tallos, estolones y por el desarrollo de costras negras sobre los tubérculos (Atkinson *et al.*, 2010). Así mismo, se ha reportado que la enfermedad ocasiona una reducción en el rendimiento de tubérculos, hasta un 30% (Banville, 1989).

2.2.1. Síntomas y signos de la rizoctoniasis

La rizoctoniasis es una de las enfermedades que presenta una gran variedad de síntomas, dependiendo de la severidad del daño y de la parte de la planta que se vea afectada. Este patógeno afecta a la planta en todas sus etapas fisiológicas, los brotes del tubérculo semilla son afectados en pre y post emergencia y muestran en la base lesiones necróticas de color marrón, que cuando son profundas los estrangulan. Sin embargo, en este estado la planta puede desarrollar brotes nuevos desde la parte inferior del tallo estrangulado, mismos que de no ser afectados emergen finalmente del suelo (Torres, 2002).

La infección en el tallo causa retraso en el crecimiento y rosetas en las puntas de la planta, las cuales en algunos casos se tornan de color rojo a amarillo, ocasionando algunas veces la muerte temprana del tallo. Si la lesión circunda la base del tallo, el transporte de los nutrientes a los estolones es obstaculizado, lo cual lleva a la formación de tubérculos aéreos. Estos últimos son de color verde a púrpura rojizo; su forma varía desde redonda a forma de botella; transforman los brotes laterales en las axilas y presentan algunas hojas pequeñas en la punta (Delleman *et al.*, 2005).

La enfermedad ocasionando lesiones necróticas que pueden estrangular o matar los estolones (Tsrör, 2010). En consecuencia el número de tubérculos se puede reducir; como también los estolones se pueden ramificar en exceso, llevando a la formación del tubérculo cerca del tallo, lo que resulta en ramilletes de pequeños y deformes tubérculos (Delleman *et al.*, 2005).

En la base de los tallos de las plantas crecidas en suelos infestados, se puede observar una capa micelial de color blanco grisáceo, misma que consiste de las estructuras sexuales del hongo. Se cree que este micelio y sus esporas (basidiosporas) no causan ningún daño al cultivo (Tsrör, 2010).

En la superficie de los tubérculos afectados se observa la presencia de costras negras, llamadas esclerocios, las cuales funcionan como estructuras de conservación del hongo (Bains *et al.*, 2002). La costra negra es el signo mejor conocido; éste se manifiesta en tubérculos lavados, ya que el esclerocio no es removido con el proceso de limpieza, sino que permanece distintivamente visible sobre la superficie del tubérculo. El tamaño de los esclerocios individuales es de aproximadamente 1.0-5.0 mm de ancho y de 1 mm a 10 mm de largo; pero algunas veces una parte grande o todo el tubérculo es cubierta por costra negra (Delleman *et al.*, 2005).

Las costras negras le dan un mal aspecto a los tubérculos y en un mercado exigente, los tubérculos afectados son rechazados; por ejemplo en Costa Rica y/o México, en donde dependiendo del porcentaje de tubérculos infectados, los

rechazan o los cotizan a un menor precio. Además, las costras negras restan la calidad sanitaria de los tubérculos cuando son comercializados como semilla (Torres, 2002).

2.2.2. Ciclo de la enfermedad causada por *Rhizoctonia*

La enfermedad puede iniciar a partir de esclerocios presentes sobre el tubérculo semilla o inóculo del suelo en forma de micelio, que sobrevive de manera saprofitica en los residuos de cosechas.

Cuando tubérculos semilla infectados son plantados, el hongo crece desde la superficie de la semilla hasta el desarrollo del brote y ocurre la infección de la raíz primordial, estolones primordiales y de los primordios foliares (Figura 1). El inóculo en la semilla es particularmente efectivo debido a su proximidad al desarrollo de los brotes y estolones. Así mismo, el inóculo proveniente del suelo es potencialmente tan dañino como el inóculo en la semilla, pero éste solo puede causar infección cuando los órganos de la planta se desarrollan en proximidad al inóculo (Wharton *et al.*, 2007).

Los síntomas de la enfermedad son observados en la parte aérea de la planta (cancro del tallo) y en la parte subterránea en tubérculos con formación de esclerocios (costra negra) (Tsrer, 2010).

Las raíces y los estolones pueden ser infectados durante cualquier etapa del periodo de cultivo; sin embargo, la mayoría de las infecciones probablemente ocurren durante las primeras etapas del desarrollo de la planta, ya que la resistencia a la infección de estolones y tallo incrementa después de la emergencia del brote, limitando eventualmente la expansión de la infección (Wharton *et al.*, 2007)

La formación de esclerocios ocurre en condiciones de suficiente humedad y temperatura optima de 18 °C; sin embargo, el máximo desarrollo de esclerocios se produce cuando los tubérculos que se encuentran listos para ser cosechados se mantienen en el campo por un tiempo prolongado (Torres, 2002).



Figura 1. Ciclo de la enfermedad cancro del tallo y costra negra de la papa causadas por *R. solani*.

2.2.3. Control de la costra negra

Actualmente, no es posible controlar completamente la enfermedad causada por *Rhizoctonia*, pero utilizando una combinación de estrategias de control cultural y protección del cultivo es posible limitar su severidad. El manejo efectivo de esta enfermedad requiere de la implementación de una estrategia de manejo integrado basada en el conocimiento de cada estado de la enfermedad (Wharton *et al.*, 2007)

Debido a que los esclerocios pueden sobrevivir largo tiempo en el suelo, sólo las rotaciones con amplios periodos de tiempo con cereales y pastos pueden reducir la incidencia de la enfermedad. También se ha observado que la siembra superficial de tubérculos con brotes reduce el tiempo de exposición al hongo en el suelo. La enfermedad puede ser aminorada con aplicaciones de fungicidas mezclados con el suelo en la franja de siembra, o aplicando el tratamiento a los

tubérculos semilla, cuando los suelos no están demasiado infestados (INIFAP, 2008). Sin embargo, los resultados con fungicidas han sido variables, lo que puede deberse a que el hongo presenta distintos grupos anastomóticos (AG), cuya sensibilidad a fungicidas puede ser diferencial (Virgen *et al.*, 2000).

El uso de fungicidas aplicados al suelo o como desinfectantes de tubérculos, incrementa la calidad sanitaria. Por otro lado, los fungicidas deberían utilizarse de acuerdo al GA presente. Trabajos realizados en México han determinado que el Pencicurón controla eficientemente el GA3 y el Tolclofos-metil al GA4; pero el GA7, que también forma esclerocios, es tolerante a todos los fungicidas (Torres, 2002).

El control biológico también se ha aplicado con éxito contra los diferentes grupos anastomóticos de *R. solani*. Entre los enemigos naturales más eficientes de *R. solani* se encuentran *Trichoderma harzianum*, *Rhizoctonia* binucleada y *Veticillium biguttatum*; aunque en la práctica, el control biológico debe ser considerado sólo como un componente del manejo integrado (Torres, 2002).

III. Justificación

Sinaloa es uno de los principales estados productores de papa en México. La papa es un cultivo de gran valor económico, cuyos costos de producción llegan a alcanzar hasta \$150,000 pesos mexicanos por hectárea (USAID, 2005). Los gastos pueden aumentar por el ataque de patógenos y el mal manejo de los mismos, en detrimento del rendimiento y calidad de la cosecha.

La costra negra de la papa, causada por *R. solani* es muy común en los campos de cultivo de papa y llega a reducir el rendimiento hasta en un 30%. Por lo anterior resulta importante establecer técnicas rápidas, sencillas y confiables para el diagnóstico adecuado de la enfermedad y así poder tomar medidas de manejo apropiadas.

IV. Hipótesis

Los grupos anastomósicos AG1, AG2, AG3, AG4 y AG5 del hongo *R. solani*, causante de la costra negra de la papa y cancro del tallo, se encuentran presentes en el cultivo de papa en Sinaloa.

V. Objetivos

A. Objetivo general

Identificar molecularmente los diferentes grupos anastomósicos de *R. solani* presentes en el cultivo de papa en Sinaloa.

B. Objetivos específicos

- Aislar y caracterizar molecularmente grupos anastomósicos de *R. solani* asociados a la costra negra de la papa y cancro del tallo en el cultivo de papa en Sinaloa.
- Diseñar una estrategia de diagnóstico molecular específica para cada uno de los grupos anastomósicos de *R. solani* asociados al cultivo de papa en Sinaloa.
- Identificar, por reacción de anastomosis, los grupos AG de *R. solani* asociados al cultivo de papa en Sinaloa.

VI. Materiales y métodos

1. Colecta y manejo de las muestras

En el Estado de Sinaloa el cultivo de papa se establece en el periodo de otoño-invierno, de ahí que las muestras se tomaran durante los meses de diciembre a febrero del ciclo agrícola 2010-2011, en las siguientes localidades: Santa Rosa, Zona Industrial, Carretera La Clayton, Ruiz Cortínez, Las Colonias, La Esmeralda y Palos Blancos, correspondientes a los Municipios de El Fuerte, Ahome y Guasave (Figura 2).



Figura 2. Localidades visitadas para la obtención de muestras.

Se realizó tres muestreos, en el primero y el segundo se colectó cinco plantas por lote y en el tercero diez plantas y tubérculos por cada plantación. Durante el segundo muestreo también se visitó las bodegas de la empresa Agro Reservas, en donde se colectó 30 tubérculos con signos de esclerosios. Los muestreos se realizaron en forma dirigida enfocándose en las plantas que presentaran el síndrome de *R. solani*, principalmente tallos con canchales y tubérculos con esclerosios. Adicionalmente, se analizaron tres tubérculos

provenientes de una zona comercial que presentaban esclerocios grandes y uno con esclerocios pequeños, proveniente de Guayparime, Guasave.

Las muestras fueron transportadas al Laboratorio de Biología Molecular de Fitopatógenos del CIIDIR-Sinaloa. Los tallos y tubérculos se lavaron con agua de la llave, se secaron con papel secante y se almacenaron en bolsas de plástico a 4 °C, en un cuarto frío, hasta su procesamiento.

2. Aislamiento y preservación de *R. solani*

2.1. Obtención de aislados

Para la obtención de aislados se tomaron trozos de tallo, raíz y tubérculos en los cuales se observó cancro, estrangulamiento y esclerocios, respectivamente (Figura 3).



Figura 3. Síntomas a partir de los cuales se obtuvieron aislados de *Rhizoctonia*: a) cancro en la base de un tallo de papa, b) esclerocios sobre un tubérculo.

El tejido en trozos se colocó en un tubo Eppendorf de 1.6 ml y en una campana de flujo laminar se desinfectó superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex ®) al 1% durante un minuto; posteriormente, se lavó con agua destilada estéril tres a cinco veces, para eliminar los residuos de cloro; finalmente el tejido se secó sobre una toalla de papel estéril.

El tejido desinfectado se sembró en placas Petri con agua agar (15 g/l) adicionado con 250 mg/l de ampicilina, para evitar el crecimiento bacteriano. Se

incubó en oscuridad a 25 °C de dos a cuatro días hasta observar el crecimiento del micelio. Las colonias con la morfología característica se purificaron transfiriendo puntas de hifa, mediante una aguja de disección, a placas con medio PDA (agar dextrosa y papa) adicionado con 250 mg/l de ampicilina. Se incubó en oscuridad a 25 °C para la propagación del hongo.

2.2. Identificación morfológica

Para la identificación morfológica de *R. solani* se realizó un frotis en fresco del micelio crecido en medio PDA con una aguja estéril o con cinta adhesiva. El micelio se colocó sobre un porta objetos con una gota de agua destilada y se examinó en un microscopio óptico a 100 y 400X, procurando observar las claves taxonómicas características (Ogoshi, 1987):

- Pigmentos marrones oscuros de las hifas.
- Ramificación cerca del septo central en la hifa vegetativa joven.
- Estrangulamiento de la hifa y formación de septos a una corta distancia del punto donde se originan las ramas hifales.
- Células multinucleadas en la hifa vegetativa joven.
- Ausencia de conexiones tipo fíbulas entre células contiguas.
- Producción nula de conidios

2.3. Almacenamiento y preservación de los aislados

Para la criopreservación se tomó un disco de 50 mm de diámetro de cada uno de los aislados a partir de cultivos del hongo en medio PDA con cinco a siete días de crecimiento. El disco de micelio se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml con 1 ml de glicerol al 30%. Los tubos se colocaron en refrigeración a 4 °C toda la noche; se transfirieron a un congelador a – 20 °C de dos a cuatro horas y se almacenaron en un ultracongelador a –70 °C (Sneh *et al.*, 1991).

3. Análisis moleculares

3.1. Extracción de DNA de tejido vegetal

Para la extracción de DNA del tejido vegetal se utilizó el método de CTAB en caliente (Zhang *et al.*, 1998). Se tomaron de 1 a 2 g de tejido de tallo, raíz, brote o tubérculo con los síntomas característicos ocasionados por *R. solani*. El tejido se colocó en un tubo Eppendorf de 1.6 ml y se le agregaron 200 µl de buffer CTAB al 3% (Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, EDTA 20 mM, NaCl 1.4 M, 3% de CTAB y 0.2% de β-mercaptoetanol precalentado a 60 °C y añadido justo antes de su uso). El material se maceró con la ayuda de un homogenizador con pistilo. Posteriormente se le adicionaron 600 µl del buffer CTAB y se incubó a 60 °C por 30 min y con agitación por inversión cada 5 min. Se le agregaron 600 µl de cloroformo: isoamílico 24:1 y se agitó por inversión varias veces. Se centrifugó 10 min a 12,000 rpm y se recuperó el sobrenadante. Luego se precipitó con un volumen de isopropanol frío al 100%. Se centrifugó 8 min a 12,000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó por 3 min a 12,000 rpm. Se eliminó el sobrenadante, se dejó secar la pastilla para finalmente resuspender en un volumen de 30 a 50 µl de agua destilada libre de DNAsas y ARNsas. El DNA se almacenó a -20 °C hasta su posterior utilización.

3.2. Extracción del DNA de los aislados fúngicos

Para la extracción de DNA de los aislados fúngico se utilizó el método de CTAB en caliente (Zhang *et al.*, 1998). Se realizó, como se mencionó anteriormente, en la extracción de DNA de tejidos, tomando de 1 a 2 g de micelio de hongo crecido en medio PDA y el macerado se realizó manualmente.

3.3. Electroforesis

Para observar la calidad de la extracción de DNA se mezclaron 2 µl de DNA y 8 µl de colorante naranja G (0.025% de naranja G, 25 mM de EDTA pH 8 y 30% de glicerol). Se realizó una corrida de electroforesis en un gel de agarosa al 1%

teñido con bromuro de etidio a una concentración de 0.2 µl/ml. El proceso se corrió a 80 V durante 20-25 min en una cámara de electroforesis con el buffer TAE 1X. Finalmente, el DNA se visualizó en un documentador de imágenes (GelDoc, Biorad).

3.4. Identificación molecular

Para la identificación molecular de *R. solani* y sus diferentes grupos anastomósicos se amplificó por PCR la región del espaciador interno transcrito, ITS (“Internal Transcribed Spacer” por sus siglas en inglés) del DNA ribosomal (rDNA), utilizando diferentes juegos de primers, los cuales se describen en el cuadro 2.

Cuadro 2. Lista de primers utilizados para la identificación molecular por PCR del hongo *R. solani* y de sus grupos anastomósicos AG1, AG2, y AG3.

Nombre	Secuencia de primers	Tamaño (pb)	Referencia
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	700	White <i>et al.</i> , 1990
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'		
<i>R. solani</i> AG^a	5'CTCAAACAGGCATGCTC-3'		
AG 1-IA	5'-CAGCAATAGTTGGTGGGA-3'	265	Matsumoto, 2002
AG 1-IB	5'-AAGGTCCTTTGGGGTTGGGG-3'	300	
AG 1-IC	5'-CTTTTTTTGGGGGGCCTTGC-3'	230	
AG 2-1	5'-AGGCAATAGGTTATTGGACC-3'	250	
AG 2-2	5'-CATGGATGGGAGAACTTTTA-3'	300	
Rs ₁ F ₂	5'-TTGGTTGTAGCTGGTCTATTT-3'	500	Lees <i>et al.</i> , 2002
Rs ₂ R ₁	5'-TATCACGCTGAGTGGAACCA-3'		

^aPrimer común (forward).

3.4.1. Amplificación por PCR de regiones conservadas de eucariontes

En la fase inicial del estudio se utilizaron los primers generalistas para eucariontes ITS1-ITS4 (White *et al.*, 1990), que amplifican la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosomal en un fragmento de aproximadamente 700 pb. La mezcla de PCR se realizó en tubos Eppendorf de 200 µl en un volumen total de 25 µl conteniendo: 1 X de buffer, 2 mM de MgCl₂, 0.2 mM de nucleótidos trifosfatados (dNTP's), 0.2mM de cada primer, 1 Unidad de Taq DNA polimerasa (Invitrogen

Cat. 18038-018) y 1 µl de DNA templado. Se utilizó un termociclador automático (C1000™, BIO-RAD), bajo las siguientes condiciones: un ciclo a 95 °C por 4 min, 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 60 °C y 2 min a 72 °C y un ciclo final de 10 min a 72 °C. Los productos de PCR amplificados fueron purificados, cuantificados y secuenciados.

3.4.1.1. Purificación de producto de PCR

El producto de PCR fue purificado con el kit Wizard® SV Gel y PCR Clean-Up System, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se agregó un volumen igual de la solución de unión de membrana (“membrane binding”) al volumen de la reacción de PCR. Cada reacción se realizó por triplicado y se purificó junto el producto de las tres repeticiones, para poder obtener una concentración apropiada de DNA.

3.4.1.2. Cuantificación del DNA

La cuantificación de DNA se realizó con el kit comercial Quant-its DNA HS (Invitrogen). En un tubo Falcón se preparó la solución de trabajo diluyendo el fluoróforo (picogreen) en el buffer (1:200). Para los estándares, en tubos lisos Eppendorf de 600 µl se adicionaron 190 µl de la solución de trabajo y 10 µl de cada estándar, agitándose por inversión. Para las muestras de DNA a evaluar, se adicionaron 199 µl de la solución de trabajo y 1 µl de DNA. Todos los tubos se incubaron a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, se procedió a calibrar el fluorómetro (Qubit, invitrogen, Turner Biosystems) con los dos estándares y posteriormente se tomó lectura para cada muestra. Los valores dados por el fluorómetro (ng/ml), se utilizaron para calcular la concentración de DNA en las muestras, mediante la siguiente ecuación:

$$[DNA] = QF \left(\frac{200}{X} \right)$$

Donde

QF = Valor dado por el fluorómetro

X = Número de μL de DNA adicionados a cada tubo Eppendorf durante el ensayo

3.4.1.3. Secuenciación y análisis

La secuenciación se realizó utilizando el kit Dye Terminator Cycle Sequencing, Ready Reaction, en un secuenciador ABI PRISM 377 PERKIN-ELMER (Cetus, Norwalk, CT) en el Laboratorio de Ingeniería Genética del CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato.

Las secuencias obtenidas fueron sometidas a comparación con secuencias reportadas en el Banco de Genes (Gen Bank), del Centro Internacional para la Información en Biotecnología (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) con el programa BLAST-N.

3.4.1.4. Análisis filogenético

El análisis filogenético se realizó con el método Clustal X de la serie de programas MegAlingn. El árbol filogenético fue generado usando el programa Njplot para Clustal X. Como brazo externo se utilizó la secuencia de *Athelia* (*Sclerotium*) *rolfsii* (AY684917). Se utilizó el método estándar del programa njPlot para estimar la estabilidad y soporte de las ramas (Sharon *et al.*, 2008).

3.4.2. PCR específicos para AG1 y AG2 de *R. solani*

Para la detección específica de los grupos anastomóticos AG1 y AG2 de *R. solani* se utilizaron los primers AG/AG1-IA, AG1-IB, AG1-IC, AG2-1, AG2-2 (Matsumoto, 2002), que amplifican un fragmento de 200 a 300 pb en la región 28S del DNA ribosomal (Cuadro 2). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 μl conteniendo 1X de buffer, 2.5 mM de MgCl_2 , 0.1 mM de nucleótidos trifosfatados (dNTP's), 0.5 mM de cada primer, 1 Unidad de Taq DNA polimerasa (Invitrogen) y 1 μl de DNA templado. La reacción se incubó en el termociclador ya

mencionado bajo las siguientes condiciones: un ciclo de 1 min a 94 °C; 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 54 °C por 2 min, 72 °C por 3 min; un ciclo final de 72 °C por 3 min.

3.4.3. PCR específicos para AG3 de *R. Solani*

También se utilizó el juego de primers $Rs_1F_2-Rs_2R_1$ específico para AG3 reportado por Lees *et al.* (2002), que amplifican en la región ITS1-5.8S-ITS2, dando un fragmento de 500 pb (Cuadro 2). Se preparó una mezcla de PCR con un volumen final de 25 μ l, la cual consistió de 1X buffer de PCR, 2 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de nucleótidos trifosfatados (dNTP's), 0.3 mM de cada primer, 1 Unidad de Taq DNA polimerasa (Invitrogen Cat. 18038-018) y 1 μ l de DNA templete. En el termociclador se programó: un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 2 min; seguido de 35 ciclos de 95 °C por 45 s, 63 °C por 60 s y 72 °C por 90 s; con un ciclo final de extensión de 72 °C por 5 min.

3.4.4. Diseño de primers específicos para AG4

En la bibliografía no se encontraron referencias sobre primers específicos para el grupo anastomósico AG4 de *R. solani* y dado que este grupo se detectó por secuenciación de segmentos de DNA amplificados por PCR, se optó por el diseño de primers específicos para AG4. Se utilizaron secuencias reportadas en la base de datos del NCBI correspondientes a nuestro grupo anastomósicos de interés. Para identificar regiones únicas en las secuencias de los aislados de AG4 se seleccionaron diez secuencias completas correspondientes a la región ITS de AG4 y cinco secuencias de la misma región de AG1, AG2 y AG3 y se compararon con el programa Clustal X (DNASTar, Inc.).

Las secuencias específicas encontradas para AG4 se analizaron con el programa en línea Primer 3 Input versión 4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) para identificar el mejor juego posible de primers específicos para AG4. Las secuencias de los primers seleccionadas se compararon con la base de datos BLAST del NCBI, para asegurarse de que no presentaran homología con otros organismos.

Se seleccionaron dos pares de secuencias para ser usadas como primers específicos para la amplificación por PCR de *R. solani* AG4 (Cuadro3).

Cuadro 3. Secuencias seleccionadas para ser utilizadas como primers específicos para la reacción por PCR de *R. solani* AG4, temperatura de alineación de los primers (Tm) y tamaño de fragmento que amplifican.

Nombre	Secuencia del primer	Tm	Tamaño (pb)
RsAG4F1	5'-TCCTTGGAGCATGCCTGTTT-3'	66.9	214
RsAG4R1	5'-TACCTTGGCCACCCCTTTTT-3'	66.3	
RsAG4F2	5'-GAATTAATGTAGAGTTTGGTTG-3'	54.6	248
RsAG4R2	5'-GCCAAGAGATCCGTTGTTGA-3'	65.2	

3.4.4.1. PCR específicos para AG4 de *R. solani*

Para la amplificación específica de *R. solani* AG4, se utilizaron los primers diseñados en el desarrollo de este proyecto, Rs₁AG4F₁-Rs₁AG4R₁, que amplifican un fragmento de 214 pb de la región ITS1-5.8S-ITS2. La reacción de PCR se realizó como lo descrito en los apartados anteriores, modificando las condiciones del termociclador ya que se realizó un gradiente de temperaturas, para determinar la temperatura más adecuada para el alineamiento de los primers.

Con base en la temperatura de alineación de los primers (Tm) el gradiente utilizado fue de 64 °C, 66 °C, 68 °C y 70 °C. En la prueba anterior se pudo observar que a 68 °C se lograba la amplificación del fragmento del tamaño de bases esperado con una buena intensidad, por lo que se optó por utilizar este valor como Tm para posteriores análisis.

3.4.5. Electroforesis del producto de PCR

Para observar la presencia de bandas del tamaño deseado, se realizó una corrida electroforética en un gel de agarosa al 1%, con bromuro de etidio a una concentración de 0.2 µl/ml, usando la siguiente proporción: 8 µl de producto de PCR y 2 µl de colorante naranja G (0.025% de naranja G, 25 mM de EDTA pH 8 y 30% de glicerol). A la par, en el mismo gel, se corrieron 3 µl del marcador molecular 1 kb plus (Invitrogen®).

El gel se corrió a 95 V durante 40-45 min, en una cámara de electroforesis con el buffer TAE 1X. Finalmente el DNA se visualizó en el fotodocumentador de imágenes ya mencionado en donde se comparó el tamaño de la base obtenida con el tamaño de las bandas dadas por el marcador molecular.

3. Pruebas de anastomosis

Los ensayos de anastomosis se realizaron basándose en el método reportado por Moller *et al.* (2007), con algunas modificaciones. En una caja Petri con una capa delgada de medio PDA se colocó en el centro un disco de 1 cm de diámetro del aislado control (aislado de referencia con AG a identificar) y alrededor de éste se colocaron 3 discos de 1 cm de diámetro del aislado a probar. Se incubaron a ± 25°C durante 2-3 días, hasta que se formó una zona de traslape entre las hifas de ambos aislados. Parte de esta zona se cortó con un bisturí, se colocó en un porta objetos y se tiñó con azul de tripano 0.05% en lactofenol y se observó en un microscopio óptico a 400X.

Las relaciones entre las hifas, se clasificaron de acuerdo a las distintas categorías de interacción descritas por MacNish *et al.* (1997):

C0, cuando no se observó reconocimiento entre las hifas, no hay interacción, las hifas pasan una por encima de la otra sin que haya contacto. Indica que no pertenecen al mismo AG y carecen de relación vegetativa.

C1, contacto de las hifas y conexión de las paredes celulares, pero no de membrana a membrana. Esta reacción sugiere una relación distante entre AG altamente heterógamos.

C2, fusión de las hifas, conexión de las paredes celulares obvias, contacto de membranas incierto, localización del sitio de reacción obvio, seguido de la muerte de las células fusionadas y células adyacentes. Indica que se trata de AGs relacionados, pero que son vegetativamente incompatibles.

C3, fusión de la pared y la membrana, punto de anastomosis frecuentemente no obvio, sin evidencia de muerte celular (fusión perfecta). Corresponde a aislados que pertenecen al mismo AG y son vegetativamente compatibles.

VII. Resultados

1. Colecta y manejo de las muestras

Se realizaron tres muestreos en el norte de Sinaloa, durante el periodo de cultivo otoño-invierno (2010-2011), el primero se realizó el 03 de noviembre del 2010 en Las Colonias, Esmeralda, Palos Blancos y Ruiz Cortínez del municipio de Guasave y en la zona industrial en el municipio de Ahome (Cuadro 4). En estas localidades el cultivo de papa tenía de dos a cuatro semanas desde su siembra. Se seleccionaron las plantas con enanismo, amarillamiento de las hojas y cancro en el tallo.

Cuadro 4. Muestreo realizado el 03 de noviembre del 2010 en campos de cultivo de papa en el Norte de Sinaloa.

Origen		No. de muestra	Síntomas	
			Tubérculo Semilla	Follaje
Municipio de Guasave	Las Colonias Variedad "Fiana"	6	Oscurecimiento, descarapelada de la piel, pústulas claras, manchas café	Hojas pequeñas, necrosis engrosamiento del tallo, clorosis
	Esmeralda Variedad "Agata"	7	Oscurecimiento y descarapelado de la piel Manchas café Pequeñas pústulas	Engrosamiento del tallo, clorosis, necrosis de yemas, enanismo, necrosis y flacidez de tallo, escaso desarrollo radicular, pudrición de raíz
	Palos Blancos Variedad "Agata y FL"	5	Pecas cafés y levantadas oscurecimiento de la piel	Amarillamiento, enanismo, engrosamiento del tallo, necrosis
	Ruiz Cortínez	5	Oscurecimiento y descarapelado de la piel, pequitas café, Costras negras	Necrosis en la parte apical de las hojas
Municipio de Ahome	Zona industrial Variedad "Fianna"	4	Oscurecimiento y descarapelado de la piel pequeñas pústulas claras	Engrosamiento del tallo punta de brotes necrosados necrosis del tallo

El segundo muestreo se realizó el 14 de Diciembre del 2010 en las localidades del municipio de Ahome Santa Rosa y Zona Industrial. También se visitaron las bodegas de la empresa Agro Reservas, la cual aportó tubérculos semilla con síntomas de diferentes enfermedades (Cuadro 5).

Cuadro 5. Muestreo realizado el 14 de Diciembre del 2010; localidades que se visitaron y descripción de las muestras colectadas.

Localidad	Muestra	Síntomas
Santa Rosa	5 plantas	Cancro en el tallo
Zona industrial	5 plantas	Cancro en el tallo
Bodega de Agro Reservas	8 tubérculos variedad Atlantic provenientes de Los Mochis	Pecas café posibles costras de <i>Rhizoctonia</i>
	3 tubérculos variedad Atlantic provenientes de Chihuahua	Síntomas de <i>Rhizoctonia</i>
	10 tubérculos variedad FL provenientes de Los Mochis	Síntomas de <i>Rhizoctonia</i>

El tercer muestreo (29 de enero del 2011) fue realizado cuando las plantaciones estaban en la etapa de cosecha de tubérculos en las localidades de El Fuerte, zona industrial y Clayton del municipio de Ahome y Ruiz cortinez del municipio de Guasave (Cuadro 6).

Cuadro 6. Muestreo realizado el 29 de enero del 2011; localidades que se visitaron y descripción de las muestras colectadas.

Localidad		Muestra	Síntomas
Lote 26 de Agroreservas		19 tubérculos	Manchitas café
		13 plantas (tallos y raíces)	Cancro del tallo, Marchitamiento Presencia de micelio en tallo y esclerocios
Municipio de Ahome	Zona Industrial	4 tubérculos	Manchas café y posibles costras
		10 plantas	Cancro en tallo, Enanismo y marchitez
	Clayton	20 tubérculos	Manchas café, posibles costras
Municipio de Guasave	Ruiz Cortínez	6 tubérculos	Manchas café, Costras
		19 plantas	Cancro del tallo, Marchitez, Micelio en tallo y esclerocios, Pudrición del tallo

2. Identificación morfológica de aislados de *Rhizoctonia*

En el primer muestreo se obtuvieron 11 aislados cuya morfología coincidía con la de *Rhizoctonia* (Hifas gruesas y septadas, con ramificación en T); cuatro de ellos provienen de tubérculos colectados en Las Colonias, uno de Esmeralda, dos de Palos Blancos, cuatro de Ruiz Cortínez, y de la Zona Industrial no se obtuvo ningún aislado con morfología típica de *Rhizoctonia*. En el segundo muestreo no se obtuvo ningún aislado con características morfológicas típicas de *Rhizoctonia*. En el tercer muestreo se obtuvieron siete aislados que coincidían morfológicamente con *Rhizoctonia*. Los aislados obtenidos de tubérculos fueron colectados en El Fuerte, uno de la Zona industrial, dos de Ruiz Cortínez y dos de Clayton.

Del tubérculo del predio Guayparime se obtuvieron 6 aislados con morfología de *Rhizoctonia* y otros nueve de los tres tubérculos comerciales.

También se analizaron morfológicamente seis aislados de *Rhizoctonia* obtenidos de la base de los tallos de plantas de chile con pudrición y cancro; éstos

fueron proporcionados por el Dr. Miguel Ángel Apodaca Sánchez (Universidad Autónoma de Sinaloa). Estos aislados mostraron un micelio típico de *Rhizoctonia* y se identificaron morfológicamente como tales. Los aislados de Chile se utilizaron como cepas control en la identificación de áquellos obtenidos en el cultivo de papa.

Cuadro 7. Identificación morfológica de aislados de *Rhizoctonia*; muestra de la que se obtuvieron, localidad y fecha de muestreo.

Localidad	Aislado	Tejido del que se obtuvo el asilado	Localidad	Aislado	Tejido del que se obtuvo el asilado
Muestreo 03-12-2010			Tubérculo de Guyaparime	TPG1	Esclerocio
Las Colonias	LCT2S1	Tallo		TPG2	Esclerocio
	LCT4S1-2	Tallo		TPG5	Esclerocio
	LCT5S2-1	Tallo		TPG9	Esclerocio
	LCT5S1	Tallo		TPG16	Esclerocio
Esmeralda	EST4S2-1	Tallo		TPG17	Esclerocio
Palos Blancos	PbTS1	Tallo		Tubérculo comercial 1	TC1-4
	PbTS4	Tallo	TC1-5		Esclerocio
Ruiz Cortínez	RCT1S1	Tallo	Tubérculo comercial 2	TC2-1	Esclerocio
	RCT3S1	Tallo		TC2-2	Esclerocio
	RCT4S1	Tallo	TC2-5	Esclerocio	
	RCT5S2	Tallo	Tubérculo comercial 3	TC3-1	Esclerocio
Muestreo 29-01-2011				TC3-2	Esclerocio
El Fuerte	EF8	Tubérculo		TC3-3	Esclerocio
Zona Industrial	ZI6T	Tallo		TC3-6	Esclerocio
Ruiz Cortínez	RC2	Tubérculo			
	RCT2	Tallo			
	RCT2-3	Tallo			
Clayton	CT2	Tubérculo			
	CT2-2	Tubérculo			

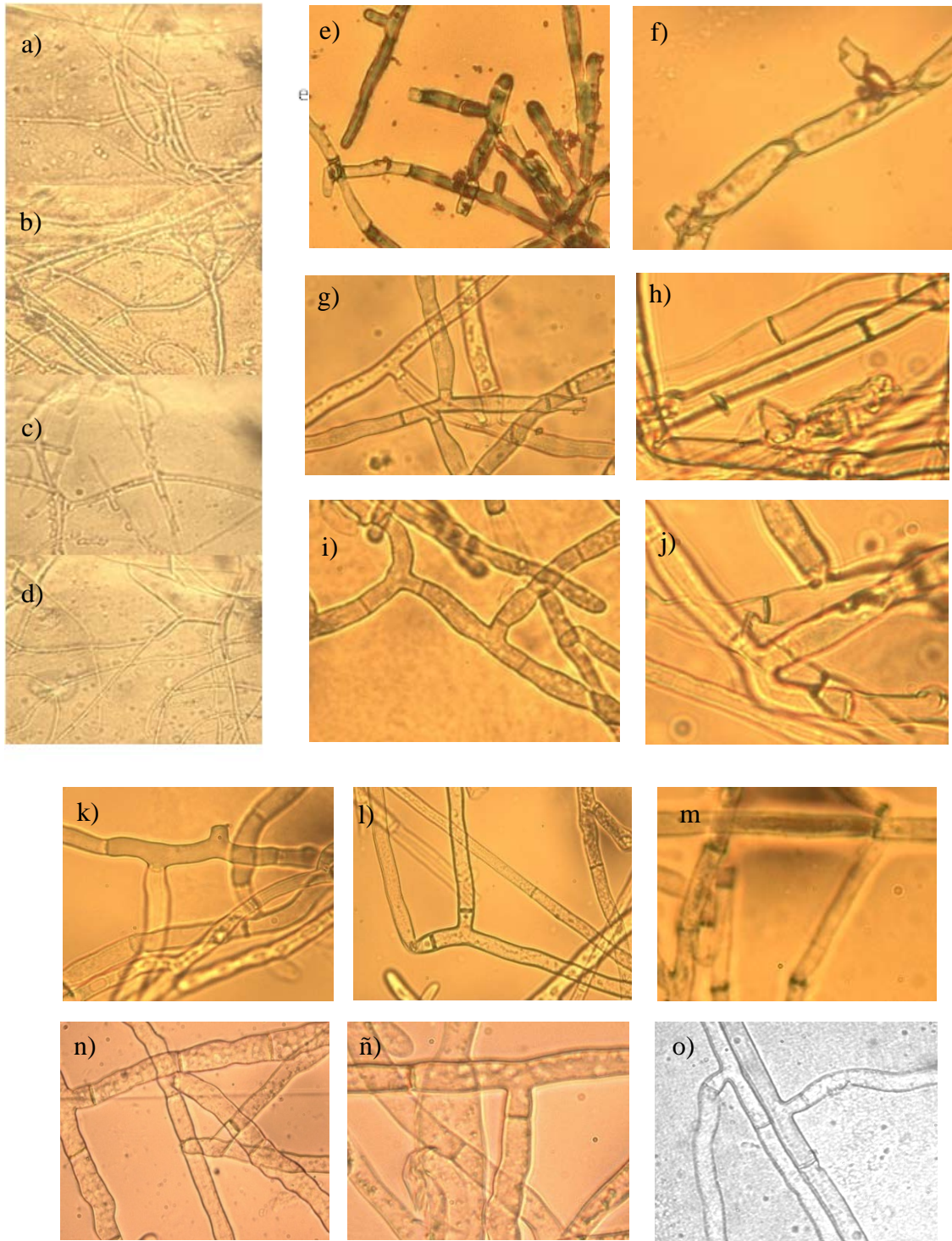


Figura 4. Aislados identificados morfológicamente como *Rhizoctonia* (microscopio óptico, 400X). a, LCT2S1; b, EST4S2-1; c, PbTS1; d) RCT1S1, e) R1, f) R2, g) R3, h) R4, i) R5, j) R6, k) EF8, l) RC2, m) RCT2, n)TPG1, ñ) TPG16, o)TC1-4

1. Extracción del DNA fúngico

El método de CTAB en caliente proporcionó buenos resultados, ya que con éste se pudo observar una buena cantidad de DNA, una pastilla limpia y uniformidad entre las bandas (Figura 5).



Figura 5. DNA genómico total extraído de aislados de hongos por el método de CTAB.

2. Identificación molecular

4.1. Amplificación por PCR de regiones conservadas de eucariontes

La amplificación por PCR de las regiones ITS de rDNA conservadas en eucariontes se realizó con los primers generalistas ITS1-ITS4, con los que se obtuvo una banda del tamaño esperado, de aproximadamente 650 pb, para todos los aislados (Figura 6).

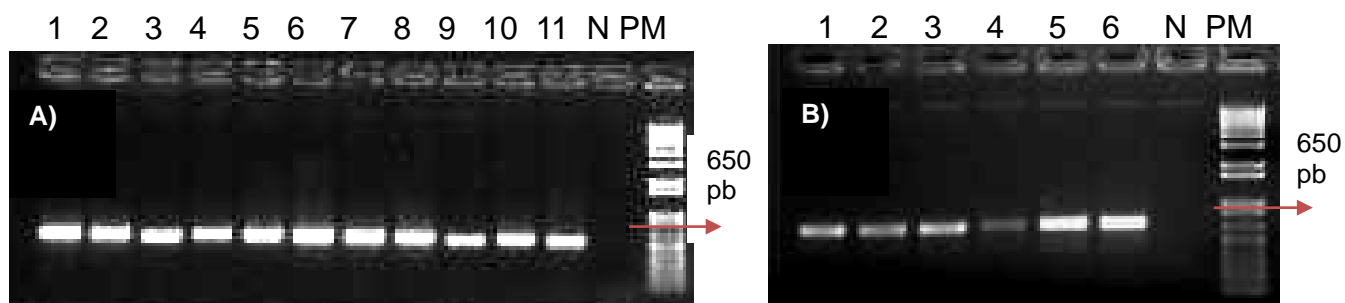


Figura 6. Productos amplificados por PCR de aislados fúngicos obtenidos a partir de tallo y tubérculo con primers generalistas para eucariontes ITS1-ITS4. A: aislados 1. LCT2S1, 2. LCT4S12, 3. LCT5S21, 4. LCT5S1, 5. RCT1S1, 6. RCT5S2, 7. RCT3S1, 8. RCT4S1, 9. EST4S21, 10. PbTS1, 11. PbTS4. B: aislados 1.R1, 2.R2, 3.R3, 4.R4, 5. R5, 6. R6. N es el carril del control negativo y PM es el marcador de peso molecular.

4.1.2. Análisis de secuencias de aislados fúngicos

En la comparación de las secuencias de los productos de PCR amplificados con los primers generalistas ITS1-ITS4 y con secuencias reportadas en el banco de genes del NCBI, se observó que los aislados R1, R2, R5, R6 y EF8 tuvieron una homología mayor al 95% con *R. solani* AG4, mientras que los aislado RC2, RCT2, y los obtenidos a partir de esclerocios en los tubérculos comerciales y del tubérculo del predio Guayparime, tuvieron homología de 99% con *R. solani* AG3. También se obtuvieron dos aislados (R3 y R4) con homología de 99% a otras especies binucleadas de *Rhizoctonia* (AG-F). Las secuencias de los demás aislados fueron clasificadas por homología con otros géneros de hongos fitopatógenos, entre ellos *Alternaria* y *Fusarium*. (Cuadro 8)

4.1.3. Análisis filogenético

Al alinear las secuencias de DNA de los aislados que se obtuvieron con secuencias reportadas de los grupos anastomósicos AG1-IA, AG1-IB, AG1-IC, AG2-1, AG2-IIIB, AG2-IV, AG3, AG4-HGI, AG4-HGII, AG5, AG6HGI y AG6VGI, se observó un alto porcentaje de similitud (mayor al 90%) entre los aislados que se asignaron al mismo grupo anastomósico, mediante la comparación de secuencias con las reportadas en la base de datos del NCBI. La similitud de las secuencias entre aislados de diferentes AGs fue de 82-96%, notando que hubo una divergencia de 8-12% entre los aislados AG3 con los aislados AG4, mientras que la similitud de las secuencias entre aislados de AG3 fue de 96-100%, y de 97-100% entre aislados de AG4 (Figura 7).

El árbol construido con base en la región ITS-rDNA para los grupos anastomósicos de *R. solani*, mostró que los 18 aislados asignados como AG3 obtenidos en este trabajo, se agruparon en una rama junto con la secuencia AG3 reportado en el banco de datos de NCBI. Además, se pudo observar la formación de varias sub ramas dentro de la agrupación de AG3. De igual manera, los aislados identificados como AG4 se agruparon con los aislados reportados en el NCBI como AG4 en diferentes subramas dentro de un mismo brazo (Figura 8).

Cuadro 8. Identificados de aislados de hongos, por comparación de secuencias amplificadas con los primers ITS1-ITS4 con secuencias reportadas en la base de datos del NCBI.

Aislado	Organismo	% identidad
LCT2S1	<i>Alternaria</i>	100
LCT4S12	<i>Alternaria</i>	100
LCT5S1	<i>Ascomycete no cultivable</i>	100
LCT5S21	<i>Macrophomina phaseolina</i>	100
RCT1S1	<i>Macrophomina phaseolina</i>	99
RCT3S1	<i>Alternaria</i>	100
RCT4S1	<i>Alternaria</i>	100
RCT5S2	<i>Alternaria</i>	100
EST4S21	<i>Fusarium oxysporum</i>	100
PbTS1	<i>Fusarium oxysporum</i>	100
PbTS4	<i>Fusarium oxysporum</i>	100
ZI6T	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	100
R3	<i>Rhizoctonia</i> spp. (RBN) AG-F	99
R4	<i>Rhizoctonia</i> spp. (RBN) AG-F	99
EF8	<i>Rhizoctonia solani</i> AG4 HG-I	100
R1	<i>R. solani</i> AG4 HG I	99
R2	<i>R. solani</i> AG4 HG I	99
R5	<i>R. solani</i> AG4 HG I	99
R6	<i>R. solani</i> AG4 HG I	100
RCT2	<i>Rhizoctonia solani</i> AG3	100
RC2	<i>R. solani</i> AG3	100
TPG1	<i>R. solani</i> AG3	99
TPG2	<i>R. solani</i> AG3	99
TPG5	<i>R. solani</i> AG3	100
TPG9	<i>R. solani</i> AG3	99
TPG16	<i>R. solani</i> AG3	99
TPG17	<i>R. solani</i> AG3	99
TC1-4	<i>R. solani</i> AG3	100
TC1-5	<i>R. solani</i> AG3	100
TC2-1	<i>R. solani</i> AG3	89
TC2-2	<i>R. solani</i> AG3	99
TC2-5	<i>R. solani</i> AG3	99
TC3-1	<i>R. solani</i> AG3	99
TC3-2	<i>R. solani</i> AG3	99
TC3-3	<i>R. solani</i> AG3	99
TC3-6	<i>R. solani</i> AG3	100

Figura 7. Rango de similitud entre secuencias de ITS-rDNA entre grupos anastomósicos de *R. solani* y 2 *Rhizoctonias* binucleadas (RBN).

	RB																<i>R. solani</i> AG4						<i>R. solani</i> AG3					
	AG1-IA	AG1-IB	AG1-IC	AG2-I	AG2-IIIE	AG2-IV	AG3	AG3	AG4	AG4	AG5	AG6-H	AG6-V(R3	R4	EF8	R2	R1	R6	R5	RC2	TG17	RCT2	TC1-4	TC2-2	TC3-3	TG16		
AG1-IA	100	94.9	88	86.3	87	87.5	86.6	88.9	88.7	87.4	89.3	89.5	90.6	90.5	87.2	88.6	88.7	88.6	88.5	86.5	86.9	86.7	86.8	87	87	86.8		
AG1-IB	0	100	94.9	88	86.3	87	87.5	86.6	88.9	88.7	87.4	89.3	89.5	90.6	90.5	87.2	88.6	88.7	88.6	88.5	86.5	86.9	86.7	86.8	87	87	86.8	
AG1-IC	5.3	5.3	100	90.7	88	88.9	90.9	89.9	90.2	90.2	89.2	90.7	90.9	90.7	90.6	88.3	90.1	90.1	90.1	90	89.8	90.2	90.1	90.2	90.3	90.4	90.2	
AG2-I	13.1	13.1	10	100	90.3	90.4	94.9	94	89.5	89.5	92.2	91.1	90.7	91.3	91.1	86.4	89.5	89.5	89.5	89.3	93.8	94	93.8	94.1	94.3	94.1	94	
AG2-IIIB	15.1	15.1	13.1	10.4	100	97	90.3	89.3	88.1	87.9	92.9	90.8	89.9	90.5	89.8	86.3	88.2	88	88.3	88.2	89.5	89.2	90.2	89.8	89.9	90.5	89.8	
AG2-IV	14.4	14.4	12.1	10.3	3	100	90.6	89.6	86.9	86.8	92.5	90.1	89	90.4	89.7	84.7	87.2	87.1	87.2	87.1	89.7	89.5	90.4	90	90.2	90.7	90	
AG3	13.7	13.7	9.7	5.3	10.4	10.1	100	95.7	89.8	89.8	92.9	91.2	91.2	92.1	92	86.1	89.7	89.7	89.7	89.6	95.5	95.7	95.6	95.8	96	95.9	95.7	
AG3-2	14.9	14.9	10.9	6.3	11.6	11.3	4.5	100	88.9	88.9	91.3	90.7	90.7	90.6	90.5	85.4	88.8	88.9	88.8	88.7	99.8	99.4	100	99.5	99.4	99.7	99.4	
AG4-HGI	12.2	12.2	10.6	11.3	13	14.4	11	12	100	99.8	89.4	91.2	91.1	91.4	91.3	99.3	99.4	99.4	99.1	99.2	88.7	89	88.7	89	89.2	89.1	89	
AG4-HGII	12.3	12.3	10.6	11.3	13.2	14.5	11	12	0.2	100	89.4	91.2	91.1	91.4	91.3	99.3	99.2	99.2	98.9	99.1	88.7	89	88.7	89	89.2	89.1	89	
AG5	13.9	13.9	11.6	8.2	7.4	8	7.5	9.3	11.4	11.4	100	91	89.8	91.2	90.4	87.1	89.5	89.7	89.5	89.4	91.3	90.9	92	91.6	91.7	92.3	91.6	
AG6-HGI	11.5	11.5	9.9	9.5	9.8	10.7	9.4	10	9.3	9.3	9.6	100	97.8	92.4	92.2	89.4	91.2	91.2	91	90.5	90.8	90.6	90.8	90.8	90.9	90.8		
AG6-VGI	11.3	11.3	9.7	10	10.9	12	9.4	10	9.5	9.5	10.9	2.3	100	92	91.9	89.4	91.1	91.1	91.4	91.2	90.5	90.5	90.6	90.5	90.5	90.6	90.5	
R3	10.1	10.1	9.9	9.3	10.2	10.3	8.3	10	9.1	9.1	9.4	8.1	8.4	100	90.2	91.7	91.5	91.7	91.6	90.8	91.2	90.8	91	91.3	91	91.2		
R4	10.3	10.3	10.1	9.5	11	11.1	8.5	10.2	9.3	9.3	10.3	8.2	8.6	0	100	90.2	91.7	91.3	91.7	91.6	90.8	90.6	90.8	91	91.3	91	91.2	
EF8	14.2	14.2	12.7	15	15.1	17.1	15.4	16.2	0.7	0.7	14.2	11.5	11.4	10.6	10.6	100	100	100	100	85.4	85.9	85.4	85.9	85.9	85.9	85.9		
R2	12.4	12.4	10.6	11.3	12.9	14	11.1	12.1	0.6	0.8	11.3	9.4	9.6	8.8	8.8	0	100	99.7	99.7	99.8	89	89.3	88.9	89.3	89.5	89.2	89.3	
R1	12.4	12.4	10.6	11.3	13	14.2	11.1	12.1	0.6	0.8	11.1	9.4	9.5	9	9.2	0	0.3	100	99.4	99.5	88.7	89.1	88.9	88.9	89.1	89.2	89.1	
R6	12.4	12.4	10.6	11.3	12.7	14	11.1	12.1	0.9	1.1	11.3	9.4	9.2	8.8	8.8	0	0.3	0.6	100	99.8	89	89.3	88.9	89.3	89.5	89.2	89.3	
R5	12.6	12.6	10.8	11.5	12.9	14.2	11.3	12.3	0.8	0.9	11.5	9.6	9.4	8.9	8.9	0	0.2	0.5	0.2	100	88.9	89.2	88.8	89	89.3	89	89.2	
RC2	14.9	14.9	11	6.5	11.4	11.1	4.6	0.2	12.3	12.3	9.3	10.2	10.2	9.8	9.8	16.2	11.9	12.2	11.9	12	100	99.5	100	99.5	99.5	99.7	99.5	
TG17	14.5	14.5	10.6	6.3	11.7	11.4	4.5	0.6	11.9	11.9	9.8	9.8	10.2	9.4	10	15.6	11.6	11.8	11.6	11.6	0.5	100	99.5	99.7	99.7	99.8	100	
RCT2	14.7	14.7	10.7	6.5	10.6	10.3	4.6	0	12.2	12.2	8.5	10.1	10.1	9.9	9.9	16.2	12.1	12	12.1	12.2	0	0.5	100	99.5	99.5	99.7	99.5	
TC1-4	14.5	14.5	10.6	6.2	11	10.7	4.3	0.5	11.9	11.9	9	9.8	10.2	9.6	9.6	15.6	11.6	12	11.6	11.9	0.5	0.3	0.5	100	99.8	100	99.7	
TC2-2	14.3	14.3	10.4	6	10.9	10.6	4.1	0.6	11.7	11.7	8.8	9.8	10.2	9.3	9.3	15.6	11.4	11.8	11.4	11.6	0.5	0.3	0.5	0.2	100	99.8	99.7	
TC3-3	14.3	14.3	10.3	6.2	10.2	9.9	4.3	0.3	11.9	11.9	8.1	9.7	10.1	9.6	9.6	15.6	11.7	11.7	11.7	11.9	0.3	0.2	0.3	0	0.2	100	99.8	
TG1	14.7	14.7	10.7	6.5	11.7	11.4	4.6	0.8	12.1	12.1	9.4	10	10.4	9.7	10.3	15.6	11.8	12.1	11.7	11.9	0.6	0.8	0.6	0.3	0.5	0.3	99.8	
TG16	14.5	14.5	10.6	6.3	11	10.7	4.5	0.6	11.9	11.9	9	9.8	10.2	9.4	9.4	15.6	11.6	11.8	11.6	11.6	0.5	0	0.5	0.3	0.3	0.2	99.8	

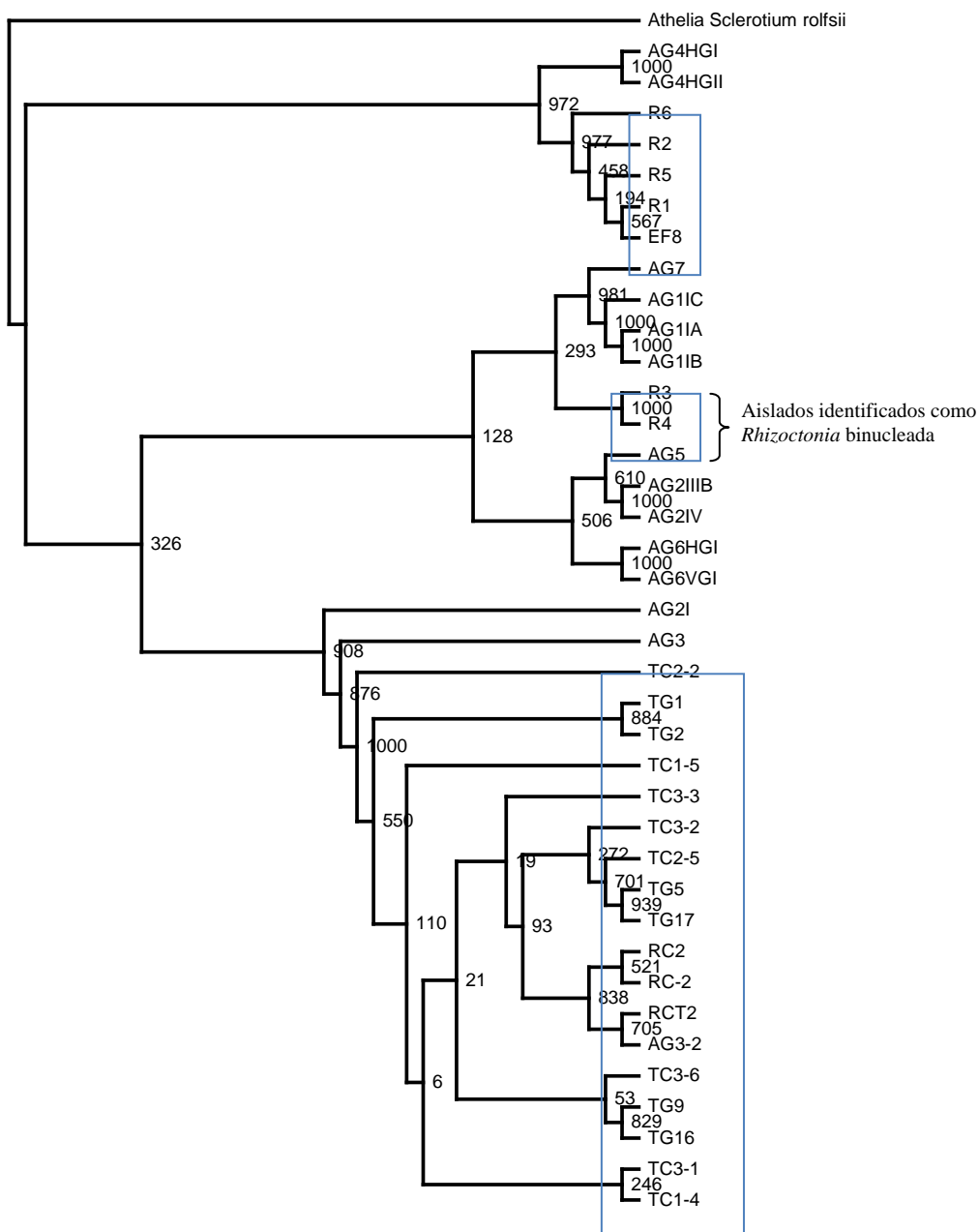


Figura 8. Árbol filogenético de la región ITS de rDNA de aislados de *R. solani* pertenecientes a diferentes grupos anastomósicos. El árbol se construyó utilizando el método neighbor-joining, usando la secuencia de *Athelia (Sclerotium) rolfsii* (No. de accesoión AY684917) como brazo externo. Los aislados obtenidos en este trabajo se encerraron en un cuadro.

4.2. Análisis de PCR para subgrupos de AG1 y AG2

El conjunto de primers AG/AG1-IA, AG/AG1-IB, AG/AG1-IC, AG/AG2-1 y AG/AG2-2 no se pudieron probar en este trabajo, ya que no se obtuvieron aislados pertenecientes a las grupos anastomósicos AG1 y AG2 de *R. solani*.

4.3. Análisis de PCR con los primers Rs1F2-Rs2R1 específicos para AG3

Los primers Rs1R2 y Rs2R1 diseñados por Lees *et al.* (2002) para la identificación específica mediante PCR de *R. solani* AG3, fueron probados con los aislados secuenciados.

Primero se probaron los primers con los aislados R1, R2, R3, R4, R5, R6, RC2 y RCT2, de los cuales sólo los dos (R6 y RC2) están caracterizados como *R. solani* AG3; de éstos se obtuvo la amplificación del fragmento esperado de 500 pb (Figura 9a). Se obtuvo una amplificación inespecífica con el aislado R6, ya que éste está caracterizado como *R. solani* AG4. Al no obtener amplificación para el aislado RCT2, el cual está caracterizado como *R. solani* AG3, se repitió la reacción de PCR utilizando 3 alícuotas diferentes de DNA de este aislado, cuya calidad se comprobó mediante electroforesis y se cuantificó por fluometría para asegurar una concentración adecuada para amplificar por PCR. Aun así, no se logró obtener amplificación con este aislado, hasta que se redujo la temperatura de alineamiento de 65 a 63 °C; sin embargo, a 63 °C se presentaron más amplificaciones inespecíficas.

También se realizó la amplificación de los 16 aislados obtenidos de esclerocios presentes sobre tubérculos, usando el aislado RC2 como control positivo; de esta amplificación se obtuvo la banda esperada de 500 pb para todos los aislados (Imagen 9b).

Se corroboró que con estos primers no se obtiene una amplificación con el DNA de otros hongos fitopatógenos que se encontraron en los tejidos analizados, tales como: *Macrophomina phaseolina*, *Alternaria*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*.

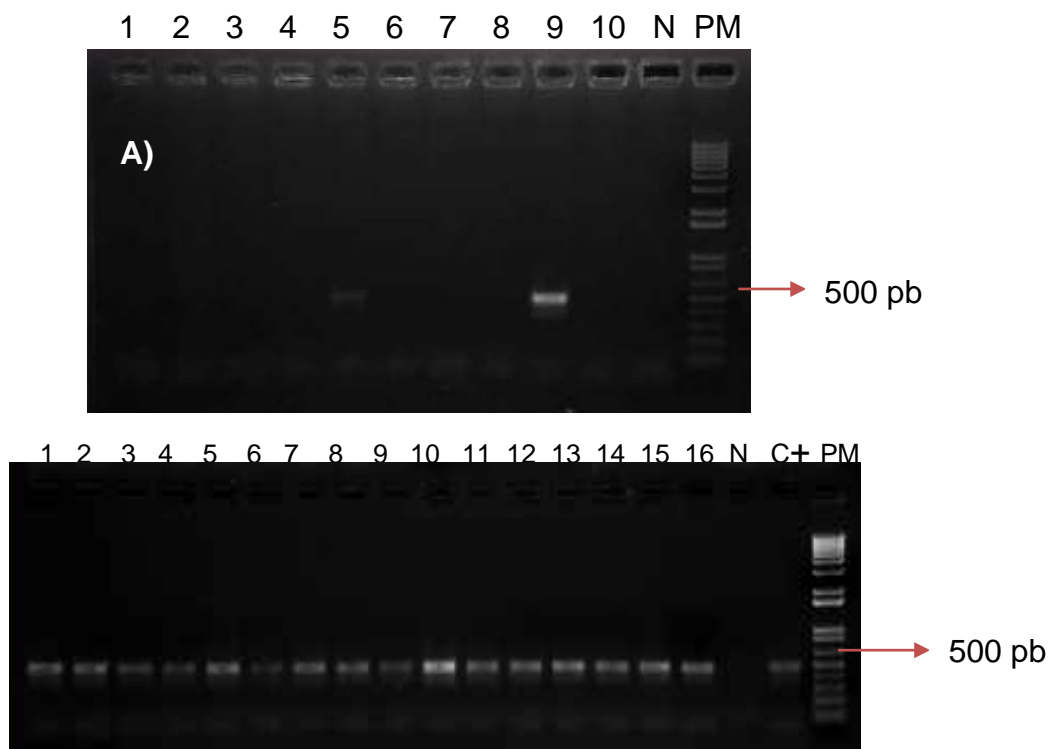


Figura 9. Amplificación por PCR de fragmentos de 500 pb de la región ITS de DNA con los primers Sr1F2-Sr2R1 de aislados fúngicos. A) PCR de aislados: 1. R3 (*Rhizoctonia binucleada*), 2. R4 (*R. binucleada*), 3. R1 (*R. solani* AG4), 4. R2 (*R. solani* AG4), 5. R5 (*R. solani* AG4), 8. R6 (*R. solani* AG4), 6. EF8 (*R. solani* AG4), 7. T1S1RC (*Macrophamina phaseolina*), 9. RC2 (*R. solani* AG3), 10. RCT2 (*R. solani* AG3). B) PCR de aislados obtenidos de esclerocios en tubérculos: 1. TPG1, 2. TPG2, 3. TPG5, 4. TPG9 5. TPG16, 6. TPG17, 7. TC1-4, 8. TC1-5, 9. TC2-1, 10. TC2-1, 11. TC2-2, 12. TC2-5, 13. TC3-1, 14. TC3-2, 15. TC3-3, 16. TC3-6. N es el carril del control negativo, C + en el carril del control positivo y PM es el marcador de peso molecular.

4.4. Análisis de PCR específicos para *R. solani* AG4

Se probó el juego de primers RsAG4F1 y RsAG4F2 con los aislado R3 (*R. binucleada*), RC2 (*R. solani* AG3), R5 (*R. solani* AG4) y R6 (*R. solani* AG4), realizando un gradiente de temperaturas para la alineación de los primers (T_m) de 64, 66, 68 y 70 °C, mediante la cual pudimos observar que a 68 °C es una

temperatura adecuada para la alineación de los primers que nos puede brindar una mayor especificidad (Figura 10a).

Una vez que se obtuvo la amplificación del tamaño de bases esperado (~200 pb) para los aislados del grupo anastomótico AG4 de *R. solani*, y después de seleccionar una temperatura de alineamiento, se procedió a probar la especificidad de nuestro juego de primers con los aislados de *Rhizoctonia* binucleada, *R. solani* AG3, *Alternaria*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*, dando como resultado bandas del tamaño esperado, inespecíficas para aislados de otras *Rhizoctonias* y otros hongos (Figura 10b).

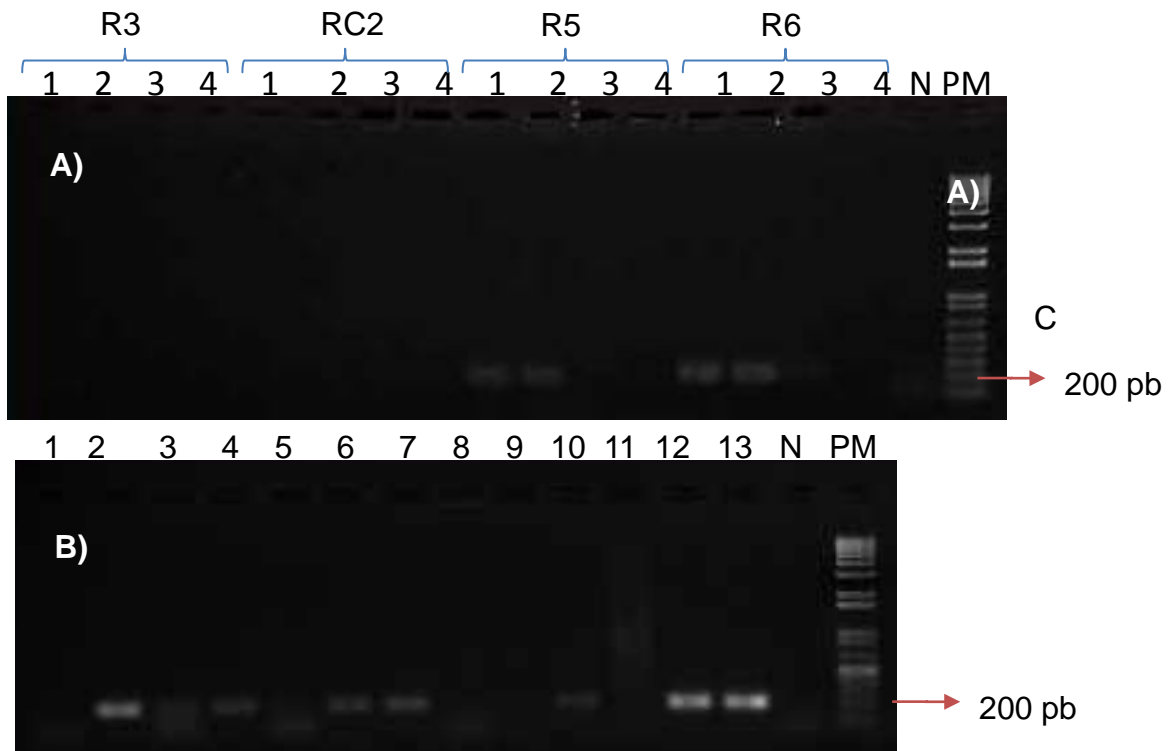


Figura 10. Productos de PCR corridos en un gel de agarosa al 1%. A) Gradiente de Tm para los primers RsAG4F1- RsAG4R1 con los aislados R3, RC2, R5 y R6: 1. 64 °C, 2. 66 °C, 3. 68 °C, 4. 70 °C. B) Producto de PCR con los primers RsAG4F1- RsAG4R1: 1. R2 (*Rhizoctonia* binucleada), 2. R4 (*Rhizoctonia* binucleada), 3. RC2 (*R. solani* AG3), 4. RCT2 (*R. solani* AG3), 5. T1S1RC (*Macrophomina phaseolina*), 6. T4S1LC (*Alternaria*), 7. ZI6T (*Fusarium oxysporum*), 8. FS3 (*Fusarium solani*), 9. R1 (*R. solani* AG4), 10. R2 (*R. solani* AG4), 11. EF8 (*R. solani* AG4), 12. R5 (*R. solani* AG4), 13. R6 (*R. solani* AG4).

4.5. Pruebas de anastomosis

Mediante los análisis de reacción de anastomosis en el cual se observa la compatibilidad de diferentes aislados entre ellos, se pudo confirmar que los aislados obtenidos en este trabajo e identificados molecularmente si corresponden al grupo AG al que se designaron por comparación de secuencias de DNA. Los aislado pertenecientes a AG4 y AG3 mostraron reacciones C2 (mismo grupo anastomósico, diferente población) y C3 (mismo grupo anastomósico, genéticamente iguales) cuando se fusionaron con aislados del mismo grupo anastomósico, mostrando también reacción del tipo C0 (reacción de incompatibilidad, grupos anastomósicos diferentes) cuando se pusieron en contacto con aislados de otro grupo anastomósico y aislados de *Rhizoctonia* binucleada (Tabla 9). Los aislados se examinaron bajo el microscopio después de 3 días de su cultivo, cuando ya se observaba una amplia zona de interacción; sin embargo, en varias ocasiones el ensayo se tuvo que repetir y observarse los aislados 2 días después del cultivo, debido al crecimiento excesivo de los aislados el cual no permitió distinguir con precisión qué tipo de reacción se estaba presentando.

Cuadro 9. Categoría de anastomosis de los aislados obtenidos basada en la observación microscópica.

Aislados		R5	RC2	TG1
		AG4	AG3	AG3
R. binucleada	R3	C0	C0	C0
R. bunucleada	R4	C0	C0	C0
AG4	R1	C1	C0	C0
AG4	R2	C2	C0	C0
AG4	R5	C3	C0	C0
AG4	R6	C2	C0	C0
AG3	RC2	C0	C3	C2
AG3	TG1	C0	C2	C3
AG3	TG5	C0	C3	C3
AG3	TG9	C0	C2	C3
AG3	TC1-5	C0	C3	C3
AG3	TC2-1	C0	C3	C3
AG3	TC3-2	C0	C3	C3

VIII. Discusión

El estado de Sinaloa es uno de los principales productores de papa en México, ubicándose en el 2009 en el segundo lugar de producción nacional; sin embargo, este cultivo enfrenta una serie de problemas como es el caso de los organismos patógenos, entre los cuales se encuentra el hongo *R. solani*, que en diversos trabajos se ha reportado que causa reducción en el rendimiento del cultivo y calidad de los tubérculos.

En este estudio pudimos identificar los grupos anastomóticos AG3 y AG4 de *R. solani* asociados al cancro del tallo y costra negra en el cultivo de papa en Sinaloa, encontrándose con mayor medida el grupo AG3 en tubérculos y con una menor frecuencia en tallos. El grupo AG4 se encontró con una menor frecuencia asociado al cancro del tallo, aunque también se le pudo identificar en un tubérculo. Esto coincide con lo reportado por Virgen *et al.* (2000), quienes identificaron los grupos anastomóticos de *R. solani* en papa en la región de León, México, encontrando la presencia de los grupos AG3 con una frecuencia de 73.5% en todas las etapas del cultivo y AG4 con frecuencia de 26.5%.

En este trabajo no se determinaron los parámetros fisicoquímicos de los suelos y zonas de muestreo. Sin embargo, es importante mencionar que las condiciones climáticas como altitud y temperatura influyen en la virulencia y presencia de diferentes grupos anastomóticos de *R. solani* (Carling y Leiner 1990). Anguiz y Martin (1989) encontraron que aislados de AG4 son colectados en un mayor número en ambientes cálidos y a baja elevación, mientras que aislados de AG3 son obtenidos más comúnmente en ambientes fríos a altitudes elevadas.

Aunque en este trabajo solo se pudieron identificar dos grupos anastomóticos (AG3 y AG4), en muchos estudios se han reportado otros grupos anastomóticos presentes en el cultivo de papa, como los grupo AG5 y AG2-2, identificados con diferentes frecuencias en campos paperos de Nueva Zelanda, Paquistán, Gran Bretaña y Turquía, entre otros (Yanar *et al.*, 2005; Farrokhi *et al.*, 2007; Rauf *et al.*, 2007; Woodhall *et al.*, 2007). Considerando lo anterior, no se

puede descartar la posibilidad de que los grupos anastomóticos AG5 y AG2, o incluso otros, se encuentren presentes en el cultivo de papa en Sinaloa.

Para realizar la identificación molecular de los aislados obtenidos nos basamos primeramente en la identidad de secuencias de rDNA de las regiones ITS que incluye la región codificante 5.8s ARNr y las regiones intergénicas ITS1 e ITS2, en las cuales existe una alta variación genética, por lo que han sido constantemente utilizadas en estudios filogenéticos y como soporte genético de la clasificación de *R. solani* en grupos anastomóticos y subgrupos.

Gracias a la variabilidad presente en las regiones ITS de rDNA es que nos fue posible identificar los distintos grupos anastomóticos a los cuales pertenecen los aislados obtenidos del cultivo de papa en Sinaloa (AG4 y AG3), así como la variación entre los aislados pertenecientes al mismo grupo anastomótico (hasta 4.5% de divergencia entre los aislados AG3 y de 3% entre los aislados AG4).

Kuninaga y Yokosawa (1984) dividieron al grupo AG4 con base en la homología del DNA en dos subgrupos AG4-HI y AG4-HII, lo cual fue confirmado en el trabajo de Boysen *et al.* (1996), quienes secuenciaron las regiones ITS1 y ITS2, encontrando divergencia de 0-40% en la región ITS1 y de 0-18% en la región ITS2 entre los subgrupos de *R. solani* AG4, mediante lo cual ellos señalan que el análisis de las secuencias de la región rDNA ITS puede ser usada para clasificar aislados de AG4 de acuerdo a su virulencia y hábitat, lo cual fue soportado posteriormente por Kunnigal *et al.* (1997), quienes encontraron una alta homología de 100-99% entre aislados del mismo subgrupo de AG4.

Comúnmente los aislados de AG3 se han asociado únicamente a la costra negra de la papa, sin embargo, Shew y Main (1985) asociaron a este grupo anastomótico con la mancha de la hoja en tomate y posteriormente se asoció con el tizón de la hoja en tomate (Dante *et al.*, 1988), basándose en el análisis de secuencias de la región ITS del rDNA mostraron por primera vez un alto grado de variabilidad genética en esta región entre aislados de AG3 obtenidos de tabaco y de papa (Kuninaga *et al.*, 1997), posteriormente este último grupo de investigadores dividió a *R. solani* AG3 en dos subgrupos PT (tipo papa) y TB (tipo tabaco) de acuerdo a la comparación de secuencias de la región ITS.

Kuninaga *et al.* (1997 y 2000) reportan una variabilidad genética de hasta 10% en las regiones ITS entre aislados de tabaco y papa; sin embargo, en sus trabajos también podemos observar variabilidad entre los aislados obtenidos de papa (0-4%) lo cual coincide con las similitudes mostradas entre las secuencias de aislados de AG3 que obtuvimos en este trabajo.

En la actualidad existen diversos estudios sobre variabilidad genética entre poblaciones de *R. solani* AG3 basados en las diferencias encontradas en la región ITS de ARNr (Ceresini *et al.*, 2002a; Ceresini *et al.*, 2002b; Balali *et al.*, 2007). En el estudio realizado por Kuninaga *et al.* (1997) indican que las secuencias de las regiones ITS1 y ITS2 son útiles para identificar subgrupos con significado biológico; sin embargo, consideran que la región ITS de rDNA no es apropiada para estudios filogenéticos en *R. solani* debido a su alta tasa de mutación. A pesar de esto, actualmente, la información que nos brindan las secuencias de rDNA parecen ofrecer la forma más precisa de establecer relaciones taxonómicas y filogenéticas para *Rhizoctonia* spp. (Sharon *et al.*, 2008).

Aunque la identificación por comparación de secuencias de la región ITS de rDNA se ha utilizado exitosamente para la identificación y clasificación de los grupos y subgrupos anastomóticos de *R. solani*, esta técnica resulta inapropiada para fines de diagnóstico, sobre todo cuando se maneja una cantidad considerable de muestras, ya que se requiere de varios procesos y materiales para llegar hasta la obtención de resultados. Por lo antes mencionado, se han estudiado otras técnicas para una identificación directa de *R. solani* y del grupo anastomótico que se encuentra presente infectando el tejido, una de estas técnicas es la identificación por PCR mediante el diseño de primers específicos para cada grupo anastomótico.

Basándose en las secuencias de las regiones ITS1 e ITS2 se diseñó un juego de primers específicos para el grupo anastomótico AG3 y a partir de este juego de primers se diseñó un juego de primers para su uso en PCR tiempo real, con el objetivo de desarrollar un ensayo específico para *R. solani* AG3 que permita la tipificación inequívoca de aislados AG3, y para usar este análisis como una herramienta cuantitativa para la detección del patógeno en tejido de plantas y suelo (Lees *et al.*, 2002).

Nosotros probamos el juego de primers para PCR punto final, diseñado por Lees *et al.* (2002), con los 18 aislados que obtuvimos, 17 de los cuales se obtuvieron de tubérculo y 1 de cancro en tallo, así como con los 4 aislados de AG4 que obtuvimos y con aislados de otros hongos fitopatógenos que encontramos en las muestras analizadas, obteniendo la amplificación del fragmento esperado para los 17 aislados de AG3 obtenidos de tubérculos, pero no conseguimos tener amplificación del aislado de AG3 obtenido de tallo. Además, obtuvimos una amplificación inespecífica del tamaño de bases esperado para un aislado de AG4. Lo anterior lo podemos atribuir a la variación genética que existe entre los aislados de AG3, así como también a una variación causando similitud en el área de alineación de los primers para el aislado de AG4, por lo tanto, concluimos que mutaciones similares pueden ocurrir constantemente entre aislados de todos los grupos anastomóticos ya que éstos están en constante recombinación genética lo que causa una gran variabilidad en las regiones ITS.

Al no encontrar primers reportados para el grupo anastomóticos de *R. solani* AG4, y ya que obtuvimos aislados de este grupo, nos dimos la tarea de diseñar un juego de primers que fueran específicos para AG4, para lo cual nos basamos en las regiones ITS1 y ITS2, ya que en estas regiones se han realizado varias investigaciones sobre diseño de primers para hongos fitopatógenos incluyendo a *Rhizoctonia* spp. En un trabajo realizado sobre la identificación a nivel cepa de aislados de *R. solani* AG4, basándose en el análisis de secuencias de la región ITS, se señala que es posible construir primers que sean específicos para un grupo particular de AGs basándose en la región de los ITS1 y ITS2 (Boysen *et al.*, 1996).

Con los primers que diseñamos fuimos capaces de amplificar el fragmento del tamaño de bases esperado para los aislados que obtuvimos de AG4; sin embargo, no fueron específicos ya que también amplificaron este fragmento con aislados que no pertenecían a AG4. Por lo tanto, estos primers no pueden ser utilizados para el diagnóstico e identificación del grupo anastomótico AG4.

Con base en los resultados mostrados en nuestro trabajo y considerando otros estudios realizados sobre la identificación con primers específicos para *R. solani*, se recomienda utilizar otra región de DNA para el diseño de una estrategia

de diagnóstico específica para cada grupo anastomósico causante de enfermedades en platas.

Es importante enfatizar la importancia de una identificación molecular de este patógeno, ya que el método de identificación convencional por reacción de anastomosis, además de ser laborioso, tardado y complicado para distinguir las categorías de reacción, no brinda resultados confiables, a causa del comportamiento de los aislados al ser conservados y constantemente resemebrados, ya que en ocasiones un aislado se anastomosa, total o parcialmente, con aislamientos de más de un grupo anastomósico. Además, algunos aislados ocasionalmente pierden su habilidad de fusión (González, 2002). Además, este método de identificación no permite distinguir entre subgrupos de cada grupo anastomósico.

Por último, es necesario recalcar la importancia de conocer el grupo anastomósico que infecta a determinado cultivo para poder asumir una adecuada estrategia de manejo de la enfermedad.

IX. Conclusiones

- Los Grupos anastomósicos AG3 y AG4 de *Rhizoctonia solani* están presentes en el cultivo de papa en Sinaloa concordando con lo reportado por Virgen (2000).
- Encontrándose mayormente el grupo AG3 en tubérculos y el grupo AG4 en tallos, aunque también se le puede identificar en tubérculos
- Las regiones genómicas ITS de rDNA en *R. solani* presentan una gran variabilidad entre grupo anastomósicos e incluso se observa variabilidad entre aislados del mismo AG, permitiendo diferenciar los grupos anastomósicos de *R. solani* con un alto porcentaje de identidad en base a la comparación de secuencias de esta región.
- El diseño de primers específicos para un grupo anastomósicos de *R. solani* en base a las regiones ITS ha demostrado ser poco eficiente.

X. Bibliografía

- Abe, H. y Tuboki, K. 1978. Anastomosis groups of isolates of *Rhizoctonia solani* Kuhn. From potatoes. Bull. Hokkaido Prefecture Agric. Exp. Station. 40: 60-70.
- Adams, C. G. y Butler, E. E.. 1978. Serological Relationships Among Anastomosis Groups of *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 69: 629-633.
- Anguiz, R. y Martin, C. 1989. Anastomosis groups, pathogenicity, and other characteristics of *Rhizoctonia solani* isolated from potatoes in Peru. Plant Dis. 73: 199–201.
- Atkinson, D., Thornton, M. K. y Miller, J. S. 2010. Development of *Rhizoctonia solani* on stems, stolons and tubers of potatoes I. Effect of inoculum source. American Journal of Potato Research 87: 374–381.
- Bains, P. S. y Bisht, V.S. 1995. Anastomosis group identify and virulence of *Rhizoctonia solani* isolates collected from potato plants in Alberta, Canada. Plant Dis. 79: 241-241.
- Bains, P. S., Bennypau, H. S., Lynch, L. D. R., Kawchuk, L. M., Schaupmeyer C. A. 2002. *Rhizoctonia* Disease of Potatoes (*Rhizoctonia solani*): Fungicidal Efficacy and Cultivar Susceptibility. Amer J of Potato Res 79:99-106.
- Balali, G. R., Neate S. M., Kasalkheh A. M., Stodart B. J., Melanson D. L., Scott E. S. 2007. Intraspecific variation of *Rhizoctonia solani* AG 3 isolates recovered from potato fields in Central Iran and South Australia. Mycopathologia 163:105–115.
- Banville, G. J. 1989. Yield losses and damage to potato plants caused by *Rhizoctonia solani* Kuhn. American Potato Journal 66: 821–834.
- Belali G. R., Neate S. M., Scott E. S., Whisson D. L., Wicks T. J. 1995. Anastomosis group and pathogenicity of isolates of *Rhizoctonia solani* from potato crops in South Australia. Plant Pathology 44:1050-1057.
- Boysen, M., Borja, M., del Moral, C., Salazar, O., Rubio, V. 1996. Identification at strain level of *Rhizoctonia solani* AG-4 isolates by direct sequence of asymmetric PCR products of the ITS regions. Curr Genet 29: 174 – 181

- Carling, D. E. 1996. Grouping in *Rhizoctonia solani* by hyphal anastomosis reaction. *In: Rhizoctonia species: Taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. pp. 37-47.
- Carling, D. E. y Leiner R. H.. 1990. Effect of temperature on virulence of *Rhizoctonia solani* and other *Rhizoctonia* on potato. *Phytopathology* 80:930-934.
- Carling, D. E., Brainard K. A, Virgen C. G., Olalde, P. V. 1998. First report of *Rhizoctonia solani* AG-7 on potato in Mexico. *Plant Dis*. Pg 82:127.
- Ceresini, P. C., Shew, H. D., Vilgalys, R. J., Cubeta, M. A. 2002_b Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* AG-3 from potato and tobacco in North Carolina. *Mycologia* 94:437-449.
- Ceresini, P. C., Shew, H. D., Vilgalys, R. J., Rosewich, U. L., Cubeta, M. A. 2002_a. Genetic structure of populations of *Rhizoctonia solani* AG-3 on potato in eastern North Carolina. *Mycologia*, 94(3), 2002, pp. 450–460.
- Chand, T. y Logan, C. 1983. Cultural and pathogenic variation in potato isolates of *Rhizoctonia solani* in Northern Ireland. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 81: 585-589.
- Date, H. O. y Oniki, M. 1988. Leaf blight of tomato caused by *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk (in Japanese with English summary). *Kinki Chugoku Agric Res* 76:12–16
- Delleman, J., Mulder, A., Peeten, J. M., Shipper, E., Turkensteen, L. J. 2005 *Potato diseases*.
- Farrokhi, N. R., Cromey, G. M., Moosawi, J. A. 2007. Determination of the Anastomosis Grouping and Virulence of *Rhizoctonia* spp. Associated with Potato Tubers Grown in Lincoln, New Zealand. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10: 3786-3793.
- González, .H. G. 2002. Estado actual de la taxonomía de *Rhizoctonia solani* Kühn. *Revista Mexicana de Fitopatología* vol. 20, número 002. Pp 200-205.

ITSM. 2005. Plan rector, sistema producto nacional papa. Segunda Fase: diagnóstico inicial, base de referencia, estructura estratégica. SAGARPA.

Kuninaga, S., Carling, D. E., Takeuchi, T., Yokosawa, R. 2000. Comparison of rDNA-ITS sequences between potato and tobacco strains in *Rhizoctonia solani* AG-3. *J Gen Plant Pathol* 66:2–11

Kuninaga, S., Natsuaki, T., Takeuchi, T., Yokosawa, R. 1997. Sequence variation of the rDNA ITS regions within and between anastomosis groups in *Rhizoctonia solani*. *Curr Genet* 32: 237–243

Kuninaga, S. y Yokosawa, R. 1984. DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kuhn. IV. Genetic relatedness within AG-4. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 50: 322 – 330

Lees, A. K., Cullen, D. W., Sullivan, L., Nicolson, M. J. 2002. Development of conventional and quantitative real-time PCR assays for the detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG-3 in potato and soil. *Plant Pathology* 51:293–302.

MacNish, G. C., Carling, D. E., Brainard, K. A. 1997. Relationship of microscopic and macroscopic vegetative reactions in *Rhizoctonia solani* and the occurrence of vegetatively compatible populations (VCPs) in AG8. *Mycological Research* 101, 61–8.

MacNish, G. C, Carling, D. E., Brainard, K. A. (1993) Characterization of *Rhizoctonia solani* AG-8 from bare patches by pectic isozyme (zymogram) and anastomosis techniques. *Phytopathology* 83: 922–927.

Matsumoto, M. 2002. Trial of direct detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG1 and AG2 subgroups using specifically PCR analysis. *Mycoscience* 43:185–189.

Moller, M. A., Esqueda, M., Gardea, A., Tiznado, M., Virgen C. G. 2007. Variabilidad morfológica , patogénica y susceptibilidad a fungicidas de *Rhizoctonia solani* aislado de Rhizosfera de vitis vinífera var. Perlette seedless. *Revista Mexicana de Micología*, volumen 024. 0187-3180.

- Nejad, F. R., Cromey, G., S. Moosawi, J. A. 2007. Determination of the anastomosis grouping and virulence of *Rhizoctonia* spp. associated with potato tubers grown in Lincoln, New Zealand. *Pak. J. Biol. Sci.*, 10: 3786-3793.
- Ogoshi, A. 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Ann Rev Phytopathol* 25:125-143.
- Parmeter, J. R. 1970. *Rhizoctonia Solani* Biology and Pathology. Berkeley. University of California Press. Berkeley, CA, USA. Pg. 3.
- Parmeter, R. J., Sherwood T. R., Platt D. W. 1969. Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology* 59:1270-1278.
- Parmeter, J.R., Sherwood R.T., Platt W. D. 1969. Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology* 59:1270-1278.
- Pascual, C. B., Hyakumachi M. 2000. Distribution of Vegetatively Compatible Populations of *Rhizoctonia solani* AGI-IA in a Field Planted with Different Host Species. *J. Gen. Plant Pathol.* 66 : 206-209.
- Perera, M. B., Hernandez F. H., Villafana M. C. 1998. La papa en México, un cultivo con potencialidad. *Claridades Agropecuarias*. Pg.3-15.
- Petkowski, J. E., Czerniakowski, B., deBoer, R. F. 2003. *Rhizoctonia solani* anastomosis groups associated with potatoes in Victoria, Australia. In: 8th International Congress of Plant Pathology, Vol. 2, Abstracts of Offered Papers, 27 Feb-2 March Christchurch, New Zealand. Pp. 127.
- Rauf, C. A, Ahimad, I., Aahraf, M. 2007. Anastomosis groups of *rhizoctonia solani* Kühn isolates from potato in Pakistan. *Pak. J. Bot.*, 39(4): 1335-1340.
- Richter, H. y Schneider, R. 1953. Studies on morphological and biological differentiation of *Rhizoctonia solani* K. *Phytopathol* 20:167-226
- Rubio, C. O., Rangel, G. J., Flores, L. R., Magallanes, G. J., Díaz, H. C., Zavala, Q. T., Rivera, P. A., Cadena, H. M., Rocha, R. R., Ortiz, T. C., Lopez, D. H., Diaz V. M., Paredes, T. A. 2000. Manual para la producción de papa en las sierras y

valles altos del centro de Mexico. Libro Tecnico No. 1. Division Agricola. Pg. 49-65.

Sharon, M., Kuninaga, S., Hyakumachi, M., Naito, S., Sneh, B. 2008. Classification of *Rhizoctonia* spp. Using rDNA-ITS sequence analysis supports the genetic basis of the classical anastomosis grouping. *Mycoscience* 49: 93-114

Shew, H.D. y Main, C.E. 1985. *Rhizoctonia* leaf spot flue-cured tobacco in North Carolina. *Plant Dis.* 69:901-903.

Sneh, B., Burpee, L., Ogoshi, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* Species. APS PRESS. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. Pp. 26-29.

Torres, H. 2002. Rizoctoniasis; Manual de las enfermedades más importantes de la papa en el Perú. Centro internacional de la papa (CIP). pg 19-22.

Truter, M., Wehner, F. C, 2004. Anastomosis grouping of *Rhizoctonia solani* associated with black scurf and stem canker of potato in South Africa. *Plant Dis.*, 88:83.

Tsrer, L., 2010. Review Article. Biology, Epidemiology and Managment of *Rhizoctonia solani* on Potato. *J Phytopathol* 158:649–658.

Ulacio, U.; Salas, J.; Querales, P. y Sanabria, M. E. 2002 Microbiota del suelo de zonas productoras de papa del Estado Mérida y su relación con *Rhizoctonia solani*. *Bioagro* 14(1). Mérida, Venezuela. Pp. 11-16.

Virgen, C. G., Olalde, P. V., Carling, D. E. 2000. Anastomosis Groups of *Rhizoctonia solani* on Potato in Central Mexico and Potential for Biological and Chemical Control. *Amer J of Potato Res* 77:219-224.

Wharton, P., Kirk, W., Berry, D., Snapp, S. 2004. Michigan Potato Diseases. Michigan state university. Extension Bulletin E-2994. www.potatodiseases.com.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, W. J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A

Guide to Methods and Applications, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York. Pp. 315-322

Woodhall, J. W., Lees, A. K., Edwards, S. G., Jenkinson, P. 2007. Characterization of *Rhizoctonia solani* from potato in Great Britain. *Plant Pathology* 56: 286–295.

Yanar, Y., Yilmaz, G., Cesmeli, I., Coskun, S. 2005. Characterization of *Rhizoctonia solani* Isolates from Potatoes in Turkey and Screening Potato Cultivars for Resistance to AG-3 Isolates. *Phytoparasitica* 33(4):370-376

Zhang, Y., Uyemoto, K. J., Kirkpatrick, C. B. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *J. Virol. Methods*, 71: 45-50.

Instituto Nacional de Investigación Agrícola Forestaría y Pecuaria. 2007.
<http://www.inifap.gob.mx/>

Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera 2011.
www.siap.sagarpa.gob.mx

<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>