

Trichoderma koningiopsis Th003,
alternativa biológica para el
control de *Rhizoctonia solani* en el
cultivo de papa

Trichoderma koningiopsis Th003, alternativa biológica para el control de *Rhizoctonia solani* en el cultivo de papa. Bogotá: Corpoica, 2011. 72 p.

Palabras clave: *TRICHODERMA KONINGII*; *SOLANUM TUBEROSUM*; *RHIZOCTONIA SOLANI*; PAPA; CONTROL DE ENFERMEDADES DE PLANTAS; CONTROL BIOLÓGICO

EDITORES

Camilo Rubén Beltrán Acosta Carlos Andrés Moreno Velandía Alba Marina Cotes Prado

Investigadores Laboratorio de Control Biológico, Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB).
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA, Km 14 vía Bogotá - Mosquera (Cundinamarca)

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

"Generación de una Estrategia para el Control de *Rhizoctonia solani* en el Cultivo de Papa que incluya el uso de *Trichoderma spp.*"

LÍDER DEL PROYECTO

Alba Marina Cotes Prado, Ph.D.

EQUIPO TÉCNICO

Investigadores

Camilo Rubén Beltrán Acosta, B.Sc.

Martha Isabel Gómez Álvarez, Ph.D.

Andrés Díaz García, M.Sc.

Sonia Jaramillo, M.Sc.

Carlos Andrés Moreno Velandía, M.Sc.

Erika Paola Grijalba Bernal, M.Sc.

Magda Xiomara García Rodríguez, M.Sc.

Laura Fernanda Villamizar Rivero, Ph.D.

Alexander Smith May, B.Sc.

Eder Leonardo Sastoque Cala, M.Sc.

Jorge Evelio Ángel, Ph.D.

Auxiliares técnicos

Darwin Vásquez

Claudia Mesa

Nemesio Torres

Reynaldo Tamayo (q.e.p.d).

Estudiantes

Paula Blanco, Microbióloga Industrial

Adriana Santos, Microbióloga Industrial

Edisson Chavarro, Biólogo M.Sc.

Agradecimientos a:

Los productores Luis Moncada, Pedro Castiblanco, agricultores Asoagroalzal (Carmen de Carupa); Pedro Briceño, Manuel Ruiz, Luis Triana, agricultores Coopinaven (Ventaquemada); Jhon Jairo Rodríguez, Milena Layton, Gustavo Alzate y Claudia Villota (investigadores CORPOICA).



© Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA
Laboratorio de Control Biológico

ISBN: 978-958-740-076-2
CUI: 1300
CA: PN25100052
Primera edición: Diciembre de 2011
Tiraje: 1.000 ejemplares

Línea de atención al cliente: 018000121515
atencionalcliente@corpoica.org.co
www.corpoica.org.co

Producción editorial:
Diagramación, impresión y encuadernación



www.produmedios.org

Impreso en Colombia
Printed in Colombia

La presente publicación ha sido elaborada con la cofinanciación del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, MADR y la Asociación Hortifrutícola de Colombia, ASOHOFRUCOL, con recursos del Fondo Nacional de Fomento Hortifrutícola, FNFH; el contenido de la misma es responsabilidad exclusiva de los investigadores y en ningún caso debe considerarse que refleja los puntos de vista del MADR y ASOHOFRUCOL.

Tabla de contenido

Biología y manejo de <i>Rhizoctonia solani</i>	4
Caracterización molecular y análisis de la variabilidad genética de <i>R. solani</i>	16
Control de <i>R. solani</i> en semilla de papa criolla con <i>T. koningiopsis</i> (Th003) y <i>T. asperellum</i> (Th034)	32
Sensibilidad de aislamientos nativos del hongo <i>R. solani</i> a fungicidas	43
Eficacia de dos formulaciones a base de <i>T. koningiopsis</i> Th003 para el control de <i>R. solani</i> en campo	55

Biología y manejo de *Rhizoctonia solani*

Alba Marina Cotes Prado, Camilo Beltrán Acosta

Introducción

El hongo *Rhizoctonia solani* fue descrito por Julius Kühn en 1858, pertenece a la clase Basidiomycete y únicamente en condiciones especiales produce esporas sexuales (basidiosporas). En la naturaleza *R. solani* se reproduce asexualmente y existe como micelio vegetativo, el cual forma estructuras de resistencia o esclerocios (Figura 1), que son masas de hifas estrechamente entrelazadas con superficies duras y resistentes. El estado sexual se conoce como *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk (Domsch *et al.*, 1980).

El fitopatógeno *R. solani* puede atacar 250 especies de plantas y se presenta tanto en campo como en el sitio de almacenamiento de tubérculos que van a ser usados como material de propagación. De estas 250 especies que ataca el fitopatógeno, 52 corresponden a plantas arvenses asociadas al cultivo de papa.



Figura 1. Tubérculos de papa con costra negra o esclerocios de *R. solani* de color marrón a negro en la superficie (izquierda) y tallos de papa afectados por rhizoctoniasis (derecha).

Este fitopatógeno está presente en casi todos los suelos debido a que tiene una amplia gama de hospedantes; allí sobrevive en los residuos de plantas y como esclerocios. En las plantas de papa *R. solani* ocasiona la enfermedad denominada rhizoctoniasis o cáncer de raíces o tallos (Figura 1 der.), y costra negra cuando se presenta como esclerocios en la superficie de los tubérculos (Figura 1 izq.). Se desarrolla a temperaturas muy diversas en zonas cálidas y templadas frías, ocasionando daño considerable en los brotes emergentes del tubérculo cuando las condiciones no favorecen su rápida emergencia; por ejemplo, en suelos húmedos, ácidos y fríos (suelos inundables). La enfermedad es común en todas las regiones donde se cultiva papa, encontrándose tanto superficialmente como en estratos profundos del suelo (CIP, 1996).

La rhizoctoniasis es una enfermedad persistente, muy adaptable, versátil y con capacidad de causar daños importantes al tejido vegetal colonizado (Yildiz y Timur, 2002), logrando ocasionar lesiones significativas en las raíces, el tallo y tubérculos de papa.

De acuerdo con observaciones realizadas *in vitro*, se determinó la habilidad que presenta el fitopatógeno para fusionar sus hifas (anastomosis). Según dicha característica, este hongo se clasifica en grupos de anastomosis (AG), que se diferencian morfológica y fisiológicamente en rangos de hospederos por requerimientos nutricionales, por características bioquímicas, molecula-

res y secuencias de ADN, habiendo descrito y caracterizado más de 13 AG usando las reacciones de anastomosis (Carling *et al.*, 2002).



Figura 2. Fusión de hifas de *Rhizoctonia solani* que muestran anastomosis

A pesar de los daños que puede ocasionar *R. solani* en diversos cultivos, este patógeno es bastante versátil, ya que dentro de esta misma especie también se incluyen grupos de anastomosis binucleados tales como el np-R (Sneh *et al.*, 1998) y un aislamiento no patogénico del AG3 capaces de ejercer un control biológico efectivo de *R. solani* en el cultivo de papa. Esta especie igualmente encierra grupos de anastomosis como el AG5, que es considerado como un patógeno débil en papa y que puede hacer asociaciones micorrícicas en orquídeas (Sneh *et al.*, 1998).

Los aislamientos de *R. solani* correspondientes al grupo de anastomosis AG3 se caracterizan por ser los de mayor incidencia en plantas de papa (Figura 2) y se asocian con lesiones que ocasionan chancros y la infestación de los tubérculos originando costras negras, ya que en su superficie forman esclerocios que soportan temperaturas variables (Jeger *et al.*, 1996). El AG4 es el más patogénico, no forma esclerocios, soporta temperaturas altas, afecta otros cultivos –incluyendo la papa– (Anguiz y Martin, 1990) y produce volcamiento y pudrición de raíces (Anderson, 1982); sin embargo, de este mismo grupo se han encontrado también aislamientos no patogénicos en papa (Ichielevich-Auster *et al.*, 1985).

Varios aislamientos del género *Rhizoctonia* spp. constituyen un grupo de endófitos asociados con raíces de orquídeas que pueden vivir como simbiosiontes, siendo esenciales en muchos casos para la germinación de semillas y para el desarrollo de la planta; entre los aislamientos de *Rhizoctonia* spp. muchos muestran especificidad por su hospedero, mientras otros tienen un amplio rango sin haber sido identificados a especie (Sneh *et al.*, 1998).

Síntomas de la enfermedad

Los síntomas típicos de la enfermedad rhizoctoniasis, cáncer o costra negra en la papa, comprenden la muerte de brotes pre-emergentes, cáncer de tallos subterráneos y estolones, disminución del sistema radical, y la formación de esclerocios en tubérculos maduros y en formación (Figura 1) (Tsror *et al.*, 2001).

Este microorganismo afecta la planta desde sus primeros estadios de desarrollo. El hongo puede matar los brotes subterráneos anulando su emergencia, especialmente en suelos húmedos. Los brotes que emergen también se pueden infectar, originando la enfermedad llamada pudrición del tallo, que se evidencia por la formación de chancros en los tallos en desarrollo (Figura 1), los que a menudo presentan depresiones profundas que progresan hasta rodear completamente el tallo llegando a estrangularlos, produciendo volcamiento y muerte de la planta.

El estrangulamiento inicial de los tallos puede ocasionar retardo en el desarrollo de la planta, encrespamiento de las hojas (Figura 3), pigmentación púrpura de folíolos, formación de tubérculos aéreos, y a menudo clorosis y amarillamiento que se manifiestan con mayor severidad en la parte apical de la planta. Las lesiones que se forman en los estolones son de color castaño oscuro y provocan la muerte de los mismos. Las raíces también son atacadas y destruidas. En la superficie de los tubérculos maduros se forman esclerocios de color negro o castaño oscuro. Los esclerocios son superficiales e irregulares, en forma de terrones o "costra negra". Otros síntomas en los tubérculos incluyen grietas y malformaciones (Rodríguez, 2001).

Esta enfermedad no siempre está asociada a reducciones en los rendimientos, pero la formación de esclerocios sobre los tubérculos reduce su calidad comercial; esto, asociado con el desarrollo de tubérculos malformados y alteraciones en el tamaño y el número de los mismos, resulta en pérdidas económicas considerables en el cultivo (Jager *et al.*, 1996).



Figura 3. Ápices de raíces generados a partir de brotes afectados por *R. solani*. Se observa aquí la pudrición y el estrangulamiento (izquierda), y planta de papa con encrespamiento de los folíolos (derecha), síntoma característico de rhizoctoniasis.

Diseminación

R. solani se desarrolla bien en suelos húmedos, ácidos y con temperaturas bajas. Tiene gran capacidad saprofitica, logrando sobrevivir en forma de esclerocios por largos periodos de tiempo en condiciones desfavorables; estas estructuras son la principal fuente de inóculo para el inicio de la enfermedad (Prado *et al.*, 2001), y la forma más común de propagar el hongo es la siembra de tubérculos con esclerocios. La lluvia, el riego y las operaciones de labranza aumentan la distribución del patógeno en el terreno (Garcés de Granada *et al.*, 2003). La formación de esclerocios sobre la superficie de los nuevos tubérculos ocurre en condiciones de buena humedad y temperatura óptima de 18 °C; no obstante, 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 (CIP, 1996). Un gramo de suelo puede contener como inóculo patogénico desde dos propágulos de *R. solani* (Adams, 1990) hasta $2,27 \times 10^5$. Se puede sugerir que

la virulencia de la cepa, la susceptibilidad del hospedero y las condiciones ambientales son los factores que más favorecen el desarrollo y crecimiento del patógeno en campo abierto, el cual repercute negativamente en la producción y rendimiento de la cosecha.

Ciclo de vida de *Rhizoctonia solani*

Inicialmente los esclerocios presentes en el suelo son estimulados por exudados producidos por la actividad de crecimiento celular de las plantas y por la descomposición de residuos orgánicos. A partir de los esclerocios se forma el micelio, que al entrar en contacto con la planta ataca la superficie externa; el proceso de infección es promovido por la producción de diferentes enzimas extracelulares que degradan varios componentes de la pared celular de las plantas, como la celulosa, la cutina y la pectina. Después de este primer ataque, el hongo continúa su desarrollo en la superficie externa de la planta, causando enfermedad por la formación de apresorios que penetran las células vegetales tomando nutrientes de ésta para continuar su crecimiento y desarrollo (Ceresini, 1999).

Como el hongo destruye las células de las plantas, las hifas prosiguen el crecimiento y colonización del tejido muerto, muchas veces formando nuevos esclerocios. El nuevo inóculo es producido dentro o fuera del tejido del hospedero, repitiéndose sucesivamente nuevos ciclos en el momento que nuevos tubérculos-semilla y el material vegetal están disponibles (Ceresini, 1999).

Hofman y Jongebloed (1988) luego de estudiar la infección de brotes de papa, enfatizaron la relación entre el desarrollo del micelio de *R. solani* en la superficie de los brotes y la severidad de la enfermedad, encontrando que bajo el colchón de infección las hifas pueden penetrar en las células de la epidermis. Este proceso es causado por la actividad enzimática del patógeno, debido a que estas paredes son localmente menos gruesas y la profundidad de la lesión excede la profundidad del tejido colonizado.

La colonización del tejido de la planta es inicialmente restringida a una o dos capas celulares bajo el colchón de infección; la degradación de la pared ce-

lular y la muerte de sus células son más comunes en la tercera y cuarta capa celular; finalmente, las lesiones pueden llegar hasta cerca de doce capas de células alcanzando los haces vasculares del tallo, afectando el transporte en el floema y –en casos severos– atacando también el xilema. Las lesiones que circundan un brote causan la muerte del mismo, provocando la aparición de rebrotes jóvenes (Hofman y Jongebloed, 1988). Estos mismos autores concluyeron que el tamaño de la lesión causado por la infección de *R. solani* es proporcional al tamaño del colchón de infección en la superficie de los brotes, indicando que las lesiones son únicamente formadas después de la penetración del hongo desde el colchón de infección, por lo que el tamaño de la lesión en el tallo constituye un limitante para su crecimiento.

Excepto durante la colonización inicial de células epidérmicas, el micelio nunca se observa en tejido sano; por tanto, el tejido colonizado de la planta se restringe a la parte directamente bajo el colchón de infección. *R. solani* coloniza el tejido muerto después de pocos días, donde puede utilizar los nutrientes liberados de las lesiones para su crecimiento. Es así como brotes emergidos saludables pueden infectarse severamente y caerse (Hofman y Jongebloed, 1988).

Manejo de *Rhizoctonia solani*

Debido a que los esclerocios pueden sobrevivir largos periodos de tiempo en el suelo, principalmente en los primeros 15-20 cm (Sneh *et al.*, 1998) y en los residuos de cosecha, solamente las rotaciones amplias del cultivo –de 1 a 5 ciclos o más– con siembra de pastos no susceptibles y cultivos de cereales como avena y cebada pueden reducir la incidencia de la enfermedad y el nivel del patógeno en el suelo. La siembra superficial de tubérculos con buen desarrollo de brotes reduce el tiempo de exposición al hongo, especialmente en suelos fríos y húmedos (CIP, 1996). El uso de tubérculo semilla certificada o la selección de semilla libre de esclerocios es una práctica importante; así mismo, la siembra en lotes nuevos, el control de malezas y el manejo adecuado del cultivo evitando sitios con exceso de humedad, además de la eliminación de los residuos de cosecha, permiten la reducción del inóculo en el suelo (Zapata, 2000).

El control químico es considerado por los agricultores como el arma más efectiva y rápida contra los principales problemas fitosanitarios, aunque en este caso dicho control ha demostrado baja eficacia (Garcés de Granada *et al.*, 1999). Para el control de *R. solani* en el cultivo de papa se utilizan moléculas químicas como Benomyl y Carbendazim, que son fungicidas sistémicos de amplio espectro pertenecientes al grupo de los benzimidazoles, usados para el control de enfermedades en semilla. Dichos fungicidas actúan sobre Ascomycetes y Deuteromycetes inhibiendo la síntesis de la tubulina en la mitosis; actúan rápidamente, puesto que son absorbidos por la planta a través del tallo, las hojas y las raíces, y son transportados por el xilema en sentido acropétalo. Se emplean también en el control de las enfermedades que afectan el arroz, como el añublo de la vaina ocasionado por *R. solani* para enfermedades de hortalizas y para la sigatoka negra en cultivos de plátano. Igualmente, es aplicado Tiabendazol para la prevención y control de enfermedades en tubérculos en almacenamiento o semillas.

Aunque los anteriores fungicidas son moderadamente tóxicos (III) pueden generar riesgos debido a sus efectos crónicos y subcrónicos (Diccionario de Especialidades Agroquímicas, 2003).

De la misma forma se aplican ingredientes activos como Carboxin y Captan, que pertenecen a la categoría toxicológica II en la protección y desinfección de semillas y en la desinfección de suelos aplicándolo directamente. El fungicida preventivo Captan es un compuesto heterocíclico que inhibe la respiración celular y generalmente es aplicado al suelo junto con Carboxin, que pertenece al grupo de las oxantinas e inhibe la síntesis de la enzima del ácido succínico deshidrogenasa ejerciendo una acción sistémica en la planta e inhibiendo la síntesis de ARN; estas moléculas químicas tienen transporte apoplástico, siendo eficientes para el control de Basidiomicetes e interviniendo en los procesos respiratorios y energéticos de los hongos (Diccionario de Especialidades Agroquímicas, 2003).

Las moléculas químicas mencionadas son comúnmente aplicadas al tubérculo semilla previo a la plantación, siendo recomendables cuando se utiliza

semilla infectada con *R. solani* (Mantecón, 2003). Igualmente, en etapas iniciales del cultivo se emplea el manejo de diferentes moléculas en tres épocas: siembra (Carbendazim), emergencia (Tiabenazol) y desyerba (Tiabendazol), dirigiendo la aplicación al sitio de siembra en el contorno del sitio de emergencia y a la base de la planta, respectivamente (Ñústez, 2002). Según el CIP (1996), el tratamiento con moléculas químicas preventivas es efectivo en los tubérculos semilla para reducir el inóculo de *R. solani* presente en ellas o cuando los suelos no están demasiado infestados, pero este beneficio puede ser menor en campo cuando el suelo está infestado por *R. solani* AG3 persistente en los cultivos de papa.

Benomil y Captan son fungicidas de categorías toxicológicas III y II respectivamente; generan altos riesgos para la salud humana, puesto que se ha determinado que pueden ser carcinogénicos y mutagénicos (De Liñán, 1997). Además, presentan residualidad y contaminación de suelos y aguas cuando son utilizados intensivamente o se hace uso indiscriminado de los mismos (sobredosis y sobreaplicaciones) (Santibáñez y Rivera, 2000).

El control biológico ha sido usado como una alternativa muy promisoriosa para el control de *R. solani* y se define como la disminución del inóculo o de la actividad de una enfermedad causada por un patógeno como consecuencia de la interacción de uno o más organismos, incluyendo la planta hospedera pero excluyendo al hombre (Baker, 1987).

Varios géneros de hongos han sido identificados como potenciales agentes de control biológico contra varios fitopatógenos del suelo; sin embargo son *Trichoderma* spp. y *Gliocladium* spp. los que han ofrecido mejores resultados en la práctica y los que han sido registrados como formulaciones en diferentes países de Europa y América (Cotes, 2001). Ambos hongos ejercen su acción mediante varios mecanismos, entre los que juega un rol importante el parasitismo. Especies del género *Trichoderma* han sido muy estudiadas como antagonistas de patógenos del suelo, como *R. solani*, *Sclerotium rolsii* y *Sclerotium cepivorum* (Harman *et al.*, 2004). En otros modelos de biocontrol se están empleando especies de *Rhizoctonia* no

patogénica consideradas como hipovirulentas (binucleadas) (Carling *et al.*, 2002) como agentes de control biológico para reducir la severidad de la rhizoctoniasis (CIP, 1996).

Chet y Baker (1981) reportaron en Colombia suelos supresivos a *R. solani* en los que encontraron que era *T. hamatum* el microorganismo causante de este efecto en monocultivos de rábano. También encontraron que en suelos orgánicos de la sabana de Bogotá la densidad de propágulos de *T. hamatum* es extremadamente alta en suelos con bajo pH, 8×10^5 propágulos.g⁻¹, siendo esta condición favorable para el desarrollo de supresividad de *R. solani* y el incremento del antagonismo de *T. hamatum*.

En estudios previos desarrollados por CORPOICA se encontró que cinco aislamientos nativos de *Trichoderma* spp. (Th002, Th003, Th007, Th034, Th181) presentaron eficiente actividad parasítica contra los esclerocios de *R. solani* obtenidos de tubérculos semilla de papa (Beltrán *et al.*, 2007). *T. koningiopsis* Th003 (antes *T. koningii*) –seleccionado en trabajos previos por su actividad contra *R. solani* en tomate (Cotes *et al.*, 2001)– y *T. asperellum* Th034 fueron los más eficientes, pues además de controlar la enfermedad incrementaron significativamente el crecimiento de las plantas. Estos resultados demuestran el potencial de *Trichoderma* spp. para el control de *R. solani*, siendo este microorganismo biocontrolador el objeto del presente trabajo.

Bibliografía

- Adams, P. (1990). The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 22:59-79.
- Anderson, N. A. (1982). The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. *Annual Review of Phytopathology* 20: 329-374.
- Anguis, R. y C. Martin. (1990). Caracterización y Patogenicidad de *Rhizoctonia solani* Khün que afecta a la papa en tres zonas ecológicas del Perú. *Fitopatología* 25: 16-22.
- Baker, K. F. (1987). Evolving concepts of biological control of plants pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 25: 67-85.

- Beltrán, C.; Cotes, A. M.; Paris, A. (2007). Selection of isolates of *Trichoderma* spp. with biocontrol activity over *Rhizoctonia solani* Kühn in potato. IOBC Bulletin Vol. 30 (6): 55-58.
- Cotes, A. M.; Cárdenas, A.; Pinzón, H. (2001). Effect of seed priming in the presence of *Trichoderma koningii* on seed and seedling disease induced in tomato by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. IOBC Bulletin Vol. 24 (3) 259-263.
- Carling, D.; Leiner, R. (1990). Virulence of Isolates of *Rhizoctonia solani* AG-3 Collected from Potato Plant Organs and Soil. Plant Disease. 74: 901-903.
- Carling, D.; Kuninaga, S.; Brainard, K. (2002). Hyphal anastomosis reactions, rDNA- Internal Transcribed Spacer Sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* Anastomosis Group-2 (AG-2) and AG-BI. Phytopathology. 92(1):43-50.
- Ceresini, P. (1999). *Rhizoctonia solani*. Pathogen profile. En línea. <http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/rhizoctonia>.
- Centro Internacional de la Papa (CIP). (1996). Principales enfermedades, nematodos e insectos de la papa. Lima, Perú. 42 p.
- Chet, I.; Baker, R. (1981). Isolation and biocontrol potencial of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. Phytopathology. 71: 286-290.
- De Liñán, C. (1997). Farmacología Vegetal. Ediciones Aerotécnicas S.L. Madrid. 1187 p.
- Diccionario de Especialidades Agroquímicas. (2003). Ediciones PLM S.A. 13ª Edición. 599 p.
- Domsch, K. H.; Gams, W.; Anderson, T. H. (1980). Compendium of soil fungi. Vol. 1. Academic Press. New York. pp. 795-809.
- Garcés de Granada, E.; Orozco de A, M.; Arbeláez, G. (2003). Utilización de microorganismos del suelo para el control de enfermedades de plantas. p. 1-26.
- Garcés de Granada, E.; Orozco de A. M.; Zapata, A. C. (1999). Fitopatología en Flores. Acta Biológica Colombiana. 4: 5-27.
- Harman, G.; Howell, Ch.; Viterbo, A.; Chet, I.; Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews. Microbiology. 2: 43-56.

- Hofman, T.W.; Jongebloed, P.H.J. (1988). Infection process of *Rhizoctonia solani* on *Solanum tuberosum* and effects of granular nematicides. Netherland Journal of Plant Pathology 94: 243-252.
- Ichielevich-Auster, M.; Sneh, B.; Koltin, Y.; Barash, I. (1985). Pathogenicity, host specificity and anastomosis groups of *Rhizoctonia* spp. Isolated from soils in Israel. Phytoparasitica 13: 103-112.
- Jager, G.; Velvis, H. (1988). Inactivation of sclerotia of *Rhizoctonia solani* on potato tubers by *Verticillium biguttatum*, a soil-borne mycoparasite. Netherland Journal of Plant Pathology 94(5):225-231.
- Núñez, C. (2002). Efecto de diferentes niveles de inóculo de *Rhizoctonia solani* en semilla y dos sistemas de manejo, sobre el rendimiento y sanidad del tubérculo cosechado. Informe Técnico. Convenio 094 de 2000. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT. CORPOICA.
- Prado, G.; Correa, F.; Aricapa, M.; Escobar, F. (2001). Caracterización preliminar de la resistencia de germoplasma de arroz al añublo de la vaina (*Rhizoctonia solani* Kühn). Foro Arroceros Latinoamericano. 7: 8-11.
- Rodríguez B, A. (2001). Generalidades del Cultivo de la Papa en Colombia. En: Vademécum del cultivo de la papa. Federación Colombiana de Productores de Papa –Fedepapa–. pp. 1-42.
- Santibáñez, T.; Rivera, L. (2000). Uso de plaguicidas en la zona productora de flores y sus efectos en la incidencia del aborto espontáneo. <<http://www.geocities.com>>
- Sneh, B.; Burpee, L.; Ogoshi, A. (1998). Identification of *Rhizoctonia* Species. St. Paul, Minnesota, USA. APS Press. pp. 135.
- Tsrar, L.; Barak, R.; Sneh, B. (2001). Biological control of Black scurf on potato under organic management. Crop Protection. 20: 145-150.
- Yildiz, A.; Timur, M. (2002). Anastomosis group determination of *Rhizoctonia solani* Kühn (Teleomorfh: *Thanatephorus cucumeris*) isolates from tomatoes grown in Aydin, Turkey and their disease reaction on various tomato cultivars. J. Phytopathology 150:526-528.
- Zapata, J. L. (2000). Manejo integrado de las enfermedades de la papa. En: Manejo Integrado del Cultivo de la Papa. Manual Técnico. CORPOICA Tibaitatá. pp. 130-141.



Caracterización molecular y análisis de la variabilidad genética de *R. solani*

Edisson Chavarro, Jorge Evelio Ángel

Introducción

Una de las enfermedades más recurrentes en tubérculos de papa es la rhizoctoniasis, causada por el hongo *R. solani*. Este hongo ataca más de 250 especies de plantas y está presente en muchas áreas productoras de papa afectando el desarrollo del cultivo, ya que bajo condiciones ambientales frías y húmedas después de la siembra la rhizoctoniasis puede afectar la emergencia y el desarrollo de la planta. Dicha enfermedad también reduce en forma importante el rendimiento comercial debido a que las plantas infectadas tienden a producir una gran cantidad de tubérculos deformes, con protuberancias y partiduras; además se forman esclerocios (“costra negra”) en la superficie de los tubérculos, lo cual afecta su apariencia y calidad. El hongo sobrevive en el suelo como micelio en tejido en descomposición y como esclerocios en la superficie de tubérculos o en el suelo.

Las regiones ITS son secuencias de ADN altamente específicas, que se encuentran entre los genes que codifican para el RNA ribosomal. Estas regiones son utilizadas en el estudio de poblaciones puesto que muestran diferencias evolutivas y permiten obtener una buena información filogenética y taxonómica de los individuos (Liu et al. 1992)

Este estudio contribuye a la caracterización patológica y molecular del agente causal de la rhizoctoniasis en el cultivo de papa, así como en el conocimiento de la estructura y diversidad filogenética mediante la amplificación de Secuencias Trascritas Internas (ITS) de *R. solani*.

Materiales y métodos

Aislamiento del hongo

Esta fase de la investigación se ejecutó en el Laboratorio de Control Biológico de CORPOICA, donde se realizaron las pruebas de compatibilidad de grupos de anastomosis. El proceso se llevó a cabo utilizando la metodología descrita por Beltrán (2004), el cual consistió en desinfectar superficialmente los tubérculos sumergiéndolos durante un minuto en alcohol al 70 % y luego durante un minuto en hipoclorito de sodio al 0,2 %; posteriormente se lavaron con abundante agua destilada estéril, se secaron con papel filtro estéril y se colocaron en recipientes con tapa para generar condiciones de cámara húmeda. Por último, los recipientes se incubaron en un cuarto con luz constante y 24 °C.

El micelio que se desarrolló sobre el tubérculo a partir de los esclerocios fue sembrado en medio de cultivo PDA para su aislamiento. A continuación se iniciaron las pruebas de anastomosis para ubicar aquellos grupos de anastomosis de importancia fitopatológica en el cultivo de papa.

Extracción de ADN

La extracción de ADN se efectuó con el protocolo propuesto por Goodwin *et al.* (1993), que ha sido utilizado en varios trabajos de investigación desarrollados en el Laboratorio Nacional de Diagnóstico Fitosanitario y Análisis

Molecular del ICA (con hongos fitopatógenos este protocolo ha demostrado altas eficiencia y reproducibilidad). Igualmente se utilizó el kit Master Pure DNA purification de EPICENTRE®, que permite obtener un ADN de alta pureza y es usado para procesos de clonación, secuenciación, restricción enzimática y marcadores moleculares.

Prueba de PCR-ITS ADNr

La prueba de PCR se realizó bajo las condiciones descritas en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Mezcla de reacción para PCR-ITS

Componente	Concentración inicial	Concentración Final	Volumen 25 μ L / Reacción
H ₂ O grado molecular.			17
Buffer PCR	10X	1X	2.5
MgCl ₂	50 mM	3 mM	1,5
BSA	0,1%	0.04 %	1
Primer Forward	10 μ M	0.24 μ M	0.6
Primer Reverse	10 μ M	0.24 μ M	0.6
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.5
Taq Polimerasa	5 U/ μ l	2,5 U/ μ l	0.3
DNA templado			1.0

Tabla 2. Programa de termociclado PCR-ITS

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Denaturación inicial	94	2
Denaturación de los ciclos	94	1
Hibridación	57	1
Elongamiento	72	1
Elongamiento final (después de los 30 ciclos)	72	10

Análisis de datos

El alineamiento de las secuencias se realizó con el software CLUSTAL X y BIO-EDIT. El árbol que muestra la similitud entre los aislados se construyó mediante método neighbor-joining utilizando el software CLUSTAL X y TREE-VIEW. *Rhizoctonia oryzae* se incluyó como control externo en el presente estudio. Las relaciones filogenéticas se determinaran por el método de máxima parsimonia con el software PAUP. Datos no mostrados. (Fenille

et al., 2003). Mediante el análisis BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.* 1997), disponible en internet.

Resultados

Extracción de ADN

El kit de extracción manejado permitió obtener un buen templado de ADN utilizado en las reacciones de PCR-ITS y posterior secuenciación.

Amplificación y Secuenciación PCR-ITS B

Con la amplificación de la región ITS B se obtuvo un producto de 420 Pb. (Figura 4). Éste fue secuenciado y utilizado para la identificación molecular de *R. solani* y para la verificación de su grupo de anastomosis correspondiente.

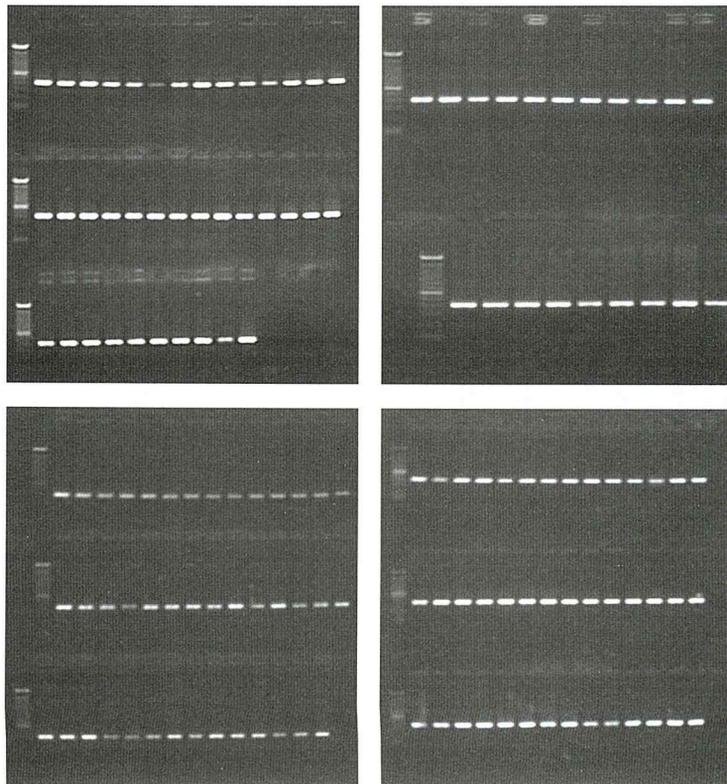


Figura 4. PCR-ITS B a partir de aislamientos de *R. solani*, donde se observa un producto de amplificación cercano a los 420 Pb.

El análisis preliminar de 41 secuencias (Tabla 3) mediante el programa BLASTn arrojó un valor promedio de máxima similitud con *Thanatephorus cucumeris* de 97 % forma sexual para *Rhizoctonia solani*, comprobando por metodología molecular que los aislamientos correspondieron al hongo *R. solani*. Con estos hallazgos se procedió a filtrar, seleccionar la información, alinear secuencias y construir árboles filogenéticos para corroborar el grupo de anastomosis.

Alineamiento de secuencias, determinación de Grupos de Anastomosis AG y construcción de árboles filogenéticos basados en una secuencia ITS-B

Determinación de Grupos de Anastomosis AG

Se logró determinar el posible AG a que pertenecían los 41 aislamientos usando como parámetro la secuencia AF354107 (AG-3), disponible en el GENBANK, y teniendo como referencia el porcentaje de máxima similitud que tenía cada aislamiento con dicha secuencia buscando así determinar el AG correspondiente para cada aislamiento de *R solani* (tablas 3 y 4). De las 33 secuencias, 31 correspondieron al grupo AG-3 y las dos restantes al grupo AG2-1 (Tabla 3).

Siete aislamientos no pudieron ser caracterizados mediante pruebas tradicionales de compatibilidad de anastomosis, de tal forma que se secuenció la región ITS-B para corroborar su grupo de anastomosis. Del análisis de secuencia realizado, se obtuvo que, tres aislamientos correspondieron al grupo AG-3, dos aislamientos correspondieron al grupo AG2-1 y dos correspondieron al grupo AG-1. Este último no es común hallarlo en papa, por lo que se recomienda comprobar la consistencia de esta determinación mediante el uso de un iniciador específico para este grupo y posterior secuenciación.

El aislamiento suministrado por la Universidad Nacional de Colombia fue codificado como Control AG-3 UNAL y presentó una máxima identidad del 99

% y 98 % con las accesiones AY387547 y AF354107, respectivamente. Estas accesiones corresponden al grupo AG-3 que infecta papa, la accesión AY387547 tiene como origen geográfico a España y la AF354107 a México.

Finalmente, se concluye que el 86 % (35 aislamientos) pertenece al grupo AG-3, el 9 % (4 aislamientos) corresponde al grupo AG2-1 y el 5 % restante (2 aislamientos) es posiblemente del grupo AG-1.

Los resultados muestran que el grupo de anastomosis predominante en tubérculos de papa es el AG-3 comparado con el grupo AG-2. Estudios realizados por Cedeño *et al.* (2001) permitieron la identificación en Mérida (Venezuela) de una variante del grupo AG-2, el AG2-1 en papa, a partir de 173 aislamientos de *R. solani* analizados, de los cuales 163 pertenecieron al grupo AG-3 y 10 al grupo AG2-1. Estos resultados concuerdan con lo encontrado en el presente estudio, donde el grupo de anastomosis de mayor frecuencia fue AG-3.

Respecto al grupo AG-1 no es común encontrarlo en papa tal como se dijo anteriormente; no obstante, este resultado parcial está sujeto a comprobación mediante el uso de iniciadores específicos de grupo para su detección. Este proceso se le puede realizar igualmente a los otros dos grupos AG2-1 y AG-3 respectivamente, siguiendo los protocolos descritos por Carling *et al.* (2002) y Lees *et al.* (2002).

Tabla 3. Aislamientos pertenecientes a AG-3 +/- según el análisis morfológico y porcentaje de máxima similitud comparados con el aislamiento AF354107 (AG-3).

No.	Aislado	AG3	Max Identidad	Código Accesion	Procedencia
1	(024)	+	97%	AF354107	Boyacá
2	(028)	+	95%	AF354107	Boyacá
3	(037)	+	97%	AF354107	Boyacá
4	(031)	+	96%	AF354107	Boyacá
5	(019)	+	97%	AF354107	Boyacá
6	(026)	+	87%	AF354107	Boyacá
7	(034)	+	93%	AF354107	Boyacá
8	(023)	+	88%	AF354107	Boyacá
9	(004)	+	94%	AF354107	Boyacá

10	(030)	-	95% posible (AG2-1)	DQ355130 (Strain Y25)	Boyacá
11	(003)	+	98%	AF354107	Boyacá
12	(021)	+	96%	AF354107	Boyacá
13	(069)	+	97%	AF354107	Antioquia
14	(070)	+	97%	AF354107	Antioquia
15	(074)	+	98%	AF354107	Antioquia
16	(075)	+	98%	AF354107	Antioquia
17	(078)	+	97%	AF354107	Antioquia
18	(055)	+	93%	AF354107	Antioquia
19	(084)	+	96%	AF354107	Antioquia
20	(056)	-	94% posible (AG2-1)	DQ355130 (Strain Y25)	Antioquia
21	(054)	+	89%	AF354107	Antioquia
22	(053)	+	96%	AF354107	Antioquia
23	(051)	+	95%	AF354107	Antioquia
24	(105)	+	91%	AF354107	Cundinamarca
25	(114)	+	95%	AF354107	Cundinamarca
26	(199)	+	96%	AF354107	Cundinamarca
27	(176)	+	97%	AF354107	Cundinamarca
28	(121)	+	96%	AF354107	Cundinamarca
29	(181)	+	98%	AF354107	Cundinamarca
30	(125)	+	96%	AF354107	Cundinamarca
31	(191)	+	97%	AF354107	Cundinamarca

Tabla 4. Aislamientos AG-3 +/- determinados molecularmente y porcentaje de máxima similitud comparados con AF354107 (AG-3).

No.	Aislado	AG3	Max Identidad	Código Accesion	Procedencia
1	(076)	-	97% posible (AG2-1)	DQ355130 (Strain Y25)	Antioquia
2	(106)	-	90% posible (AG1)	EF206342	Cundinamarca
3	(101)	-	98% posible (AG2-1)	DQ355130 (Strain Y25)	Cundinamarca
4	(115-A)	-	91% posible (AG1)	EU152874	Cundinamarca
5	(116-B)	+	95%	AF354107	Cundinamarca
6	(126)	+	96%	AF354107	Cundinamarca
7	(129)	+	93%	AF354107	Cundinamarca

Alineamiento múltiple de 42 secuencias de *R. solani*

Se tomaron 42 secuencias –de las 120 que se tienen– con el objetivo de hacer un acercamiento preliminar de la diversidad genética utilizando la secuencia de la región ITS B del hongo. Pensando en ello, se depuró la se-

cuencia ITS-B buscando una región conservada entre los aislamientos para ser alineada con los Software CLUSTAL X y BIO-EDIT. Con la secuencia parcial obtenida a partir de la región ITS-B de 298 Pb., se realizó el siguiente alineamiento para 38 aislamientos obtenidos en el presente estudio y cuatro secuencias controles disponibles en el GENBANK (sombreadas – Anexo 1).

El alineamiento múltiple permitió inferir inicialmente que estos aislamientos presentan gran variabilidad intraespecífica a nivel de grupo de anastomosis AG-3; los aislamientos 030Boy, 056Ant, 076Ant y 101Cun, corresponden al grupo AG2-1 y evidencian también gran diversidad en su secuencia (región parcial ITS-B 298Pb). Los controles AY387547, AF354107, DQ355130 y AB213578Ro corresponden respectivamente a los siguientes microorganismos: *R. solani* AG-3 (España), *R. solani* AG-3 (México), *R. solani* AG2-1 (Reino Unido) y *R. oryzae* (EUA); este último es el control externo. Hacia los nucleótidos 120 hasta 145 se presenta una región conservada de 25 Pb. entre los aislamientos, región que se conserva para ambos grupos AG-3 y AG2-1 (la región puede ser de gran interés práctico para el desarrollo de algún marcador molecular). Finalmente, el alineamiento preliminar permitió visualizar gran diversidad al interior de la secuencia y así mismo generar árboles que ilustran el agrupamiento de los aislamientos y diversidad genética medida posiblemente por región geográfica (filogeografía) o por grupo de anastomosis (AG).

El alineamiento múltiple permitió deducir que estos aislamientos pertenecen al grupo de anastomosis tres debido a la alta homología de secuencia, tal como se observa con anterioridad, respecto a la comparación con la accesión AF354107 (AG-3), que es la secuencia de referencia. Con estos resultados preliminares se pudo identificar a *R. solani* AG-3 mediante la utilización de pruebas moleculares como la PCR-ITS.

Es recomendable de todas maneras confirmar siempre los resultados mediante ensayos morfo-funcionales, bioensayos y diagnóstico PCR-específico. Aquellos aislamientos que presentaron una alta similitud con AG3 serán amplificados con la pareja de iniciadores específicos Rs1F2/ Rs2R1 (Lees *et al.*, 2002), que permite una detección específica de este grupo de

anastomosis; de esta manera se verificarán los resultados obtenidos en el ensayo de PCR-ITS B.

Árbol filogenético para 42 secuencias parciales (ITS B) de *R. solani*

El árbol filogenético fue generado mediante la subrutina TREE-VIEW. Con estos resultados se alcanzó a observar que las secuencias analizadas presentan un alto grado de similitud con las secuencias control AF354107 (AG-3), AY387547 (AG-3) y DQ355130 (AG2-1), disponibles en el GENE BANK.

El árbol filogenético deja ver claramente la formación de dos clados, donde se agrupan las 33 secuencias de AG-3 más los tres controles (AG-3UNAL, AF354107AG3-Mex y AY387547AG3-Esp), y otro clado que contiene las cuatro secuencias de AG2-1 y el control (DQ355130AG2-UK) (Figura 5). Estos resultados preliminares muestran una alta variabilidad intraespecífica a nivel de grupo de anastomosis AG-3 para las tres regiones geográficas donde se realiza el estudio, de tal manera que los aislamientos no se diferencian o agrupan según la población geográfica de origen sino que presentan características genéticas únicas para cada individuo, pero a su vez se agrupan por diferenciación de grupo de anastomosis. Para la elaboración del árbol filogenético se utilizó como control externo la secuencia con código de acceso AB213578, que corresponde a *Rhizoctonia oryzae* (ver Figura 5). De forma preliminar, estos hallazgos permitieron dilucidar la variabilidad genética de la región ITS B en las poblaciones colombianas del hongo.

Conclusiones

- Los grupos de anastomosis AG-3 y AG2-1 están presentes en las tres regiones geográficas muestreadas (Boyacá, Antioquia y Cundinamarca) en 86 % y 9 % respectivamente.
- El análisis preliminar de la región ITS B de *R. solani* (AG-3) evidenció una marcada variabilidad genética de interés práctico para los análisis filogenéticos.
- Los aislamientos presentaron una alta variabilidad fenotípica respecto a su caracterización morfológica.

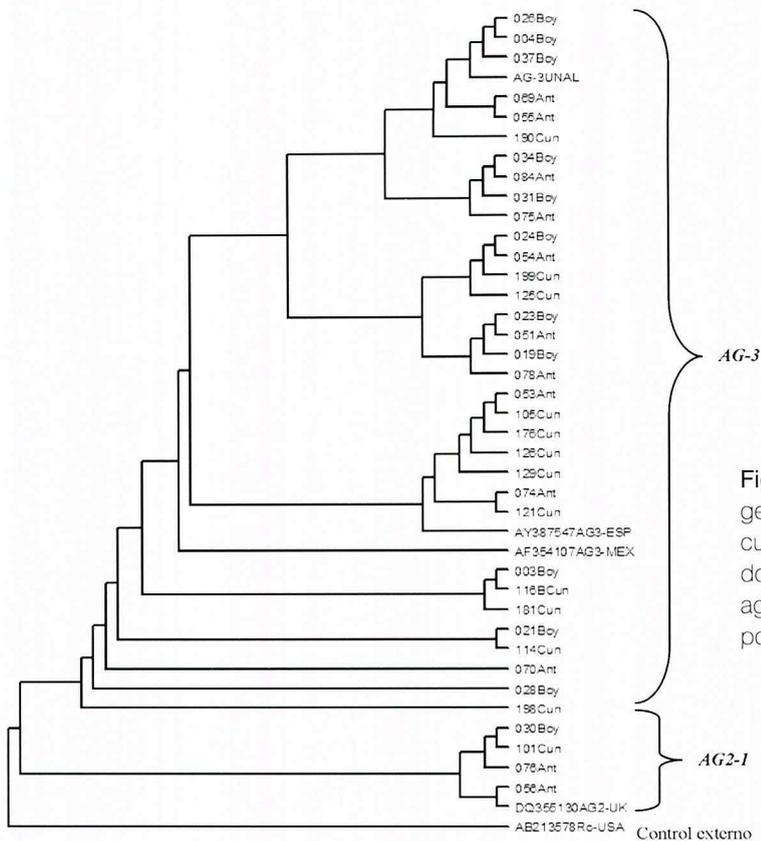


Figura 5. Árbol filogenético para 42 secuencias de *R. solani*, donde se observa el agrupamiento por grupo de anastomosis.

Recomendaciones

- Se recomienda corroborar estos hallazgos preliminares mediante la detección PCR- específica para grupos de anastomosis y su posterior secuenciación.
- Es aconsejable observar la condición nuclear para los aislamientos de *R. solani*, debido a sus implicaciones patogénicas.
- Por la alta variabilidad fenotípica de los aislamientos se hace necesario una caracterización morfológica de los aislamientos.
- Dado que se observó una alta variabilidad genética al interior de AG-3, sería de gran interés caracterizar mediante el uso de marcadores moleculares de tipo RFLP, MLST o variantes moleculares dentro del grupo de anastomosis AG-3.

Bibliografía

Altschul, F.; Madden, T.; Schäffer, A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. Vol. 25: 3389-3402.

Beltrán, C. R. (2004). Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. con potencial biocontrolador de *Rhizoctonia solani* Kühn en papa bajo condiciones de casa de malla. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Bogotá. pp. 122.

Carling, D.; Kuninaga, S.; Brainard, K. (2002). Hyphal anastomosis reactions, rDNA-Internal Transcribed Spacer Sequences and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* Anastomosis Group-2 (AG-2) and AG-BI. *Phytopathology*. 92(1):43-50.

Cedeño, L.; Carrero, C.; Quintero, K. *et al.* (2001). Identificación y virulencia de grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* Kühn asociados con papa en Mérida, Venezuela. *INCI*. 26: 296-300.

Goodwin, J.; Lee, K. (1993). Microwave Miniprep of Total Genomic DNA from Fungi, Plants, Protists and Animals for PCR *Biotechniques*. No.15: 438-444.

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

Fenille, R. C., Ciampi, M. B., Kuramae, E. E., Souza, N. L. 2003. Identification of *Rhizoctonia solani* associated with soybean in Brazil by rDNA-ITS sequences. *Fitopatología Brasileira* 28:413-419.

Anexo 1. Alineamiento para 38 aislamientos obtenidos en el presente estudio y cuatro secuencias controles disponibles en el GENE BANK (sombreadas).

	5	15	25	35	45	55
023Boy	TTAGAAGCGG	T-TCATCTAG	CAT-ATACCT	ATGGCCACT-	ATTTACAGTG	TA-CCTCAG-
051Ant	TTAGAAGCGG	T-TCATCT-G	CAT-TTACCT	-TGGCCACT-	TTTTACAGTG	T--CCTCAG-
024Boy	TTAGAAGCGG	T-TCATCT-G	CAT-TTACCT	-TGGCCACT-	TTTTACAGTG	T--CCTCAG-
075Ant	TTAGAAGCGG	T-TCATCT-G	CAT-TTACCT	-TGGCCACT-	TTTTACAGTG	T--CCTCAG-
084Ant	TTAGAAGCGG	T-TCATCT-G	CAT-TTACCT	-TGGCCACT-	TTTTACAGTG	T--CCTCAG-
054Ant	ATAGAAGCGG	TGTCATCTAG	CAT-ATACCT	-TGGCCACT-	TTTTACAGTG	T--CCTCAG-
021Boy	TTAGAAGCGG	T-TCATCT-G	CAT-TTACC-	-TGGCCACT-	TTTTACAGTG	T--CCTCAG-

070Ant	TTAGAAGCGG	T-TCATCT-G	CAT-TTACCT	-TGGCCACT-	TTTTACAGTG	T--CCTCAG-
AG-3UNAL	TTAGAAGCGG	T-TCATCT-G	CAT-TTACCT	-TGGCCACT-	TTTTACAGTG	T--CCTCAG-
026Boy	ATAGAAGCGG	T-TCATCTAG	CATATTACCT	ATGGCCACTA	TTTTACAGTG	TACCTACAG-
069Ant	TTAGAAGCGG	T-TCATCT-G	CAT-TTACCT	-TGGCCACT-	TTTTACAGTG	T--CCTCAG-
055Ant	TTAGAAGCGG	T-TCATCT-G	CAT-TTACCT	-TGGCCACT-	TTTTACAGTG	T--CCTCAG-
037Boy	TTAGAAGCGG	T-TCATCT-G	CAT-TTACCT	-TGGCCACT-	TTTTACAGTG	T--CCTCAG-
199Cun	TTAGAAGCGG	T-TCATCT-G	CAT-TTACCT	-TGGCCACT-	TTTTACAGTG	T--CCTCAG-
AF354107	TTAGAAGCGG	T-TCATCT-G	CAT-TTACCT	-TGGCCACT-	TTTTACAGTG	T--CCTCAG-
004Boy	TTAGAAGCGG	T-TCATCTGC	-ATTTA--CC	TTGGCCA-CT	TTTTACAGTG	TCCTC--AG-
198Cun	TTAGAAGCGG	T-TCATCTGC	-ATTTGACCT	TTGGCCA-CT	TTTTACAGTG	TCCATCAAG-
003Boy	TTAGAAGCGG	T-TCATCTGC	-ATTTA--CC	-TGGCCA-CT	TTTTACAGTG	TCCTC--AG-
019Boy	TTAGAAGCGG	T-TCATCTGC	-ATTTA--CC	TTGGCCA-CT	TTTTACAGTG	TCCTC--AG-
125Cun	TTAGAAGCGG	T-TCATCTGC	-ATTTA--CC	TTGGCCA-CT	TTTTACAGTG	TCCTC--AG-
030Boy	TTAGAAGCGG	T-TCATCTGC	-ATTTA--CC	TTGGCCA-CC	TTTTACAGTG	TCCT--CAG-
DQ355130	TTAGAAGCGG	T-TCATCTGC	-ATTTA--CC	TTGGCCA-CC	TTTTACAGTG	TCCT--CAG-
076Ant	TTAGAAGCGG	T-TCATCTGC	-ATTTA--CC	TTGGCCA-CC	TTTTACAGTG	TCCT--CAG-
056Ant	TTAGAAGCGG	TGTCATCTGC	-ATATA--CC	TTGGCCA-CC	TTTTACAGTG	TCCTA-CAG-
101Cun	TTAGAAGCGG	T-TCATCTGC	-ATTTA--CC	TTGGCCA-CC	TTTTACAGTG	TCCT--CAG-
114Cun	TTAGAAGCGG	T-TCATCTGC	CATTTA--CC	TTGGCCA-C-	TTTTACAGTG	TCCT--CAG-
116BCun	TTAGAAGCGG	T-TCATCTGC	-ATTTA--CC	TTGGCCA-CT	TTTTACAGTG	TCCT--CAG-
031Boy	TTAGAAGCGG	T-TCATCTGC	-ATTTA--CC	TTGGCCA-CT	TTTTACAGTG	TCCT--CAG-
181Cun	TTAGAAGCGG	T-TCATCTGC	-ATTTA--CC	TTGGCCA-CT	TTTTACAGTG	TCCT--CAG-
074Ant	TTAGAAGCGG	T-TCATCTGC	-AT-TTACCT	TGGGCCACTT	TT-TACAGTG	T--CCTCAG-
121Cun	TTAGAAGCGG	T-TCATCTGC	-AT-TTACCT	TGGGCCACTT	TT-TACAGTG	T--CCTCAG-
053Ant	TTAGAAGCGG	T-TCATCTGC	-AT-TTACCT	TGG-CCACTT	TT-TACAGTG	T--CCTCAG-
105Cun	TAGCAAGCGG	TCTCATCTGC	-AT-TTACCT	TGG-CCACTT	TTATACAGTG	T--CCTCAGA
176Cun	TTAGAAGCGG	T-TCATCTGC	-AT-TTACCT	TGG-CCACTT	TT-TACAGTG	T--CCTCAG-
126Cun	TTAGAAGCGG	T-TCATCTGC	-AT-TTACCT	TGGGCCACTT	TT-TACAGTG	T--CCTCAG-
129Cun	TTAGAAGCGG	T-TCATCTGC	-AT-TTACCT	TGG-CCACTT	TT-TACAGTG	T--CCTCAG-
190Cun	TTAGAAGCGG	T-TCATCTGC	-AT-TTACCT	TGG-CCACTT	TT-TACAGTG	T--CCTCAG-
AY387547	TTAGAAGCGG	T-TCATCTGC	-ATTTA--CC	TTGGCCACT-	TTTTACAGTG	T--CCTCAG-
078Ant	TTAGAAGCGG	T-TCATCTGC	-ATTTA--CC	TTGGCCACT-	TTTTACAGTG	T--CCTCAG-
028Boy	TTAGAAGCGG	T-TCATCTGC	-ATTTA--CC	TTGGCCACT-	TTTTACAGTG	T--CCTCAG-
034Boy	TTAGAAGCGG	TGTCATCTGC	-ATATTCACC	TTGGCCACT-	TTTTACAGTA	GTACCTCAG-
AB213578Ro	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	65	75	85	95	105	115
023Boy	CGATAGATAA	TATT-ATACA	CGCTA--GAG	TAGGAACCAA	GCATAAC--A	CTAGAGATCC
051Ant	CGATAGATAA	T-TT-AT-CA	CGCT---GAG	T-GGAACCAA	GCATAAC--A	CT-GAGATCC
024Boy	CGATAGATAA	T-TT-AT-CA	CGCT---GAG	T-GGAACCAA	GCATAAC--A	CT-GAGATCC
075Ant	CGATAGATAA	T-TT-AT-CA	CGCT---GAG	T-GGAACCAA	GCATAAC--A	CT-GAGATCC
084Ant	CGATAGATAA	T-TT-AT-CA	CGCT---GAG	T-GGAACCAA	GCATAAC--A	CT-GAGATCC
054Ant	CGATAGATAA	T-TT-AT-CA	CGCTA--GAG	TAGGAACCAA	GCATAAC--A	CT-GAGATCC
021Boy	CGATAGATAA	T-TT-AT-CA	CGCT---GAG	T-GGAACCAA	GCATAAC--A	CT-GAGATCC
070Ant	CGATAGATAA	T-TT-AT-CA	CGCT---GAG	T-GGAACCAA	GCATAAC--A	CT-GAGATCC
AG-3UNAL	CGATAGATAA	T-TT-AT-CA	CGCT---GAG	T-GGAACCAA	GCATAAC--A	CT-GAGATCC
026Boy	CGATAGATAA	TATTGATACA	CGCT---GAG	TAGGAACCAA	GCATAAC--A	CTAGAGATCC
069Ant	CGATAGATAA	TTT--AT-CA	CGCT---GAG	T-GGAACCAA	GCATAAC--A	CT-GAGATCC
055Ant	CGATAGATAA	TTT--AT-CA	CGCT---GAG	T-GGAACCAA	GCATAAC--A	CT-GAGATCC
037Boy	CGATAGATAA	TTT--AT-CA	CGCT---GAG	T-GGAACCAA	GCATAAC--A	CT-GAGATCC
199Cun	CGATAGATAA	TTT--AT-CA	CGCT---GAG	T-GGAACCAA	GCATAAC--A	CT-GAGATCC

AF354107	CGATAGATAA	TTT--AT-CA	CGCT---GAG	T-GGAACCAA	GCATAAC--A	CT-GAGATCC
004Boy	CGATAGATAA	TTTA-TCAC-	-GCT---GAG	-TGGAACCAA	GCATAAC--A	C-TGAGATCC
198Cun	CGATAGATAA	ATTAATCAC-	-GCT---GAG	-TGGAACCAA	GCATAAC--A	CGTGAGATCC
003Boy	CGATAGATAA	TTTA-TCAC-	-GCT---GAG	-TGGAACCAA	GCATAAC--A	C-TGAGATCC
019Boy	CGATAGATAA	TTTA-TCAC-	-GCT---GAG	-TGGAACCAA	GCATAAC--A	C-TGAGATCC
125Cun	CGATAGATAA	TTTA-TCAC-	-GCT---GAG	-TGGAACCAA	GCATAAC--A	C-TGAGATCC
030Boy	CGATAGATAA	TTTA-TCAC-	-GCT---GAG	CTGGAACCAA	GCATAAC--A	CT-GAGATCC
DQ355130	CGATAGATAA	TTTA-TCAC-	-GCC---GAG	-TGGAACCAA	GCATAAC--A	CT-GAGATCC
076Ant	CGATAGATAA	TTTA-TCAC-	-GCC---GAG	-TGGAACCAA	GCATAAC--A	CT-GAGATCC
056Ant	CGATAGATAA	TTTA-TCAC-	-GCC---GAG	-TGGAACCAA	GCATAAC--A	CTAGAGATCC
101Cun	CGATAGATAA	TTTA-TCAC-	-GCC---GAG	-TGGAACCAA	GCATAAC--A	CT-GAGATCC
114Cun	CGATAGATAA	TTTA-TCAC-	-GCT---GAG	-TGGAACCAA	GCATAAC--A	CT-GAGATCC
116BCun	CGATAGATAA	TTTA-TCACG	GGCCCTTGAG	-TGGAACCAA	GCATAAC--A	CT-GAGATCC
031Boy	CGATAGATAA	TTTA-TCAC-	-GCT---GAG	-TGGAACCAA	GCATAAC--A	CT-GAGATCC
181Cun	CGATAGATAA	TTTA-TCAC-	-GCT---GAG	-TGGAACCAA	GCATAAC--A	CT-GAGATCC
074Ant	CGATAGATAA	TTTA-TCA--	CGCT---GAG	-TGGAACCAA	GCATAAC--A	CT-GAGATCC
121Cun	CGATAGATAA	TTTA-TCA--	CGCT---GAG	-TGGAACCAA	GCATAAC--A	CT-GAGATCC
053Ant	CGATAGATAA	TTTA-TCA--	CGCT---GAG	-TGGAACCAA	GCATAAC--A	CT-GAGATCC
105Cun	CGATAGATAA	TTTA-TCAG-	CGCTA--GAG	-TGGAACCAA	GCATAAACGA	CT-GAGATCC
176Cun	CGATAGATAA	TTTA-TCA--	CGCT---GAG	-TGGAACCAA	GCATAAC--A	CT-GAGATCC
126Cun	CGATAGATAA	TTTA-TCA--	CGCT---GAG	-TGGAACCAA	GCATAAC--A	CT-GAGATCC
129Cun	CGATAGATAA	TTTA-TCA--	CGCT---GAG	-TGGAACCAA	GCATAAC--A	CT-GAGATCC
190Cun	CGATAGATAA	TTTA-TCA--	CGCT---GAG	-TGGAACCAA	GCATAAC--A	CT-GAGATCC
AY387547	CGATAGATAA	TTTA-TCAC-	-GCT---GAG	-TGGAACCAA	GCATAAC--A	CT-GAGATCC
078Ant	CGATAGATAA	TTTA-TCAC-	-GCT---GAG	-TGGAACCAA	GCATAAC--A	CT-GAGATCC
028Boy	CGATAGATAA	TTTA-TCAC-	-GCT---GAG	-TGGAACCAA	GCATAAC--A	CT-GAGATCC
034Boy	CGATAGATAA	TATTGATACA	CGCT---GAG	TAGGAACCAA	GCATAAC--A	CTAGAGATCC
AB213578Ro	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	125	135	145	155	165	175
023Boy	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGTAGTAG	AAGCT-GCAA	A-AGACCTAC	CAATACCAAA
051Ant	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGT-GTAG	AAGCT-GCAA	A-AGACCT-C	CAATACCAAA
024Boy	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGT-GT-G	AAGCT-GCAA	A-AGACCT-C	CAATACCAAA
075Ant	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGT-GT-G	AAGCT-GCAA	A-AGACCT-C	CAATACCAAA
084Ant	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGT-GTAG	AAGCTAGCAA	A-AGACCT-C	CAATACCAAA
054Ant	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGTAGTAG	AAGCTAGCAA	A-AGACCTAC	CAATACCAAA
021Boy	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGT-GT-G	AAGCT-GCAA	A-AGACCT-C	CAATACCAAA
070Ant	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGT-GT-G	AAGCT-GCAA	A-AGACCT-C	CAATACCAAA
AG-3UNAL	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGT-GT-G	AAGCT-GCAA	A-AGACCT-C	CAATACCAAA
026Boy	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGTAGTAG	AAGCT-GCAA	A-AGACCTAC	CAATACCAAA
069Ant	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGTGT--G	AAGCT-GCAA	A-AGACCT-C	CAATACCAAA
055Ant	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGTGT--G	AAGCT-GCAA	A-AGACCT-C	CAATACCAAA
037Boy	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGTGT--G	AAGCT-GCAA	A-AGACCT-C	CAATACCAAA
199Cun	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGTGT--G	AAGCT-GCAA	A-AGACCT-C	CAATACCAAA
AF354107	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGT-GT-G	AAGCT-GCAA	A-AGACCT-C	CAATACCAAA
004Boy	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGT-GT-G	AAGCT-GCAA	A-AGACCTCC	-AATACCAAA
198Cun	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGT-GT-G	AAGCTAGCAA	ACAGACCTCC	TAATACCAAA
003Boy	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGT-GT-G	AAGCT-GCAA	A-AGACCTCC	-AATACCAAA
019Boy	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGT-GT-G	AAGCT-GCAA	A-AGACCTCC	-AATACCAAA
125Cun	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGT-GT-G	AAGCT-GCAA	A-AGACCTCC	-AATACCAAA
030Boy	AGCTAATGCA	CAAAGAGGAG	CAGGT-GT-G	AAGCT-GCAA	A-AGACCTCC	-AATACCAAA

DQ355130	AGCTAATGCA	CAAAGAGGAG	CAGGT-GT-G	AAGCT-GCAA	A-AGACCTCC	-AATACCAAA
076Ant	AGCTAATGCA	CAAAGAGGAG	CAGGT-GT-G	AAGCT-GCAA	A-AGACCTCC	-AATACCAAA
056Ant	AGCTAATGCA	CAAAGAGGAG	CAGGT-GT-G	AAGCT-GCAA	A-AGACCTCC	-AATACCAAA
101Cun	AGCTAATGCA	CAAAGAGGAG	CAGGT-GT-G	AAGCT-GCAA	A-AGACCTCC	-AATACCAAA
114Cun	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGT-GT-G	AAGCT-GCAA	A-AGACCTCC	-AATACCAAA
116BCun	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGT-GT-G	AAGCT-GCAA	A-AGACCTCC	-AATACCAAA
031Boy	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGT-GT-G	AAGCT-GCAA	A-AGACCTCC	-AATACCAAA
181Cun	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGT-GT-G	AAGCT-GCAA	A-AGACCTCC	-AATACCAAA
074Ant	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGT-GT-G	AAGCT-GCAA	A-AGACCT-C	CAATACCAAA
121Cun	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGT-GT-G	AAGCT-GCAA	A-AGACCT-C	CAATACCAAA
053Ant	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGT-GT-G	AAGCT-GCAA	A-AGACCT-C	CAATACCAAG
105Cun	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGT-GT-G	AAGCT-GCAA	A-AGACCTAC	CAATACCAAG
176Cun	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGT-GT-G	AAGCT-GCAA	A-AGACCT-C	CAATACCAAG
126Cun	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGT-GT-G	AAGCT-GCAA	A-AGACCT-C	CAATACCAAG
129Cun	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGT-GT-G	AAGCT-GCAA	A-AGACCT-C	CAATACCAAG
190Cun	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGT-GT-G	AAGCT-GCAA	A-AGACCT-C	CAATACCAAA
AY387547	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGT-GT-G	AAGCT-GCAA	A-AGACCT-C	CAATACCAAA
078Ant	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGT-GT-G	AAGCT-GCAA	A-AGACCT-C	CAATACCAAA
028Boy	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGT-GT-G	AAGCT-GCAA	A-AGACCT-C	CAATACCAAA
034Boy	AGCTAATACA	CAAAGAGGAG	CAGGTAGTAG	AAGCTAGCAA	A-AGACCT-C	CAATACCAAA
AB213578Ro	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	185	195	205	215	225	235
023Boy	AT-CAAAC--	TAATTA--GA	GT-TAACAAA	AA--GATT-A	GATATATATG	AAGAT--TTC
051Ant	AT-CAAAC--	TAATT---GA	GT-TAACAAA	AA--GATT--	GAT---TTTG	AAGAT--TTC
024Boy	AT-CAAAC--	TAATT---GA	GT-TAACAAA	AA--GATT--	GAT---TTTG	AAGAT--TTC
075Ant	AT-CAAAC--	TAATT---GA	GT-TAACAAA	AA--GATT--	GAT---TTTG	AAGAT--TTC
084Ant	AT-CAAAC--	TAATT---GA	GT-TAACAAA	AA--GAT--T	GATTT-T--G	AAGAT--TTC
054Ant	AT-CAAAC--	TAATATAGA	GTATAACAAA	AA--GATA-T	GATAT-TTAG	AAGATA-TTC
021Boy	AT-CAAAC--	TAATT---GA	GT-TAACAAA	AA--GAT--T	GATTT-T--G	AAGAT--TTC
070Ant	AT-CAAAC--	TAATT---GA	GT-TAACAAA	AA--GAT--T	GATTT-T--G	AAGAT--TTC
AG-3UNAL	AT-CAAAC--	TAATT---GA	GT-TAACAAA	AA--GATT--	GAT---TTTG	AAGAT--TTC
026Boy	AT-CAAAC--	TAATA--TGA	GTTTAACAAA	AA--GATATA	GATTT-TATG	AAGAT--TTC
069Ant	AT-CAAAC--	TAAT---TGA	GTT-AACAAA	AA--GAT--T	GATTT---TG	AAGAT--TTC
055Ant	AT-CAAAC--	TAAT---TGA	GTT-AACAAA	AA--GAT--T	GATTT---TG	AAGAT--TTC
037Boy	AT-CAAAC--	TAAT---TGA	GTT-AACAAA	AA--GAT--T	GATTT---TG	AAGAT--TTC
199Cun	AT-CAAAC--	TAAT---TGA	GTT-AACAAA	AA--GAT--T	GATTT---TG	AAGAT--TTC
AF354107	AT-CAAAC--	TAATT---GA	GT-TAACAAA	AA--GATT--	GATTT---TG	AAGAT--TTC
004Boy	AT-CAAAC--	TAAT---TGA	GT-TAACAAA	AA--GATT--	GAT-T-TTGA	AGATT---TC
198Cun	AT-CAAACAT	CAAT---TGA	GT-TAACAAA	AA--GATT--	GATAT-TTGA	ACGATGTGTC
003Boy	AT-CAAAC--	TAAT---TGA	GT-TAACAAA	AA--GATT--	GAT-T-TTGA	AGATT---TC
019Boy	AT-CAAAC--	TAAT---TGA	GT-TAACAAA	AA--GATT--	GAT-T-TTGA	AGATT---TC
125Cun	AT-CAAAC--	TAAT---TGA	GT-TAACAAA	AA--GATT--	GAT-T-TTGA	AGATT---TC
030Boy	GT-GAAAC--	CAGTG---TGA	AT-TAACAA-A	AA--GATT--	TAC-T-TTGA	ACGAAT--TC
DQ355130	GT-GAAAC--	CAGT---TGA	AT-TAACAA-A	AA--GATT--	TAC-T-TTGA	A-GAAT--TC
076Ant	GT-GAAAC--	CAGT---GGA	AT-TAACAAA	AA--GATT--	TAC-T-TTGA	A-GAAT--TC
056Ant	GTAGAAAC--	CAGT---TGA	AT-TAACAA-A	AA--GATT--	TAC-T-TTGA	AGAATA--TC
101Cun	GT-GAAAC--	CAGT---TGA	AT-TAACAA-A	AA--GATT--	TAC-T-TTGA	AGAAT---TC
114Cun	AT-CAAAC--	TAAT---TGA	GT-TAACAAA	AA--GATT--	GAT-T-TTGA	A-GATT--TC
116BCun	AT-CAAAC--	TAAT---TGA	GT-TAACAAA	AA--GATT--	GAT-T-TTGA	A-GATT--TC
031Boy	AT-CAAAC--	TAAT---TGA	GT-TAACAAA	AA--GATT--	GAT-T-TTGA	A-GATT--TC
181Cun	AT-CAAAC--	TAAT---TGA	GT-TAACAAA	AA--GATT--	GAT-T-TTGA	A-GATT--TC

074Ant	A-TCAAAC--	TAATT---GA	GTTA-ACAAA	AA--GATT--	GATTT---TG	AAGATT--TC
121Cun	A-TCAAAC--	TAATT---GA	GTTA-ACAAA	AA--GATT--	GATTT---TG	AAGATT--TC
053Ant	A-TCAAAC--	TAATT---GA	GTTA-ACAAA	AA--GATT--	GATTT---TG	AAGATT--TC
105Cun	AATCAAAC--	TAATT---GA	GTTACACAAG	AAACGATTC-	GATTT--ATG	AAGATTA-TC
176Cun	A-TCAAAC--	TAATT---GA	GTTA-ACAAA	AA--GATT--	GATTT---TG	AAGATT--TC
126Cun	A-TCAAAC--	TAATT---GA	GTTA-ACAAA	AA--GATT--	GATTT---TG	AAGATT--TC
129Cun	A-TCAAAC--	TAATT---GA	GTTA-ACAAA	AA--GATT--	GATTT---TG	AAGATT--TC
190Cun	A-TCAAAC--	TAATT---GA	GTTA-ACAAA	AA--GATT--	GATTT---TG	AAGATT--TC
AY387547	AT-CAAAC--	TAATT---GA	GT-TAACAAA	AA--GATT--	GATTT---TG	AAGATT--TC
078Ant	AT-CAAAC--	TAATT---GA	GT-TAACAAA	AA--GATT--	GATTT---TG	AAGATT--TC
028Boy	AT-CAAAC--	TAATT---GA	GT-TAACAAA	AA--GATT--	GATTT---TG	AAGATT--TC
034Boy	ATACAAAC--	TAATT---GA	GT-TAACAAA	AA--GATT--	GATTT---TG	AAGATT--TC
AB213578Ro	-----	-----	--TTAACAAA	AA-TCATTG-	TATTT---GA	GAGA---TTC

	245	255	265	275	285	295
023Boy	ATAGATAACT	ACAAACATGT	GACATAGCTA	-CCAATGGAA	TAACCAAAGG	AAGCGCAA
051Ant	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	-CCAA-GGAA	TACC---AAG	GAGCGCAA
024Boy	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	-CCAA-GGAA	TACC---AAG	GAGCGCAA
075Ant	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	-CCAA-GGAA	TACC---AAG	GAGCGCAA
084Ant	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	-CCAA-GGAA	TACC---AAG	GAGCGCAA
054Ant	ATAGATAACT	ACAAACA---	GGCAT-GCTA	-CCAA-GGAA	TACC---AAG	GAGCGCAA
021Boy	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	-CCAA-GGAA	TACC---AAG	GAGCGCAA
070Ant	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	-CCAA-GGAA	TACC---AAG	GAGCGCAA
AG-3UNAL	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	-CCAA-GGAA	TACC---AAG	GAGCGCAA
026Boy	ATAGATAACT	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	-CCAAGGGAA	TACC--AAGG	GAGCGCAA
069Ant	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	-CCAAGG-AA	TACC--AAGG	GAGCGCAA
055Ant	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	-CCAAGG-AA	TACC--AAGG	GAGCGCAA
037Boy	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	-CCAAGG-AA	TACC--AAGG	-AGCGCAA
199Cun	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	-CCAAGG-AA	TACC--AAGG	-AGCGCAA
AF354107	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	-CCAA-GGAA	TACC---AAG	GAGCGCAA
004Boy	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	-CCAAGGGAA	TACC--AAGG	-AGCGCAA
198Cun	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GACT	ACCAAAGGAA	TACC--AAGG	-AGCGCAA
003Boy	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	--CCAAGGAA	TACC--AAGG	-AGCGCAA
019Boy	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	--CCAAGGAA	TACC--AAGG	-AGCGCAA
125Cun	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	--CCAAGGAA	TACC--AAGG	-AGCGCAA
030Boy	ATCGATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	--CCAAGGAA	TACC--AAGG	-AGCGCAA
DQ355130	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	--CCAAGGAA	TACC--AAGG	-AGCGCAA
076Ant	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	--CCAAGGAA	TACC--AAGG	-AGCGCAA
056Ant	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	--CCAAGGAA	TACC--AAGG	GAGCGCAA
101Cun	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	--CCAAGGAA	TACC--AAGG	-AGCGCAA
114Cun	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	--CCAAGGAA	TACC--AAGG	-AGCGCAA
116BCun	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	--CCAAGGAA	TACC--AAGG	-AGCGCAA
031Boy	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	--CCAAGGAA	TACC--AAGG	-AGCGCAA
181Cun	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	--CCAAGGAA	TACC--AAGG	-AGCGCAA
074Ant	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	--CCAAGGAA	TACC---AAG	GAGCGCAA
121Cun	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	--CCAAGGAA	TACC---AAG	GAGCGCAA
053Ant	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	--CCAAGGAA	TACC---AAG	GAGCGCAA
105Cun	ATAGATAACT	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	--CCAAGGAA	TACC---AAG	GAGCGCAA
176Cun	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	--CCAAGGAA	TACC---AAG	GAGCGCAA
126Cun	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	--CCAAGGAA	TACC---AAG	GAGCGCAA
129Cun	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	--CCAAGGAA	TACC---AAG	GAGCGCAA

190Cun	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	--CCAAGGAA	TACC---	AAG	GAGCGCAA
AY387547	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	--CCAAGGAA	TACC---	AAG	GAGCGCAA
078Ant	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	--CCAAGGAA	TACC---	AAG	GAGCGCAA
028Boy	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	--CCAAGGAA	TACC---	AAG	GAGCGCAA
034Boy	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	--CCAAGGAAA	TACC---	AAG	GAGCGCAA
AB213578Ro	AT-GATACT-	-CAAACA---	GGCAT-GCT-	--CTTCGGAA	TACC---	AAA	GAGCGCAA

Control de *R. solani* en semilla de papa criolla con *T. koningiopsis* (Th003) y *T. asperellum* (Th034)

Adriana Santos, Camilo Beltrán, Magda García,
Alba Marina Cotes, Laura Villamizar

Introducción

El cultivo de papa es de gran importancia socioeconómica en Colombia, sin embargo, el rendimiento promedio es de 17 Ton/ha, valor muy bajo en comparación con grandes productores como China, Rusia, India, Estados Unidos y Ucrania, que alcanzan rendimientos de 43,8 Ton/ha (Faostat, 2008). El bajo rendimiento en el país se debe en parte al escaso uso de semilla certificada y al bajo desarrollo tecnológico en el manejo del cultivo (Alvarado, 1998; Martínez *et al.*, 2003).

Tradicionalmente, el agricultor no le da importancia a la consecución de semilla de buena calidad para su cultivo, limitándose a dejar para la próxima siembra la papa de menor calidad o de menor precio en el mercado. Este hecho ha desatado pérdidas significativas en la producción y dispersión de problemas fitosanitarios en las zonas cultivadas (Alvarado, 1998).

La calidad de la semilla de papa es afectada por la presencia de fitopatógenos e insectos plaga. Entre los fitopatógenos más importantes en el cultivo de papa se destaca *R. solani*, hongo que afecta raíces, tallos y especialmente los tubérculos, causándoles deformaciones y grietas en la epidermis con pérdidas de rendimientos entre el 10 % y el 26 % (Guerrero, 1998; Díaz, 2002).

Hasta ahora, el agricultor ha tratado de controlar este problema fitosanitario con el uso de fungicidas químicos como Carboxin-Captan, Benomil y Carbendazim, con resultados totalmente insatisfactorios. Por tal razón, es necesario desarrollar nuevas alternativas que puedan integrarse en programas de manejo de la enfermedad. En este sentido, el control biológico con microorganismos antagonistas constituye una medida de control eficiente, con beneficios, en los costos de producción y en la reducción del impacto ambiental por uso de fungicidas químicos.

Considerando las ventajas que traería para el cultivo de papa la implementación de bioplaguicidas como alternativas de control de *R. solani* desde la fase de tratamiento de la semilla, CORPOICA desarrolló dos prototipos de bioplaguicida formulados como polvos para espolvoreo a base de *Trichoderma koningiopsis* y *T. asperellum* diseñados para este fin. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad biocontroladora de los dos productos en condiciones de almacenamiento de semilla y en condiciones *in planta*.

Metodología

Actividad biocontroladora en condiciones de almacenamiento de semilla

Los bioplaguicidas a base de *T. koningiopsis* (Th003) y *T. asperellum* (Th034) se aplicaron sobre tubérculos semilla con presencia de esclerocios de *R. solani* en la epidermis, los cuales se almacenaron durante un tiempo determinado para luego ser sembrados.

Se utilizó semilla de papa criolla (*Solanum phureja*) variedad yema de huevo, infestada con esclerocios de *R. solani* (8-10 esclerocios/papa). Para la aplicación de los bioplaguicidas las papas fueron pesadas y colocadas en una bolsa de polietileno, en la cual se adicionó la dosis recomendada de producto (5g de producto/Kg de papa). Posteriormente, las bolsas fueron agitadas vigorosamente hasta que los tubérculos quedaron completamente cubiertos por el producto.

Los tubérculos tratados con los bioplaguicidas se ubicaron individualmente en recipientes plásticos de 16 onzas, los que fueron tapados y se mantuvieron en condiciones de oscuridad durante 15 días, simulando las condiciones utilizadas por el agricultor.

Transcurrido dicho tiempo se evaluó la incidencia y se determinó el porcentaje de eficacia en la reducción de la enfermedad utilizando la fórmula empleada por Elad (2000) $[(a-b)/a] * 100$, donde (a) es la incidencia en el testigo patógeno y (b) es la incidencia en el tratamiento evaluado.

Se evaluó un testigo absoluto y los tratamientos correspondientes a los tubérculos semilla tratados con el bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* (Th003) y el bioplaguicida a base de *T. asperellum* (Th034).

El bioensayo se realizó bajo un diseño completamente al azar, con cinco repeticiones por tratamiento. Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza ANAVA, y los promedios fueron comparados con la prueba de Tukey (95 %), empleando el programa Statistix versión 7.0.

Actividad biocontroladora en condiciones *in planta*

Se utilizaron recipientes plásticos de 16 onzas de capacidad con 300 g de suelo, el cual fue inoculado con 16 discos de agar colonizados con el aislamiento de *R. solani* (Rh200), seleccionado previamente por su alta patogenicidad (Santos, 2009).

Los tubérculos de papa se trataron con los bioplaguicidas –como se describió anteriormente– y a continuación se sembraron individualmente en los recipientes plásticos. Transcurridos 30 días después de la siembra, se evaluó la incidencia del patógeno y el peso seco de la planta (parte aérea y radicular) (Beltrán, 2004). La eficacia de los productos se determinó utilizando la fórmula descrita.

Se evaluaron cuatro tratamientos: testigo absoluto, testigo patógeno y los tratamientos correspondientes a los tubérculos semilla tratados con el bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* (Th003) y el bioplaguicida a base de *T. asperellum* (Th034).

Este bioensayo se efectuó utilizando un diseño completamente al azar, con diez repeticiones por tratamiento. Los resultados fueron sometidos a un estudio de varianza ANAVA y los promedios fueron comparados con la prueba de Tukey (95 %), empleando el programa Statistix versión 7.0.

Resultados

Actividad biocontroladora de los bioplaguicidas en condiciones de almacenamiento de semilla

Los bioplaguicidas formulados como polvo para espolvoreo a base de *T. koningiopsis* (Th003) y *T. asperellum* (Th034) redujeron la incidencia de *R. solani* en un 80 % en comparación con la semilla de papa no tratada, en donde la incidencia de la enfermedad fue del 100 % (Figura 6). La eficacia obtenida para los dos productos evaluados cumplió con el límite de aceptación de calidad biológica establecido por el Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas Biotécnica (CORPOICA) para este tipo de productos, el cual corresponde a un valor ≥ 80 %.

En la evaluación cualitativa del estado de los tubérculos tratados con los bioplaguicidas a base de Th003 y Th034, se observó que algunos brotes resultaron afectados por *R. solani*. No obstante, en los tratamientos que incluían los hongos antagonistas se produjeron más brotes laterales o re-

brotres. También se observó que el desarrollo de la infección causada por el patógeno fue más lento y, en algunos casos, los brotes presentaron colonización superficial del micelio de *Rhizoctonia* pero no se evidenciaron lesiones sobre el tejido. Los brotes de todas las semillas de papa tratadas con los bioplaguicidas presentaron mayor vigor y grosor en términos de diámetro y longitud del brote y en el número de raíces en comparación con los brotes de la semilla sin tratar (Figura 7).

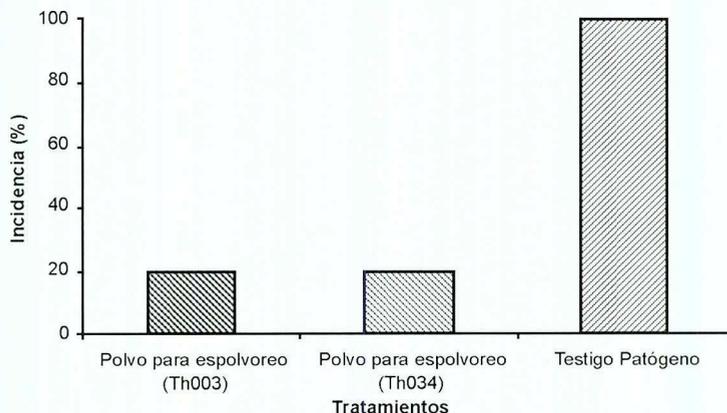


Figura 6. Efecto del tratamiento de semilla de papa con los bioplaguicidas a base de *T. koningiopsis* (Th003) y *T. asperellum* (Th034) sobre la incidencia (%) de *Rhizoctonia solani*.

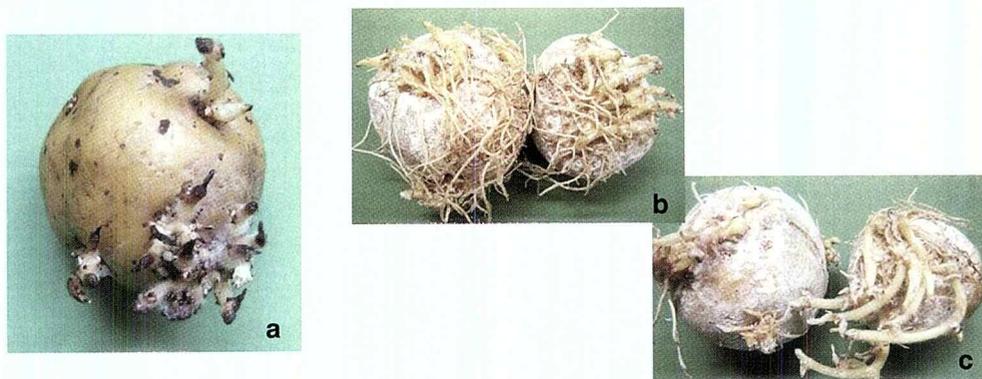


Figura 7. Efecto de las formulaciones a base de Th003 y Th034 sobre la brotación de semillas de papa después de 15 días de almacenamiento **a.** Semilla de papa no tratada (obsérvese la necrosis en los brotes y poco desarrollo de raíces). **b.** Semilla tratada con el bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* (Th003) **c.** Semilla tratada con el bioplaguicida a base de *T. asperellum* (Th034) (obsérvese los brotes raíces de mayor longitud).

Resultados similares fueron descritos por Paris *et al.* (2003), quienes evaluaron el efecto del mismo aislamiento de *T. koningiopsis* sobre tubérculos de papa pastusa con inóculo natural de *R. solani*. Estos autores observaron que los tubérculos tratados con el agente biocontrolador presentaron brotes sanos y raíces de mayor desarrollo y vigor en comparación con los tubérculos no tratados.

En este sentido, se puede afirmar que en el presente estudio los dos aislamientos de *Trichoderma* tuvieron un efecto promotor del crecimiento vegetal, ya que el peso de los brotes de la semilla de papa tratada fue significativamente mayor (1,43 y 1,03 g para *T. koningiopsis* y *T. asperellum*, respectivamente) en comparación con los brotes de la semilla del tratamiento testigo (0,17 g) (Figura 8).

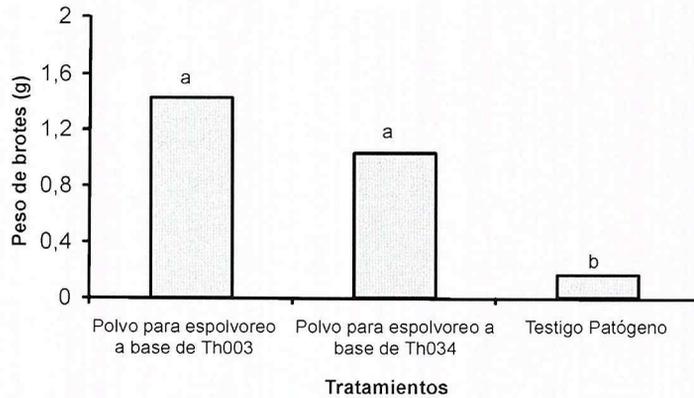


Figura 8. Efecto en el peso de brotes (g) de semilla de papa tratada y no tratada con los biofungicidas formulados como polvo para espolvoreo a base de *T. koningiopsis* (Th003) y *T. asperellum* (Th034). Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas, según prueba de Tukey (95 %).

La acción positiva que ejerció *Trichoderma* spp. se concentró en la estimulación de la velocidad de crecimiento y en la expresión de los brotes laterales. Verma *et al.* (2007) sugirieron que *Trichoderma* spp. puede producir hormonas o metabolitos que aumentan la transferencia de minerales desde la rizósfera hasta las raíces de las plantas, lo que trae como consecuencia un aumento en la velocidad de crecimiento y, por

tanto, un aumento en la biomasa de la planta. En el caso particular de Th003, Moreno *et al.* (2009) demostraron que este hongo tiene la capacidad de estimular el crecimiento del tomate (*Solanum lycopersicum*), lo cual se explicó parcialmente por la estimulación de genes de crecimiento en la planta.

En el presente estudio se evidenció la presencia de otros microorganismos contaminantes, potencialmente fitopatógenos (*Fusarium* sp. o *Erwinia* sp.) del tubérculo. Sin embargo, la aplicación de los bioplaguicidas disminuyó su acción. Lo anterior posiblemente se debe a la actividad de *Trichoderma* spp. y a la disminución de la humedad en la superficie de la semilla por efecto de la formulación utilizada, la cual presenta una baja capacidad de retención de agua.

Estas deducciones indican que la aplicación de los bioplaguicidas formulados como polvos para espolvoreo brindan a la semilla de papa protección contra el fitopatógeno *R. solani* durante las condiciones de almacenamiento de la misma, dado que retardan y disminuyen tanto los síntomas como los signos de la enfermedad.

Evaluación de la actividad biocontroladora de los bioplaguicidas en condiciones *in planta*

La eficacia obtenida con el polvo para espolvoreo a base de *T. koningiopsis* (Th003) contra *R. solani* fue del 86 %, y con el producto a base de *T. asperellum* (Th034) del 71 % en comparación con el testigo patógeno, en el cual la incidencia de la enfermedad fue del 100 %.

En el presente estudio y en el trabajo de Beltrán (2004) se evidenció micoparasitismo de los aislamientos Th003 y Th034 de *Trichoderma* sp. sobre *R. solani*, efecto que fue descrito por Wilson *et al.* (2008). Así mismo, en la superficie del tubérculo se podrían sugerir mecanismos de competencia por espacio y por nutrientes, y desactivación de las enzimas de los fitopatógenos (Elad *et al.*, 2000; Harman *et al.*, 2004).

De igual manera, se comprobó la capacidad de los dos aislamientos de *Trichoderma* sp. para promover el crecimiento vegetal (Figura 9). El peso seco de las plantas de papa provenientes de la semilla tratada con el bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* fue de 1,20 g y con el bioplaguicida a base de *T. asperellum* fue de 1,10 g, valores significativamente superiores ($P < 0,05$) al presentado por el testigo absoluto (0,66 g) y por el testigo patógeno (0,51 g). Se evidenció que la presencia de *Trichoderma* sp. en el sustrato de crecimiento incrementó el desarrollo de las plantas, especialmente del sistema radical y foliar (Figura 10).

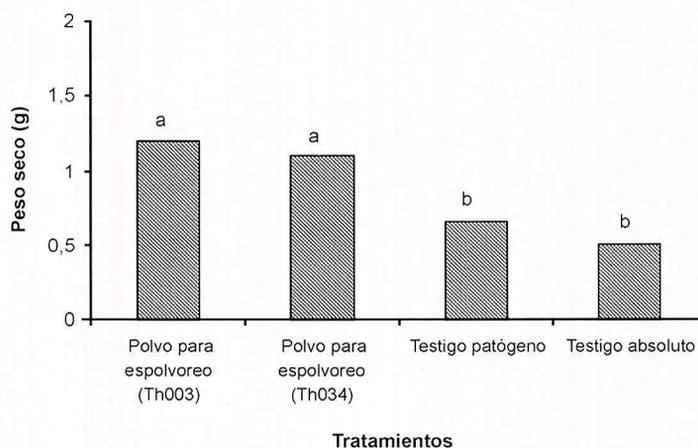


Figura 9. Efecto del tratamiento de semilla con formulaciones a base de *T. koningiopsis* (Th003) y *T. asperellum* (Th034) sobre el peso seco de las plantas evaluadas a los 30 días después de la siembra. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey (95 %).

Es importante resaltar que las plantas originadas de semilla tratada con los bioplaguicidas y sembradas en presencia del patógeno aunque presentaron lesiones en las raíces no mostraron necrosis total en el órgano afectado, a diferencia de las plantas del testigo patógeno, evidenciando una reducción de la severidad de la enfermedad causada por *R. solani*.

Vinale *et al.* (2008) establecieron que algunos aislamientos de *Trichoderma* spp. tienen la capacidad de producir compuestos que actúan como promotores y reguladores del crecimiento, entre los que se encuentran ácidos

orgánicos como el ácido glucónico, el ácido cítrico o el ácido fumárico, los cuales disminuyen el pH del suelo permitiendo la solubilización de fosfatos, minerales, micronutrientes y cationes como el hierro, el manganeso y el magnesio, útiles para el metabolismo vegetal. Sin embargo, estos fenómenos no han sido dilucidados en la interacción de Th003 y Th034 con las plantas.



Figura 10. Efecto del tratamiento de tubérculos semilla con las formulaciones a base de Th003 y Th034 sobre el crecimiento de plantas de papa *S. phureja* **a.** Plantas tratadas con el bioplaguicida a base de *T. asperellum* (Th034). **b.** Plantas tratadas con el bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* (Th003). **c.** Testigo absoluto. **d.** Testigo patógeno.

Conclusión

La aplicación de los bioplaguicidas a las semillas de papa, que posteriormente se sembraron en suelo inoculado con *R. solani*, ejerció un efecto protector frente al ataque del fitopatógeno, sugiriendo que los bioproductos aplicados a la semilla no solo protegen el tubérculo durante el almacenamiento sino que tienen un efecto positivo en condiciones de cultivo.

Bibliografía

- Alvarado, L. F. (1998). Producción y manejo de la semilla de papa. En: Manejo Integrado del Cultivo de Papa. Comité de sanidad de la papa, departamento de Nariño. pp. 32-42.
- Beltrán, C. (2004). Selección de aislamientos de *Trichoderma spp.* con potencial biocontrolador de *Rhizoctonia solani* Kühn en papa bajo condiciones de casa de malla. Trabajo de pregrado. Biología. Universidad Nacional de Colombia. pp. 52-56.
- Díaz, A. (2002). Evaluación del fungicida Tiabendazol para el control de *Rhizoctonia solani* Kühn en papa (*Solanum tuberosum*). Trabajo de pregrado. Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. pp. 24-32.
- Elad, Y. (2000). *Trichoderma harzianum* T39 Preparation for biocontrol of plant diseases- control of *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Cladosporium fulvum*. Biocontrol Science and Technology. 10 (4): 499 – 507.
- FAOSTAT. (2008). Database online, www.faostat.fao.org. Fecha de consulta: 14 de enero de 2010
- Guerrero, O. (1998). Principales enfermedades de la papa causadas por hongos y bacterias transmitidas por semilla. En: Manejo sanitario del cultivo de papa. Comité de sanidad de la papa, departamento de Nariño. pp.10-35.
- Harman, G. E.; Howell, C. R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology 2: 43–56.
- Martínez, H.; Barrios, C.; Acevedo, X. (2003). Características y estructura de la cadena de la papa en Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Informe de Trabajo No. 3. <http://www.agrocadenas.gov.co>. Fecha de Consulta: 14 de enero de 2010.
- Moreno, C.A.; Castillo, F.; González, A.; Bernal, D.; Jaimes, Y.; Chaparro, M.; González, C.; Rodríguez, F.; Restrepo, S.; Cotes, A.M. (2009). Biological and molecular characterization of the response of tomato plants treated with *Trichoderma koningiopsis*. Physiological and Molecular Plant Pathology. 74: 111-120.
- Paris, A.; Beltrán, C.; Cotes, A.M. (2003). Informe Final. Proyecto: Selección de cepas de *Trichoderma spp.* con potencial biocontrolador de *Rhizoc-*



tonia solani en diferentes variedades de papa. Documento interno, CORPOICA.

Santos, A. (2009). Caracterización de un prototipo de bioplaguicida a base de *Trichoderma koningiopsis* (Th003) y el granulovirus de *Phthorimaea operculella* para la protección de semilla de papa en almacenamiento. Tesis de Pregrado. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. pp. 236.

Verma, M.; Brar, K.; Tyagi, R. D.; Surampalli, T. Y.; Valero, J. V. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*. 37: 1–20.

Vinale, F.; Sivasithamparam, K.; Ghisalbertic, E.; Marra, R.; Woo, L.; Lorito, M. (2008). *Trichoderma* plant pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 1–10.

Wilson, P. S.; Ketola, E. O.; Ahvenniemi, P. M.; Lehtonen, M. J.; Valkonen, J. (2008). Dynamics of soilborne *Rhizoctonia solani* in the presence of *Trichoderma harzianum*: effects on stem canker, black scurf and progeny tubers of potato. *Plant Pathology*. 57: 152–161.

Sensibilidad de aislamientos nativos del hongo *R. solani* a fungicidas

Erika Paola Grijalba, Camilo Beltrán, Alba Marina Cotes

Introducción

El control que generalmente se ha hecho contra el hongo fitopatógeno *R. solani* se fundamenta en prácticas culturales y en el manejo químico dado por los agricultores, en el cual se utilizan moléculas químicas pertenecientes al grupo de los benzimidazoles, organofosforados, carboxi-anilidas y antibióticos pseudo-oligosacáridos, pertenecientes a categorías toxicológicas III y II, es decir moderada y altamente tóxicos. Estos productos son aplicados a la semilla en almacenamiento o durante la siembra, la emergencia y la deshierba del cultivo de la papa (Ñústez, 2002); no obstante, su eficacia no siempre es satisfactoria, y depende de factores como la concentración y la sensibilidad del inóculo del hongo presente en el tubérculo o en el suelo.

Los plaguicidas comúnmente empleados en el cultivo de la papa contra *R. solani* representan riesgos para la salud humana si no se manejan adecuadamente, causando efectos agudos o crónicos, ya que muchos de estos son carcinogénicos y teratogénicos; además, pueden ocasionar problemas inmunológicos u hormonales (Liñán, 1997). Igualmente representan riesgos de contaminación ambiental, llegando a afectar ecosistemas completos, razón por la que es necesario hacer un uso racional de los mismos, en el que se eliminen sobredosis por usos ineficaces o sobreaplicaciones. Siguiendo este propósito, en el presente estudio se planteó evaluar la sensibilidad de los aislamientos de *R. solani*, Rh080, Rh176 y Rh200 con seis productos usados habitualmente por los agricultores para su control.

Materiales y Métodos

Fungicidas

Los productos evaluados fueron seleccionados a partir de un diagnóstico inicial realizado mediante encuestas a los agricultores en los municipios de Carmen de Carupa (Cundinamarca), Ventaquemada (Boyacá) y Santa Elena (Antioquia) (Tabla 5).

Tabla 5. Fungicidas comúnmente utilizados por los agricultores en el manejo convencional de *R. solani*

Fungicida	Ingrediente activo (i.a)	Concentración del i.a. en el producto comercial	Dosis recomendada (ppm)
Derosal	Carbendazim	500 g/l	150
Benlate	Benomil	50 %	300
Rizolex	Tolclofos metil	750 g/kg	22.500
Vitavax	Carboxin+Captan	40 %	1.050
Validacín	Validamicina	30 g/l	300
Mertect	Tiabendazol	500 g/l	1.125

Preparación del medio de cultivo

Se utilizó el medio Agar Papa Dextrosa Saboureaud (PDS) inoculado con los fungicidas a evaluar, ajustando la concentración de estos en 25, 50, 100, 200 y 400 ppm. Los fungicidas se suspendieron inicialmente en agua estéril preparando una suspensión concentrada a partir de la cual se llevaron a cabo las diluciones necesarias para obtener la concentración requerida.

Aislamientos de *R. solani*

Se evaluaron los aislamientos Rh080, Rh176 y Rh200 de *R. solani* del grupo de anastomosis AG3 obtenidos a partir de esclerocios sobre tubérculos de papa.

Prueba de sensibilidad

Como unidad experimental se tomó una caja de Petri con el medio PDS y se colocó en el centro un círculo de agar de 5 mm de diámetro proveniente de un cultivo puro de *R. solani* de diez días de edad. Como parámetro de evaluación se tomó la inhibición del crecimiento micelial en condiciones *in vitro*; para esto, las cajas se incubaron a una temperatura de 25 °C y se midió el diámetro con un calibrador después de 3, 6, 9, 12 y 15 días de incubación.

Diseño experimental y análisis de datos

El diseño experimental fue completamente al azar, con tres réplicas por tratamiento. Se incluyó un testigo que consistió en el medio de cultivo sin fungicida, en el que se colocó un círculo de agar con *R. solani*.

El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de cada aislamiento se calculó mediante la siguiente fórmula, empleando los datos leídos el día 15:

$$\text{Inhibición del crecimiento (\%)} = \left(\frac{a - b}{a - c} \right) * 100$$

Donde a = diámetro de la colonia en el testigo; b = diámetro de la colonia en el tratamiento con fungicida; y c = diámetro inicial de la colonia.

Con los resultados obtenidos se realizó una gráfica para cada producto evaluado, en la que se comparó su efecto sobre las tres cepas de *R. solani* y efectuó un ANAVA y comparación de medias de Tukey, $\alpha = 0,05$ empleando el programa Statistics versión 4.0.

Resultados y discusión

Los fungicidas Carbendazim (Derosal) y Validacin (Validamicina) presentaron un menor impacto sobre el crecimiento micelial de los tres aislamientos en comparación con Tiabendazol (Mertec), Benomil (Benlate), Tolclofos me-

til (Rizolex) y Carboxin-Captan (Vitavax), que presentaron un efecto mayor, en el que la inhibición fue superior al 90 % en todos los casos.

Con los productos Benomil (Benlate) y Tolclofos metil (Rizolex) se presentó una inhibición total del crecimiento radial (100 %) con las cinco dosis evaluadas, lo que indica que los tres aislamientos son sensibles a estos fungicidas. El Benomil es transformado en la célula fúngica en metilbencimidazolil carbamato (MBC) y posteriormente a un mononucleótido activo (Liñán, 1997). El MBC actúa interfiriendo en la síntesis de la tubulina durante la mitosis; además, afecta el ADN y la transcripción de mensajes genéticos de ADN a ARN (Liñán, 1997). Este producto está indicado para el tratamiento de *R. solani* en el cultivo de la papa pero únicamente en el tratamiento de la semilla, con una dosis recomendada de 200 g/Tonelada de papa (Diccionario Agropecuario, 2000), lo que equivale a 0,1 ppm.

En el presente estudio, con las concentraciones evaluadas en las pruebas *in vitro* (superiores a la recomendada) se inhibió el crecimiento de los tres aislamientos de *R. solani* con 25 ppm. Los resultados obtenidos en el este trabajo son similares a los resultados obtenidos por Meyer *et al.* en el año 2006, quienes evaluaron el efecto del Benomil sobre el crecimiento diametral del aislamiento *R. solani* AG1-IA, encontrando que a partir de una dosis de 10 ppm la inhibición en el crecimiento diametral fue del 100 %.

El producto Tolclofos metil actúa al producir la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares y de la pared celular (Pesticides and environment, 2009). La dosis de Tolclofos metil recomendada para el manejo de *R. solani* en papa (5 a 7 Kg/Ha) se encuentra en un rango de 25.000 a 35.000 ppm, asperjando el producto en el momento de la siembra (Pro-Agro, 2009). En el presente estudio el crecimiento de los tres aislamientos de *R. solani* fue inhibido completamente con 25 ppm, lo que indica que los tres aislamientos de *R. solani* son sensibles a la acción de este fungicida. Kataria *et al.* (1991) evaluaron el efecto de Tolclofos metil sobre cinco aislamientos de *Rhizoctonia* mediante pruebas *in vitro* e *in vivo*, encontrando que en todos los casos este producto inhibió el crecimiento del hongo. Por su parte, Salazar (1999)

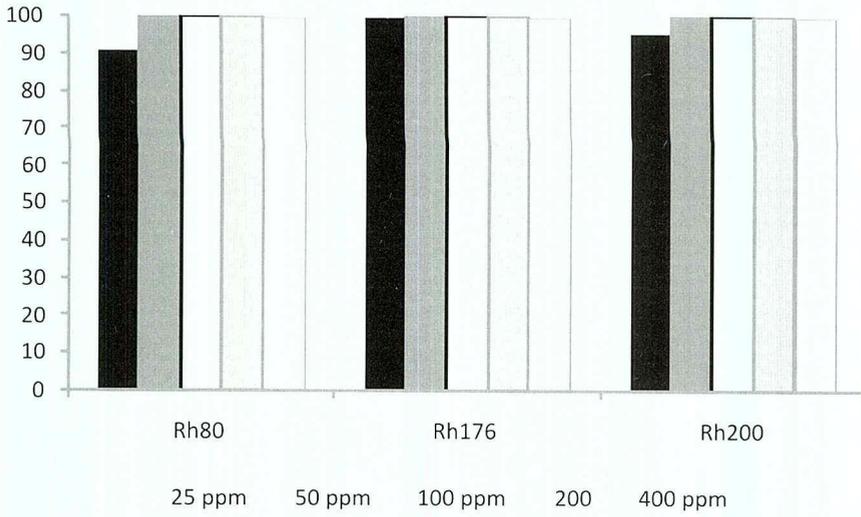
evaluó el efecto de diferentes fungicidas a la dosis recomendada sobre *R. solani* en el cultivo de arroz, notando que los fungicidas evaluados –dentro de los cuales se encontraba Benomil y Tolclofos metil– redujeron significativamente la incidencia y la severidad de la enfermedad, y que al aplicar estos agroquímicos se obtuvo el mayor rendimiento en el cultivo.

El fungicida Tiabendazol (Mertec) (Figura 11A) pertenece al grupo de los bencimidazoles y actúa inhibiendo la síntesis de la tubulina en la mitosis (Liñán, 1997). Este producto no está indicado para el control de *R. solani* en el cultivo de la papa sino únicamente en el cultivo del arroz a una dosis recomendada de 4.000 ppm, lo que equivale a 4 gramos por litro (Vademécum Florícola, 2002); sin embargo, los agricultores también lo utilizan para el control de *R. solani* en papa, razón por la que se evaluó en el presente estudio.

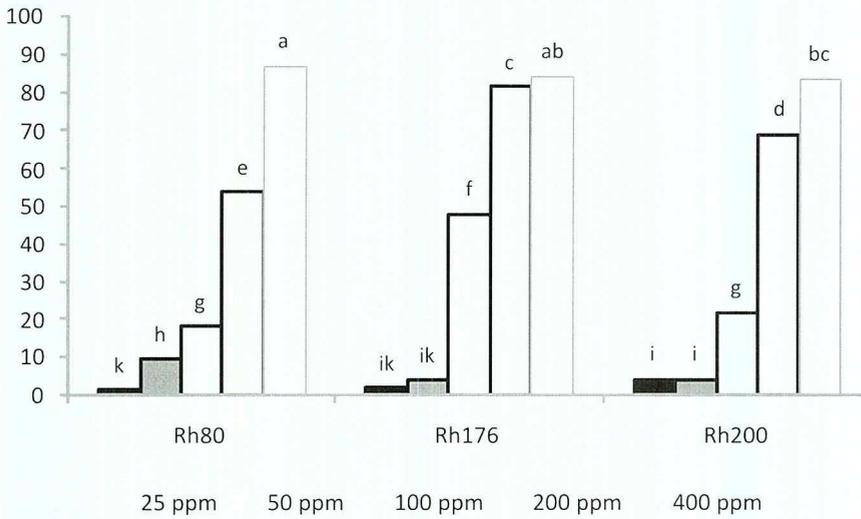
El porcentaje de inhibición en el crecimiento diametral para los tres aislamientos (Rh080, Rh176 y Rh200) con la dosis de 25 ppm de Tiabendazol se encontró entre el 90 % al 100 %, resultados que no fueron significativamente diferentes a los encontrados con las demás dosis evaluadas, en las que la inhibición en el crecimiento diametral fue del 100 % (lo que indica que las tres cepas son sensibles a la acción de este fungicida bajo condiciones *in vitro*). Resultados similares fueron obtenidos por Meyer *et al.* (2006), quienes encontraron una inhibición en el crecimiento de *R. solani* AG1-I del 100 % cuando se empleó una dosis entre 10 ppm y 100 ppm de este fungicida.

Aunque la dosis recomendada en el cultivo del arroz es diez veces mayor a la máxima dosis evaluada en este estudio, y con esta última la inhibición en el crecimiento diametral fue del 100 %, es necesario evaluar *in vivo* la dosis a emplear en el cultivo de la papa con el fin de evitar que surjan posibles problemas de pérdida de sensibilidad de *R. solani* a este fungicida, más si se tiene en cuenta que en el 2008 la FRAC (Comité de Acción de Resistencia a Fungicidas) lo catalogó como un producto con un alto riesgo para que diversas especies de hongos desarrollen resistencia, pues se conocen diferentes puntos del gen de la β -tubulina en los que se han producido mutaciones, impidiendo así la acción de los bencimidazoles (FRAC, 2008).

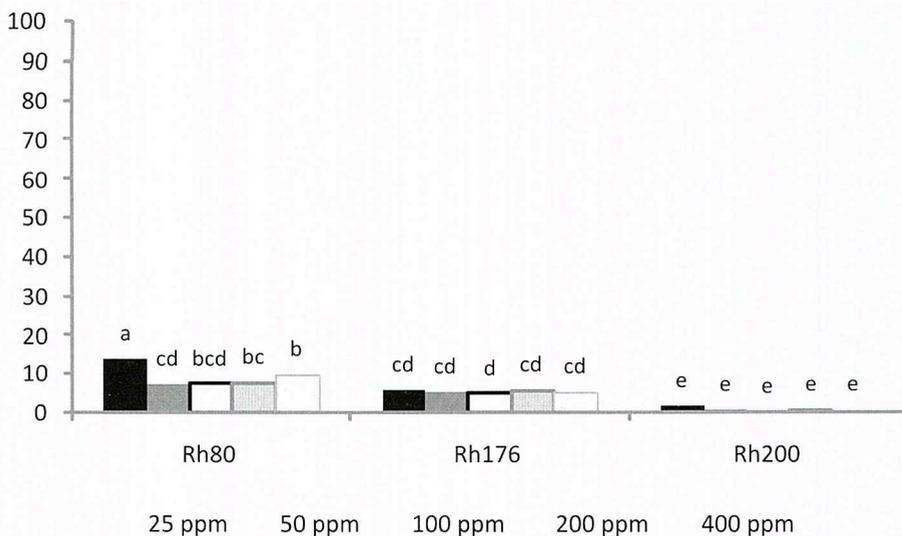
A)



B)



C)



D)

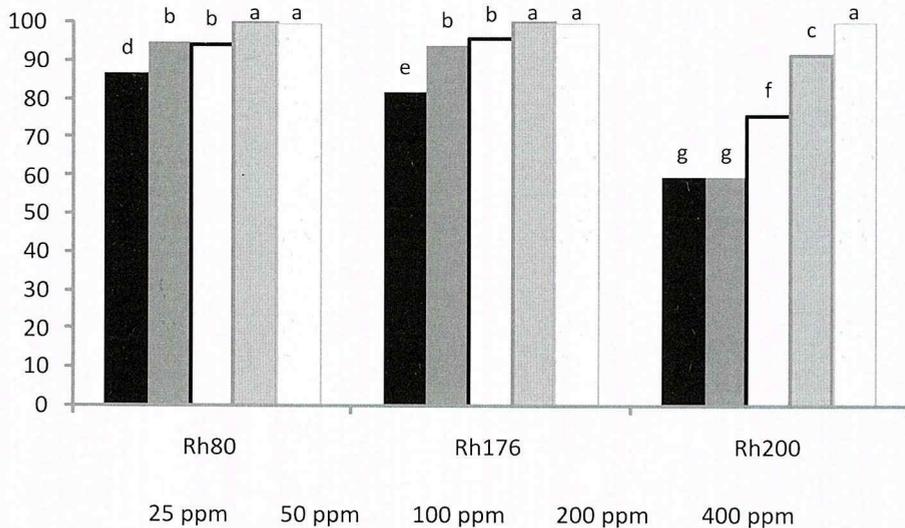


Figura 11. Sensibilidad de los aislamientos Rh80, Rh176 y Rh200 a agroquímicos. A) Tiabendazol; B) Validacin; C) Carbenidazim; D) Carboxin-Captan. Las columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey, $\alpha = 0,05$.



Validamicina (Validacin) es un antibiótico no sistémico que presenta actividad fungicida. Consiste en una mezcla de seis estructuras diferentes, designadas de la A a la F, siendo Validamicina A el componente más importante y eficaz (Liñán, 1997). Este producto impide la descomposición de la trehalosa reduciendo la producción de glucosa, vital en el proceso de respiración y generación de energía en las células del patógeno (Fede-arroz, 2007). El antibiótico se recomienda para el control de *R. solani* en arroz y papa (Vademécum Florícola, 2002). Cuando se evaluó en este estudio una concentración de 25 ppm y 50 ppm, la inhibición en el crecimiento diametral fue inferior al 10 % para las tres cepas; con la concentración de 100 ppm y 200 ppm la cepa Rh176 fue significativamente más sensible, en comparación con Rh080 y Rh200. Con la máxima dosis evaluada (400 ppm) las tres cepas presentaron un rango de inhibición del crecimiento diametral de entre el 84 % y el 88 %, siendo el aislamiento Rh80 particularmente menos sensible en comparación con la cepa Rh200 (Tukey, $\alpha = 0,05$).

Los resultados obtenidos permitieron evidenciar que el efecto de la Validamicina sobre el crecimiento diametral de los tres aislamientos depende de la concentración evaluada; así mismo, teniendo en cuenta que la dosis recomendada para el producto en papa es de 300 ppm –lo que corresponde al rango evaluado entre 200 ppm y 400 ppm– se puede observar que el aislamiento Rh80 presenta menor sensibilidad al producto evaluado.

El fungicida Carbendazim (Derosal) pertenece al grupo de los bencimidazoles e interfiere con la biosíntesis de ADN durante la mitosis y la transcripción de mensajes genéticos de ADN a ARN. Impide el desarrollo de las hifas, la formación de apresorios y el crecimiento del micelio. Permite la germinación de las esporas, aunque detiene el desarrollo del tubo germinativo provocando irregularidades en la división celular, dando lugar a células anormales que provocan la muerte del hongo (Liñán, 1997). Sin embargo, este fungicida está indicado para el control de *R. solani* en el macollamiento del cultivo de arroz, pero no en el cultivo de la papa (Diccionario Agropecuario, 2000). En este estudio la inhibición en el crecimiento diametral para las tres cepas

con las cinco concentraciones evaluadas fue inferior al 15 %. Igualmente, los resultados de inhibición obtenidos para el aislamiento Rh200 con las cinco concentraciones evaluadas fueron significativamente menores en comparación con los resultados obtenidos para los aislamientos Rh80 y Rh176, lo que sugiere que aunque las tres cepas presentan poca sensibilidad a Carbendazim, la cepa Rh200 es significativamente menos sensible a este fungicida. Los resultados obtenidos aquí difieren de los resultados reportados por Meyer *et al.* (2006), quienes observaron que con una dosis de 10 ppm se inhibió el 100 % del crecimiento diametral del hongo.

En cuanto al fungicida Carboxin-Captan (Vitavax), la molécula de Carboxin inhibe la enzima succinato-dehidrogenasa afectando la respiración celular, y la molécula de Captan tiene múltiples sitios de acción (FRAC, 2008). Con este producto se observó como tendencia que a medida que aumentó la dosis se incrementó el porcentaje de inhibición del crecimiento diametral. Para los aislamientos Rh80 y Rh176 la inhibición en el crecimiento diametral se encuentra entre el 81 % al 100 %, en donde se detectaron diferencias significativas entre las dosis evaluadas ($P < 0,05$). Por su parte, para el aislamiento Rh200 la inhibición en el crecimiento diametral se encuentra entre el 59 % al 100 %.

Con las concentraciones correspondientes a 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm y 200 ppm, el aislamiento Rh200 presentó valores de inhibición representativamente menores en comparación con los aislamientos Rh80 y Rh176. Estos resultados indican que la cepa Rh200 mostró menor sensibilidad a este fungicida en balance con los aislamientos Rh80 y Rh176. No obstante, con la concentración de 400 ppm la inhibición en el crecimiento diametral fue del 100 % para las tres cepas. Este fungicida está indicado para el control de *R. solani* en papa y arroz (Diccionario Agropecuario, 2000); en el primero, con una dosis recomendada de 2.000 ppm, casi cinco veces mayor a la dosis evaluada que presentó una inhibición en el crecimiento diametral del 100 %. De acuerdo con la FRAC (2008), los fungicidas que tienen este mecanismo de acción presentan un menor riesgo en el desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos.

Generalmente cuando un patógeno desarrolla una menor sensibilidad a un fungicida, automática y simultáneamente llega a ser menos sensible a otros fungicidas que tienen el mismo mecanismo de acción y pertenecen al mismo grupo químico (Brent y Hollomon, 2007). Con todo, a partir de los resultados obtenidos para el grupo de los benzimidazoles los aislamientos evaluados presentaron mayor sensibilidad a Benomil y a Tiabendazol en comparación con el Carbendazim, lo que se conoce como 'resistencia cruzada parcial' cuando se estudian poblaciones de patógenos que son sensibles solo a algunos productos de un grupo químico (Brent y Hollomon, 2007). La resistencia a los benzimidazoles se ha evidenciado en diferentes especies de hongos, existiendo diferentes sitios blanco de mutaciones, principalmente en el gen de la β -tubulina (FRAC, 2008), lo que posiblemente explica la sensibilidad de Rh80, Rh176 y Rh200 a Benomil y a Tiabendazol.

Debido al uso indiscriminado de los productos químicos en la agricultura, los microorganismos han desarrollado mecanismos de defensa ante diferentes moléculas que buscan inhibir procesos metabólicos o interferir con funciones vitales para controlarlos; ejemplo de esto es la inactivación de dichas moléculas por enzimas, alteraciones en la molécula receptora del microorganismo para reducir la afinidad por la molécula del producto químico, mecanismos de reparación del ADN que es afectado por acción de los fungicidas y bombas de flujo para expulsar de la célula sustancias tóxicas, entre otros (Kolaczowski y Goffeau, 1997), procesos que llevan al desarrollo de resistencia de poblaciones de patógenos.

Aun cuando el presente estudio no evaluó el desarrollo de resistencia, es necesario tener en cuenta que la baja sensibilidad de un patógeno a un producto bajo condiciones controladas es una señal de alarma de un posible desarrollo de resistencia (Brent y Hollomon, 2007), lo que en este caso se evidenció con el Carbendazim y con el Validacin a una dosis inferior a 400 ppm. Se hace entonces preciso utilizar solamente las dosis recomendadas por el fabricante, desarrollar estrategias de manejo integrado de plagas, rotar el empleo de los productos que han demostrado eficacia en el control del fitopatógeno para reducir el riesgo de desarrollo de mecanismos de

defensa ante los productos empleados para su control y evitar el uso de productos deteriorados.

Conclusiones

1. Las cepas de *R. solani* Rh80, Rh176 y Rh200, fueron sensibles a las cinco dosis evaluadas de Benlate, Tolclofos metil y Tiabendazol ya que presentaron una inhibición del crecimiento diametral entre el 90% al 100%.
2. Los aislamientos de *R. solani* presentaron una menor sensibilidad a las cinco dosis evaluadas del fungicida Carbendazim, evidenciada por una menor inhibición en el crecimiento diametral.
3. La sensibilidad de los aislamientos de *R. solani* frente al fungicida Validamicina estuvo relacionada directamente con la dosis evaluada, donde a mayor dosis mayor fue la inhibición del crecimiento del hongo.
4. Con los fungicidas Carbendazim y Carboxín-Captan la sensibilidad de la cepa Rh200 fue menor en comparación con los aislamientos Rh80 y Rh176.

Bibliografía

- Brent, K.; Hollomon, D. (2007). Fungicide resistance in crops pathogens: How can it be managed? Segunda edición. CropLife International, Fungicide Resistance Action Committee. p. 60.
- Diccionario Agropecuario. (2001 – 2002). Vademécum de productos agropecuarios. Año XV. Edición 13. Ediciones HC Ltda.
- Fedearroz - Federación nacional de productores de arroz. (2007). Lista de insumos fungicidas-Validacin. www.fedearroz.com.co
- FRAC (Fungicide Resistance Action Committee). (2008). Code List©*: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering). Versión consultada en diciembre de 2009. www.frac.info.com.
- Kataria, H. R.; Hugelshofer, U.; Gisi, U. (1991). Sensivity of *Rhizoctonia* species to different fungicides. *Plant Pathology* (40): 203 – 211.
- Kolaczowski, M.; Goffeau, A. (1997). Active efflux by multidrug transporters as one of the strategies to evade chemotherapy and novel practical implications of yeast pleiotropic drug resistance. *Pharmacology Therapeutics* (76): 219-242.

- 
- Liñán, C. (1997). Farmacología vegetal. Compendio de las sustancias activas, insectos y ácaros utilizados en la prevención y control de plagas, enfermedades y plantas no deseadas, así como en la regulación de la fisiología de los vegetales cultivados. España.
- Meyer, M.; Bueno, C.; Souza, N.; Yorinon, J. (2006). Effect of doses of fungicides and lant resistance activators on the control of *Rhizoctonia foliar* blight of soybean and on *Rhizoctonia solani* AG1-IA in vitro development. *Crop Protection* (25): 848-854.
- Ñústez, C. (2002). Efecto de diferentes niveles de inóculo de *Rhizoctonia solani* en semilla y dos sistemas de manejo, sobre el rendimiento y sanidad del tubérculo cosechado. Informe Técnico. Convenio 094 de 2000. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, y Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT. CORPOICA.
- Pesticides and environment. Blog: 2009. Versión consultada en diciembre de 2009. www.dropdata.org.
- PRO-AGRO. (2009). Versión consultada en junio de 2010. <http://www.pro-agro.com.mx/prods/valent/valent19.htm>.
- Salazar, J. (1999). Evaluación de fungicidas en el control de *Rhizoctonia solani* en arroz. Resumen 63. XI Congreso Nacional Agronómico/ IV Congreso Nacional de Fitopatología. p. 65.
- Vademécum Florícola. 2002. Edifarm. La Imprenta Editores. Colombia.

Eficacia de dos formulaciones a base de *T. koningiopsis* Th003 para el control de *R. solani* en campo

Camilo Beltrán, Alexander Smith, Alba Marina Cotes, Carlos Andrés Moreno

Introducción

La semilla es uno de los principales factores e insumos en el proceso de producción de papa, pero de su calidad y del manejo agronómico del cultivo dependen en gran parte los rendimientos (Corzo, 2000). En la primera fase del proceso de producción de semilla certificada de papa (*Solanum tuberosum* ssp. *andigena*, *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* y *Solanum phureja*), para siembra de material libre de virus se utilizan plántulas originadas por propagación *in vitro* (plantas madre) buscando producir minitubérculos o esquejes (semilla Súper élite), los cuales a su vez darán origen en condiciones *in vitro* a plántulas que se siembran en invernadero o casa de malla, produciendo hasta dos generaciones de tubérculos que corresponden a la categoría Élite. En la segunda fase estos tubérculos a su vez po-

drán generar en campo hasta dos descendencias de las categorías Básica y Registrada, y hasta una generación de semilla certificada (ICA, 2003).

La legislación fitosanitaria en Colombia exige una sanidad del 100 % de los minitubérculos (Súper élite) y tubérculos (Élite) producidos en la primera fase. Esto quiere decir que no se permite la presencia de ningún insecto plaga ni de fitopatógenos, incluyendo la presencia de *Rhizoctonia solani*. Sin embargo, en la segunda fase de producción de semilla sí se permite una tolerancia leve a moderada para la enfermedad rhizoctoniasis en los tubérculos (ICA, 2003). Se estima que tan solo el 1 % del total de la producción de papa en Colombia utiliza semilla certificada, haciendo parte importante de la problemática de la baja productividad de este cultivo.

R. solani es un hongo Basidiomycete que tiene una amplia distribución mundial (Tsrer, 2010) y en Colombia afecta de forma importante al cultivo de la papa desde las fases de producción de semilla Élite, convirtiéndose ésta en una etapa crítica para implementar medidas de control fitosanitario buscando prevenir la diseminación de la enfermedad en los suelos utilizados para producción de semilla y de papa dirigida al consumo.

El control de la rhizoctoniasis de la papa es difícil, debido a que el patógeno sobrevive en el suelo por varios años como esclerocios o como micelio en la materia orgánica; adicionalmente, la enfermedad puede dispersarse fácilmente por los esclerocios que están en la superficie de los tubérculos (Hyakumachi y Ui, 1982; Tsrer, 2010). El control de *R. solani* se ha realizado de forma tradicional con los fungicidas de síntesis química Carboxin, Captan y Benomil con el propósito de recubrir semilla, y con Carbendazim y Tiabendazol para aplicación al suelo o a la planta sin que se obtengan resultados satisfactorios. Por tanto, es necesario desarrollar nuevas estrategias de control e implementar dichas estrategias en programas de manejo integrado.

El control biológico con *Trichoderma* spp. es una de las alternativas sostenibles y quizá la más estudiada para el control de patógenos del suelo (Vinale *et al.*, 2008). En un estudio previo, la actividad antifúngica de los

aislamientos *Trichoderma koningiopsis* Th003 y *T. asperellum* Th034 fue evaluada contra *R. solani* en plántulas de papa (*Solanum tuberosum*) var. parda pastusa, mostrando alta actividad antagonista (eficacia en reducción de la incidencia de 45 % y 19 %, respectivamente) y también efectos de promoción de crecimiento vegetal (Beltrán *et al.*, 2005 y 2007). Con cada uno de estos dos antagonistas se desarrollaron dos prototipos de formulación: un polvo mojable (WP) y un granulado dispersable (WG), cuya eficacia fue evaluada contra *R. solani* en plántulas de papa (Beltrán *et al.*, 2010). En este último estudio las formulaciones WP de ambos antagonistas fueron más eficaces en la reducción de la enfermedad, pero la formulación WG a base de *T. asperellum* presentó una eficacia significativamente inferior.

Según los resultados de los estudios previos, *T. koningiopsis* Th003 ha mostrado la eficacia más alta y consistente en el control de *R. solani* en papa, lo cual es necesario validar en condiciones de campo. En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad biocontroladora de las formulaciones WG y WP a base de Th003 sobre *R. solani* en condiciones semicontroladas y en campo abierto.

Materiales y métodos

Uso de formulaciones a base de *T. koningiopsis* (Th003) para la producción de semilla Élite de papa libre de *R. solani*

Ubicación

El experimento se realizó en la vereda El Alizal, del municipio Carmen de Carupa-Cundinamarca, en la finca El Recuerdo (5° 19.901' N - 73° 51.939' O y 2.700 m.s.n.m.), propiedad de un productor de semilla certificada de papa.

Material vegetal y condiciones ambientales

Se utilizaron 3.380 plántulas de papa var. parda pastusa de tres semanas de edad propagadas *in vitro*. Estas plántulas se trasplantaron con una distancia de siembra de 15 cm en camas (20 m x 0,9 m) con sustrato suelo y escoria (3:2) en un invernadero tipo túnel (Figura 12) con temperatura y humedad

relativa promedio de 20 °C y 65 % respectivamente. En este experimento se reutilizó el sustrato empleado en el ciclo anterior de producción de semilla que presentó esclerocios de *R. solani* en la superficie. Una semana antes del trasplante el sustrato se desinfectó con Benomil (Benlate 0,5 g/l) y Clorpirifos (Lorsban 4EC 2 ml/l), aplicados por aspersion con una fumigadora de espalda. Durante el primer mes de establecimiento las plantas recibieron riego con manguera cada tercer día y luego se aplicó riego por goteo. Para la fertilización se utilizó Nitro K® 13-3-43 (2 kg/200 l) y fosfato monopotásico® 0-52-34 (500 g/200 l); después del aporque se aplicó 12-24-12 (4 kg/cama). Los fungicidas Dimetomorph (Forum 500® WP) y Propineb + Cimoxanil (Fitoraz 76® WP) se asperjaron en dos ocasiones para el control de goma; y para el control de áfidos se realizó una aplicación con Acefate (Orthene).

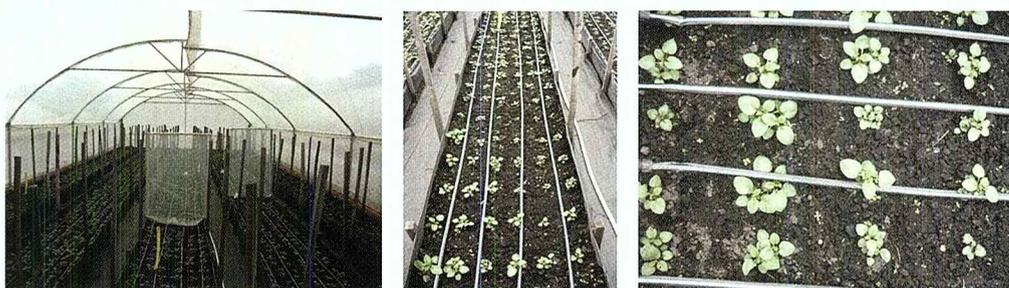


Figura 12. Producción de minitubérculos en invernadero

Tratamientos

Se evaluaron 3 tratamientos: (i) Producto WP a base de la cepa Th003 (1×10^6 conidios. ml^{-1}); (ii) Producto WG a base de Th003 (1×10^6 conidios. ml^{-1}); (iii) Fungicida Tolclofos metil (Rizolex 75 WP) (0,4 g/L); y se incluyó un testigo en el cual no se realizó ningún control de la enfermedad (iv). Los bioplaguicidas se aplicaron en drench, utilizando 15 ml/planta en los siguientes tiempos de crecimiento: al trasplante, 7, 21, 35, días después del trasplante (ddt) y luego del aporque. El producto químico (4 g/10 l) fue aplicado también en drench al trasplante, 7 y 21 (ddt).

Diseño experimental y análisis de datos

El ensayo se estableció bajo un diseño de bloques completos al azar (BCA) con cinco repeticiones. La unidad experimental consistió en un área

de 22,5 m². Al finalizar el ciclo de cultivo (7 meses después de siembra) se tomó una muestra de 100 minitubérculos, a los que se les evaluó la presencia de esclerocios y se calificó la cantidad de estos en la superficie de acuerdo con una escala predeterminada (Tabla 6). También se registró el rendimiento de minitubérculos en términos de peso (kg/m²). Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza (ANAVA) y los promedios se compararon con la prueba DMS ($P < 0,05$), utilizando el programa estadístico Statgraphics Plus 4.0.

Tabla 6. Escala de severidad de la enfermedad causada por *R. solani* en tubérculos de papa

Grado	Descripción de la enfermedad	Rango de esclerocios	Área superficial con esclerocios (%)
1	Trazas - ligeramente	1 – 10	0 - 5
2	Altamente ligero	11 - 20	5 - 10
3	Moderadamente alto	21 - 30	> 10
4	Severo	31 - 40	> 10

Uso de formulaciones a base de *T. koningiopsis* (Th003) para el control de *R. solani* en condiciones de campo

Ubicación

En predios de la finca El Laurel (5° 21.082' N 73° 32.005' O y 2.860 m.s.n.m.), vereda Montoya del municipio de Ventaquemada (Boyacá), se estableció una parcela experimental de 640 m².

Material vegetal y condiciones experimentales

Se utilizó semilla Básica de papa var. parda pastusa. La semilla fue tratada, según el caso, con producto biológico o fungicida químico y se almacenó en bodega semioscura para estimular la brotación.

Bajo un Diseño experimental de Bloques Completos al Azar (BCA) con cuatro repeticiones, se evaluaron cuatro tratamientos: (i) Testigo (manejo convencional de la enfermedad) –la semilla se recubrió con el fungicida Carboxin + Captan (Vitavax®) 4 g/kg de semilla–; (ii) Bioplaguicida Th003

WP –la semilla de papa se recubrió con el producto en seco (5 g/kg semilla) y se aplicó posteriormente como suspensión en agua (1×10^6 conidios.ml⁻¹) durante la siembra, luego a los 26, 40 y 61 días–; (iii) Bioplaguicida Th003 WG suspendido en agua (1×10^6 conidios.ml⁻¹) en las mismas épocas del tratamiento anterior –la semilla de este tratamiento fue cubierta por Th003 WP–; (iv) Tolclofos metil 75 WP (4 g/10 l).

La unidad experimental consistió en cuatro surcos de 10 m de longitud, en cada uno de los cuales se sembraron 30 tubérculos (la distancia entre surcos fue de 1,0 m). La forma de aplicación de los bioplaguicidas fue en drench, con volumen de aplicación de 30 ml por planta.

Antes de la siembra se incorporaron 160 kg de CaCO₃; y para la fertilización de fondo se utilizaron 30 kg de urea, 20 kg de sulfato de magnesio, 16 kg de sulfato de potasio, y después del aporque se aplicaron 50 kg de fertilizante 15-15-15 (NPK).

Variables evaluadas y análisis de datos

Se evaluó el número de esclerocios de *R. solani* formados en la superficie de los tubérculos cosechados, para lo cual se tomó una muestra de 200 tubérculos. Igualmente, se evaluó el rendimiento en la unidad experimental (35 m²). Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza y a la prueba LSD para comparación de medias ($P < 0,05$) utilizando el programa estadístico Statgraphics Plus 4.0.

Validación del uso de la formulación WP a base de *T. koningiopsis* (Th003) para el control de *R. solani* en condiciones de campo

Ubicación

Se realizó un experimento en cada una de las localidades en las que se llevaron a cabo los experimentos descritos anteriormente: en la finca El Recuerdo en Carmen de Carupa (abril 30 de 2010) y en la finca Buena vista (5° 21.082' N / 73° 32.005' O; 2.860 msnm) en Ventaquemada (mayo 13 de 2010).

Material vegetal y condiciones experimentales

Como semilla se utilizaron los minitubérculos (semilla Élite) cosechados en el experimento anterior, llevado a cabo bajo invernadero. Se seleccionó la semilla que presentara hasta 10 esclerocios en la superficie, de acuerdo con la norma del ICA. En almacenamiento las semillas fueron peletizadas con el bioplaguicida Th003 WP para los tratamientos respectivos, y todas las semillas se peletizaron con una formulación de Baculovirus (Baculovirus CORPOICA®) para prevenir el ataque de la polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*) (Figura 13).



Figura 13. Semilla de papa en almacenamiento. A) Semilla peletizada con Baculovirus; B) Semilla peletizada con el bioplaguicida WP *T. koningiopsis* Th003; C) Semilla en almacenamiento.

En ambos experimentos se evaluaron los siguientes tratamientos: (i) Testigo (manejo convencional donde las plantas no recibieron tratamiento para el control de la enfermedad); (ii) Aplicación del bioplaguicida Th003 WP (1×10^6 conidios. ml^{-1}); (iii) Aplicación de Th003 WP (1×10^6 conidios. ml^{-1}) y del fungicida Tolclofos metil, 75 WP en dosis de 0,4 g/l; (iv) Aplicación de Tolclofos metil, 75 WP (0,4 g/l). Los productos se aplicaron con una fumigadora de espalda sin boquilla, 30 ml aproximadamente por cada planta dirigidos a la base. En Carmen de Carupa se estableció un experimento adicional empleando semilla no certificada.

El tamaño de la unidad experimental fue de 4 surcos de 10 m de longitud (Carmen de Carupa) y de 3 surcos cada uno de 13 m (Ventaquemada). La distancia de siembra fue de 0,3 m entre plantas y 1,0 m entre surcos; se colocaron dos minitubérculos en cada sitio de siembra.

Para el control de goma (*Phytophthora infestans*) se aplicó Propineb (Trivia® WP) y Fosetil Al (Rhodax® 70 WP); y para el control de polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*) se aplicó Baculovirus (Baculovirus CORPOICA®).

cia solanivora) se aplicó Metamidofos (Amidor® 60 SL). La fertilización se hizo según las recomendaciones generadas a partir del análisis químico de suelo.

Variables evaluadas y análisis estadístico

Cada dos semanas se evaluó la presencia de pudrición en la base del tallo por *Rhizoctonia*; si bien durante el ciclo del cultivo no se detectó, sí se evidenció el encrespamiento de hojas apicales en algunas plantas.

Se midió el rendimiento de tubérculos cosechados y la incidencia de esclerocios en la superficie. Para estimar el rendimiento se muestreó una longitud de 1 m en el centro de cada unidad experimental, y para medir la incidencia y número de esclerocios se tomó una muestra de 100 tubérculos.

Con los valores de rendimiento y severidad de rhizoctonias se efectuó un ANAVA y comparación de medias con la prueba de Tukey HSD (α : 0,05) con el programa Statistix 9.

Resultados

Reducción de la formación de esclerocios en la producción de semilla Élite de papa

Durante el desarrollo de las plántulas de papa no se observó incidencia de damping-off o rhizoctonias; no obstante, al final del ciclo del cultivo fue evidente la formación de esclerocios en la superficie de los minitubérculos muestreados. Durante la cosecha se advirtió formación de esclerocios en todas las categorías de calidad. A continuación se presentan los resultados de la evaluación realizada en los tubérculos categoría cinco o riche, ya que esta categoría presentó la mayor formación de esclerocios.

En todos los tratamientos biológicos se presentó una reducción considerable de la formación de esclerocios en la superficie en comparación con el testigo, aunque las diferencias estadísticas solo se presentaron en el rango de 11 a 20 esclerocios/minitubérculo para la formulación WG y en el rango de 21 a 30 esclerocios para las dos formulaciones (Figura 14).

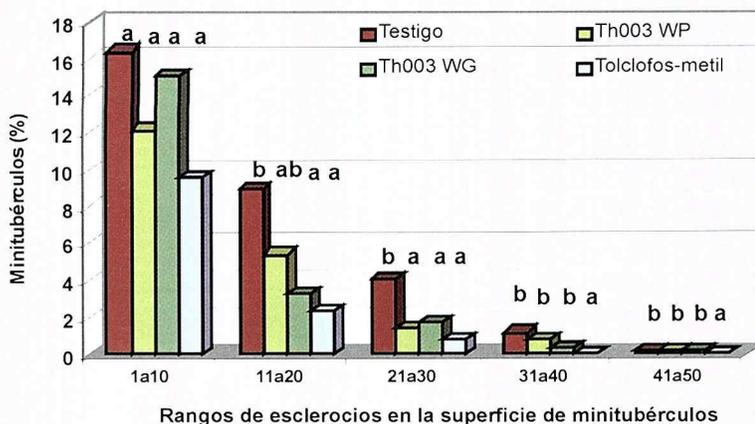


Figura 14. Efecto de la aplicación de dos formulaciones biológicas a base del hongo antagonista *T. koningiopsis* Th003 sobre la formación de esclerocios de *R. solani* en la superficie de minitubérculos semilla. (Parcela experimental de Carmen de Carupa, Cund. – invernadero tipo túnel).

En todos los tratamientos el rango de esclerocios de 1 a 10 fue el que se presentó con mayor frecuencia (9-16 % de los minitubérculos cosechados); en contraste, no fue usual encontrar minitubérculos con más de 31 esclerocios en la superficie. El fungicida Tolclofos metil fue el tratamiento que redujo en mayor proporción la formación de esclerocios en la superficie de los minitubérculos, con una reducción de la incidencia de esclerocios en 41 % y 73 % en los rangos de 1 a 10 y 11 a 20 respectivamente (Figura 14).

Los tratamientos biológicos no presentaron diferencias significativas entre sí en la reducción de la formación de esclerocios sobre los minitubérculos. El bioplaguicida Th003 WG redujo la incidencia de esclerocios en 8,6 % y 62,3 % en los rangos de 1 a 10 y 11 a 20 respectivamente, mientras que el bioplaguicida Th003 WP redujo la incidencia en 26 % y 40 % respectivamente.

Estimulación del rendimiento de semilla Élite de papa

El tratamiento testigo presentó un rendimiento de 2,7 kg/m²; el tratamiento Th003 WP 3,4 kg/m², (26% significativamente mayor que el testigo); el tratamiento Th003 WG 3,0 kg/m² (10 % más en relación con el testigo); y el tratamiento químico presentó un rendimiento de 2,8 kg/m² (6,0 % más que

el testigo) (Figura 15). Por su parte, el tratamiento Th003 WP tuvo un comportamiento consistente en las evaluaciones realizadas, siendo seleccionado como la mejor formulación para el control de *R. solani*. En la Figura 16 se muestran las categorías de calidad de los minitubérculos cosechados.

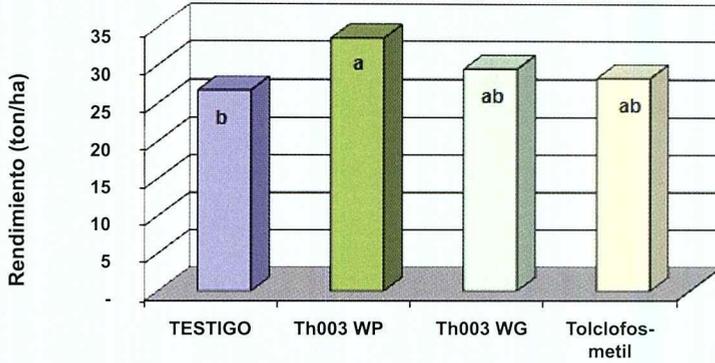


Figura 15. Efecto de tratamientos biológicos sobre el rendimiento de minitubérculos (semilla Élite) de papa var. parda pastusa. Th003: bioplaguicida a base de *Trichoderma koningiopsis*; WP: polvo; WG: granulado.



Figura 16. Tubérculos cosechados separados por categorías. Canasta (de izquierda a derecha) categoría segunda, tercera, cuarta y quinta o riche.

Reducción de la formación de esclerocios de papa en campo

Durante el desarrollo de las plantas de papa a partir de semilla básica no se observó daño por damping-off ocasionado por *R. solani*, sin embargo fue evidente la sintomatología de entorchamiento de hojas en un 20 % de las plantas y el desarrollo de esclerocios en la superficie de los tubérculos cosechados al final del ciclo de cultivo.

Los tratamientos biológico y químico redujeron significativamente la proporción de tubérculos cosechados con esclerocios entre 1 a 10 formados en su superficie (33 % a 49 %) en comparación con el testigo absoluto, mientras que la proporción de tubérculos con más de 11 esclerocios en la superficie fue similar en todos los tratamientos, pero ésta fue inferior a 1 % (Figura 17). Aunque los tratamientos para controlar al fitopatógeno no presentaron diferencias significativas entre sí, se observó que la aplicación del prototipo Th003 WG tuvo el mayor efecto de reducción de la infección de *R. solani* en los tubérculos. En los tratamientos biológicos y en el testigo absoluto no fue usual la formación de un número mayor de 20 esclerocios en la superficie de los tubérculos.

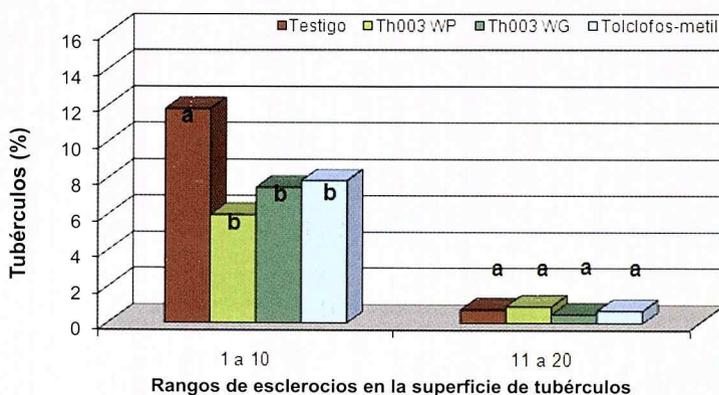


Figura 17. Efecto de formulaciones a base de *T. koningiopsis* Th003 aplicadas en campo sobre la formación de esclerocios del hongo *R. solani* en la superficie de tubérculos para consumo. (Parcela experimental de Ventaquemada, Boyacá).

Evaluación de los rendimientos de papa en campo

Ninguno de los tratamientos evaluados presentó un efecto significativo sobre el rendimiento (Figura 18); la cual –en términos de ton/ha– estuvo entre 16 y

18. Sin embargo, la aplicación de los prototipos biológicos aumentaron los rendimientos entre 0,5 y 11 % en comparación con el testigo.

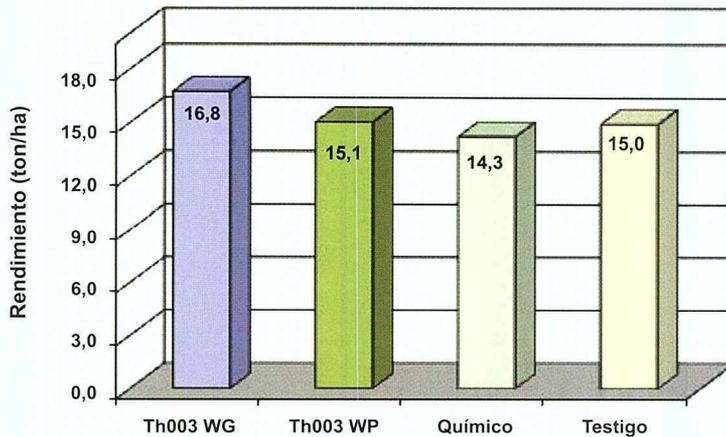


Figura 18. Efecto de formulaciones a base de *T. koningiopsis* Th003 aplicadas en campo sobre el rendimiento.

Validación del uso de la formulación WP a base de *T. koningiopsis* (Th003) para el control de *R. solani* en condiciones de campo

Durante el desarrollo del cultivo en las parcelas experimentales de ambas localidades no se detectaron síntomas de rhizoctoniasis, como pudrición en los tallos de las plantas o formación de tubérculos aéreos. Tan solo fue



Figura 19. Sintomatología de rhizoctoniasis en plantas. Entorchamiento de hojas apicales (izquierda); Hojas sanas (derecha)

evidente el entorchamiento de hojas apicales en algunas plantas (Figura 19), manifestación del desarrollo de esta enfermedad.

Reducción de la formación de esclerocios

En las dos zonas de estudio el mayor número de tubérculos con esclerocios en la superficie correspondió a aquellos con 1 a 10 esclerocios, máximo valor admisible en la legislación fitosanitaria para semilla certificada (ICA, 2003).

Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con bioplaguicida, químico o la mezcla de ambos tratamientos. En Carmen de Carupa la mayor eficacia en la reducción de tubérculos con esclerocios en el rango de 1 a 10 se obtuvo con las aplicaciones de Tolclofos metil, tanto en el experimento con semilla certificada como en el experimento en donde se utilizó semilla no certificada (Figura 20 A y B). En Ventaquemada la aplicación del bioplaguicida fue el que presentó mayor eficacia (Figura 20 C).

Rendimiento del cultivo

En la parcela experimental con semilla certificada de Carmen de Carupa se encontraron diferencias significativas entre la combinación del bioplaguicida y Tolclofos metil con respecto a los demás tratamientos, los cuales presentaron mayores rendimientos (Figura 21 A). En la parcela experimental con semilla convencional no hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos (Figura 21 B). Contrario a los resultados obtenidos en Carmen de Carupa, en Ventaquemada el mayor rendimiento se obtuvo cuando se combinó el tratamiento biológico con el químico (Figura 21 C).

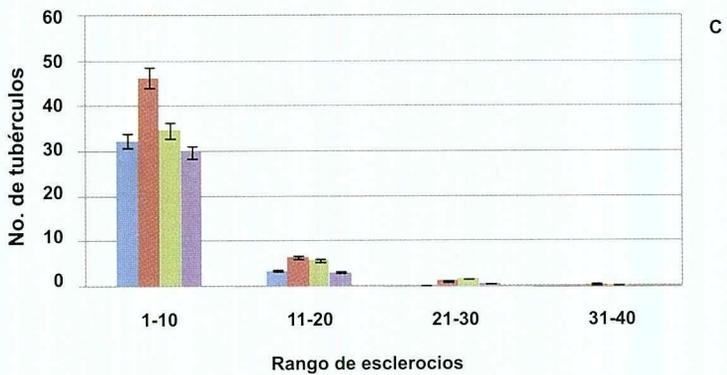
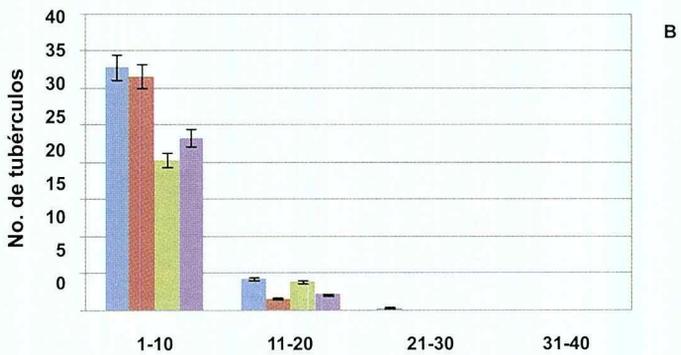
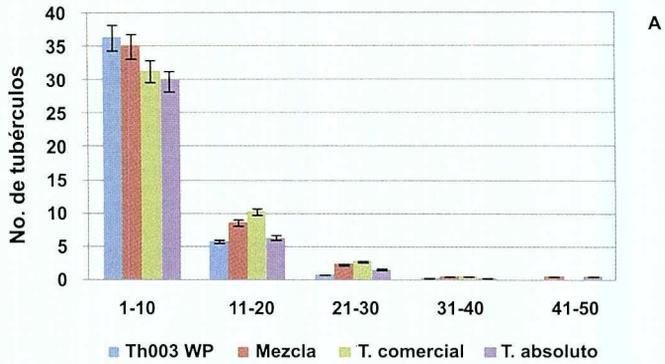


Figura 20. Efecto del control biológico y el control químico sobre la severidad de *R. solani* en los tubérculos de papa. (A) Semilla certificada y (B) Semilla convencional en Carmen de Carupa; (C) Semilla certificada en Ventaquemada.

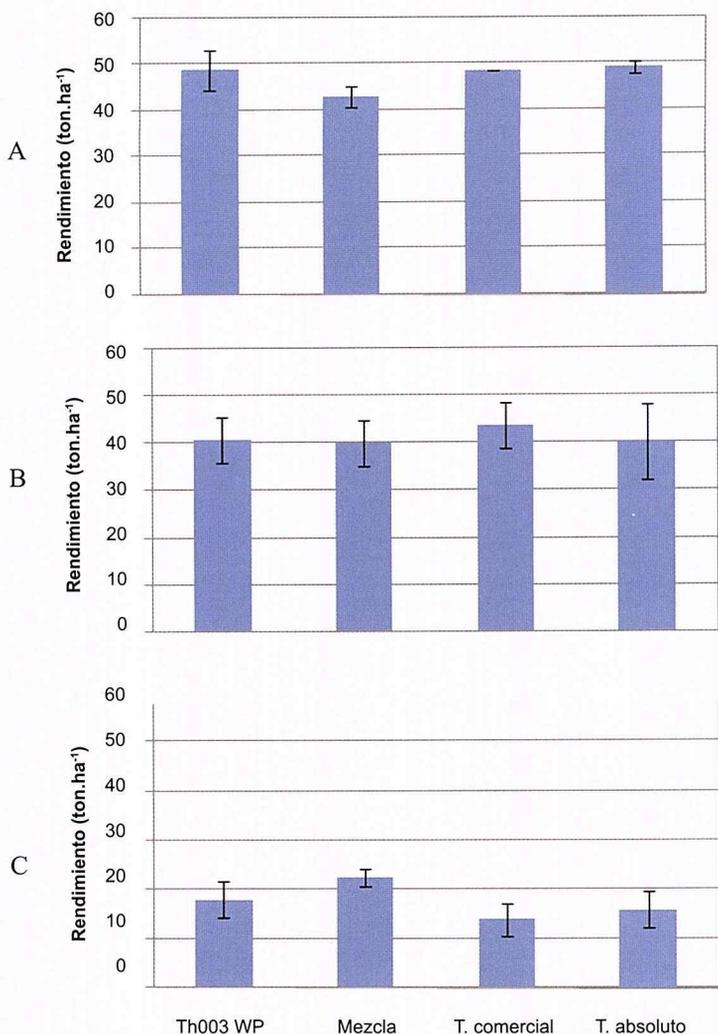


Figura 21. Efecto del control biológico y el control químico sobre el rendimiento de papa parda pas-tusa. (A) semilla certificada y (B) semilla no certificada en Carmen de Carupa; (C) semilla certificada en Ventaquemada. Las líneas sobre las columnas indican la desviación estándar entorno al promedio (n=4).

Discusión

La aplicación de los prototipos de bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* Th003 WP y WG al sustrato de siembra en el cultivo de papa disminuyó la formación de esclerocios de *R. solani* en la superficie de los tubérculos; no

obstante, ni en la fase de producción de semilla ni en la de producción de tubérculos se redujo completamente. Esto representa todavía un problema muy serio en la producción de semilla, ya que se corre alto riesgo de dispersar la enfermedad a nuevas áreas, quedando demostrada una vez más la dificultad de controlar este fitopatógeno de suelo; pero se ofrece una nueva alternativa con niveles de control significativos, que no representa riesgos para el ambiente y que puede integrarse con otras medidas de control para el manejo de la enfermedad.

Los rendimientos obtenidos en campo coinciden con el nivel de rendimientos obtenidos a nivel nacional (18 ton/ha) debido a la incidencia de una gran cantidad de problemas fitosanitarios adicional a *R. solani*, tal como pulguilla (*Epirix* sp.) en la fase temprana de desarrollo de la planta; dos ciclos de gota muy fuerte causada por épocas de lluvia constante (tercer y quinto mes de desarrollo), con 43 % de incidencia; y focos de *Rosellinia* sp., que afectó el desarrollo de las plantas desde el tercer mes del cultivo causando pudrición en el cuello del tallo de algunas ramas (25 % de incidencia) y presente hasta la cosecha, donde se observaron tubérculos con signos de la enfermedad mortaja blanca, caracterizada por el crecimiento de micelio blanco, causando una pérdida adicional aproximada del 5 % de la producción.

El control biológico de *R. solani* presenta potencial para la implementación, aunque existen dificultades para generar esquemas de manejo de la enfermedad (Bains *et al.*, 2002; Tsor *et al.*, 2001; van den Boogert and Luttikholt, 2004). En los experimentos de validación se evidenció una respuesta variable a los tratamientos: en algunos casos el control químico presentó mayor eficacia y en otros el control biológico fue mejor. No obstante, dado que en el testigo absoluto la severidad de rhizoctoniasis fue menor que las parcelas tratadas, no fue posible afirmar cuál de los tratamientos evaluados fue el mejor.

Aunque no fue claro el control de la rhizoctoniasis por los diferentes productos, hubo un beneficio en la producción. En Carmen de Carupa el uso de semilla certificada y el bioplaguicida incrementó el rendimiento del cultivo mientras que esto no ocurrió con el uso de semilla convencional, sugiriendo

que el bioplaguicida funciona mejor en un esquema de manejo integrado que incluye el uso de semilla certificada y el empleo adecuado de fungicidas recomendados para el patógeno blanco.

De esta forma, es necesario caracterizar el mecanismo de acción de potenciales biocontroladores de *R. solani* y realizar mayores estudios en campo, tendientes a generar un control a largo plazo de la rhizoctoniasis.

Finalmente, los rendimientos de papa fueron considerablemente más bajos en Ventaquemada en comparación con Carmen de Carupa. Al respecto, Brewer y Larkin (2005) indicaron que las diferencias en rendimiento en cultivos de papa dentro de una misma zona ocurren por condiciones ambientales localizadas en el tiempo. Aún así, la parcela de Ventaquemada presentó una producción cercana al rendimiento promedio nacional de papa (17,6 ton/ha), según la Encuesta Nacional Agropecuaria-2008 (MADR y CCI, 2008).

Conclusión

La aplicación de *T. koningiopsis* Th003 no redujo significativamente la formación de esclerocios de *R. solani* en la superficie de tubérculos de papa var. parda pastusa, como tampoco aumentó significativamente los rendimientos; sin embargo, constituye una herramienta alternativa para ser incluida en un programa de manejo integrado de la enfermedad, ya que su demostrada actividad biocontroladora sobre el fitopatógeno es una razón para pensar que ésta puede tener un efecto sinérgico o aditivo cuando se combine con otras herramientas de control, como el uso de semilla libre de fitopatógenos y fungicidas registrados.

Bibliografía

- Bains, P.; Bennypaul, H.; Lynch, D.; Kawchuk, L.; Schaupmeyer, C. (2002). Rhizoctonia disease of potatoes (*Rhizoctonia solani*): Fungicidal efficacy and cultivar susceptibility. American Journal of Potato Research 79: 99 - 106.
- Beltrán, C. R.; Moreno, C. A.; Blanco, P.; Villamizar, L.; Cotes, A. M. (2010). Biological control of *Rhizoctonia solani* and growth promotion activity of

- Trichoderma koningiopsis* Th003 and *Trichoderma asperellum* Th034 formulations in potato (*Solanum tuberosum*). IOBC/wprs Bulletin. En: prensa.
- Beltrán, C. R.; Paris, M. A.; Cotes, A. M. (2007). Selection of isolates of *Trichoderma* spp. with biocontrol activity over *Rhizoctonia solani* in potato. IOBC/WPRS Bulletin. 30: 55 – 58.
- Brewer, M.; Larkin, R. (2005). Efficacy of several potential biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato. Crop Protection 24: 939 - 950.
- Corzo, P. J. (2000). Semilla de papa. P. 72-86. En: Manejo integrado del cultivo de la papa. Manual técnico. CORPOICA, noviembre de 2000. p. 196.
- Díaz, A. C. (2002). Evaluación del fungicida Tiabendazol para el control de *Rhizoctonia solani* Kühn en papa (*Solanum tuberosum*). Trabajo de grado. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Hyakumachi, M.; Ui, T. (1982). The role of the overwintered plant debris and sclerotia as inoculum in the field occurred with sugarbeet root rot. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 48: 628–633.
- ICA. (2003). Resolución 02501, por la cual se establecen los requisitos mínimos para la producción de semilla certificada de papa. 9 p.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural –MADR–; Corporación Colombia Internacional –CCI–. (2008). Encuesta Nacional Agropecuaria 2008. Bogotá, D.C. pp. 60 - 61.
- Tsrör, L. (2010). Biology, epidemiology and management of *Rhizoctonia solani* on potato. Journal of Phytopathology 158: 649 - 658.
- Tsrör, L.; Barak, R.; Sneh, B. (2001). Biological control of black scurf on potato under organic management. Crop Protection 20: 145 - 150.
- Van den Boogert, P.H.J.F.; Luttikholt, A.J.G. (2004). Compatible biological and chemical control systems for *Rhizoctonia solani* in potato. European Journal of Plant Pathology 110: 111 - 118.
- Vinale, F.; Sivasithamparam, K.; Ghisalberti, E. L.; Marra, R.; Woo, S. L.; Lorigo, M. (2008). *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. Soil Biology and Biochemistry 40: 1-10.