

NOTA TÉCNICA

MÉTODO FÁCIL Y CONFIABLE PARA TEÑIR NÚCLEOS EN HONGOS DEL COMPLEJO *Rhizoctonia*

Luis Cedeño¹

RESUMEN

En el complejo *Rhizoctonia* la morfología hifal y configuración del septo permiten diferenciar los géneros, mientras que las especies pueden ser distinguidas por la condición nuclear y el grosor de hifas “guías” ó la morfometría del teleomorfo. Para caracterizar las especies en uni, bi y multinucleadas se han desarrollado varios métodos de tinción nuclear con acridina naranja, azules de anilina y tripano, diamina fenil indol (DAPI), giemsa, hematoxilina, orceina y safranina O. Algunos de esos procedimientos son rápidos, pero otros requieren técnicas especiales (fluorescencia) o consumen mucho tiempo y limitan la cantidad de muestras a procesar. Un nuevo método fue desarrollado durante análisis de anastomosis (AGs) en aislamientos de *R. solani* que atacan la papa cultivada en Mérida, Venezuela. El procedimiento es rápido, fácil, confiable y permite la manipulación simultánea de un número considerable de especímenes, y tanto el núcleo como el nucléolo conservan su integridad. El método fue probado exitosamente en 10 patrones de AGs de *R. solani*, y permitió separar 173 cepas multinucleadas y 3 binucleadas, todas del género *Rhizoctonia*. El método fue efectivo utilizando sustrato de agua-agar 2,4 % más PDA 0,39 %, en cultivos de 18 a 48 h fijado con formaldehído 4 % y coloreado con fucsina ácida 0,025 en ácido láctico 50 %.

Palabras clave adicionales: Micología, tinción, morfología hifal, papa

ABSTRACT

Easy and reliable method for nuclei staining of *Rhizoctonia* complex fungi

Hyphal morphology and septal structure configuration of the fungi included in *Rhizoctonia* complex allows for differentiation of genus, while species may be distinguished by nuclear condition and thickness of the runner hyphae, or teleomorph morphometry. For characterization of species in uni, bi, and multinucleate diverse methods of staining have been developed using acridine orange, aniline and trypan blue, diamine phenyl indole (DAPI), giemsa, hematoxiline, orcein and safranin O. Some of these procedures are quick to perform, while others require special techniques (fluorescence) or are time consuming, which impose a limit on the number of samples that can be processed at a time. A new method of nuclei staining was developed during the analysis of anastomosis groups (AGs) of *R. solani* strains isolated from potato plants cultivated in Mérida, Venezuela. The procedure is quick, easy, and reliable, and allows for simultaneous manipulation of a significant number of samples, and both nucleus and nucleolus maintain their integrity. The method was successfully assayed in 10 different AGs testers of *R. solani*, and allowed separation of 173 multinucleate and 3 binucleate *Rhizoctonia* strains. Method effectiveness depends upon growth medium (water agar 2.4 % plus PDA 0.39 %), culture age (18-48 h), fixing agent (formaldehyde 4 %), and stain (fuchsin acid 0.025 % in lactic acid 50 %).

Additional key words: Mycology, staining, hyphal morphology, potato

INTRODUCCIÓN

Los hongos del complejo *Rhizoctonia* infectan plantas silvestres y cultivadas en las más diversas regiones de la tierra, incluyendo rubros de importancia agrícola, forestal, hortícola y ornamental (Adams, 1988; Sneh et al., 1991). Los

miembros del género se distinguen por la morfología hifal y la configuración del septo (Sneh et al., 1991), mientras que las especies pueden ser diferenciadas por el número de núcleos presentes en las células somáticas de hifas jóvenes y el grosor de las hifas guías, o por las características morfométricas de las estructuras

Recibido: Octubre 11, 2007

Aceptado: Julio 18, 2008

¹ Laboratorio de Fitopatología, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, Universidad de Los Andes. Apdo.77. Mérida. Venezuela. e-mail: cedenol@ula.ve

reproductivas sexuales.

Desde finales de la década de los 1960's, la cuantificación de núcleos en las células vegetativas se constituyó en un importante criterio taxonómico para separar las especies de *Rhizoctonia* en uninucleadas, binucleadas y multinucleadas (Parmeter et al., 1967). Las uninucleadas fueron reconocidas a principios de los 1990's (Hietala et al., 1993) y su hábitat pareciera estar restringido al sistema radical de plantas coníferas donde causan pudrición. Mediante análisis combinado de cuantificación nuclear e inducción del teleomorfo, Parmeter et al. (1967) demostraron que las células vegetativas de *R. solani* Kühn son multinucleadas e igualmente descubrieron que algunas especies binucleadas habían sido identificadas erróneamente como *R. solani*. La confusión previa tuvo su origen en diagnósticos fundamentados exclusivamente en una morfología hifal que es común en otros hongos del suelo, incluyendo algunos ascomicetos (Sanders et al., 1978). Para ese entonces, la morfología hifal era el único criterio disponible porque las *Rhizoctonia* spp. no producen conidios y muy rara vez desarrollan el teleomorfo de manera natural o inducida; en consecuencia, las posibilidades de utilizar las estructuras reproductivas sexuales con propósitos taxonómicos son limitadas.

El grupo de las *Rhizoctonia* multinucleadas incluye a *R. solani*, *R. zaeae* y *R. oryzae*. El resto de las especies conocidas son uninucleadas o binucleadas. Mediante análisis de fusión hifal (anastomosis) entre cepas, las *Rhizoctonia* binucleadas y multinucleadas han sido divididas en grupos sub-específicos llamados grupos de anastomosis (AGs). La especie más importante es *R. solani* la cual está conformada por una mezcla heterogénea de cepas que han sido separadas en 14 AGs (AG-1~AG13 más AG-BI) (Carling et al., 2002).

Las *Rhizoctonia* binucleadas representan un diverso grupo de organismos con más de 20 especies descritas (Kataria y Hoffmann, 1988) y alrededor de 24 AGs (AG-A ~ AG-S) (Sneh et al., 1991). Algunas especies binucleadas son patógenos de alfalfa (Eken y Demirci, 2003), cereales (Cedeño et al., 1998), césped (Burpee y Martin, 1992), coníferas (Runion y Kelly, 1993) y fresa (Martin, 1988).

En virtud de que la cuantificación del número

de núcleos se ha convertido en un parámetro esencial para la distinción de *R. solani*, y de otros hongos cuyas hifas son morfológicamente similares, para tales fines se han desarrollado varios métodos de tinción nuclear. Sin embargo, ninguno de los métodos reconocidos, excepto el que requiere fluorescencia, muestra los núcleos completos e intactos, ni permiten procesar simultáneamente con certeza y rapidez una cantidad significativa de aislamientos.

La literatura especializada registra varios métodos de tinción para cuantificar núcleos en las células somáticas de *Rhizoctonia* spp. (Yamamoto y Uchida, 1982). Los colorantes más empleados para tales propósitos son los azules de anilina y tripano (Herr, 1979), diamina fenil indol (DAFI) (Martin, 1988), giemsa (Rogers, 1965), naranja de acridina (Yamamoto y Uchida, 1982), orceina (Tu et al., 1969) y safranina O (Bandoni, 1979). El giemsa y los azules de anilina y tripano, tiñen los núcleos de azul intenso. El naranja de acridina colorea de verde el ADN y de rojo intenso el nucleolo. La safranina O tiñe de rojo intenso el nucleolo, pero no reacciona con los otros componentes nucleares. Varios procedimientos han sido catalogados como rápidos (azules de anilina y tripano, DAFI, naranja de acridina, safranina O), pero ninguno de éstos permite la observación nítida e integral de núcleos y nucleolos y en consecuencia, generan dudas sobre la identidad de las estructuras teñidas, porque existe la probabilidad de que se contabilicen como núcleos a vacuolas cargadas que tienen afinidad con estos colorantes y que pudieran tener morfología y dimensiones similares a las de los núcleos. La reacción rápida de los azules de anilina y tripano, disueltos ambos en glicerina, aparentemente, constituyen una forma práctica de revelar las estructuras nucleares en *Rhizoctonia* spp., pero no permite distinguir los nucleolos. Algunos métodos requieren el empleo de técnicas especiales (DAFI, fluorescencia), mientras otros son tediosos y exigentes en cuanto a dedicación y precaución (HCl-giemsa y aceto orceina); por lo tanto, consumen mucho tiempo y no permiten el procesamiento simultáneo de una cantidad significativa de muestras.

El objetivo del presente estudio fue desarrollar un método de tinción nuclear fácil y confiable, para visualizar rápidamente núcleos íntegros en especies de *Rhizoctonia* y que además permita

procesar simultáneamente una cantidad significativa de especímenes.

MATERIALES Y MÉTODOS

En la investigación se utilizaron cepas de *Rhizoctonia* obtenidas de raíces, estolones, tallos, pecíolos, y principalmente tubérculos de papa cultivada en distintas áreas ecológicas del estado Mérida. Las cepas fueron sub-cultivadas por 18-48 h a temperatura ambiente (22 ± 2 °C) en placas que contenían 4,5 mL de agua agar (AA) 2,4 % más papa-dextrosa agar (PDA Difco) en concentraciones variables de 0,39 a 1,95 %. El medio se descargó en placas precalentadas por 30 min a 50 °C, para que la distribución ocurriera de la manera más uniforme posible. Los cultivos se fijaron con distintas concentraciones de formaldehído (1 al 7 %) por lapsos variables (de 10 a 60 min). Posteriormente, de cada placa se cortaron secciones angulares de agar-micelio (15 mm x 15 mm ó 30 mm x 15 mm), que seguidamente fueron colocadas sobre portaobjetos, tratadas por al menos 2 minutos con fucsina ácida 0,025 % en ácido láctico 85 %, cubiertas con cubreobjeto (22 mm x 22 mm ó 24 mm x 40 mm) y examinadas en microscopio fotónico bajo abundante iluminación. Los cubreobjetos fueron colocados al concluir el tiempo de tinción. Los núcleos se cuantificaron en las células más próximas al ápice hifal (Sneh et al., 1991). Como control se utilizó la tinción HCl-giemsá de Rogers (1965). La utilidad y eficiencia del método fueron evaluadas en 176 cepas cuyas hifas tenían la morfología típica del género *Rhizoctonia*, 10 patrones reconocidos (testers) de AGs de *R. solani*, 2 ascomicetes y 1 oomicete. Los montajes se examinaron en un microscopio Zeiss Axioplan y fueron digitalizados usando una cámara Canon PowerShot A640.

En todos los casos, los núcleos y el septo dolíporo se apreciaron con mayor nitidez cuando las cepas fueron sub-cultivadas en AA 2,4 % más PDA 0,39 %, fijadas por 30 min o más con formaldehído 4 % y tratadas por 2 min o más con fucsina ácida 0,025 % en ácido láctico 85 %. Los núcleos conservaron su integridad, mostraron forma lenticular y color rojo claro, mientras que los nucleolos aparecieron como corpúsculos globosos de color oscuro. Cuando el colorante se

aplicó en cultivos sin fijar mostró dificultades de penetración y difusión, y en consecuencia, los núcleos no fueron diferenciados. De igual manera, se pudieron distinguir núcleos y nucleolos en cepas cultivadas en AA 1,5 ó 2 %, más PDA 0,78 ó 1,95 %, porque la penetración del colorante fue interferida por la presencia de vacuolas. Los núcleos tampoco se apreciaron claramente en cultivos que después de fijados se lavaron con agua destilada estéril, alcohol etílico 70 % o tampón fosfato (pH 7,2).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método permitió separar en 173 cepas multinucleadas (Figura 1) y 3 binucleadas, todas del género *Rhizoctonia* provenientes de papas cultivadas en los andes de Venezuela. El procedimiento resultó igualmente exitoso en la visualización de núcleos íntegros en las hifas de los diez patrones de AGs de *R. solani* y uno de *Rhizoctonia* binucleada causante del “sanchocho” (damping-off) en alfalfa, así como en los ascomicetos *Neonectria radicularis* var. *radicularis* (*Cylindrocarpon destructans* var. *destructans*) y *Neonectria discophora* var. *rubi* (*Cylindrocarpon ianthothele* var. *ianthothele*), y el oomiceto *Phytophthora infestans* cultivado en harina de avena agar (0,4 %).

La investigación permitió desarrollar un procedimiento de tinción que proporciona una imagen real y exacta de las estructuras nucleares presentes en células vegetativas jóvenes de *Rhizoctonia* spp. El AA 2,4 % evitó que el material sufriera fractura durante la extracción y posterior manipulación. El PDA 0,39 % redujo la vacuolización hifal y favoreció la penetración del colorante. El formaldehído facilitó la difusión del colorante, incrementó su afinidad por los núcleos y prolongó la vida útil de las preparaciones. Sin tratamiento previo con formaldehído, la penetración del colorante fue restringida. El procedimiento permite examinar una cantidad apreciable de aislamientos en un lapso relativamente corto, es fácil, poco costoso, no exige el empleo de técnicas microscópicas especiales y no genera dudas sobre la identidad de las estructuras teñidas. La preparación no necesita lavado y es notablemente limpia porque el colorante no precipita.



Figura 1. Hifas de *R. solani* en las que se observan los núcleos de la célula

LITERATURA CITADA

- Adams, G.C. Jr. 1988. *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) a species complex of wide host range. *Adv. Plant Pathol.* 6: 535-552.
- Bandoni, R.J. 1979. Safranin O as rapid nuclear stain for fungi. *Mycologia* 71: 873-874.
- Burpee, L.L. y B. Martin. 1992. Biology of *Rhizoctonia* species associated with turfgrasses. *Plant Dis.* 76: 112-117.
- Carling, D.E, S. Kuninaga y K.A. Brainard. 2002. Hyphal anastomosis reactions, rDNA internal transcribed spacer sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2 (AG2) and AG-BI. *Phytopathology* 92: 43-50.
- Cedeño, L., H. Nass, C. Carrero, R. Cardona, H. Rodríguez y L. Alemán. 1998. *Rhizoctonia oryzae-sativae*, agente causal de la mancha agregada del arroz en Venezuela. *Interciencia* 23: 248-250.
- Eken, C. y E. Demirci. 2003. Identification and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* anastomosis groups isolated from forage legumes in Erzurum, Turkey. *Phytoparasitica* 31: 76-80.
- Herr, L.J. 1979. Practical nuclear staining procedure of *Rhizoctonia*-like fungi. *Phytopathology* 69: 959-961.
- Hietala, A., R. Sen y A. Lilja. 1993. Anamorphic and teleomorphic characteristics of a uninucleate *Rhizoctonia* species isolated from the roots of nursery grown conifer seedlings. *Mycol. Res.* 98: 1044-1050.
- Kataria, H.R. y G.M. Hoffmann. 1988. A critical review of plant pathogenic species of *Ceratobasidium* Rogers. *J. Plant Dis. Protec.* 95: 81-107.
- Martin, B. 1988. Identification, isolation, frequency, and pathogenicity of anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* spp. from strawberry roots. *Phytopathology* 78: 379-384.
- Parmeter, J.R. Jr, H.S. Whitney y W.D. Platt. 1967. Affinities of some *Rhizoctonia* species that resemble mycelium of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology* 57: 218-223.
- Rogers, J.D. 1965. The conidial stage of *Coniochaeta lignaria*: morphology and

- citology. Mycologia 57: 368-378.
13. Runion, G.B. y W.D. Kelly. 1993. Characterization of a binucleate *Rhizoctonia* species causing foliar blight of Loblolly pine. Plant Dis. 77: 754-755.
14. Sanders, P.L., L.I. Burpee y H.Jr. Cole. 1978. Preliminary studies on binucleate turfgrass pathogens that resemble *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 68: 145-148.
15. Sneh, B., L. Burpee y A. Ogoshi. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. Am. Phytopathol. Soc., St. Paul, Minnesota. 133 p.
16. Tu, C.C., D.A. Roberts y J.W. Kimbrough. 1969. Hyphal fusion, nuclear condition and perfect stage of three species of *Rhizoctonia*. Mycologia 61: 775-783.
17. Yamamoto, D.T. y J.Y. Uchida. 1982. Rapid nuclear staining of *Rhizoctonia solani* and related fungi with acridine orange and with safranin O. Mycologia 74: 145-149.