



CERATOBASIDIUM ALBASITENSIS, UN NUEVO HONGO DEL COMPLEJO RHIZOCTONIA AISLADO EN ESPAÑA

(*) V. GONZÁLEZ¹, O. SALAZAR¹, M.C. JULIÁN¹, J. ACERO¹, M. A. PORTAL¹, R. MUÑOZ², H. LÓPEZ-CÓRCOLES², E. GÓMEZ-ACEBO³, P. LÓPEZ-FUSTER² & V. RUBIO¹

SUMARIO

1	DESCRIPCIÓN.....	385
2	AGRADECIMIENTOS	398
3	BIBLIOGRAFÍA	398

(*) *Autores*





CERATOBASIDIUM ALBASITENSIS, UN NUEVO HONGO DEL COMPLEJO RHIZOCTONIA AISLADO EN ESPAÑA

1 DESCRIPCIÓN

C. albasitensis es descrito como nueva especie, en base a datos morfológicos, así como en reconstrucción filogenética a partir de secuencias de AND ribosomal, que incluyó representantes de algunas especies relacionadas dentro del género. Los diferentes aislados que definen la nueva especie fueron encontrados en varias localidades de la provincia de Albacete (Sudeste de España). Este táxon pertenece al complejo de especies de *Rhizoctonia s.l.*, y se sitúa en el género *Ceratobasidium* (anamorfo= *Ceratorhiza*) debido a sus características macro y micromorfológicas. Además, dos nuevos métodos de inducción a la esporulación sexual en placa son descritos.

El género-forma *Rhizoctonia* es actualmente considerado como un conjunto heterogéneo de táxones fúngicos que no producen esporas asexuales, pero que poseen ciertos caracteres vegetativos en común. Hasta la fecha, es aceptada en general la disgregación de las especies del complejo en al menos siete u ocho (dependiendo de los autores) géneros (Moore, 1987; Anderson y Stalpers, 1994). El grupo tiene una importancia económica y ecológica grande, debido a que se distribuye prácticamente por todo el globo, y los diferentes aislados del complejo pueden vivir como saprófitos o simbioses, como en el caso de las orquídeas terrestres. También, muchos aislados han sido caracterizados como protectores frente a varias enfermedades fúngicas (Sneh, 1998), promoviendo en general el crecimiento vegetal. Muchos otros aislados del complejo causan pérdidas significativas en la agricultura y selvicultura; actualmente, las enfermedades atribuidas a *Rhizoctonia* han sido descritas en más de 200 especies vegetales. Al menos 120 epítetos referidos a *Rhizoctonia* pueden ser encontrados en la literatura especializada, mientras que muy pocos han sido los intentos realizados para clarificar conceptos genéricos y específicos dentro del grupo. (Sneh y col., 1991; Andersen y Stalpers, 1994; Roberts, 1999). Los teleomorfos de los diferentes hongos que muestran características vegetativas asignables a *Rhizoctonia* binucleada (una parte del complejo), han sido habitualmente incluidos en el género *Ceratobasidium* Rogers, con la excepción de *Epulorhiza repens* (Bernard) Moore (= *Rhizoctonia repens* Bernard), cuyo teleomorfo ha sido asignado por algunos autores al



género *Tulasnella* J. Schroeter (*T. calospora* (Boud.) Juel) (Sneh y col., 1991). *Ceratobasidium* es considerado como cercano a *Thanatephorus* Donk, siendo propuesto por algunos autores (i.e. Stalpers y Andersen, 1996; Roberts, 1999) como un complejo genérico, en donde la delimitación entre estos dos géneros presenta a menudo dificultades. En este sentido, los anamorfos de estos dos géneros del grupo *Rhizoctonia* han sido tradicionalmente identificados y clasificados sobre la base del número de núcleos por célula hifal, considerando *Thanatephorus* como multinucleado, y *Ceratobasidium* como binucleado, a pesar de que la condición nuclear es desconocida aún para muchas especies de ambos géneros.

Otro importante handicap en la taxonomía de estos hongos lo constituye el hecho de que la mayoría de estudios sobre *Rhizoctonia s.l.* son efectuados en cultivos "in vitro", en los cuales las estructuras reproductoras sexuales no suelen ser observadas, con lo que la delimitación de táxones está habitualmente basada en las características morfológicas de los estados anamórficos. Debido a lo anterior, la existencia y desarrollo de nuevos métodos para inducir la formación de teleomorfos, constituye sin duda una valiosa herramienta para clarificar y correlacionar la taxonomía del grupo.

Algunos aislados no patógenos o hipovirulentos del género-forma *Rhizoctonia* han demostrado ser agentes de biocontrol altamente eficaces (Sneh, 1998). En gran parte de los estudios sobre el tema realizados hasta la fecha, la mayoría de los aislados de *Rhizoctonia s.l.* conocidos capaces de proteger y prevenir varias enfermedades de origen fúngico, han sido determinados como pertenecientes al género *Ceratobasidium*. En estudios preliminares (datos no mostrados), algunos aislados de la nueva especie descrita han demostrado poseer capacidades de protección en varias especies vegetales, frente a cepas virulentas de *R. solani* (*T. cucumeris*), y otros patógenos fúngicos tales como *Fusarium spp.*, *Alternaria spp.*, *Penicillium spp.*, etc. Tal y como indican algunos autores (i.e. Mordue y col., 1989; Andersen, 1996, etc.), el empleo de aproximaciones integradoras para solventar problemas de índole taxonómico en *Rhizoctonia* (lo que incluiría el manejo e integración de datos morfométricos, culturales, bioquímicos, ecológicos y moleculares), podría desembocar en el establecimiento de clasificaciones más razonables y naturales para este grupo de organismos. En este trabajo, se realizó una filogenia molecular de *Rhizoctonia* binucleada basada en la comparación de datos de secuencia de la región ITS ribosomal, que incluyó los aislados de Albacete, varias cepas de referencia empleadas para definir grupos de anastomosis en *Rhizoctonia* binucleada y secuencias variadas de especies de *Ceratobasidium* obtenidas de GenBank, cuyos resultados aportaron evidencias adicionales (a nivel de secuencia) para la validación de la nueva especie aquí descrita.

Métodos. Aislados de *C. albasitensis*: Muestras de cormo y raíz de azafrán, plántulas de pino, así como un volumen de aproximadamente 50 ml de suelo y/o sustrato de semillero fueron recogidas



en seis localidades en Albacete. Los aislamientos se realizaron lavando las raíces y plántulas con agua corriente para limpiar el material de partículas de tierra adheridas, colocando posteriormente tanto segmentos radiculares como partículas de suelo rizobial en placas petri que contenían **agar-agua (WA)** 1.5%, suplementadas con Cloranfenicol (250 mg/ml) e incubadas a 24°C durante 2-6 días. De entre todas las colonias emergentes en las diferentes placas, las pertenecientes al género *Ceratohiza s. Moore* (1987) (= *Rhizoctonia* binucleada) fueron identificadas mediante observación directa al microscopio de características morfológicas en cultivo tales como ramificación hifal, color de la colonia o formación de esclerocios o hifas molinioides. Tras esto, las cepas seleccionadas fueron transferidas y mantenidas como subcultivos sucesivos en placas **PDA** (39 g/l Agar de Patata Dextrosa). El número de núcleos por célula hifal fue determinado mediante el método descrito en Julián y col. (1997).

Formación de los estados perfectos: Para la inducción en los diferentes aislados de la formación de estructuras de reproducción sexual en placa, se emplearon dos métodos no descritos previamente. El primero de ellos consistió en una modificación del previamente descrito por Hietala y col. (1994). En este primer método, semillas de rabanito (*Raphanus sativus* L.) y/o colza (*Brassica napus* L.) fueron esterilizadas en superficie (etanol 70% 2 min.; hipoclorito sódico 5% con Tween 20 0.005% 15 min., y al menos cinco lavados en agua destilada estéril), y posteriormente pregerminadas por incubación en placas de agar-agua 15% invertidas y en oscuridad a 24°C durante 2-4 días. Tras esto, las plántulas fueron transferidas a placas petri que contenían 20 ml de agua destilada estéril y dos inóculos de hongo de aprox. 5 x 5 mm provenientes de un cultivo de 7 días, e incubadas a temperatura ambiente y con luz natural. La producción de fases teleomórficas tuvo lugar entre 3 y 10 días tras la inoculación de los aislados. Un segundo nuevo método fue también desarrollado en el laboratorio, consistiendo en una modificación de algunos de los previamente descritos para este tipo de hongos, basados en la transferencia de cepas desde medios nutritivos a medios pobres en nutrientes (i.e. Flentje, 1956; Murray, 1982 y 1984). Brevemente, las fases sexuales fueron obtenidas tras crecer cultivos de las distintas cepas en PDA (Agar de Patata Dextrosa) durante 5-6 días y realizar después pases a placas de agar-agua 15% que contenían pequeños trozos (como media dos trozos de 10 cm² por placa) de hojas, ramitas o serrín de diferentes especies vegetales tales como *Nerium oleander* L., *Prunus laurocerasus* L., *Ligustrum vulgare* L., *Pinus halepensis* Miller, etc. o materiales altamente hidrofóbicos como restos capilares, previamente esterilizados en superficie (etanol 70% 2 min.; hipoclorito sódico 5% con Tween 20 0.005% 15 min., y al menos cinco lavados en agua destilada estéril). La producción de himenio (según las diferentes cepas) comenzó entre 7 y 15 días después de la transferencia de las colonias.

Reconstrucción filogenética: Para los análisis filogenéticos, la secuencia completa de la región ITS de 37 aislados de *Rhizoctonia* binucleada (lo que incluyó varias especies de



Ceratobasidium) fué determinada. Las secuencias fueron alineadas y procesadas para reconstrucción filogenética. Todos los aislados empleados en esta reconstrucción están listados en la tabla I, incluyendo los aislados de *C. albasitensis*, todos los testigos de anastomosis en *Rhizoctonia* binucleada disponibles y algunos aislados de *C. cornigerum* y *C. cerealis* procedentes de la colección de cultivos vivos de CBS (Baarn, Holanda). Además, varias secuencias ITS de *C. oryzae-sativae*, *C. cerealis*, *Waitea circinata* y *Serendipita vermifera* s. Roberts (1999) (= *Sebacina vermifera*) fueron obtenidas de GenBank y procesadas para su inclusión en el estudio. Los protocolos de aislamiento de AND, PCR y secuenciación empleados han sido previamente descritos en Boysen y col. (1996). Los alineamientos automáticos de la región ITS de las cepas estudiadas fueron realizados con el programa CLUSTALW (Thompson y col., 1994). Los análisis filogenéticos fueron efectuados mediante el método de máxima parsimonia, usando el algoritmo de búsqueda heurística del programa PAUP 3.1.1 (Swofford, 1993). Los árboles fueron enraizados con la secuencia ITS de un aislado de *A. bisporus*. La fiabilidad estadística de los datos obtenidos fue comprobada con 1000 réplicas de bootstrap empleando la opción de búsqueda heurística del programa. El porcentaje de réplicas que mostró cada agrupamiento del árbol fue utilizado como medida de la confianza estadística. Un agrupamiento con un porcentaje de bootstrap de más de 90% fue considerado como estadísticamente fiable.

Ceratobasidium albasitensis V. González & V. Rubio, *spec. nov.* — Figs. 1-4

Basidiocarpus albidus, resupinatus, sparsus, inconspicuus, tenuis, pelliculosus vel pulveraceum quando recens et in aridus. Hyphae subiculares hyalina, laxa, partim incrassate tunicatae, ramis angulis rectis, fibulae destitutae, 3,5-5,5 (6,5) μm latae. Basidia subglobosa vel sphaericopedunculata, producta aut singula aut quasi racemis aggregata ex hyphis subicularibus, (16,2-)18,2-20,8 (24) x 7-11 μm , 4(-5) sterigmata, longissima, cornuta, subcurvata, saepe cum septis adventitis prope apices (19) 22-35,7 x 1,9-3 μm . Sporae subglobosae vel latae ellipsoideae (Q = 1,2-1,4), laeves, hyalina, inamiloideae, raro iterativae prope laterales, 5-7-(8) x (3,5) 4-5,5(-6) μm . Hyphae moliniformiae amplae, tumoribus, 13-15 μm latae. Status anamorphosis Ceratorhiza.

In terra ad *Crocus sativus* L. et *Pinus halepensis* Miller

Holotypus: Hispania, Albacete, Tobarra, 7 Nov. 1996, *O. Salazar & M. C. Julián*, in herb. Alcalá (AH 26603) conservatur

Etymology: referring to the geographical origin of the isolates



De los nueve aislados iniciales, tres de ellos fructificaron repetidamente con los métodos de inducción empleados. Por ello, las descripciones de los caracteres macro- y microscópicos de los estados sexuales, están basadas en fructificaciones en laboratorio de esos tres aislados anteriormente mencionados.

Basidiocarpo blanquecino a casi hialino, resupinado, delgado, himenio consistiendo en una capa pelicular hipochnoide y pruinosa producido sobre la superficie del agua (en fructificaciones sobre agua estéril con plántulas de rabanito) o en la superficie externa del agar, cerca de los márgenes de la colonia, más raramente cubriendo toda la superficie de la placa, e incluso colonizando ocasionalmente residuos vegetales añadidos al medio sintético (i.e. ramitas de pino, hojas de Nerium oleander, etc).

Basidios globosos al principio, luego piriformes a esferopedunculados, de (16.2-)18.2-20.8 (-24) x 7-11 μm , producidos directamente sobre hifas basales o en grupos arracimados. Esterigmas en n° de 4(5), muy largos (más de 2 veces la longitud del basidio), de (19-)22-35.7 x 1.9-3 μm , curvados o erectos, fácilmente colapsados y a menudo con septos adventicios situados junto a la base del esterigma. Basidiósporas anchamente elipsoidales a ovoides (Q= 1.2-1.4, media 1.26) en vista frontal, amigdaliformes a ligeramente citriformes en vista lateral, de 5-7(-8) x 4-5.5(-6) μm (media 6.42-4.19) (n=21), apiculadas, hialinas, lisas, no amiloides, germinando por un tubo de germinación lateral, y más raramente por repetición. Hifas subiculares laxas, hialinas, de pared gruesa a fina, de 3.5-5.5(-6.5) μm de diámetro. Hifas molinioides presentes entre los tejidos himeniales, consistiendo en elementos inflados tipo barril de hasta 15 μm de diámetro. Fíbulas ausentes en todos los tejidos.

Habitat — Saprofítico en suelo rizosférico y cormos sanos de azafrán (*Crocus sativus* L.) y plántulas de pino (*Pinus halepensis* Miller), en suelos agrícolas.

Material estudiado. ESPAÑA: Albacete, Tobarra, 28 Nov. 1996, en suelo agrícola con *Crocus sativus* L., leg. O. Salazar y M.C. Julián (holotypus, AH 26603); ibidem, 7 Jul. 1996, AH 26605; Albacete, Aguas Nuevas, 7 Jul. 1996, leg. O. Salazar y M.C. Julián, AH 26604.

El sistema de agrupamiento en base a reacciones de compatibilidad somática (anastomosis), es actualmente la base aceptada sobre la cual se asienta la taxonomía de los diferentes grupos de hongos englobados bajo el concepto de *Rhizoctonia s.l.* (Ogoshi, 1975; Sneh y col., 1991). Estos métodos han sido ampliamente empleados en aislados multi- y binucleados de *Rhizoctonia*, en detrimento de aproximaciones basadas en el estudio de fases perfectas. En este sentido, varios autores han apuntado



la dificultad para diferenciar especies dentro del género *Ceratobasidium* (Ogoshi y col., 1983). Aunque existen algunos trabajos en la literatura que recogen especies bien definidas por su teleomorfo [i.e. *C. oryzae-sativae* Gunell & Webster (1987); *C. ramicola* Tu, Roberts & Kimbrough (1969)], muchos de los teleomorfos de los diferentes grupos de anastomosis en *Rhizoctonia* binucleada (AG-E, AG-L, AG-I, AG-K, etc) obtenidos en laboratorio por métodos indirectos, están asignados a *Ceratobasidium* pero sin descripción alguna de epíteto específico (Sneh y col., 1991).

Thanatephorus, el teleomorfo de *Rhizoctonia* multinucleada (i.e. *R. solani*) es reconocido como el género más cercano a *Ceratobasidium*. La posición sistemática de ambos géneros en basidiomicetos y las relaciones evolutivas de la familia *Ceratobasidiaceae* con el grupo de los heterobasidiomicetos (principalmente *Tulasnellaceae* y *Tremellaceae*), han sido previamente estudiada por varios autores (i.e. Talbot, 1965; Eriksson y Ryvarde, 1973; Stalpers y Andersen, 1996, etc). La posición sistemática de los dos géneros permanece aún confusa, aunque actualmente son situados en la familia *Ceratobasidiaceae* (Ceratobasidiales, Basidiomycetes), dentro del grupo de los Homobasidiomicetos (Hawksworth y col., 1995). Recientemente, Roberts (1999) sugiere una redistribución de la anterior clasificación propuesta en Hawksworth y col. (1995). Este autor propone simplificar los esquemas taxonómicos de algunos géneros de *Ceratobasidiaceae*, sinonimizándolos a alguno de los tres géneros aceptados para la familia por el autor: *Ceratobasidium*, *Thanatephorus* y *Waitea*. Tal y como numerosos autores han sugerido (i.e. Stalpers y Andersen, 1986; Roberts, 1999), las diferencias morfológicas usadas para distinguir entre géneros de *Ceratobasidiaceae* son graduales, aunque es comúnmente aceptado el epíteto *Thanatephorus* para aquellos aislados mayoritariamente parásitos, con basidiomas hipochnoides y a veces gelatinizados, basidios elipsoides a mazudos a partir de hifas subculares verticales y apretadas en empalizadas, generalmente con más de dos núcleos por célula hifal, mientras que el epíteto *Ceratobasidium* es preferido para designar táxones con basidiocarpos ceráceos con basidios ovoides a esferopedunculados emergiendo de hifas subculares arracimadas, con dos núcleos por célula hifal. La conveniencia de aceptar *Waitea* como miembro de la familia *Ceratobasidiaceae* será discutida en un posterior epígrafe.

Los tamaños de la región ITS (ITS1, gen 5,8S e ITS2) de los diferentes aislados están listados en la tabla I. La región ITS1 varió en longitud entre 171 y 228 pb, mientras que la región ITS2 lo hizo entre 198 y 249 pb. Fue también observado regularmente que la región ITS1 era ligeramente más corta que la ITS2 en todos los aislados estudiados. La región codificante para el gen 5,8S apareció altamente conservada; todos los aislados midieron 155 pb de longitud, aunque se detectaron variaciones mínimas en la secuencia nucleotídica entre algunos aislados. Los porcentajes de similitud para toda la región ITS entre grupos del árbol filogenético (etiquetados de G1 a G9), son resumidos en la tabla II.



Con la excepción de dos aislados de *C. cornigerum* (AG-Bo y AG-P), *C. cerealis* (AG-D) y *C. oryzae-sativae* (AG-Bb), cuando se secuenciaron dos o más aislados de la misma especie, siempre agruparon en la misma rama, o al menos en ramas adyacentes.

Los análisis filogenéticos agruparon todos los aislados binucleados con teleomorfo en *Ceratobasidium* en siete grupos, estando la mayoría de ellos bien soportados por valores de bootstrap. Todos estos grupos se situaron lejos de los dos aislados de *W. circinata* y la cepa de *S. vermifera*. Varios autores han discutido la posición de estos dos miembros de los Stereales y Tremellales (Heterobasidiomicetes) respectivamente (Hawksworth y col., 1995), habitualmente considerados como *Rhizoctonia* s.l. debido a ciertas características vegetativas exhibidas por sus estados anamórficos. Moore (1978, 1987), empleando microscopía electrónica para caracterizar la ultraestructura del aparato septal en los táxones del complejo, designó los anamorfos de *Rhizoctonia* binucleados con estado perfecto en *Tulasnella* como pertenecientes a *Epulorhiza*, mientras que Andersen y Moore (Moore, 1996) adoptan el epíteto *Opadorhiza* para acomodar *Rhizoctonia globularis* Saksena y Vaartaja, un táxon con teleomorfo en *Sebacina*, muy similar a *Epulorhiza* pero con distinta estructura en su aparato septal.

Sobre la base de este tipo de estudios, ambos géneros deberían ser considerados como periféricos a *Rhizoctonia* en el concepto moderno del complejo. No obstante, Roberts (1999) incluye *Waitea* como miembro de la familia *Ceratobasidiaceae*, considerando este género como muy cercano (sino sinónimo) a *Thanatephorus*, mediante el manejo de criterios morfométricos y moleculares. La presente reconstrucción filogenética no está en concordancia con esa hipótesis, y sugiere mantener este género fuera de *Ceratobasidiaceae*. Además, Johanson y col. (1998), empleando métodos basados en PCR para discriminar entre los diferentes táxones implicados en el complejo del tizón del arroz, mostraron que aislados de *R. oryzae* (teleomorfo= *Waitea circinata*) agruparon separados de los de *R. solani* y *R. oryzae-sativae* (teleomorfo= *Ceratobasidium oryzae-sativae*).

La posición sistemática de *S. vermifera* que revela este análisis, coincide con las conclusiones previamente apuntadas por algunos autores (i.e. Roberts, 1999; Andersen, 1996, etc.). el primer autor disgregó algunas especies del género *Sebacina* Tul. (Tremellales s. Hawksworth y col., 1995) en al menos cuatro géneros: *Ceratosebacina* P. Roberts, *Endoperplexa* P. Roberts, *Serendipita* P. Roberts y *Hauerslevia* P. Roberts, todos ellos incluidos por el autor en el orden Exidiales. Además, Andersen (1996) empleó estudios de ultraestructura y métodos moleculares (análisis por RFLP) para distinguir *Waitea* y *Sebacina* de táxones homobasidiados en el complejo *Rhizoctonia*.

El grupo 7 incluyó varias cepas testigo de grupos de anastomosis tales como AG-Bo, AG-Bb, AG-P, AG-N y AG-K, un aislado binucleado español previamente identificado como *Ceratobasidium*



sp., más los aislados 521 y 2815, dos cepas reportadas previamente en la literatura como *R. solani* AG4 (Boysen y col., 1996). Este clado se diferenció del resto de los aislados binucleados (con un 100% de bootstrap), configurando un conjunto heterogéneo de táxones, en donde pueden reconocerse dos cepas *C. cornigerum* y *C. oryzae-sativae* respectivamente, junto con varias cepas testigo de otros grupos de anastomosis con fase teleomórfica no o insuficientemente conocida. A pesar de toda esta heterogeneidad nomenclatural en el grupo 7, la divergencia nucleotídica observada dentro de este clado oscilaba entre 0.35 y 4.37%, lo que sugiere que la posición taxonómico de todas esas cepas testigo del grupo 7 deberían ser revisadas.

El grupo 6 incluye 3 aislados testigo de grupos de anastomosis (AG-I, AG-G y AG-J), todos ellos sin teleomorfo bien definido. Recientemente, Matsuhara y col. (1994) describieron las características de los teleomorfos de varios aislados de AG-I, y los caracterizaron como pertenecientes al complejo *C. cornigerum*, aunque los mencionados autores llegan a citar en su estudio dos probables teleomorfos para los diferentes aislados; *C. cornigerum* y *C. pseudocornigerum*. Los otros dos aislados del clado, AG-G y AG-J son habitualmente citados en la literatura como pertenecientes a *Ceratobasidium*, sin epíteto específico definido.

El grupo 5 reunió todas las cepas pertenecientes a la nueva especie descrita (con un valor de bootstrap del 98%). Los aislados de este clado mostraron unos porcentajes de divergencia nucleotídica entre 0.00 y 1.06% (los valores más bajos encontrados entre los nueve grupos), sugiriendo que las secuencias del grupo 5, aunque procedentes de distintas localidades geográficas (e incluso de diferentes sustratos), podrían representar un táxon homogéneo y natural dentro del género.

Los grupos 3 y 4 se dispusieron de forma contigua (agrupación soportada por un 76% de bootstrap) y contenían varios aislados de *C. cerealis* (G4) y un conjunto de cepas de *C. oryzae-sativae* (G3), junto con una cepa testigo (AG-5) citada como *Ceratobasidium sp.* (Sneh y col., 1991). El grupo 4 incluía secuencias obtenidas de aislados depositados en CBS, más una secuencia de la misma especie obtenida de GenBank, mostrando todo el conjunto una divergencia nucleotídica de entre 0.34 y 1.53%, lo que sugiere una baja variación infraespecífica para este táxon. Por otro lado, el otro aislado (AG-D) con teleomorfo asignado a *C. cerealis* presente en el estudio, quedó incluido en el grupo 1, junto a varias cepas testigo con fase sexual perteneciente a *C. cornigerum*. *Ceratobasidium gramineum* (= *C. cerealis*; *Corticium gramineum*) fue propuesto por Oniki y col. (1986) como el teleomorfo de los aislados de AG-D (CAG1). Dichos autores obtuvieron fructificaciones sexuales de cepas de AG-D y compararon las medidas de sus estructuras himeniales con las de *Corticium gramineum* Ikata & T.Matsuura y *Ceratobasidium cereale* Murray & Burpee, concluyendo que los tres táxones debían ser considerados sinónimos. Después de una revisión crítica de las dimensiones



recogidas en Oniki y col. (1986) para *Corticium gramineum* y *C. cerealis*, estos dos últimos táxones no deben ser considerados como pertenecientes a la misma entidad taxonómica. Así, los teleomorfos exhibidos por los aislados de AG-D podrían ser asignados al táxon descrito por Murray y Burpee (1984), pero no a *Corticium gramineum*. De otro lado, las dimensiones aportadas por estos dos últimos autores para *C. cereale* entran en el rango de las medidas citadas por Rogers (1935) para *C. cornigerum*. Además, en un reciente estudio (Toda y col., 1999) sobre varios aislados de AG-D de céspedes, se diferenciaron dos subgrupos (I y II) por métodos de secuenciación del ADN ribosomal y análisis de RAPDs. En resumen, los datos moleculares y morfológicos sugieren la existencia de dos fases teleomórficas para este grupo de anastomosis; una de ellas probablemente relacionada con otros grupos (AG-A, AG-C, etc) con una fase sexual perteneciente a *C. cornigerum*, y otro grupo de aislados definidos por la posesión de un teleomorfo en *C. cerealis*.

El grupo 3 incluyó cuatro secuencias de *C. oryzae-sativae* obtenidas de GenBank y un aislado testigo de AG-S. El hospedante original de esta última cepa no es mencionado en la literatura y, aunque no se ha definido tampoco hasta hoy un teleomorfo para este grupo, AG-S podría representar un miembro de *C. oryzae-sativae*. La reconstrucción filogenética sugiere que este documentado patógeno de arroz constituye un grupo natural, a pesar del elevado porcentaje de divergencia nucleotídica observado en el grupo (entre 0.16 y 8.46%) y la heterogeneidad del origen geográfico de los aislados del clado.

El grupo 2 reunió cepas de CBS (con un 100% de bootstrap), todas ellas depositadas bajo el epíteto de *C. cornigerum*, mas un aislado de Albacete previamente identificado (empleando métodos de inducción en laboratorio) como *C. cornigerum s.l.* Dentro de este clado, la divergencia nucleotídica varió entre 3.15 y 13.88%, indicando una alta heterogeneidad a nivel de secuencia. Interesantemente, esas cepas de CBS fueron depositadas como aislados testigo de varios de los grupos de anastomosis definidos para *Rhizoctonia* binucleada en America (Burpee y col., 1980a; 1980b). Los datos moleculares indican que los grupos americanos podrían representar un conjunto de táxones estrechamente relacionados, en donde cada uno de los diferentes grupos descritos representarían poblaciones del mismo táxon colectivo con diferentes tasas de aislamiento somático entre ellos.

Los grupos 1 y 2 formaron una rama común. Los aislados del grupo 1 representan 5 cepas de referencia para grupos de anastomosis japoneses (AG-A, AG-C, AG-D, AG-E y AG-L), más un aislado de CAG2. Con la excepción de AG-D (mencionado en un párrafo anterior), los teleomorfos recogidos en la literatura para los miembros de este grupo 1 son en su mayoría *C. cornigerum*, o *Ceratobasidium* sin epíteto específico definido. Varios autores (i.e. Ogoshi y col., 1983) han propuesto una correlación entre la mayoría de los grupos de anastomosis americanos con los japoneses. La



reconstrucción filogenética llevada a cabo en este trabajo, sugiere considerar a los diferentes grupos de anastomosis creados en *Rhizoctonia* binucleada como miembros del mismo táxon colectivo, en donde las relaciones entre los diferentes grupos de aislados (en términos de compatibilidad somática) deberían ser revisadas, debido a que las correlaciones basadas en anastomosis hifal no parecen estar reflejadas a nivel de secuencia. Cubeta y col. (1991), emplearon metodologías moleculares (análisis mediante RFLP) para caracterizar la mayoría de los grupos de anastomosis de *Rhizoctonia* binucleada, siendo capaces de diferenciar mediante esta técnica, 13 de los 21 grupos descritos, aunque las correlaciones entre grupos japoneses y americanos que arrojó es estudio no fueron del todo consistentes con las propuestas en Ogoshi y col. (1983).

En lo referente al comportamiento nutricional de los táxones incluidos en el estudio, los datos moleculares apoyan la diferenciación de varios tipos de estrategias vitales dentro del género *Ceratobasidium*. En este sentido, la reconstrucción filogenética sugiere la existencia de al menos dos tendencias monofiléticas en el género; una de ellas estaría relacionada con la posesión de patogenicidad, que incluiría los grupos 1 y 2, en donde la mayoría de los aislados son reportados como patógenos en varias especies vegetales (Ogoshi y col., 1983; Burpee y col., 1980b; Toda y col., 1999, etc.), y los grupos 3 y 4, que incluyen aislados patógenos de arroz y otras gramíneas. Los restantes clados en el árbol filogenético, contienen en su mayoría aislados saprofiticos (grupo 5), así como otros aislados no descritos previamente como patógenos (i.e. AG-I, AG-P, AG-N, etc), o incluso descritos en la literatura como agentes de biocontrol (i.e. AG-G) (Leclerc-Potvin y col., 1999).

En resumen, el análisis filogenético de la región ITS apoyó la definición de *C. albasitensis*, un táxon de *Rhizoctonia* binucleada no descrito previamente, bien diferenciado del resto de táxones descritos para el género mediante métodos morfométricos (ver discusión posterior). Además, la reconstrucción filogenética permitió apuntar algunas hipótesis acerca de las relaciones entre algunas de las especies de *Ceratobasidium*. Así, *C. cornigerum*, la especie más común y distribuida del género, se mostró en este estudio como un amplio complejo de táxones (que incluiría diferentes especies, variedades, ecotipos y poblaciones), en el que es necesario una revisión crítica del concepto de especie, así como una redefinición de los criterios que definen grupos de anastomosis.

La presencia de dos núcleos por célula hifal, comportamiento saprofitico, posesión de un anamorfo tipo *Ceratorhiza* y los caracteres morfológicos (incluyendo estructuras himeniales) exhibidos por los basidiomas de los diferentes aislados, permiten situar la nueva especie descrita en el género *Ceratobasidium*. *C. albasitensis* es caracterizado por su hábitat en suelo, basidios largos y esferopedunculados, esporas ovoides a subelipsoidales y esterigmas extremadamente largos (hasta 35.7 μ m), diferenciándose claramente de otras especies de *Ceratobasidium*. *C. stridii* J. Erikss. &



Ryvarden, un táxon poco frecuente del norte de Europa caracterizado por poseer esporas de $5.5 \times 3-4 \mu\text{m}$, recuerda a *C. albasitensis*, pero según la literatura disponible (Eriksson y Ryvarden, 1973; Roberts, 1999), las esporas de *C. stridii* deben ser consideradas como de oblongas a fusiformes ($Q=1.5-1.9$). Además, se han descrito que las esporas de *C. stridii* producen esporas secundarias en su mayoría apicalmente, característica no constante a lo largo del género, y ausente en *C. albasitensis*. El táxon más común y ubiquista del género, *C. cornigerum* difiere de *C. albasitensis* en la posesión de basidiocarpos subcer ceos (no peliculares) con basidios cuboides a papilados de menor tamaño y lateralmente pedunculados, esporas de mayor tamaño (hasta $12.5 \mu\text{m}$ de longitud) elipsoidales a fusiformes e incluso a veces subcilíndricas ($Q=1.4-2$) y esterigmas de hasta $12 \mu\text{m}$ de longitud (Rogers, 1935; Eriksson y Ryvarden, 1973; J ulich, 1989; Roberts, 1999, etc). *C. obscurum* Rogers, un táxon descrito habitualmente como simbiote en *Orchidaceae* (Warcup, 1967) y actualmente combinado a *Thanatephorus obscurum* (Rogers) P. Roberts (Roberts, 1999), recuerda a también a *C. albasitensis*, pero aunque posee esporas subglobosas a anchamente elipsoidales con $Q=1.2-1.4$ (no solapantes en los rangos de anchura y longitud), debe ser considerado definitivamente como una especie de *Thanatephorus*, tal y como apunta Roberts (1998) en su estudio de la colección tipo de *C. obscurum*, donde el mencionado autor describe basidios oblongos que forman empalizadas himeniales compactas, además de una ecología parasítica sobre madera de *Ulmus sp.*

Las medidas morfológicas de *C. albasitensis* y otras especies de *Ceratobasidium* relacionadas, quedan resumidas en la tabla III.



Tabla I. Aislados empleados en este estudio. Tipo de hospedante, tamaños de ITS1, ITS2, de la región rDNA-ITS total, y números de acceso de EMBL o GenBank. **a)** aislados de *C. albasitensis*, **b)** aislados testigos de grupos de anastomosis en *Rhizoctonia* binucleada. **c)** otros aislados.

a) Aislado	Origen		ITS1	ITS2	Total	N° Acceso
Eab-F1	<i>Crocus sativus</i>		184	231	570	AJ242875
Eab-F2	<i>Crocus sativus</i>		185	230	570	AJ242876
Eab-F3	<i>Crocus sativus</i>		184	230	569	AJ242877
Eab-F5	<i>Crocus sativus</i>		184	230	569	AJ242878
Eab-F6	<i>Crocus sativus</i>		184	230	569	AJ242879
Eab-F7	<i>Crocus sativus</i>		184	232	571	AJ242880
Eab-S1	<i>Crocus sativus</i>		185	231	571	AJ242881
Eab-S5	<i>Crocus sativus</i>		184	230	569	AJ242885
Eab-S6	<i>Pinus halepensis</i>		184	230	569	AJ242886

b) Aislado	AG	Origen	ITS1	ITS2	Total	N° Acceso
C-662	AG A	Soil	188	223	566	AJ242890
BN4	AG A (CAG2)	Soil	188	223	566	AJ242891
SIR-2	AG B(o)	<i>Ipomoea batatas</i>	185	230	570	AJ242892
C-455	AG Bb	<i>Oryza sativa</i>	185	230	570	AJ242893
70B	AG C	Soil	189	223	567	AJ242894
C-610	AG D	unknown	189	223	567	AJ242895
Rh155	AG E	unknown	190	223	568	AJ242896
C-653	AG G	unknown	183	232	570	AJ242897
AV-2	AG I	<i>Artemisia sp.</i>	183	229	567	AJ242898
184	AG J	unknown	183	229	567	AJ242899
FA59209	AG K	unknown	193	237	585	AJ242900
76146	AG L	unknown	190	222	567	AJ242901
TC1	AG N	unknown	186	230	571	AJ242902
76150	AG P	unknown	187	230	572	AJ242903

c) Aislado	Origen		ITS1	ITS2	Total	N° Acceso
<i>R. cerealis</i>	<i>Poa annua</i>		212	231	598	AF063019
C. o-s 2	<i>Oryza sativa</i>		226	249	630	AJ000192
C o-s 1	<i>Oryza sativa</i>		227	249	631	AJ000191
C o-s 3	<i>Oryza sativa</i>		226	249	630	AJ000193
C o-s 4	<i>Oryza sativa</i>		226	248	631	AJ000194
Rh2815	<i>Vicia faba</i>		188	228	571	U19962
521	soil		190	230	575	U19950
C1 (CAG-1)	<i>Festuca</i>		198	241	594	AJ301903
C2 (CAG-2)	<i>Pittosporum</i>		198	238	591	AJ301899
C4 (CAG-3)	<i>Juniperus</i>		191	243	589	AJ301900
C5 (CAG-5)	<i>Taxus</i>		190	240	585	AJ301901
C6 (CAG-6)	<i>Erigeron canadiensis</i>		185	236	576	AJ301902
C8 (CAG-7)	<i>Pittosporum</i>		190	245	590	AJ302006
C11	<i>Triticum aestivum</i>		210	231	596	AJ302007
C13	<i>Triticum aestivum</i>		210	231	596	AJ302009
C12	<i>Triticum aestivum</i>		210	231	596	AJ302008
Eab-aB	<i>Medicago sativa</i>		228	242	625	AJ302010
Eab-S3	<i>Crocus sativus</i>		185	233	573	AJ242883
<i>W. circinata</i> I	<i>Oryza sativa</i>		213	198	566	AJ000196
<i>W. circinata</i> II	<i>Oryza sativa</i>		212	198	565	AJ000195
<i>A. bisporus</i>	unknown		294	207	656	AJ301619
<i>S. vermifera</i>	<i>Orchidaceae</i>		171	199	525	AF202728



Tabla II. Porcentaje de divergencia nucleotídica entre los nueve grupos reconocidos en el árbol filogenético.

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9
G1	0.00- 6.27	14.09- 17.84	13.03- 18.24	14.89- 17.38	10.84- 12.80	10.44- 13.02	10.48- 14.61	31.67- 33.48	40.64- 43.48
G2		3.15- 13.88	15.16- 22.80	15.75- 25.22	10.57- 14.38	12.07- 13.99	11.63- 15.94	34.07- 40.23	42.90- 44.56
G3			0.16- 8.46	16.46- 17.75	13.23- 15.85	11.80- 15.06	12.89- 17.82	36.19- 39.46	42.03- 43.61
G4				0.34- 1.53	13.84- 15.09	13.67- 15.43	14.78- 16.65	38.25- 39.19	43.01- 43.72
G5					0.00- 1.06	4.56- 6.30	6.27- 8.35	30.56- 31.52	40.32- 41.71
G6						0.18- 2.88	7.34- 10.02	29.83- 31.15	40.08- 40.32
G7							0.35- 4.37	29.61- 30.85	39.05- 41.83
G8								0.53	45.24- 45.37
G9									-----

Tabla III. Comparación microscópica entre *C. albasitensis*, *T. obscurum*, *C. stridii* y *C. cornigerum*

Especie	Esporas	Q	Esterigmas	Hábitat
C. albasitensis	5-7(-8) x 4-5.5(-6)	1.2-1.4	-35.7µm long.	Saprotítico ¹
C. stridii	5.5-7.5 x 3-4	1.5-1.9	-8 µm long.	Saprotítico ^{2,3}
T. obscurum	8-10 x 6-7	1.2-1.4	-12.5 µm long.	Parasítico ³
C. cornigerum	(6.5-)7-11.5 x 3.5-6	1.9-2	-12 µm long.	Saprotítico, parasítico y simbiote ^{3,4}

1 ESTE TRABAJO; 2 ERIKSSON & RYVARDEN, 1973; 3 ROBERTS, 1999; 4 ROGERS, 1935



2 AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto BIO1997-0760-C02-02 de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) y por Merck, Sharp & Dohme de España, S.A. Los autores agradecen a D. Manuel Villarreal (Universidad de Alcalá, España) los dibujos realizados y su ayuda en la redacción del manuscrito.

3 BIBLIOGRAFÍA

Andersen, T.F. 1996. A comparative taxonomic study of *Rhizoctonia* sensu lato employing morphological, ultrastructural and molecular methods. *Mycol. Res.* 100(9): 1117-1128.

Andersen, T.F. & J.A. Stalpers. 1994. A check-list of *Rhizoctonia* epithets. *Mycotaxon* 51: 437-457.

Burpee, L.L., Sanders, P.L. & Cole Jr., H. 1980a. Anastomosis groups among isolates of *Ceratobasidium cornigerum* and related fungi. *Mycologia* 72: 689-701.

Burpee, L.L., Sanders, P.L., Cole Jr., H. & Sherwood, R.T. 1980b. Pathogenicity of *Ceratobasidium cornigerum* and related fungi representing five anastomosis groups. *Phytopathology* 70: 843-846.

Boysen, M., Borja, M., del Moral, C., Salazar, O. & V. Rubio. 1996. Identification at strain level of *Rhizoctonia solani* AG4 isolates by direct sequence of asymmetric PCR products of the ITS regions. *Curr. Genet.* 29: 174-181.

Cubeta, M.A., Echandi, E., Abernethy, T. & Vilgalys, R. 1991. Characterization of anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* species using restriction analysis of an amplified ribosomal RNA gene. *Phytopathology* 81: 1395-1400.

Eriksson, J. & L. Ryvarden. 1973. *The Corticiaceae of North Europe*. 2. Oslo. Fungiflora.

Felsenstein, J. 1985. Confidence intervals on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.

Felsenstein, J. 1993. *PHYLIP manual version 3.5*. Seattle: University of Washington.



Flentje, N.T. 1956. Studies on *Pellicularia filamentosa* (Pat.) D.P. Rogers-I. Formation of the perfect stage. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 39: 343-356.

Gunell, P.M. & R.K. Webster. 1987. *Ceratobasidium oryzae-sativae* sp. nov., the teleomorph of *Rhizoctonia oryzae-sativae* and *Ceratobasidium setariae* comb. nov., the probable teleomorph of *Rhizoctonia fumigata* comb.nov. *Mycologia* 79: 731-736.

Hawksworth, D.L., Kirk, P.M. Sutton, B.C. & D.N. Pegler. 1995. *Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi*. International Mycological Institute, CAB International, Wallingford. UK.

Hietala, A.M., Sen, R. & A. Lilja. 1994. Anamorphic and teleomorphic characteristics of a uninucleate *Rhizoctonia* sp. Isolated from the roots of nursery grown conifer seedlings. *Mycol. Res.* 98: 1044-1050.

Johanson, A., Turner, H.C., McKay, G.J. & Brown, A.E. 1998. A PCR-based method to distinguish fungi of the rice sheat-blight complex. *Rhizoctonia solani*, *R. oryzae* and *R. oryzae-sativae*. *FEMS Microbiol. Let.* 162: 289-294.

Julián, M. C., Dullemans, A. M., Silfhout, C., and Keijer, J. 1997. Nuclear behavior in homokaryotic and heterokaryotic fruiting of *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) anastomosis group 1, subgroup IC. *Mycologia* 89: 361-374.

Jülich, W. 1989. *Guida alla determinazione dei funghi. Vol.2. Aphylophorales, Heterobasidiomycetes, Gastromycetes*. Trento. Saturnia.

Leclerc-Potvin, C., Balmas, V., Charest, P.M. & Jabaji-Hare, S. 1999. Development of reliable molecular markers to detect non-pathogenic binucleate *Rhizoctonia* isolates (AG-G) using PCR. *Mycol. Res.* 103(9): 1165-1172.

Masuhara, G., Neate, S.M. & D.A. Schisler. 1994. Characteristics of some *Rhizoctonia* spp. from South Australia plant nurseries. *Mycol. Res.* 98(1): 83-87.

Moore, R.T. 1987. The genera of *Rhizoctonia*-like fungi: *Ascorhizoctonia*, *Ceratorhiza* gen. nov., *Epulorhiza* gen. nov., *Moliniopsis*, and *Rhizoctonia*. *Mycotaxon* 29: 91-99.

Moore, R.T. 1978. Taxonomic significance of septal ultrastructure with particular reference to the jelly fungi. *Mycologia* 70: 1007-1024.



Moore, R.T. 1996. The dolipore/parenthesome septum in modern taxonomy. In: *Rhizoctonia species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control* (Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S. & G. Dijst, eds.). Dordrecht. Kluwer Academic Publishers.

Mordue, J.E.M., Currah, R.S. & P.D. Brigde. 1989. An integrated approach to *Rhizoctonia* taxonomy: cultural, biochemical and numerical techniques. *Mycol. Res.* 92: 78-90.

Murray, D.I.L. 1982. A modified procedure for fruiting *Rhizoctonia solani* on agar. *Trans. Br. mycol. Soc.* 79: 129-135.

Murray, D.I.L. 1984. Cultural conditions influencing basidium formation in the Ceratobasidiaceae. *Aus. J. Bot.* 32: 101-108.

Murray, D.I.L. & L.L. Burpee. 1984. *Ceratobasidium cereale* sp. nov., the teleomorph of *Rhizoctonia cerealis*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 82: 170-172.

Ogoshi, A. 1975. Grouping of *Rhizoctonia solani* K_{uhn} and their perfect states. *Rev. Plant Prot. Res. Japan* 8: 98-103.

Ogoshi, A., Oniki, M., Araki, T. & T. Ui. 1983. Studies on the anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* and their perfect states. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* 61: 244-260.

Oniki, M., Ogoshi, A. & Araki, T. 1986. *Ceratobasidium setariae*, *C. cornigerum* and *C. graminearum*, the teleomorphs of the pathogenic binucleate *Rhizoctonia* fungi from gramineous plants. *Trans. Mycol. Soc. Jpn.* 27: 147-158.

Roberts, P. 1998. *Ceratobasidium obscurum*: an atypical *Thanatephorus* species, misinterpreted as an orchid associate. *Mycol. Res.* 102: 1074-1076.

Roberts, P. 1999. *Rhizoctonia-forming fungi: a taxonomic guide*. Royal Botanical Gardens, Kew. 239 pp.

Rogers, D.P. 1935. Notes on the lower Basidimycetes. *Stud. Nat. Hist. Iowa Univ.* 17: 1-43.

Sneh, B., Burpee, L. & A. Ogoshi. 1991. *Identification of Rhizoctonia species*. St. Paul. APS Press.

Sneh, B. 1998. Use of non-pathogenic or hypovirulent fungal strains to protect plants against closely related fungal pathogens. *Biotech. Adv.* 16: 1-32.



Stalpers, J.A. & T.F. Andersen. 1996. A synopsis of the taxonomy of teleomorphs connected with *Rhizoctonia* s.l. In: *Rhizoctonia species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control* (Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S. & G. Dijst, eds.). Dordrecht. Kluwer Academic Publishers.

Swofford, D.L. 1993. *PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony, version 3.1.1*. Washington DC: Smithsonian Institution, Laboratory of Molecular Systematics.

Talbot, P.H.B. 1965. Studies on 'Pellicularia' and associated genera of hymenomycetes. *Persoonia* 3: 371-406.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuc. Acids Res.* 22: 4673-4680.

Toda, T., Hyakumachi, M., Suga, H., Kageyama, K., Tanaka, A. & Tani, T. 1999. Differentiation of *Rhizoctonia* AG-D isolates from turfgrass into subgroups I and II based on rDNA and RAPD analyses. *Eur. J. Plant Pathol.* 105: 835-846.

Tu, C.C., D.A. Roberts & Kimbrough. 1969. Hyphal fusion, nuclear condition, and perfect stages of three species of *Rhizoctonia*. *Mycologia* 61: 775-783.

Warcup, J.H. & P.H.B. Talbot. 1967. Perfect states of *Rhizoctonias* associated with orchids. *New Phytol.* 66: 631-641.



PIE DE FIGURAS

Figs. 1—4. *Ceratobasidium albasitensis*. **a**; hifas del subículo, **b**; estrato himenial (basidios y basidiolos), **c**; esporas, **d**; células molinioides. Barras: 10 y 20 μm respectivamente.

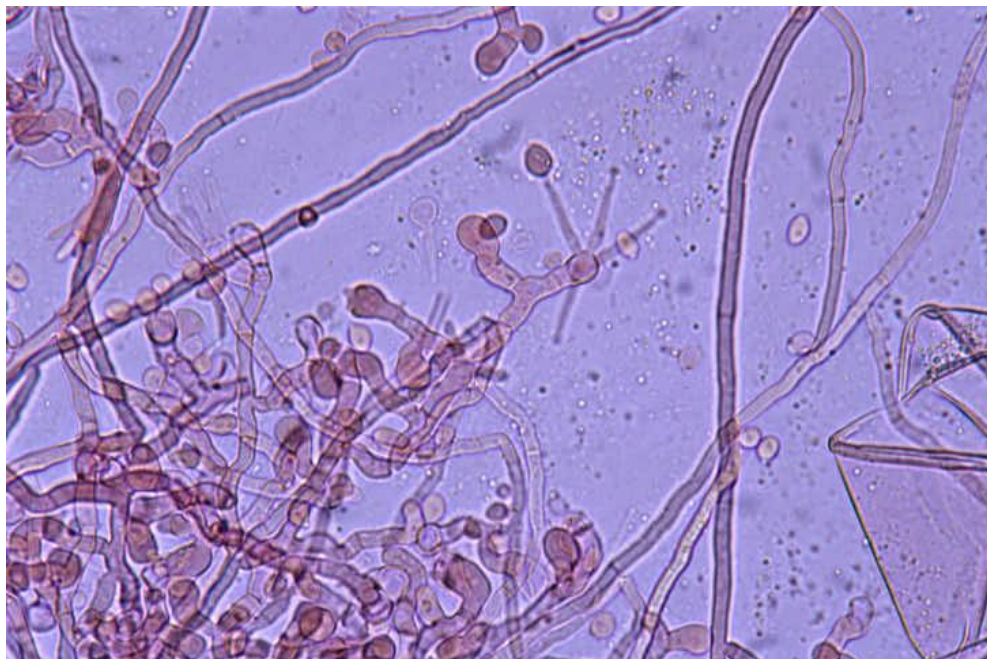


Fig. 5. Árbol filogenético generado mediante el método de máxima parsimonia utilizando el programa PAUP 3.1.1. Como cepa externa de referencia fué utilizada la secuencia ITS de un aislado de *Agaricus bisporus*. Se indican además los índices de bootstrap para valores por encima del 50% y los de decaimiento para valores por encima de 10 pasos.



Longitud =
1008
CI = 0.6577

