

Ultraestructura del Hongo *Rhizoctonia solani* Kuehn, Patógeno de *Phaseolus vulgaris* L. var. 'Seminole' en Venezuela¹

M. Cedeño*, R. Luis*, E L. Palacios Priú**

ABSTRACT

The ultrastructure of *Rhizoctonia solani* Kuehn, pathogen on *Phaseolus vulgaris* L. var. 'Seminole' was investigated with high resolution light microscopy. Two micrometer sections were stained using p-phenylendiamin 1.5% and azur II followed by a second immersion in p-phenylendiamin 1.5%. Hyphae cells were found to be multinucleated, not showing more than four nuclei. Ultrastructurally the hyphae had abundant cytoplasmic organelles including numerous mitochondriae and rough and smooth endocyttoplasmic reticulum cisternae; hyphae measured $6.045 \pm 0.304 \mu\text{m}$ average diameter at the septa level; the cytoplasmic matrix was seen constantly dense with high amounts of glycogen particles and free ribosomes. A great diversity of vacuoles and vesicles, liposome bodies without membrane and tubule-membranous structures was also found. Ovoid nuclei were usually located at the periphery of the cytoplasm. These nuclei measured $2.66 \pm 0.390 \mu\text{m}$ in length and $1.99 \pm 0.168 \mu\text{m}$ in width. Well developed nucleoli were seen close to the nuclear envelope and the chromatin was observed uniformly distributed within the nuclei. The septum is formed by a deep cell wall invagination which seems to drag the cytoplasmic membrane of the two adjacent cells originating the saccular structure of the septum. Inside the saccular cavity the cell wall appeared to become fragmented producing numerous branches giving the saccule a trabecular appearance. The septal pore apparatus appears in a central position in the saccular septum and its interior is occupied by a complex membranous system. At both ends of the septal pore the pore plugs were located and are composed of a high electron-dense and homogenous material surrounded by a regular and smooth membrane. The pore cap consists of a homogenous, electron-dense material, surrounded by a smooth mebrane which is in continuity with the saccular membrane. Contractile-like filamentous proteins perpendicularly oriented to the septum were observed at the sub-cap matrix.

INTRODUCCION

La información disponible sobre el género *Rhizoctonia*, establecido en 1815 por De Candolle (14, 17) es controversial y confusa. En el género, el concepto de especie ha sido modificado en reiteradas oportunidades a causa de la variabilidad morfológica que presentan los hongos incluidos en él (37). La complejidad y heterogeneidad del grupo tiene su origen, aparentemente, en el uso casi exclusivo de las

COMPENDIO

La ultraestructura del hongo *Rhizoctonia solani* Kuehn, patógeno de *Phaseolus vulgaris* L. var. 'seminole', fue investigada utilizando microscopía de luz de alta resolución, microscopía de contraste de interferencia y microscopía electrónica de transmisión. Las secciones de $2 \mu\text{m}$ para microscopía de luz de alta resolución fueron contrastadas con los siguientes reactivos: parafenilendiamina 1.5%, azur II y luego parafenilendiamina 1.5%. Las células hifales así preparadas resultaron ser multinucleadas y en ningún caso mostraron más de cuatro núcleos. En el nivel ultraestructural las hifas tienen un diámetro promedio de $6.045 \pm 0.304 \mu\text{m}$ al nivel de la septa y muestran abundantes organelas citoplásmicas entre las que se destaca una gran cantidad de mitocondrias, la matriz citoplásmica densa y cargada de glucógeno, retículo endocitoplásmico liso y rugoso y numerosos ribosomas libres. También se encontró una gran variabilidad vesicular y vacuolar, cuerpos de aspecto liposomal sin membranas y estructuras túbulomembranosas. Los núcleos son de forma ovoidal con dimensiones de $2.66 \pm 0.390 \mu\text{m}$ en su diámetro mayor y $1.99 \pm 0.168 \mu\text{m}$ en el diámetro menor. Estos núcleos usualmente se ubican en las porciones más periféricas del citoplasma celular, y en ellos la cromatina se observa uniformemente distribuida. Los nucleolos aparecen en posición periférica y adosados a la cisterna perinuclear. El complejo septal está integrado por la septa, o tabique, y el aparato del poro septal. La septa se forma por invaginación de la pared celular que arrastra las membranas citoplásmicas de las células contiguas y originan el sáculo. En el interior del sáculo la pared celular pareciera 'deshilacharse' para constituir una estructura esponjosa con ramificaciones que le confieren una apariencia cribosa o trabecular. En el área central del sáculo se encuentra el poro septal, que contiene en su interior un complejo sistema de membranas. A ambos lados del poro están ubicados el tapón del poro, que da la impresión de ser ocluyente, y la corona en forma de cápsulas conformadas por láminas que se ven compactadas por la presencia de un material electrón-denso. En la matriz sub-coronaria aparecen proteínas filamentosas del tipo contráctil.

descripciones basadas en las características miceliales, pues estos hongos comúnmente aparecen en su fase asexual o vegetativa y rara vez fructifican en forma natural o inducida. Transcurrido un siglo desde la creación del género, Duggar (17) trató de resolver esta contradicción, mediante el reconocimiento de la existencia de dos especies principales, *R. crocorum* y *R. solani*, y señalando a las restantes hasta entonces erigidas como pertenecientes a una de las dos especies principales. Sin embargo, en el lapso comprendido entre 1915 y 1961 (37) se describieron 57 nuevas especies entre las cuales algunas presentan diferencias morfológicas significativas y en las que las descripciones de varias de ellas están incompletas y otras fueron caracterizadas en función de parámetros miceliales que, por ser aspectos inconsistentes, carecen de im-

¹ Recibido para publicación el 28 de enero 1988.

* Sección de Fitopatología, Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Universidad de Los Andes Apartado Postal 220 Mérida 5101, Venezuela.

** Centro de Microscopía Electrónica. Universidad de Los Andes. Apartado Postal 163. Mérida 5101, Venezuela.

portancia taxonómica. Esto significa que la confusión dentro del género persistía.

En el género *Rhizoctonia* la especie más notoria es *R. solani* Kuehn, un hongo habitante natural del suelo que ha sido reportado en diferentes partes del mundo como patógeno de un extenso rango de especies vegetales con reconocida importancia agrícola, hortícola y forestal (1, 2, 22, 26, 30, 37, 44). Su parasitismo parece haber evolucionado según tres patrones distintos: subterráneo, superficial y aéreo (25). *R. solani* es considerado capaz de provocar putrefacción de raíces, bulbos, brotes, coronas, estolones y rizomas, "sancocho" ("damping-off") pre-emergente y post-emergente, chancros en los tallos, quemazón en el follaje y descomposición de las semillas y los frutos de una gran diversidad de cultivos agrícolas (3, 5, 25). Es opinión general que *R. solani* es una especie extremadamente variable por lo que se le atribuyen numerosas razas o cepas naturales que difieren en su comportamiento ecológico, fisiológico, genético y patológico y en las características de las colonias producidas en los medios de cultivo (4, 9, 10, 12, 18, 19, 21, 26, 27, 29, 31, 32, 33, 40, 41, 42, 50, 51).

En 1967, por primera vez Parmeter *et al.* (35) demostraron, por medio del análisis de las características nucleares y de la fase sexual, que algunos hongos clasificados en el pasado como *R. solani* son otros que tienen una morfología hifal similar a la que posee *R. solani*. Ellos separaron numerosas cepas de *R. solani* y otras especies de *Rhizoctonia* en dos grupos, uno integrado por los hongos provistos de células vegetativas binucleadas y otro donde incluyeron los hongos con células multinucleadas. Los binucleados produjeron un estado sexual perteneciente al género *Cerotobasidium*, y los multinucleados desarrollaron como fase sexual a *Thanatephorus cucumeris*. La especie *T. cucumeris* (Frank) Donk es hoy unánime y universalmente aceptada como la fase reproductiva de *R. solani* (34, 45). A partir de las investigaciones realizadas por Parmeter *et al.* (35), el número de núcleos se constituyó en el criterio taxonómico más importante para el reconocimiento de las cepas de *R. solani*. La multiplicidad nuclear de sus células vegetativas ha sido corroborada por otros investigadores (8, 23, 43, 46, 47, 49, 52), quienes han desarrollado algunos procedimientos de tinción nuclear para el diagnóstico rutinario de *R. solani* y hongos semejantes. Las sustancias mayormente utilizadas para la tinción de los núcleos de estos hongos son: azul de anilina (8, 23, 46, 47), azul de trypan (8, 23, 38), giemsa (11, 20, 23, 24, 36, 47), hematoxilina (36), orceína (49), safranina O (52), y acridina naranja (52). Según Herr (23), las llamadas tinciones rápidas permiten la separación preliminar de estos hongos en binucleados y multinucleados, pero a veces fallan en el revelado

de los núcleos de algunas cepas y las preparaciones tienen la particularidad de deteriorarse prontamente, aun cuando se conserven bajo condiciones de refrigeración. En el microscopio de contraste de fase los núcleos de *R. solani* miden 2-3 μm (20), mientras que bajo el microscopio de luz simple han presentado dimensiones de 1.9-2.4 μm (49), 2-2.4 μm (23) y 2-2.5 μm (23) con tinciones de aceto-orceína, Hcl-giemsa y los azules de anilina y trypan respectivamente. El número de núcleos de *R. solani* jamás ha sido investigado con microscopía de luz de alta resolución. Por otra parte, con excepción del estudio realizado por Bracker y Butler (6) la mayoría de los análisis ultraestructurales practicados a *R. solani* han estado dirigidos fundamentalmente hacia el conocimiento de la configuración y estructuración del complejo septal (7, 28, 39, 47).

En Venezuela, Díaz y Salas (16), en su "Lista de patógenos de las plantas cultivadas en Venezuela", registran a *R. solani* como causante de enfermedades en importantes cultivos agrícolas; sin embargo, en el país se han realizado muy pocos estudios relativos a la biología del patógeno.

Tomando en consideración el impacto económico que representa *R. solani* para el agro venezolano y las dificultades que existen para su identificación, nos propusimos investigar una cepa de *R. solani* aislada de plantas enfermas de *P. vulgaris* L. var. 'Seminole', utilizando microscopía de luz de alta resolución, microscopía de contraste de interferencia y microscopía electrónica de transmisión, con el propósito de describir sus características nucleares y ultraestructurales para contribuir a mejorar el conocimiento sobre su biología celular.

MATERIALES Y METODOS

El hongo objeto de estudio fue aislado de plantas *P. vulgaris* L. var. 'Seminole' afectadas por lesiones hundidas y de color marrón-rojizo que eventualmente estrangulan los tallos y provocan la muerte de las plantas. Su patogenicidad fue comprobada mediante inoculaciones que permitieron reproducir en el laboratorio una sintomatología similar a la observada en el campo.

El material necesario para los análisis de microscopía de luz de alta resolución (MLAR) y microscopía electrónica de transmisión (MET), se produjo haciendo crecer el hongo durante 65 horas a temperatura ambiente, sobre discos estériles de papel celofán (7 cm de diámetro) depositados en la superficie de placas de medio papa-extracto de levaduras -dextrosa-agar (PYDA, PDA más extracto de levaduras al 0.75%) (47). Las colonias fueron separadas del papel

celofán humedeciéndolas previamente con solución fijadora de paraformaldehído 3% y glutaraldehído 3% en tampón cacodilato de sodio 0.1 M y pH 6.3. Fue imprescindible utilizar resinas diferentes y procedimientos de fijación e inclusión parcialmente distintos para poder obtener preparados que cumplieran, de manera satisfactoria, las exigencias de las técnicas de MLAR y MET. Los materiales destinados a MLAR y MET se incluyeron en las resinas EPON 812 y SPURR, respectivamente. El procedimiento utilizado fue el siguiente: 1) seleccionar el material y con un sacabocado estéril cortar discos miceliales de 4 mm de diámetro; 2) fijar por 4 horas a 4°C con una mezcla de paraformaldehído y glutaraldehído diluidos cada uno de ellos al 3% en solución tampón 0.1 M de cacodilato de sodio pH 6.3; 3) lavar varias veces con el mismo tampón; 4) postfijar durante una noche a 4°C con tetraóxido de osmio preparado al 1% en tampón 0.1 M de cacodilato de sodio pH 6.3; 5) lavar varias veces con igual tampón; 6) deshidratar en soluciones seriadas de alcohol etílico (30, 50, 80 y 100%) el material a incluir en EPON 812 y en iguales soluciones de alcohol etílico más dos cambios de acetona absoluta cuando se usa SPURR; 7) infiltrar el material seleccionado para MLAR con mezclas graduales de óxido de propileno-EPON 812, y en acetona-SPURR el destinado a MET; 8) incluir en EPON 812 y SPURR puros; 9) polimerizar los plásticos en estufa a 60°C durante 48 horas mínimo.

Durante la deshidratación los materiales fueron tratados por 2 horas con acetato de uranilo diluido al 2% en alcohol etílico 70%. Las secciones gruesas y finas se cortaron con una cuchilla de diamante incorporada a un ultramicrotomo Porter Blum MT-2. Las secciones gruesas se trataron con una combinación de parafenilendiamina 1.5% -azur II-para fenilendiamina 1.5%, mientras que en la "tinción" de las secciones finas aplicamos el procedimiento reportado por Daddo (13) con algunas modificaciones. Los análisis de MLAR se realizaron con un microscopio fotónico Polyvar y los de MET con un equipo HITACHI H-500.

RESULTADOS

A. Microscopía de luz de alta resolución:

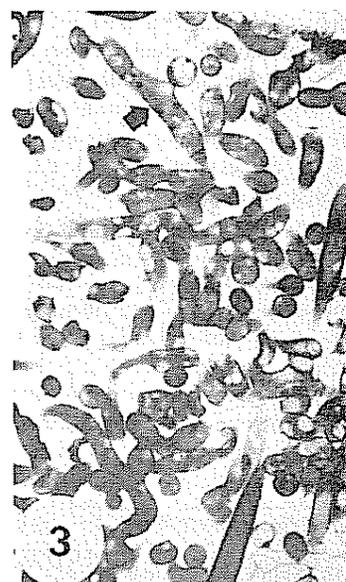
La MLAR resultó ser una excelente técnica para el revelado de los núcleos hifales del hongo investigado. Su aplicación permitió diferenciar en forma clara y evidente las estructuras nucleares de otros componentes celulares que, por sus afinidades con los colorantes de uso común en el diagnóstico rutinario de *R. solani* y los hongos afines, pueden ser confundidos fácilmente con los núcleos bajo microscopía de luz normal. Las células vegetativas de la cepa de hongo aislada de

P. vulgaris L. var 'Seminole' presentaron como característica ser multinucleares. Sin embargo, en ningún caso pudimos detectar células con más de cuatro núcleos (Figs. 1-3). El colorante azul II y la reacción con parafenilendiamina en solución acuosa al 1.5%, mostraron los núcleos claramente cuando fueron usados individualmente, pero la combinación de ambos en la siguiente serie: para fenilendiamina-azur II-para fenilendiamina proporcionó más y mejores detalles, tanto de los núcleos como de otras estructuras celulares. La preparación del azul II en partes iguales de alcohol etílico absoluto y agua destilada resultó ser más efectiva que su dilución en agua exclusivamente. La extracción de los excesos de azul II y para fenilendiamina con solución acuosa 1% de ácido acético glacial favoreció la visualización de los núcleos.

B. Microscopía electrónica de transmisión:

En las secciones longitudinales y a bajo aumento en el microscopio electrónico de transmisión (Fig. 6), las hifas del hongo presentaron una riqueza citoplásmica altamente significativa cuando se comparan con otros estudios ultraestructurales (5, 6, 48). La enorme riqueza citoplásmica de estas células es mayor en las hifas jóvenes que en las adultas. Esta diferencia citoplásmica se contrasta fácilmente en la Fig. 7, donde una hifa vieja, cortada en sección transversal, muestra acúmulos de lípidos y escasas mitocondrias de tamaño reducido. En cada célula hifal pudimos apreciar claramente abundantes mitocondrias y una matriz citoplásmica densa, cargada de glucógeno disperso y en acúmulos de dimensiones variables alternando con ribosomas libres (Fig. 6). Las mitocondrias son alargadas y finas y presentan las mismas características ultraestructurales descritas en la mayoría de las células eucarióticas (15), es decir, tienen una matriz mitocondrial, crestas mitocondriales y una doble membrana de cuya porción más interna se originan las crestas mitocondriales (Fig. 9). El retículo endocitoplásmico es de dos tipos, retículo endocitoplásmico liso (RL) y retículo endocitoplásmico rugoso (RR). Sin embargo, es necesario señalar que las cisternas del RR en realidad son mixtas (Fig. 9). Es decir, que algunos de sus segmentos tienen ribosomas adheridos y otros aparecen lisos.

En la mayoría de las células estudiadas usualmente se encontraron dos núcleos (Fig. 6). Estos núcleos se ubican por lo regular en las porciones más periféricas del citoplasma, son ovoidales y tienen dimensiones que oscilan entre 2.34 y 3.20 μm ($2.66 \pm 0.390 \mu\text{m}$) en su diámetro mayor y entre 1.75 y 2.11 μm ($1.90 \pm 0.168 \mu\text{m}$) en el menor. Los nucleolos aparecen localizados en posición periférica y ado-



Figs 1 y 2 Estas imágenes corresponden a dos secciones sucesivas del mismo conjunto de hilas de *R. solani* Con flechas se indican células con núcleos evidentes X 562.5

Fig. 3 En esta microfotografía aparece una célula con tres núcleos (flecha) X 652.5.

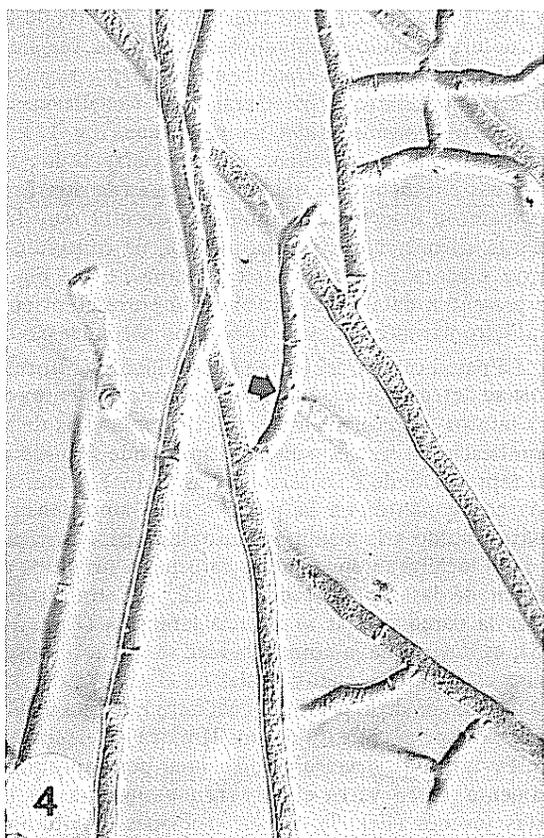


Fig. 4. Microfotografía lograda con el sistema óptico de contraste de interferencia (Nomarsky). En la célula indicada con una flecha se visualizan en relieve dos núcleos y otras estructuras no nucleares X 437.5.

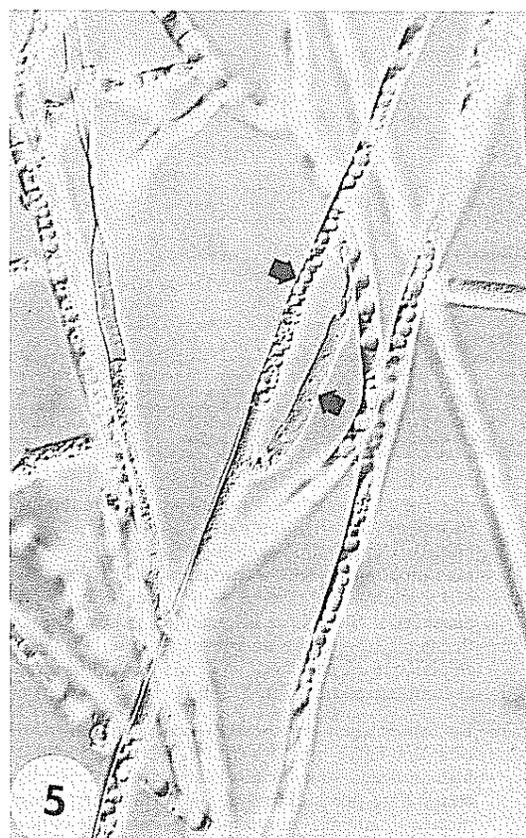


Fig 5 Imagen obtenida con el sistema de contraste de interferencia (Nomarsky) en la cual pueden verse células con una gran cantidad de vacuolas y granulaciones X 437.5

sados a la cisterna perinuclear. Cuando el corte es afortunado, los nucleolos se ven en los dos núcleos que se destacan en cada célula; sin embargo, frecuentemente la masa nucleolar sólo se observa en uno de los núcleos mientras que en el otro no aparece en el plano de sección (Fig. 6). En promedio el nucleolo ocupa un área de $0.625 \pm 0.115 \mu\text{m}^2$ que representa aproximadamente el 14.7% de la superficie total del núcleo que es de $4.252 \pm 0.810 \mu\text{m}^2$. La cromatina se observa uniformemente distribuida en toda el área nuclear (Fig. 8). La cisterna perinuclear está conformada por dos unidades de membrana como normalmente ocurre en las células nucleadas, y la pudimos apreciar irregularmente interrumpida por la presencia de poros que tienen las mismas características descritas en otros organismos eucarióticos (Fig. 9) (15).

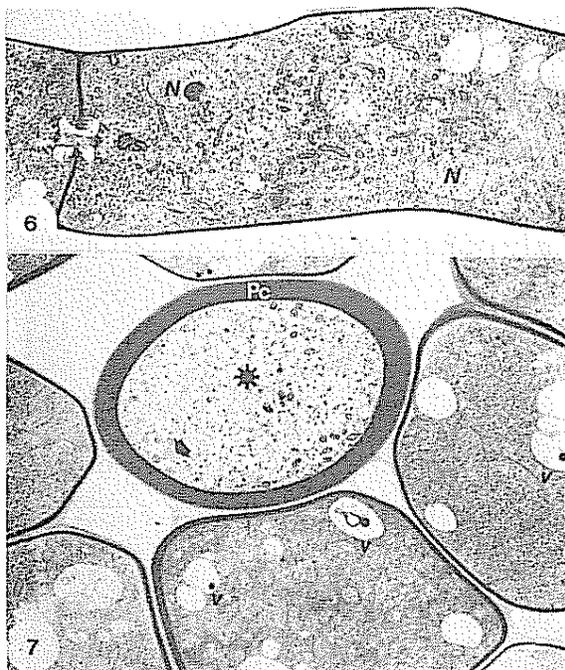


Fig. 6 Microfotografía electrónica en la cual podemos apreciar las características citológicas fundamentales de *R. solani*. En el interior del citoplasma se ven dos núcleos (N) próximos a la superficie celular; numerosas mitocondrias (m); vacuolas (v) de diversos tamaños y abundantes ribosomas libres en la matriz citoplasmática. El tabique intercelular, indicado con una flecha, se observa de mayor grosor que la fina pared celular que recubre toda la célula y se interrumpe en el complejo septal (Cs). X 7500

Fig. 7 En esta imagen se muestran las características diferenciales entre hifas jóvenes e hifas envejecidas. La hifa indicada con un asterisco tiene un citoplasma translúcido por la disminución de la matriz citoplasmática y, además, posee menor número de organelas celulares, mientras que está provista de una gruesa pared celular (Pc). Las hifas jóvenes que la rodean, por el contrario, tienen una mayor riqueza citoplasmática y paredes celulares de menor grosor. La flecha señala las lipoproteínas v. vacuolas. X 9000

Acompañan a las estructuras citoplásmicas anteriormente descritas una gran cantidad de vesículas y vacuolas de variadas dimensiones (Figs. 6 y 7). Por lo regular las vacuolas tienen muy poco contenido, con excepción de algunas que tienen un material medianamente electrón-denso que en determinadas circunstancias se compacta y aparece como pequeños gránulos densos (Fig. 7). Se observaron, con relativa frecuencia, la matriz citoplásmica, cuerpos densos que contienen en su interior un material homogéneo de aspecto lipoproteico rodeado por membrana (Fig. 8) y cuerpos de depósito de aspecto liposomal (LP) que simplemente constituyen masas de apariencia lipídica desprovistas de membrana (Fig. 10). Es importante señalar la existencia, en el citoplasma, de una gran diversidad de los llamados cuerpos túbulo-membranosos (Tm), de forma y tamaño variables, que son particularmente abundantes en las proximidades de las septas. Son estructuras citoplásmicas rodeadas por una membrana que encierra en su interior un conjunto de membranas o estructuras túbulo-membranosas. El cuerpo que se muestra en la Fig. 11 contiene en su interior estructuras túbulo-membranosas cortadas longitudinal y transversalmente, mientras que en la Fig. 12 se aprecia otro cuerpo que, además de las estructuras túbulo-membranosas, contiene vesículas de diferentes tamaños. Cuando estos cuerpos alcanzan su máximo desarrollo parecieran estar irregularmente recubiertos por una unidad de membrana (Fig. 11). El retículo endocitoplásmico, y en general todos los sistemas citomembranosos de las células de este hongo, parecen estar en continuidad y resulta muy frecuente encontrar una íntima relación de continuidad entre órganos membranosos o cisternas. En la Fig. 9 se presentan detalles de continuidad entre el retículo endocitoplásmico rugoso y la cisterna perinuclear.

La pared celular del hongo es continua y uniforme. Sólo se detectan irregularidades y ensanchamientos en los puntos de plegamiento, es decir, en cuellos de las ramificaciones hifales y en los sitios donde se originan las septas. Donde se desarrollan las septas se observan dos componentes en la pared celular, uno denso y más próximo a la membrana citoplásmica, y otro ralo o laxo localizado en las áreas cercanas a los sitios de origen de las septas (Figs. 11, 12, 15). En algunas hifas la pared celular se aprecia laminada (Figs. 14, 15), es decir, que la homogeneidad se pierde al observarse estriaciones longitudinales en el sentido del diámetro mayor de la pared, lo cual hace que esta última aparezca como constituida por láminas de crecimiento. En las hifas viejas la pared celular tiene aproximadamente cinco veces el grosor que muestra en las hifas jóvenes (Fig. 7). En las secciones longitudinales y en el complejo septal, las hifas maduras tuvieron un ancho promedio de $6.045 \pm 0.304 \mu\text{m}$.

El aparato septal del hongo bajo investigación es una estructura compleja con las siguientes dimensio-



Fig 8. En cortes transversales las células de *R. solani* muestran claramente la excentricidad nuclear (N), como se observa en esta fotografía. Cuerpos densos como los indicados con una flecha, fueron un hallazgo frecuente en estas células. Nótese la abundante cantidad de mitocondrias (m) y el nucléolo (N1) muy desarrollado X 18 000

Fig 9. En esta imagen, con mayor aumento, podemos apreciar poros de la cisterna perinuclear (flechas), retículo endocitoplásmico rugoso (RR) y detalles ultraestructurales de las mitocondrias (m) de *R. solani*. N, núcleo. X 45 000

nes: $2.555 \pm 0.162 \mu\text{m}$ de largo y $1.881 \pm 0.218 \mu\text{m}$ de ancho. La septa está constituida por una profunda invaginación de las células contiguas, acompañada por delgadas prolongaciones procedentes de la pared celular. En el sitio de constricción es característico observar una configuración de apariencia triangular en las secciones longitudinales (Figs. 12, 14, 15). En esta zona triangular de inicio de la constricción, la pared celular muestra el desfase de su organización laminar. Por encima de la constricción es evidente que la pared celular se continúa como una lámina densa, que deja en el centro de la estructura triangular un área más electrón-transparente. Bordeando las membranas citoplásmicas de las células contiguas se notan

dos láminas de pared celular, próximas y electrón-densas, separadas por una fina banda más electrón-transparente. Cada constricción finaliza en una estructura que hemos llamado sacular y que no es más que una distensión de las membranas citoplásmicas de las células contiguas (Figs. 12, 14). La estructura sacular midió $1.645 \pm 0.193 \mu\text{m}$ de largo y $0.762 \pm 0.131 \mu\text{m}$ de ancho. En el interior del sáculo la pared celular pareciera "deshilacharse" para conformar una estructura esponjosa que ocupa toda la cavidad sacular y origina prolongaciones que le confieren una apariencia cribosa (Fig. 14). En la cavidad sacular, sin embargo, se ven ramificaciones que desde la pared celular se conectan a las paredes internas de la membrana citoplásmica. El sáculo septal deja en su porción central un orificio propiamente dicho que constituye

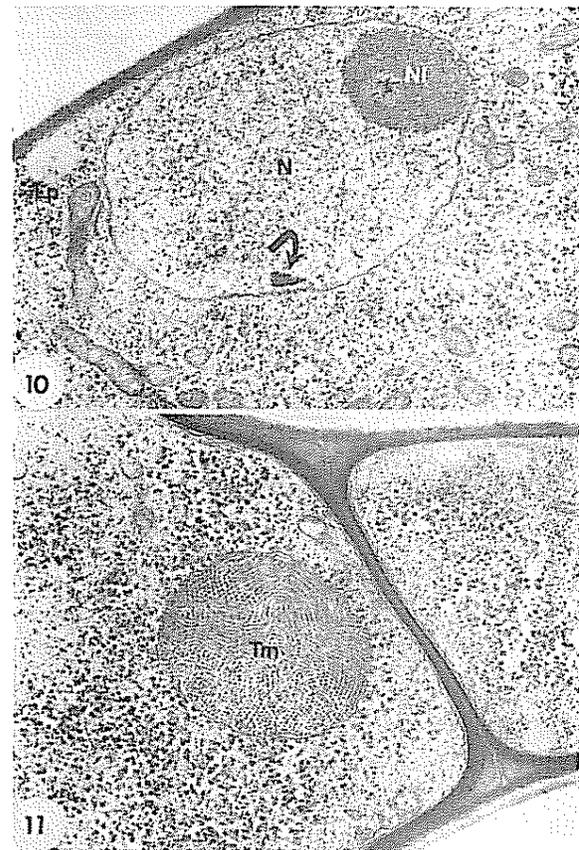


Fig 10. Algunos núcleos (N) de *R. solani* adoptan formas ovoidales como el caso mostrado en esta microfotografía. Tienen cuerpos cromatínicos (flecha) y un nucléolo (N1) de grandes proporciones. Lp, liposomas X 30 000

Fig 11. Cuerpos túbulo-membranosos (Tm) fueron frecuentemente detectados en el interior de las células de *R. solani*, como el mostrado aquí. Estas estructuras están rodeadas por una membrana que presenta interrupciones. En un mismo plano de sección se pueden apreciar secciones transversales y longitudinales de los túbulos X 30 000

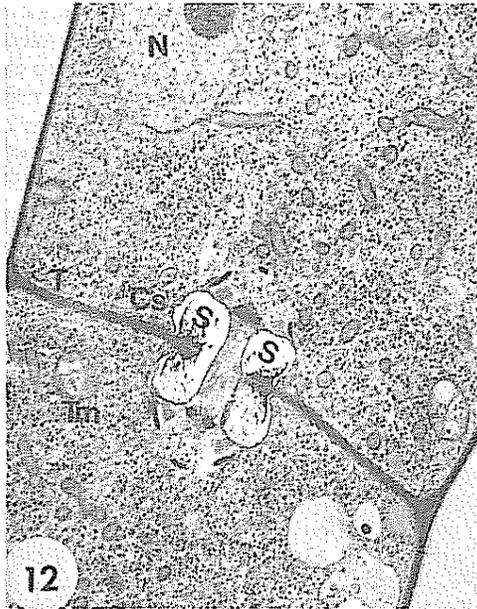


Fig 12 Imagen con menor aumento de todo el complejo septal (Cs) constituido por el tabique (T) más el sáculo (S) y las estructuras asociadas Tm, cuerpo túbulo-membranoso con vesícula y vacuolas en su interior; N núcleo

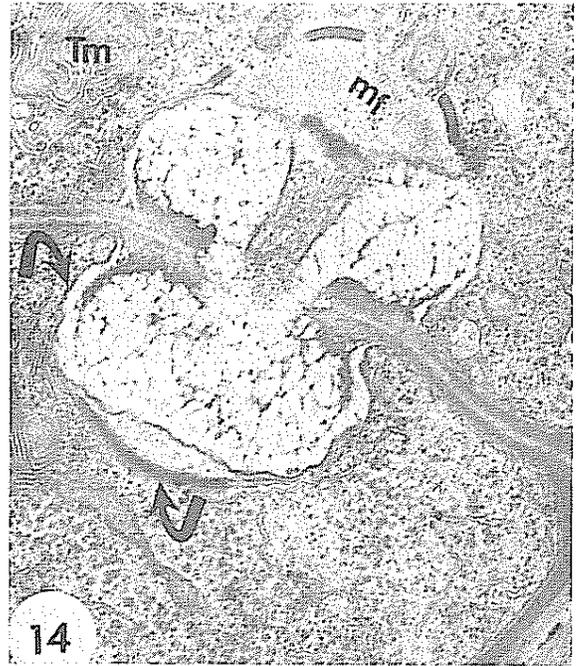


Fig 14 En esta imagen se ve claramente el componente microfilamentoso (mf) que ocupa el área subcoronaria. Con una flecha se señalan las estructuras coronarias y sacular Tm, cuerpo túbulo-membranoso X 30 000

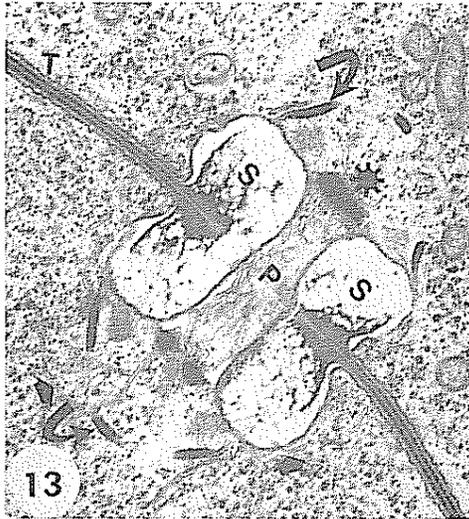


Fig 13. Amplificación del complejo septal ilustrado en la figura anterior. Se puede distinguir claramente el sáculo (S) con las proyecciones transversales de la pared celular que constituyen el tabique (T) de ambas células. Las estructuras coronarias (flechas) aparecen como cisternas ocupadas por un material electrón-denso al igual que el tapón del poro (*). Tanto las estructuras coronarias como el tapón del poro se observan interrumpidos. En el poro (P) se visualizan numerosas cisternas alargadas en el sentido del eje principal de la hifa. Nótese la relación de las cisternas de retículo endocitoplásmico liso (flechas cortas) con las estructuras coronarias y las cisternas del poro. Entre las cisternas alargadas del poro la matriz citoplásmica es escasa X 30 000

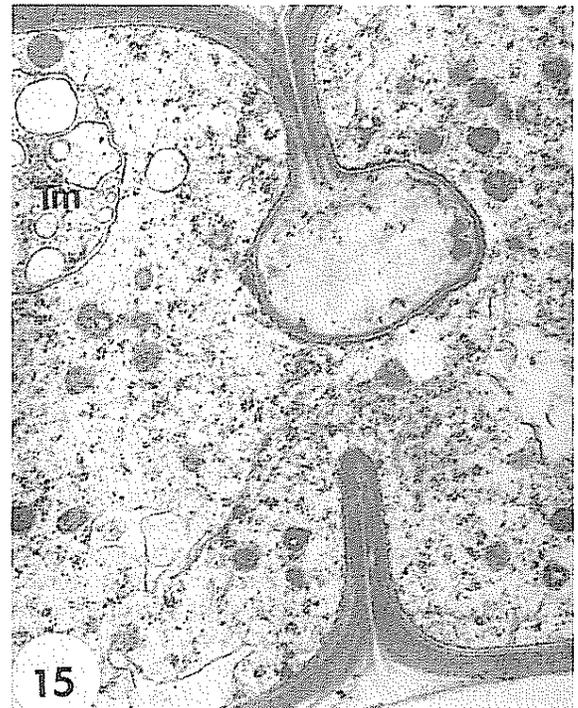


Fig 15. En esta microfotografía aparece una hemisepta constituida por un sáculo simple unilateral. Nótese la continuidad directa entre los citoplasmas de ambas células, permitida por la ausencia de un poro verdadero. Tm, cuerpo túbulo-membranoso con vesículas y vacuolas en su interior. X 22 500

el poro septal, el cual contiene en su interior un complejo sistema de membranas cisternales (Sm) orientadas de acuerdo con el eje perpendicular de la hifa (Fig. 12). El poro, en sus extremos, a ambos lados de las células contiguas, presenta una estructura conocida con el nombre de tapón del poro que da la impresión de ser ocluyente (Fig. 12). El tapón del poro tiene una unidad de membrana y contiene en su interior un material electrón-denso finamente granular. El diámetro del canal del poro en el área de mayor constricción sacular fue de $0.370 \pm 0.042 \mu\text{m}$. La membrana que forma el sáculo está en continuidad con varios cuerpos membranosos cisternales. Una de estas membranas, la que se encuentra en la posición polar de cada una de las células contiguas, forma parte de la corona. La corona a modo de cápsulas sobre los poros del sáculo constituye una estructura cuyas láminas membranosas se ven compactadas por la presencia de un material electrón-denso en las cisternas que ellas forman (Figs. 12, 13, 14, 16). La unidad de membrana coronaria presentó un grosor de $0.072 \pm 0.009 \mu\text{m}$. En algunos casos estas estructuras se ven muy continuas (Fig. 14) y otras veces se aprecian discontinuas, como se ilustra a mayor aumento en la Fig. 13. Es muy probable que las cápsulas formadas por estas membranas, que están en continuidad con la membrana del sáculo, sean estructuras provistas de perforaciones irregulares y por ello no siempre se ven en continuidad. La matriz sub-coronaria midió $0.510 \pm 0.031 \mu\text{m}$ desde los extremos del sáculo hasta el punto más elevado de la corona. Resulta interesante destacar que en el espacio existente entre la corona y el tapón del poro septal se encuentran numerosas estructuras proteicas de apariencia filamentosa (mf) (Fig. 14). Igualmente es conveniente señalar que en algunas ocasiones encontramos lo que puede ser definido como hemiseptas, es decir, estructura semejante a septas pero incompletas (Fig. 15)

DISCUSION

La patogenicidad de la cepa investigada fue comprobada por medio de inoculaciones que permitieron reproducir en plantas sanas las mismas alteraciones previamente detectadas en el campo. El hongo posee hifas que tienen en el complejo septal un diámetro promedio de $6.045 \pm 0.304 \mu\text{m}$ y muestran en el microscopio fotónico las características morfológicas registradas por Parmeter y Whitney (34) y Butler y Bracker (9). Bajo microscopía de luz, el citoplasma celular se ve regularmente distribuido y por ello se destacan en él cuerpos densos, vacuolas, núcleos y septas. Con altos aumentos puede apreciarse incluso el aparato del poro septal.

La característica nuclear ha constituido en tiempos recientes uno de los instrumentos taxonómicos más

importantes para la identificación del hongo *R. solani*, tal como lo indicaran Parmeter *et al.* (35). Para estos autores, en el trabajo de diagnóstico rutinario, *R. solani* debe ser identificado por la presencia de más de dos núcleos en sus células vegetativas. Otros investigadores (23, 48, 49, 52) informan en sus publicaciones que este hongo está caracterizado por una multiplicidad de núcleos, y han llegado a cuantificar hasta 18 núcleos por célula (48). Llegados a este punto, es necesario destacar que la cepa aislada por nosotros está constituida por un hongo cuyas células vegetativas ciertamente tienen más de dos núcleos, pero la cantidad de núcleos osciló siempre entre dos y cuatro. En ningún caso pudimos observar células con mayor número de núcleos. Esta observación se realizó utilizando técnicas de microscopía de luz de alta resolución, como las mostradas en las microfotografías 1-3.

Es importante señalar que cuando hicimos tinciones de cultivos frescos con preparaciones de azul de anilina, azul II, Hcl-giemsa y safranina O, en las células del hongo indudablemente aparece una gran cantidad de cuerpos densos semejantes a núcleos intensamente teñidos con estos colorantes. En razón de lo anterior, es necesario precisar que, si bien con las tinciones rápidas de uso común en el diagnóstico de este hongo pudimos detectar una gran cantidad de estructuras muy similares a núcleos, cuando examinamos estas hifas en cortes de $2 \mu\text{m}$ bajo microscopía de luz de alta resolución nunca logramos apreciar más de cuatro núcleos a pesar de haber realizado numerosos ensayos con cortes seriados. Esto nos induce a afirmar que algunos de los cuerpos densos vistos por varios autores (23, 36, 48, 49), corresponden a núcleos, pero otros son material de depósito con propiedades tintoriales muy parecidas, probablemente porque están compuestos por material de naturaleza proteica que también resulta teñido con estos colorantes. Esto se refuerza con observaciones como la ilustrada en la Fig. 5 en la cual, utilizando microscopía de contraste de interferencia, se ven abundantes estructuras esféricas en el interior de algunas hifas aparentemente envejecidas, que corresponden más que a núcleos, a una vacuolización citoplásmica. Aplicando la misma técnica en la Fig. 4 (flecha) podemos distinguir estructuras que si son núcleos.

En el ámbito ultraestructural logramos un acopio de información sobre las características citológicas, no solamente desde el punto de vista de la cuantificación de sus elementos, sino también para poder establecer cuáles de esas características, además del número de núcleos, pueden tener interés para la más apropiada clasificación de este hongo que hemos identificado como *R. solani* Kuehn. Como mencionamos en resultados, el citoplasma de estas células hifales es

rico en organelas celulares como numerosas mitocondrias, abundante retículo endocitoplásmico, una matriz cargada de ribosomas libres agrupadas en polisomas, y una diversidad vesicular y vacuolar de tamaño y contenido variables que se encuentran dispersas en el citoplasma. Algunas de estas características fueron descritas por Bracker y Butler (6); sin embargo, en la literatura encontramos pocas descripciones exhaustivas sobre los elementos citológicos más relevantes de este hongo. Nos referimos en particular al escaso interés que se ha dado a los aspectos citométricos que tienen una importancia significativa en el establecimiento del citotipo de la célula en estudio. De nuestros resultados podemos concluir que el núcleo ocupa un área que representa el 14 % de la superficie total de la cavidad hifal en sección transversal, que el diámetro promedio total de la hifa es de $6.045 \pm 0.304 \mu\text{m}$, y que si en cada célula se encuentran entre dos y cuatro núcleos, al microscopio electrónico de transmisión resulta fácil localizar hasta dos núcleos cortados en una misma sección longitudinal (Fig. 6). Además de estos parámetros morfométricos detectamos ciertas estructuras citoplásmicas no señaladas por la literatura especializada. Nos referimos en particular a determinadas estructuras túbulo-membranosas encontradas en asociación con el aparato septal (Figs. 11, 12). Estas estructuras túbulo-membranosas son masas intracitoplásmicas rodeadas por una membrana que da la impresión de constituir el complejo sistema túbulo-membranoso. Esto en virtud de que se observan interrupciones de la membrana que lo rodea para invaginarse y formar estas estructuras. Algunos cuerpos túbulo-membranosos eran más heterogéneos que el mostrado en la Fig. 11. En la Fig. 12 aparece una estructura túbulo-membranosa con una morfología más compleja, pues además de poseer estructuras tubulares tiene en su interior vesículas y vacuolas. Fue difícil caracterizar cuerpos de membranas o cisternas membranosas que tuviesen las características del aparato de Golgi tal como se conoce en otras células. Sin embargo, algunas estructuras membranosas pudieran perfectamente corresponder al aparato de Golgi. Las relaciones entre el retículo endocitoplásmico y la cisterna perinuclear fueron claramente observadas en la mayoría de las células examinadas. Algunos cuerpos densos no membranosos, con un contenido medianamente electro-denso de aspecto lipoproteico, fueron localizados con bastante regularidad (Fig. 8). Muchas de estas masas agrupadas podrían verse bajo microscopía de luz normal como estructuras con propiedades tintoriales que las hacen asemejarse a núcleos y, por ello, estimamos que pueden corresponder a las masas que algunos autores han retenido como núcleos. Las mitocondrias tienen las mismas características descritas en las células animales y vegetales (15), es decir, crestas mitocondriales y una doble membrana que conforma la cisterna.

La matriz mitocondrial también mostró gránulos electrón-densos como se observa en la Fig. 9.

En relación con el complejo septal debemos señalar que éste, además de la estructura del tabique producida por la invaginación de las membranas de las células contiguas y la formación del sáculo septal, tiene como componentes integrantes la corona, el poro septal y el sistema de membranas internas del canal del poro. Esta estructura septal coincide en su configuración general con la descripción dada por Bracker y Butler (6, 7), Setliff *et al.* (39), Lisker *et al.* (28), Tu *et al.* (48), como el patrón característico del complejo septal de *R. solani* Kuehn. Sin embargo, quisiéramos añadir algunas consideraciones en torno a la estructura septal, no descritas por estos autores. Por ejemplo, la íntima relación existente entre las membranas del retículo endocitoplásmico y las membranas del sáculo septal. Como se observa en las Figs. 13 y 14, existe una relación anatómica de continuidad entre las membranas que forman una cisterna interrumpida, en cuyo interior se acumula un material electrón-denso muy semejante al que constituye el tapón del poro. Esto hace pensar que este material conforma ambas estructuras. El tapón del poro también se aprecia rodeado por una membrana (Fig. 13). El canal del poro propiamente dicho está surcado por sistemas membranosos que conforman cisternas longitudinales dirigidas de una célula a otra, en el espacio del poro dejado por los dos tapones. Sobre estas estructuras cisternales del interior del poro no existen referencias en la literatura consultada. Estas estructuras también están en relación anatómica de continuidad con los sistemas de membrana localizados en el espacio sub-coronario (Fig. 13). En el mismo espacio subcoronario pudimos detectar la presencia de un material filamentososo fino, con el aspecto de proteínas filamentosas contráctiles, como se ha descrito en otros sistemas celulares (Fig. 14). La pared celular que se invagina con el tabique, al llegar al sáculo da la impresión de deshacerse para constituir una estructura esponjosa que le proporciona un aspecto trabecular a la cavidad sacular (Figs. 12, 14). Finalmente, es necesario resaltar que en algunos casos pudimos visualizar la formación de hemiseptas, caracterizadas por la formación de una hemi-invaginación de un lado de las dos células contiguas y que forma una sola sección del sáculo (Fig. 15). En estos casos, presumimos inicialmente que se trataba de septas en formación, pero a juzgar por el grosor de la pared celular tuvimos que concluir que eran septas no completamente desarrolladas en células adultas. El comportamiento morfológico se conduce de la siguiente manera: se produce una invaginación incompleta de la membrana citoplásmica con penetración de la pared celular que no desarrolla la estructura trabecular habitual del sáculo septal y

forma una especie de vesícula unilateral. La invaginación contralateral se observa adelgazada sin originar la expansión que normalmente produce para conformar el sáculo. Cuando existen hemiseptas no se forman poros verdaderos ni estructuras coronarias. Estas estructuras septales pueden ser atribuidas a un mecanismo plástico de estas células o también podrían significar anomalías en el desarrollo de las hifas

Considerando todos los resultados descritos, podemos concluir que las características del hongo aislado de plantas de *P. vulgaris* var. 'Seminole' se corresponden, tanto en su patogenicidad como en su apariencia bajo las microscopías de luz de alta resolución, de contraste de interferencia y electrónica de transmisión, con las del hongo *R. solani* Kuehn. Nuestra impresión es que la estructura coronaria deriva de la misma membrana que origina el sáculo. Otros autores (6) consideran que la corona se desarrolla a partir del retículo endocitoplásmico. Las características descritas para el aparato septal nos permiten concebir esta estructura como una compleja maquinaria que sirve a los fines de propiciar el pasaje de material de una célula a otra, de manera selectiva y asistida por las propias estructuras septales. La mayoría de las características del complejo septal descritas en este estudio se ilustran en el dibujo de la Fig. 16. El canal del poro puede tener dos vías permeables para el pasaje de material entre las células. Una es el espacio inter-

cisternal del poro y otra a través de las mismas cisternas. Las estructuras coronarias y el tapón del poro actuarían como elementos reguladores con propiedades contráctiles al encontrarse entre ellas filamentos del tipo contráctil. Es posible que el flujo de sustancias puede ser bidireccional y esto podría explorarse mediante la utilización de trazadores electrón-densos intracelulares. Esta hipotética manera de funcionamiento del aparato septal se fundamenta en los hallazgos descritos. Sabemos, sin embargo, que para lograr una mejor aproximación a ella se requiere de una mayor exploración experimental.

LITERATURA CITADA

- 1 ALFIERI JUNIOR, S.A.; SEYMOUR, C.P.; DENMARK, J.C. 1972. Aerial blight of *Carissa grandiflora* caused by *Rhizoctonia solani* Plant Disease Reporter 56:511-514.
2. ALLISON, J.L. 1951. *Rhizoctonia* blight of forage legume and grasses. Plant Disease Reporter 35:372-373.
3. BAKER, F.K. 1970. Types of *Rhizoctonia* diseases and their occurrence. In *Rhizoctonia solani*. Biology and Pathology. Ed. by J.R. Parmeter Junior. Berkeley, University of California Press. 255 p
- 4 BAKER, K.F.; FLENTJE, N.I.; OLSEN, C.M.; STREITON, H.M.; 1967. Effect of antagonists on growth and survival of *Rhizoctonia solani* in soil. Phytopathology 57:591-597.
- 5 BAKER, R.; MARISSON, C.A. 1970. Epidemiology of diseases caused by *Rhizoctonia solani*. In *Rhizoctonia solani*. Biology and Pathology. Ed by J.R. Parmeter Junior Berkeley, University of California Press 255 p
6. BRACKER, C.E.; BUTLER, E.E. 1963. The ultrastructure and development of septa in hyphae of *Rhizoctonia solani*. Mycologia 55:35-58.
7. BRACKER, C.E.; BUTLER, E.E. 1964. Function of the septal pore apparatus in *Rhizoctonia solani* during protoplasmic streaming. Journal of Cell Biology 21:152-157
- 8 BURPEE, L.L.; SANDERS, P.L.; COLE JUNIOR, H.; KIM, S.H. 1978. A staining technique for nuclei of *Rhizoctonia solani* and related fungi. Mycologia 70:1281-1283
- 9 BUTLER, E.E.; BRACKER, C.E. 1970. Morphology and cytology of *Rhizoctonia solani*. In *Rhizoctonia solani*. Biology and Pathology. Ed by J.R. Parmeter. Berkeley, University of California Press 255 p.
10. CASTRO, C.; DAVIS, J.R.; WIESE, M.V. 1983. Differential medium of identification of *Rhizoctonia solani* AG-3. Plant Disease 67:1069-1071

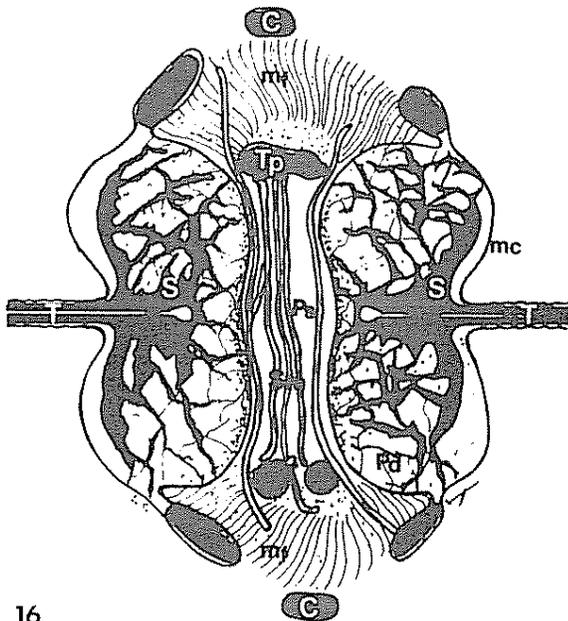


Fig. 16. Representación semiesquemática del complejo septal de *Rhizoctonia solani*. C, corona; mf, filamentos; mc, membrana celular; Ps, poro septal; S, sáculo; Sm, sistema membranoso del canal del poro septal; T, tabique o septa; Tp, tapón del poro

- 11 CEDEÑO, L. 1978. Características culturales, condición nuclear y grupos de anastomosis en aislamientos de *Rhizoctonia solani* Kuehn. *Agronomía Tropical* 28:151-161.
- 12 CHRISTOU, I. 1962. Penetration and host-parasite relationships of *Rhizoctonia solani* in the bean plant. *Phytopathology* 52:381-389.
- 13 DADDOW, L. Y. M. 1986. An abbreviated method of the double lead stain technique. *J. Submicrosc. Cytol.* 18:221-224.
- 14 DE CANDOLLE, A. P. 1815. Mémoire sur les rhizoctones, nouveau genre de champignons qui attaque les racines des plantes et en particulier celle de la luzerne cultivée. *Mem. Mus. Hist. Nat.* 2:209-216.
- 15 DE ROBERTIS, E. D. P.; DE ROBERTIS, E. M. F. 1986. *Biología celular y molecular*. 11 ed. Buenos Aires, Arg., Editorial "El Ateneo" 628 p.
- 16 DIAZ, C.; SALAS DE DIAZ, G. 1980. Lista de patógenos de las plantas cultivadas en Venezuela. Venezuela, CIARCO, Portuguesa 62 p.
- 17 DUGGAR, B. M. 1915. *Rhizoctonia crocorum* (Pers.) DC, and *R. solani* Kuehn (*Corticium vagum* B & C) with notes on other species. *Ann. Missouri Bot. Garden* 2:403-458.
- 18 DURBIN, R. D. 1955. The effect of CO₂ on the vertical distribution of various strains of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 45:693.
- 19 EXNER, B.; CHILTON, S. J. 1943. Cultural differences among single-basidiospore isolates of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 33:171-174.
- 20 FLENIJE, N. I.; STREITON, H. M.; HAWN, E. J. 1963. Nuclear distribution and behaviour throughout the life cycles of *Thanatephorus*, *Waitea*, and *Ceratobasidium* species. *Australian Journal of Biology Science* 16:450-467.
- 21 GALINDO, J. J.; ABAWI, G. S.; IHURSTON, H. D. 1982. Variability among isolates of *Rhizoctonia solani* associated with snap bean hypocotyls and soils in New York. *Plant Disease* 66:390-394.
- 22 HAWN, E. J.; VANIERPOOL, I. C. 1953. Preliminary studies on the sexual states of *Rhizoctonia solani* Kuehn. *Canadian Journal of Botany* 31:699-710.
- 23 HERR, L. J. 1979. Practical nuclear staining procedure of *Rhizoctonia*-like fungi. *Phytopathology* 69:958-961.
- 24 HERR, L. J.; ROBERTIS, D. L. 1980. Characterization of *Rhizoctonia* population obtained from sugar-beet fields with differing soil textures. *Phytopathology* 70:476-480.
- 25 HOLLIDAY, P. 1980. *Thanatephorus* Donk. In *Fungus Diseases of Tropical Crops*. London, Cambridge University Press. 607 p.
- 26 HOUSTON, B. R. 1945. Cultural types and pathogenicity of isolates of *Corticium solani*. *Phytopathology* 35:371-393.
- 27 KERNKAMP, M. F.; DE ZEEUW, D. J.; CHEM, S. M.; ORIEGA, B. C.; ISANG, C. I.; KHAN, A. M. 1952. Investigations on physiologic specialization and parasitism of *Rhizoctonia solani*. *Minnesota Agr. Expt. Station Bulletin* 200. 36 p.
- 28 LISKER, N.; KATAN, J.; HENIS, Y. 1975. Scanning electron microscopy of the septal pore apparatus of *Rhizoctonia solani*. *Canadian Journal of Botany* 53:1801-1804.
- 29 LUTTRELL, E. S. 1962. *Rhizoctonia* blight of tall fescue grass. *Plant Disease Reporter* 46:661-664.
- 30 MENZIES, J. D. 1970. The first century of *Rhizoctonia solani*. In *Rhizoctonia solani*. Biology and Pathology. Ed. by J. R. Parmeter. Berkeley, University of California Press. 255 p.
- 31 MONIEITH, J.; DAHL, A. S. 1928. A comparison of some strains of *Rhizoctonia solani* in culture. *Journal of Agricultural Research* 36:897-903.
- 32 PAPAVIDAS, G. C.; AYERS, W. A. 1965. Virulence, host-range and pectolytic enzymes of single-basidiospore isolates of *Rhizoctonia praticola* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 55:111-116.
- 33 PARMEIER JUNIOR, J. R.; SHERWOOD, R. T.; PLATT, W. D. 1969. Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology* 59:1270-1278.
- 34 PARMEIER JUNIOR, J. R.; WHITNEY, H. S. 1969. Taxonomy and nomenclature of the perfect state. In *Rhizoctonia solani*: Biology and Pathology. Ed. by J. R. Parmeter. Berkeley, University of California Press. 255 p.
- 35 PARMEIER JUNIOR, J. R.; WHITNEY, H. S.; PLATT, W. D. 1967. Affinities of some *Rhizoctonia* species that resemble mycelium of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology* 57:218-223.
- 36 SAKSENA, H. K. 1961. Nuclear structure and division in the mycelium and basidiospores of *Ceratobasidium praticola*. *Canadian Journal of Botany* 39:749-755.
- 37 SAKSENA, H. K.; VAARTAJA, O. 1961. Taxonomy, morphology, and pathogenicity of *Rhizoctonia* species from nurseries. *Canadian Journal of Botany* 39:627-647.
- 38 SANDERS, P. L.; BURPEE, L. L.; COLE JUNIOR, H. 1978. Preliminary studies on binucleate turfgrass pathogens that resemble *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 68:145-148.
- 39 SETLIFF, E. C.; MacDONALD, W. L.; PATTON, R. F. 1972. Fine structure of the septal pore apparatus in *Polyporus tomentosus*, *Poria latermarginata*, and *Rhizoctonia solani*. *Canadian Journal of Botany* 50:2559-2563.
- 40 SHATLA, M. N.; SINCLAIR, J. B. 1965. *Rhizoctonia solani*. physiologic specialization among isolates from cotton. *Plant Disease Reporter* 49:711-714.

41. SHERWOOD, R.I. 1969. Morphology and physiology in four anastomosis group of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology* 59:1924-1929.
42. SHUTERLEFF, M.G. 1953. Factors that influence *Rhizoctonia solani* to incite turfbrown patch. *Phytopathology* 43:484
43. STEPHENS, C.T.; HERR, L.J.; SCHMITTHENNER, A.F.; POWELL, C.C. 1982. Characterization of *Rhizoctonia* isolates associated with damping-off of bedding plants. *Plant Disease* 66:700-703.
44. STROUBE, W.H. 1954. Host-range of *Rhizoctonia* aerial blight fungus in Louisiana. *Plant Disease Reporter* 38:789-790
45. TALBOT, P.H.B. 1970. Taxonomy and nomenclature of the perfect state. In *Rhizoctonia solani*: Biology and Pathology. Ed. by J.R. Parmeter. Berkeley, University of California Press 255 p.
46. TU, C.C.; KIMBROUGH, J.W. 1973. A rapid staining technique for *Rhizoctonia solani* and related fungi. *Mycologia* 65:941-944.
47. TU, C.C.; KIMBROUGH, J.W. 1975. A modified soil-over-culture method for inducing basidia in *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology* 65:730-731
48. TU, C.C.; KIMBROUGH, J.W.; ALDRICH, H.C. 1977. Cytology and ultrastructure of *Thanatephorus cucumeris* and related taxa of the *Rhizoctonia* complex. *Canadian Journal of Botany* 55:2419-2436
49. TU, C.C.; ROBERTS, D.A.; KIMBROUGH, J.W. 1969. Hypal fusion, nuclear conditions, and perfect stages of three species of *Rhizoctonia*. *Mycologia* 61:775-783.
50. TU, C.C.; SCHENCK, N.C.; KIMBROUGH, L.W. 1974. Variations of single-basidiospore isolates of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology* 64:1510-1512.
51. UI, T. 1973. Zonation in cultures of *Rhizoctonia solani* Kuehn under continuous darkness. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 14:179-184.
52. YAMAMOTO, D.I.; UCHIDA, J.L. 1982. Rapid nuclear staining of *Rhizoctonia solani* and related fungi with acridine orange and with safranin O. *Mycologia* 74:145-149.