

Influencia del tipo de «cebo» y la temperatura en el aislamiento y desarrollo de *Pythium* spp

J. SINOBAS, L. VARÉS Y E. RODRÍGUEZ

Con este trabajo se pretende determinar la efectividad de varios cebos en el aislamiento de *Pythium* spp, y estudiar la influencia de la temperatura en su desarrollo.

Los análisis microbiológicos de los suelos de 6 invernaderos de la zona de Villa del Prado (Madrid) cultivados de pepino (*Cucumis sativus* L.) se iniciaron en abril de 1997. Se utilizaron como cebos pétalos de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.), cañamones (*Cannabis sativa* L.) hervidos, trozos de zanahoria (*Daucus carota* L.), patata (*Solanum tuberosum* L.) + agar-agua, trozos de tomate verde (*Lycopersicon esculentum* L) y acículas de pino (*Pinus* spp.). Con los aislados obtenidos, se estudió su crecimiento en exposición durante 24 horas a diversas temperaturas.

Los pétalos de clavel se mostraron más efectivos que el resto de los cebos, fue el único que aisló las 3 especies con más incidencia en los suelos, *Pythium aphanidermatum*, *P. irregulare* y *P. ultimum*. Semillas de cañamones aisló *P. aphanidermatum* y *P. irregulare*, y trozos de tomate verde fue el único que aisló *P. oligandrum*. Acículas de pino y trozos de zanahoria pueden ser cebos alternativos para aislar *P. aphanidermatum*.

La temperatura óptima para el desarrollo de *P. aphanidermatum* se halla comprendida entre 30 y 35°C y a temperaturas inferiores a 10°C y superiores a 42°C no se desarrolla. La variabilidad en *P. aphanidermatum* respecto al factor temperatura es muy baja en estos invernaderos. El desarrollo alcanzado por *P. irregulare* y *P. ultimum* es máximo entre 25 y 30°C. *P. irregulare* se desarrolla mejor que *P. ultimum* a temperaturas inferiores a 20°C y superiores a 30°C. Aunque la variabilidad dentro de cada especie es considerable, ninguna de las dos especies se desarrolla a temperatura inferior a 7°C. Las temperaturas cardinales mínima, óptima y máxima de *P. oligandrum* son muy similares a las de *P. ultimum* y *P. irregulare*.

J. SINOBAS, L. VARÉS y E. RODRÍGUEZ. E.U.I.T.A. Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria, 28040 Madrid.

Palabras clave: Cebos, *Pythium aphanidermatum*, *P. deliense*, *P. irregulare*, *P. ultimum*, *P. paroecandrum*, *P. oligandrum*, *P. rostratum*.

INTRODUCCIÓN

La bibliografía sobre la metodología seguida en el aislamiento de *Pythium* es muy amplia, aunque muchas veces se exponen métodos y medios selectivos demasiado complejos. La incidencia de este miceto en los suelos, principalmente sobre semillas y plántulas, y la gran velocidad de desarrollo en condiciones favorables, nos obliga a buscar técnicas de diagnóstico rápidas y eficaces

para detectar su presencia y tratar de prevenir los ataques.

Métodos y técnicas de análisis en los que se utilizan trampas o cebos son muy útiles cuando se quiere tener una idea cualitativa de la presencia o ausencia de una especie de *Pythium* en un suelo determinado. Estas técnicas se basan en la capacidad que tienen los *Pythium* en general de invadir sustratos orgánicos formados por fragmentos vegetales, unida a la de ser hongos formadores de zoos-

poras que requieren agua para su dispersión (TELLO *et al.* 1991).

El tipo de «cebo» utilizado en el aislamiento de *Pythium* de suelos puede ser muy variado. Semillas de cañamones hervidas y trozos de zanahoria son dos cebos recomendados por MARTÍN (1992); cañamones hervidos (HENDRIX y CAMPBELL, 1973); rodajas de patata cruda con bloques de agar-agua (STANGHELLINI y KRONLAND, 1985); acículas de pino (DANCE *et al.*, 1975) y pétalos inmaduros de clavel (TELLO, 1984; PALAZÓN y PALAZÓN, 1989; MANSILLA *et al.*, 1993; SINOBAS y SANTOS, 1995).

La asociación de especies de *Pythium* en los suelos es muy frecuente, aunque las especies comunes en una zona, pueden ser raras en otras o viceversa. La estructura de la comunidad y los niveles de población están muy influenciados por el tipo de cultivo, las propiedades del suelo y los factores medioambientales, destacando la humedad y la temperatura. La severidad de la enfermedad en raíz y cuello de las plantas varía con la temperatura, manifestándose generalmente a temperaturas medias y altas. Las temperaturas cardinales mínimas óptimas y máximas para el desarrollo de las distintas especies de *Pythium* pueden variar de unas zonas a otras, debido a la capacidad de adaptación de los micetos a las condiciones climáticas de cada región; la temperatura elevada es el factor responsable de la disminución de la población de ciertas especies de *Pythium* durante los meses de verano.

Con este trabajo se pretende comprobar la especificidad de determinados cebos dentro del género *Pythium* y la influencia de la temperatura en el desarrollo de los mismos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreo

Los distintos aislados se obtuvieron de muestras de suelo de 6 invernaderos de la zona de Villa del Prado (Madrid). El muestreo se realizó en el mes de abril de 1997, en

6 invernaderos cultivados de pepino (*Cucumis sativus* L.). El muestreo se realizó con sonda a una profundidad de 30 cm, tomándose muestras de 8 puntos de cada invernadero que se mezclaban posteriormente.

Técnicas de análisis

Se utilizaron las “trampas o cebos” como técnica de aislamiento. Las cazas se realizaron en suelos a humedad a saturación cuando se utilizaba como cebo trozos de zanahoria, patata + agar-agua y tomates verdes, y suelos con ligera película de agua cuando se utilizaba pétalos de clavel, cañamones y acículas de pino. Por cada tipo de cebo y muestra de suelo se utilizaron 2 cajas Petri incubadas a 27°C durante 48 horas. El número de cazas varió en función del tipo de cebo. Para el aislamiento se utilizó el medio selectivo P (PONCHET *et al.*, 1972) y para la taxonomía se recurrió al medio PZA (TELLO, *et al.*, 1991). La identificación de los hongos del género *Pythium* se hizo de acuerdo a los criterios expresados por VAN DER PLAATS-NITERINK (1981).

Preparación de cebos

Pétalos de clavel: Se colocaron cinco pétalos de clavel inmaduro por caja.

Cañamones: Las semillas hervidas durante 5 minutos se cortaron por la mitad y se colocaron cinco por caja.

Trozos de zanahoria: Se colocaron cinco rodajas de zanahoria cruda pelada previa desinfección con lejía al 5% durante 3 minutos por caja.

Patata + agar-agua: Sobre cinco rodajas de patata cruda se colocaron porciones de agar-agua de 12 mm de diámetro.

Tomate verde: Los frutos de tomate se desinfectaron en solución de lejía al 5%

durante 3 minutos y posteriormente se lavaron con agua destilada. Se colocaron cinco porciones de tomate verde en cada caja.

Acículas de pino: Acículas jóvenes de pino recién cortadas fueron desinfectadas en lejía al 5% durante 3 minutos y lavadas posteriormente con agua destilada. Se colocaron cinco acículas jóvenes por caja.

Crecimiento de los aislados

Para estudiar el crecimiento diametral de los aislados, se colocaron sobre cajas Petri de 90 mm con PDA (Patata-Dextrosa-Agar) discos de cada uno de los aislados tomados con sacabocados de 10 mm de diámetro de boca. Los crecimientos miceliares se midieron con regla milimetrada cada 24 horas. Se realizaron cinco repeticiones por aislado y temperatura. Para comprobar las temperaturas letales se incubaron durante 48 y 72 horas, y posteriormente se dejaron en bancada de laboratorio durante 5 días.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los análisis de suelos se han aislado 8 especies diferentes de *Pythium* (Cuadro 1). El mayor número de aislados corresponde a

P. aphanidermatum, seguido de *Pythium* (grupo F) y *P. deliense*. Los pétalos de clavel, se han mostrado como el cebo más eficaz y con mayor amplio espectro de acción, seguido de tomate verde. Estos dos cebos se han utilizado ampliamente en aislamiento de *Phytophthora* y algo menos en *Pythium*. Algunos especialistas (TELLO comunicación personal) utiliza pétalos de clavel en el aislamiento de *Pythium* de suelos, como cebo único. En nuestro estudio, cañamones hervidos y pétalos de clavel han sido los dos únicos cebos que han cazado *P. irregulare*. Otro cebo alternativo para el aislamiento de *P. aphanidermatum* puede ser trozos de zanahoria y acículas de pino. El cebo patata + agar-agua se ha mostrado poco eficaz en este trabajo, es el único que no ha cazado *P. aphanidermatum*, incluso en los suelos de invernaderos con alta densidad de esta especie, lo que no concuerda con los resultados obtenidos por STANGHELLINI y KRONLAND (1985) en la cuantificación de *P. aphanidermatum* mediante cebos con agar-agua sobre patata.

La especie más frecuentemente aislada ha sido *P. aphanidermatum*, aunque en todos los invernaderos se observa una asociación de 3 a 5 especies. La alta presencia de *P. aphanidermatum* encontrada en estos invernaderos, está justificada por el cultivo de pepino desarrollado en los últimos 5 años en cultivo de primavera-verano, y por la susceptibilidad de

Cuadro 1. - Especies aisladas con cada tipo de cebo y número de cebos que han cazado

Especies	TIPO DE CEBO						
	Pétalol de clavel	Semilla de cañamones	Trozos de zanahoria	Patata + agar-agua	Tomate verde	Acículas de pino	Código de Invernadero
<i>P. aphanidermatum</i> (P.a)	3	2	3	—	5	3	1,2,3,5,6
<i>P. deliense</i> (P.d)	—	3	1	—	1	—	1,2,3,4,5
<i>P. irregulare</i> (P.i)	2	1	—	—	—	—	1,3
<i>P. ultimum</i> (P.u)	1	—	—	1	—	—	2,4
<i>P. paroecandrum</i> (P.p)	1	—	—	—	—	—	5
<i>P. oligandrum</i> (P.o)	—	—	—	—	2	—	1,4
<i>P. rostratum</i> (P.r)	—	—	—	—	—	1	6
<i>P. (grupo F)</i> (P.F)	2	—	2	2	1	1	1,3,4,5,6

estas plantas a este miceto. Dos especies, *P. ultimum* y *P. irregulare*, consideradas como patógenos de numerosos cultivos hortícolas, sólo se aislaron en dos invernaderos, y en ningún caso estas especies coincidieron. La baja densidad de *P. irregulare* y *P. ultimum* puede ser debida a que el tipo de cultivo implantado favorece más a *P. aphanidermatum*, o quizás, a que en dos de los invernaderos donde se aislaron estas dos especies, también se aisló *P. oligandrum* considerado como hiperparásito de *P. ultimum* y de *P. irregulare* (MARTÍN y HANCOCK, 1987; THINGGAARD *et al.*, 1988).

Los pétalos de clavel han sido el único cebo que ha cazado las tres especies más frecuentes en los suelos de los invernaderos, *P.*

aphanidermatum, *P. irregulare* y *P. ultimum*. Cuando por cualquier circunstancia no se pueda disponer de pétalos de clavel, se puede recurrir a cañamones hervidos, tomates verdes o zanahorias, de fácil adquisición todos ellos.

La temperatura óptima para el desarrollo de *P. aphanidermatum* (Cuadro 2), se halla comprendida dentro del rango de 30-35°C. Dentro de este rango no hay diferencias en el crecimiento, alcanzando en 24 horas un desarrollo miceliar de 75 mm de diámetro. Estas temperaturas óptimas coinciden con las obtenidas para esta especie por TELLO *et al.* (1990), aunque nuestros aislados alcanzan un desarrollo miceliar mayor. A temperatura de 10°C el crecimiento es muy lento, son nece-

Cuadro 2. - Crecimiento (mm) de los aislados de *P. aphanidermatum* en medio PDA (24 horas).
Media de 5 repeticiones por aislado y temperatura acompañada del error estándar

TEMPERATURAS (°C)												
Aislado	2	10	15	20	25	30	32	35	38	40	42	45
<i>P. a 1</i>	(1 ^o)	—	9,0±2,6	40,1±1,5	62,5±3,8	75,0±0,0	75,0±0,0	75,0±0,0	74,1±0,9	43,9±11,2	1,3±0,7	(2)
<i>P. a 2</i>	(1 ^o)	—	12,4±1,4	39,7±1,4	63,6±3,8	75,0±0,0	75,0±0,0	75,0±0,0	74,2±0,4	32,7± 8,2	0,7±0,7	(2)
<i>P. a 3</i>	(1 ^o)	—	15,9±1,5	37,7±2,0	60,1±2,6	75,0±0,0	75,0±0,0	75,0±0,0	72,1±0,8	32,2± 7,8	(2)	(2)
<i>P. a 4</i>	(1 ^o)	—	13,2±1,6	37,1±1,1	61,8±2,3	73,8±1,2	75,0±0,0	75,0±0,0	69,7±1,1	34,6± 1,9	4,1±2,3	(2)
<i>P. a 5</i>	(1 ^o)	—	11,7±1,2	41,1±2,6	62,5±3,6	75,0±0,0	75,0±0,0	75,0±0,0	75,0±0,0	40,1±14,2	3,0±3,0	(2)
<i>P. a 6</i>	(1 ^o)	—	10,0±1,7	39,7±0,6	62,9±3,0	75,0±0,0	75,0±0,0	75,0±0,0	74,6±0,4	49,4± 9,7	(2 ^o)	(2)
<i>P. a 7</i>	(1 ^o)	—	15,6±3,0	38,2±3,5	58,9±1,8	75,0±0,0	75,0±0,0	75,0±0,0	74,5±0,5	51,1± 4,9	(2 ^o)	(2)
<i>P. a 8</i>	(1 ^o)	—	16,3±4,3	36,7±2,7	58,8±0,9	75,0±0,0	75,0±0,0	75,0±0,0	74,8±0,2	42,7±0,4	1,2±1,2	(2)

(1^o) no letal a 72 horas; (2), (2^o) y (2^o) letal a 24, 48 y 72 horas respectivamente

Cuadro 3. - Crecimiento (mm.) de los aislados de *P. deliense* en medio PDA (24 horas).
Media de 5 repeticiones por aislado y temperatura acompañada del error estándar

TEMPERATURAS (°C)												
Aislado	2	10	15	20	25	30	32	35	38	40	42	45
<i>P. d 1</i>	(1 ^o)	—	18,8±2,6	37,2±1,5	62,6±4,4	75,0±0,0	75,0±0,0	75,0±0,0	74,0±1,0	38,5±6,3	(2)	(2)
<i>P. d 2</i>	(1 ^o)	—	11,6±0,3	38,8±3,0	60,9±3,1	75,0±0,0	75,0±0,0	75,0±0,0	73,4±1,6	47,6±5,0	2,5±1,7	(2)
<i>P. d 3</i>	(1 ^o)	—	14,9±2,5	30,0±2,6	59,3±2,2	75,0±0,0	75,0±0,0	75,0±0,0	75,0±0,0	48,9±1,7	1,4±0,8	(2)
<i>P. d 4</i>	(1 ^o)	—	15,9±3,2	41,6±1,4	61,1±3,0	75,0±0,0	75,0±0,0	75,0±0,0	73,5±1,5	49,2±2,8	1,5±1,5	(2)

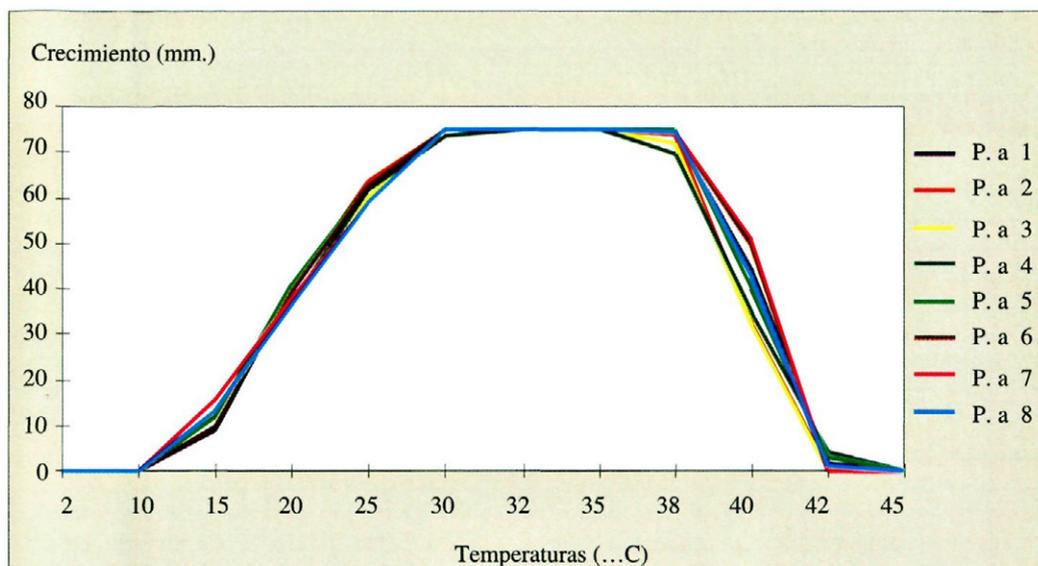


Fig. 1. - Crecimiento a diferentes temperaturas de los aislados de *P. aphanidermatum*.

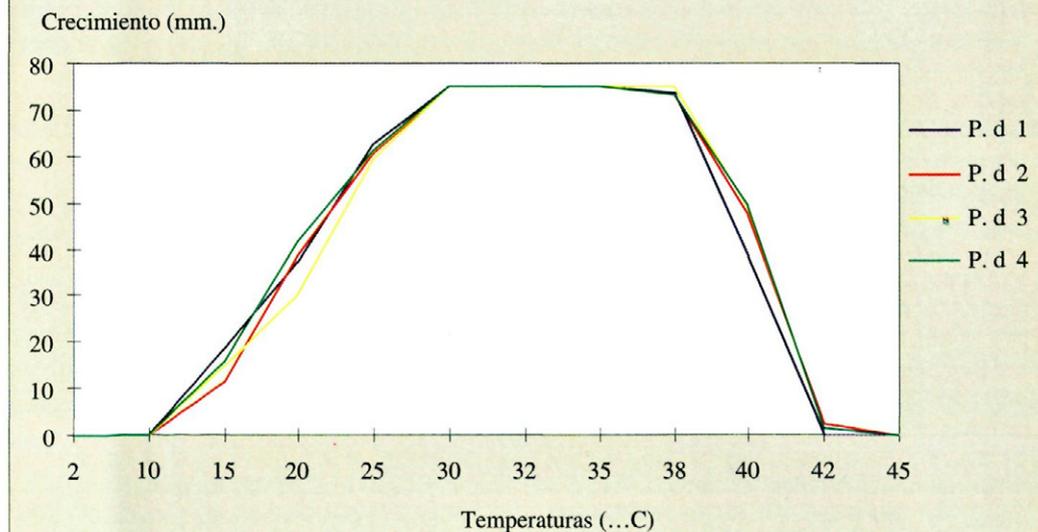


Fig. 2. - Crecimiento a diferentes temperaturas de los aislados de *P. deliense*.

sarias 48 horas para alcanzar 5 mm de diámetro y cuando se someten a temperaturas inferiores, no se observa crecimiento.

Para determinar las temperaturas letales, se sometieron todos los aislados a temperaturas de 2°C durante 72 horas y en ningún caso esta temperatura fue letal. La temperatura de 42°C fue letal para los aislados *P. a 3*, *P. a 6* y *P. a 7* a exposición de 24, 48 y 72 horas respectivamente. Cuando se sometieron a 45°C durante 24 horas, esta temperatura fue letal para todos los aislados.

Todos los aislados de *P. aphanidermatum* tienen un comportamiento térmico muy similar con pequeñas variaciones a altas temperaturas. Desde el punto de vista del comportamiento térmico, no parece que haya mucha variabilidad dentro de la especie en estos invernaderos (Fig. 1). Esta especie considerada como patógeno de clima cálido, también puede afectar a numerosos cultivos en climas templados con temperaturas próximas a 25°C. A esta temperatura e incluso a temperaturas próximas a 20°C, se ha alcanzado un desarrollo miceliar de 40 mm en 24 horas.

El desarrollo miceliar alcanzado por los aislados de *P. deliense* a distintas temperaturas (Cuadro 3), es muy similar al alcanzado por los aislados de *P. aphanidermatum*. La especie *P. deliense* se ha considerado muy próxima a *P. aphanidermatum*, ambas son polífagas, principalmente de clima cálido y frecuentemente se incluyen dentro del grupo *P. aphanidermatum*.

El desarrollo alcanzado por *P. irregulare* (Cuadro 4), es máximo a temperaturas comprendidas entre 25 y 30°C, alcanzando 45 mm de diámetro en 24 horas. En dos de los aislados se observó crecimiento a 10°C y 24 horas de exposición. Cuando la exposición se prolonga 48 horas, los tres aislados siguen creciendo a 7°C aunque muy lentamente. La temperatura mínima de 7°C obtenida en este trabajo, es superior a la dada para esta especie como temperatura mínima de crecimiento por VAN DER PLAATS-NITTERINK (1981). La temperatura máxima de crecimiento se sitúa en 35°C y la letalidad a 38°C. La temperatura máxima de las óptimas de *P. irregulare* y la

mínima de las óptimas de *P. aphanidermatum* coinciden, aunque difieren en el desarrollo alcanzado, 45 y 75 mm respectivamente.

Hay cierta controversia sobre cual de los factores, humedad y temperatura tiene más influencia en la infección. La incidencia depende de las especies de *Pythium* implicadas, en el caso de *P. irregulare*, una especie que no produce zoosporas fácilmente, tiene más incidencia en el desarrollo de la enfermedad la temperatura del suelo que la humedad del mismo. HENDRIX y CAMPBELL (1973) citan a *P. irregulare* como uno de los patógenos capaz de producir enfermedades en suelos al 50% de su capacidad de saturación.

La temperatura óptima para el desarrollo miceliar de *P. ultimum* (Cuadro 5), es muy similar a la expuesta para *P. irregulare*. Las diferencias fundamentales se observan en el crecimiento diametral a temperaturas inferiores a 20°C y superiores a 30°C. A 15°C *P. ultimum* tiene un crecimiento muy lento, y a 10°C durante 24 horas el crecimiento es nulo.

La temperatura mínima de crecimiento de los aislados de *P. ultimum* es de 7°C. A esta temperatura y en exposición de 48 horas, el máximo crecimiento alcanzado no superó los 2 mm. Esta temperatura cardinal mínima es superior a los 5°C señalados por Van der PLAATS-NITTERINK (1981). La letalidad para el aislado *P. u 2* se consiguió a 35°C, mientras que para *P. u 1* fueron necesarios 38°C durante 24 horas, en ambos casos, la exposición a 2°C durante 72 horas no fue letal. *P. ultimum* y *P. irregulare*, son dos especies principalmente de climas templados, con bastante incidencia en los suelos provocando la descomposición de las semillas y el ahogamiento de pre y postemergencia de plántulas tanto hortícolas y ornamentales como de cereales (SCOTT, 1987).

Dentro de la flora Pitiácea se ha obtenido un aislado de *P. paroecandrum* (Cuadro 6). Para esta especie que suele asociarse únicamente con el ahogado de preemergencia de plántulas, las temperaturas cardinales mínima, óptima y máxima obtenidas han sido: 5, 30 y 35°C respectivamente. A exposiciones a 5°C durante 48 horas, se alcanzó un desarro-

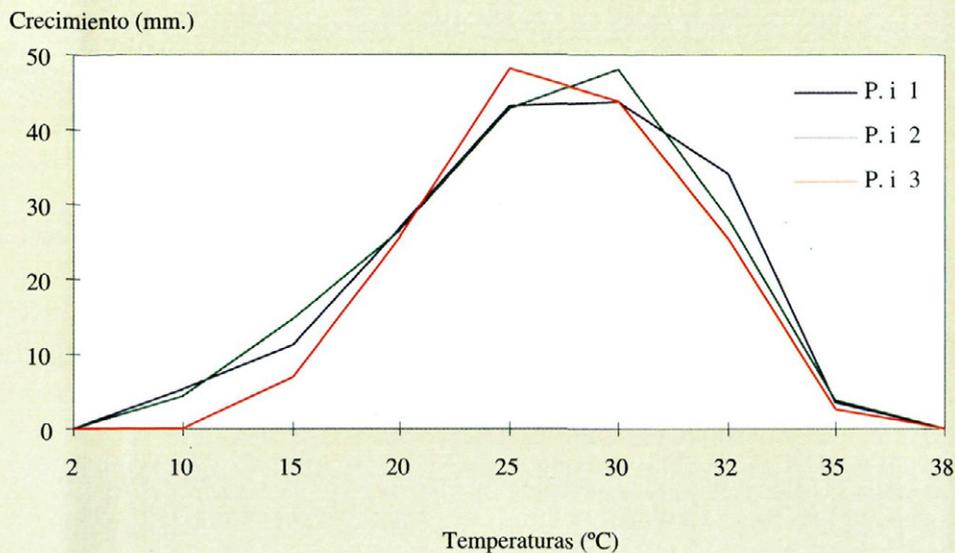


Fig. 3. - Crecimiento a diferentes temperaturas de los aislados de *P. irregulare*.

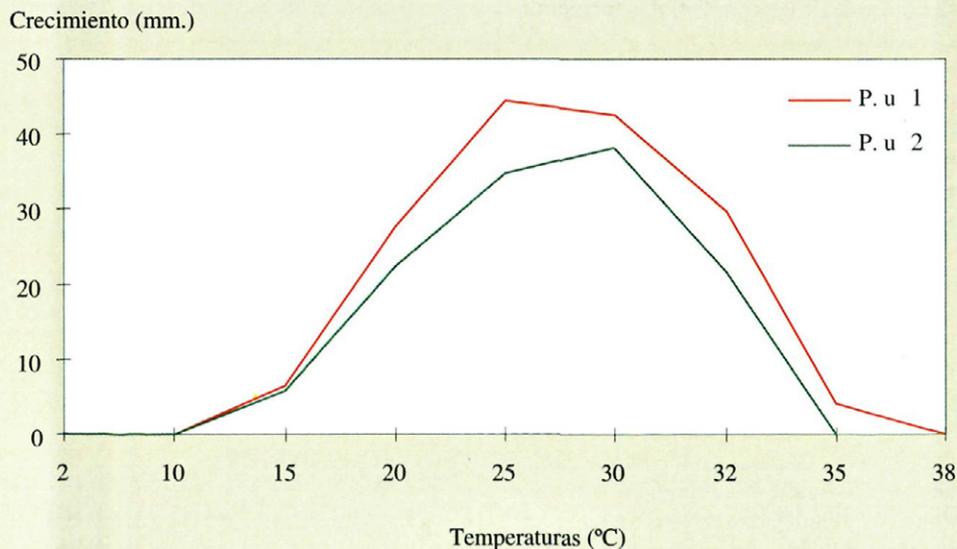


Fig. 4. - Crecimiento a diferentes temperaturas de los aislados de *P. ultimum*.

Cuadro 4. - Crecimiento (mm.) de los aislados de *P. irregulare* en medio PDA (24 horas).
Media de 5 repeticiones por aislado y temperatura acompañada del error estándar

TEMPERATURAS (°C)									
Aislado	2	10	15	20	25	30	32	35	38
<i>P. i 1</i>	(1")	5,2±0,9	11,2±1,6	26,9±3,3	43,1±3,7	43,6±2,5	34,1±3,1	3,4±1,9	(2)
<i>P. i 2</i>	(1")	4,4±0,7	14,7±2,3	26,6±2,5	42,9±5,1	48,2±0,5	28,1±5,7	3,8±3,8	(2')
<i>P. i 3</i>	(1")	(1")	6,9±2,4	25,7±0,2	48,1±3,1	43,6±1,9	25,3±0,7	2,5±1,8	(2')

Cuadro 5. - Crecimiento (mm.) de los aislados de *P. ultimum* en medio PDA (24 horas).
Media de 5 repeticiones por aislado y temperatura acompañada del error estándar.

TEMPERATURAS (°C)									
Aislado	2	10	15	20	25	30	32	35	38
<i>P. u 1</i>	(1")	(1")	6,5±1,0	27,7±2,0	44,3±1,7	42,4±1,6	29,9±2,6	4,1±1,0	(2)
<i>P. u 2</i>	(1")	(1")	6,0± 2,0	22,5±2,9	34,9±7,0	38,2±5,0	21,7±4,1	(2")	(2')

llo miceliar máximo de 3,8 mm, y a 38°C durante 48 horas se provocó la letalidad.

En la literatura revisada se cita a *P. oligandrum* como un prometedor agente de biocontrol de patógenos, especialmente de *P. ultimum*, tanto en invernaderos como en campo (MEQUILKEN *et al.*, 1990; DEACON y BERY, 1992). Los dos aislados de *P. oligandrum* obtenidos en este trabajo (Cuadro 7), han alcanzado un desarrollo miceliar óptimo a 30°C. Entre ambos aislados hay ligeras diferencias de comportamiento térmico, el aislado *P. o 1* está más adaptado a temperaturas altas que *P. o 2*, por el contrario, *P. o 2* está mejor adaptado a temperaturas bajas que *P. o 1*. Cuando estos aislados fueron sometidos a 38°C durante 24 horas, sólo se alcanzó la letalidad en *P. o 2*. Estas temperaturas cardinales obtenidas para *P. oligandrum* son muy similares a las señaladas en este trabajo para *P. ultimum*.

De la especie *P. rostratum* solamente se ha obtenido un aislado (Cuadro 8). En la exposición a 25°C se alcanzó el mayor desarrollo y a 38°C se produjo la letalidad. A las temperaturas

de 10°C y 35°C el desarrollo máximo alcanzado durante 48 horas no supera los 6,5 mm.

Como *Pythium* heterotálicos (Cuadro 9), hemos englobado todos aquellos aislados que tanto en medio PZA como en agar-guisante (AG) no producían órganos sexuales. Este grupo de 8 aislados distribuidos en 5 de los 6 invernaderos, alcanzaron un desarrollo máximo a temperatura de 30°C. El 50% de estos aislados no se desarrollaron a temperaturas de 10°C e inferiores, ni en 24 y 48 horas de exposición. El desarrollo a distintas temperaturas de estos aislados es muy variado, probablemente algunos de estos aislados corresponden a una especie distinta.

CONCLUSIONES

La flora Pitiácea de los suelos de 6 invernaderos está compuesta por 3 a 5 especies en todos los invernaderos. La especie más frecuente es *P. aphanidermatum*, como corresponde a invernaderos en los que se ha cultivado reiteradamente pepino.

Cuadro 6. - Crecimiento (mm.) del aislado de *P. parocandrum* en medio PDA (24 horas).
Media de 5 repeticiones por aislado y temperatura acompañada del error estándar

TEMPERATURAS (°C)									
Aislado	2	10	15	20	25	30	32	35	38
<i>P. p</i>	(1")	—	10,2±1,2	24,2±0,8	36,2±0,7	47,1±1,6	45,7±2,2	32,9±3,6	(2)

Cuadro 7. - Crecimiento (mm.) de los aislados de *P. oligandrum* en medio PDA (24 horas).
Media de 5 repeticiones por aislado y temperatura acompañada del error estándar

TEMPERATURAS (°C)										
Aislado	2	10	15	20	25	30	32	35	38	40
<i>P. o 1</i>	(1")	—	10,5±2,7	23,2±4,4	37,9±3	49,7±6,1	34±1,8	30,6±1,8	8,6±5,1	(2)
<i>P. o 2</i>	(1")	1,9±0,5	23,5±4,7	27,6±2,7	44±0,6	54,8±4,1	25,9±2,1	4,9±0,7	(2)	(2)

Cuadro 8. - Crecimiento (mm.) del aislado de *P. rostratum* en medio PDA (24 horas).
Media de 5 repeticiones por aislado y temperatura acompañada del error estándar

TEMPERATURAS (°C)									
Aislado	2	10	15	20	25	30	32	35	38
<i>P. r</i>	(1")	1,7±0,2	12,3±5,5	23,9±1,7	24,7±3,2	23,2±5,9	15,3±2,3	2,9±0,7	(2)

Cuadro 9. - Crecimiento (mm.) de los aislados de *P.* (grupo F) en medio PDA (24 horas).
Media de 5 repeticiones por aislado y temperatura acompañada del error estándar

TEMPERATURAS (°C)										
Aislado	2	10	15	20	25	30	32	35	38	40
<i>P. F 1</i>	(1")	8,3±0,9	21,1±3,8	28,7±0,8	40,5±2,3	48,3±2,9	40,9±2,7	36,8±3,1	3,2±1,6	(2)
<i>P. F 2</i>	(1")	2,0±1,1	16,3±3,0	23,9±0,8	39,8±4,5	49,1±0,8	42,2±1,1	27,1±4,7	11,6±2,9	(2)
<i>P. F 3</i>	(1")	6,4±2,1	16,7±3,8	28,7±3,9	47,3±4,7	52,1±1,6	49,1±2,1	39,5±1,8	12,3±0,3	(2)
<i>P. F 4</i>	(1")	—	6,2±1,9	16,2±2,4	21,6±1,1	29,2±3,6	24,2±2,2	21,7±3,0	5,0±1,5	(2)
<i>P. F 5</i>	(1")	—	8,9±2,5	18,8±1,4	25,2±3,4	28,9±3,9	25,6±2,8	23,9±2,2	—	(2)
<i>P. F 6</i>	(1")	—	4,5±2,0	6,5±2,7	11,4±2,2	11,6±1,4	11,6±1,5	11,9±1,4	1,6±0,8	(2)
<i>P. F 7</i>	(1")	—	10,3±4,8	16,6±1,9	21,7±5,9	26,3±2,7	11,4±0,5	1,0±0,2	—	(2)
<i>P. F 8</i>	(1")	3,7±1,8	16,5±2,6	22,8±2,4	27,6±3,8	37,9±2,1	18,5±0,5	3,4±0,9	—	(2)

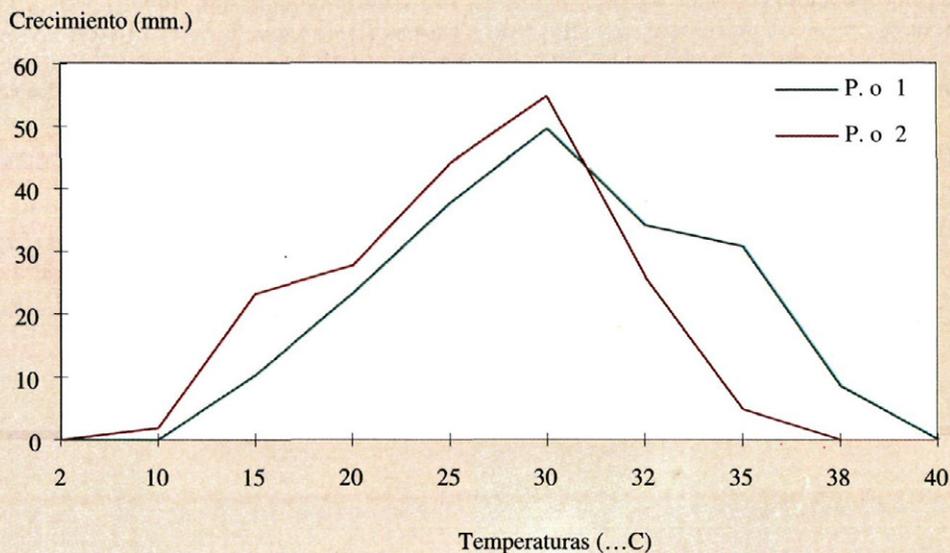


Fig. 5. - Crecimiento a diferentes temperaturas de los aislados de *P. oligandrum*.

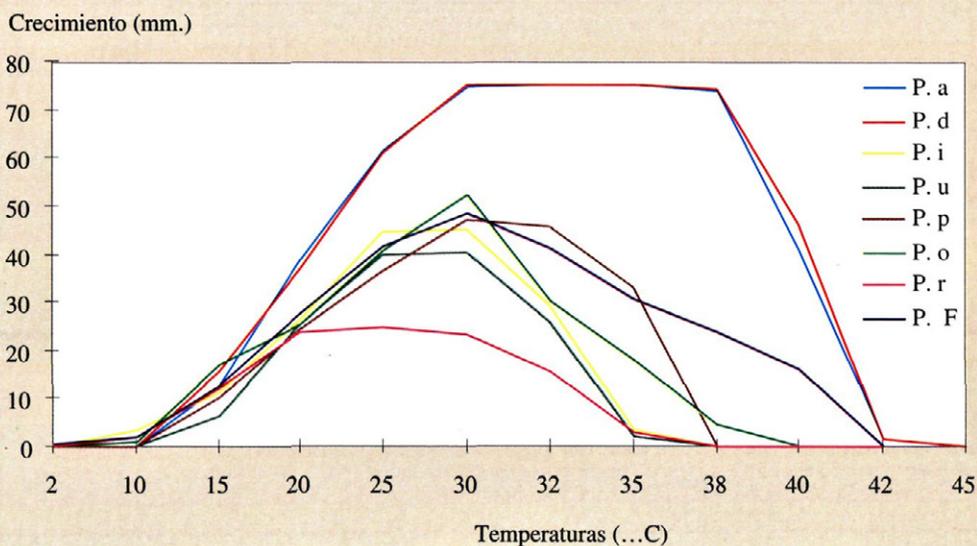


Fig. 6. - Crecimiento a diferentes temperaturas de cada una de las especies.

Los pétalos de clavel es el cebo más eficaz en el aislamiento de diversas especies de *Pythium*. Un cebo alternativo a pétalos de clavel puede ser semillas de cañamones hervidas, y en aquellos casos donde se pretende aislar *P. aphanidermatum*, se puede utilizar trozos de tomates verdes o de zanahoria. Trozos de tomate verde es el cebo más específico de los utilizados en la caza de *P. oligandrum*.

El desarrollo micelial de *P. aphanidermatum* y *P. deliense* a distintas temperaturas es muy similar, aunque se observa mayor variabilidad respecto a este carácter dentro de los aislados de *P. deliense* que de *P. aphanidermatum*. Ambos se desarrollan mejor a temperaturas próximas a 32°C.

El número de aislados de *P. irregulare* y *P. ultimum* es muy bajo. Esta baja frecuencia puede deberse a que los cebos no son muy específicos, que el cultivo de pepino conti-

nuado ha favorecido a *P. aphanidermatum*, o quizás, que *P. oligandrum* ha estado actuando como hiperparásito. Tanto *P. irregulare* como *P. ultimum* se desarrollaron mejor a temperaturas suaves próximas a 25°C. En estas dos especies, la variabilidad intraespecífica respecto al carácter temperatura es considerable.

La especie *P. oligandrum*, considerada como un prometedor agente de control biológico, se ha aislado en dos invernaderos. Cada uno de los dos aislados tiene una temperatura cardinal mínima y máxima diferente, y su temperatura óptima es muy similar a la de las especies *P. ultimum* y *P. irregulare*.

Dentro de los aislados agrupados como *Pythium* (grupo F) hay un comportamiento dispar respecto a la temperatura, probablemente porque no todos los aislados corresponden a la misma especie.

ABSTRACT

SINOBAS, J.; VARÉS, L. y RODRÍGUEZ, E. 1999: Influence of the type of bait and temperature in the isolation and development of *Pythium* spp. *Bol. San Veg. Plagas*, 25 (2): 131-142.

This project pretends to determine the efficiency of various baits in the isolation of *Pythium* spp, and to study the influence of temperature in its development.

Microbiological analysis of the soils from 6 greenhouses in the area of Villa del Prado (Madrid), where cucumber (*Cucumis sativus* L.) was grown, were initiated in April 1997, carnation petals (*Dianthus caryophyllus* L.), boiled hemp seeds (*Cannabis sativa* L.), pieces of carrots (*Daucus carota* L.), potatoes (*Solanum tuberosum* L.) + agar-water, pieces of green tomatoe (*Lycopersicon esculentum* L.) and needle of pine (*Pinus* spp.) were used as «baits». The growth of the *Pythium* isolations was studied on 24 hours exposition to different temperatures.

Carnation petals were more effective than the rest of the baits, they were only ones isolating the 3 species with more incidence in soils, *Pythium aphanidermatum*, *P. irregulare* and *P. ultimum*. Hemp seeds isolated *P. aphanidermatum* and *P. irregulare*, and the pieces of green tomatoe were the only ones that isolated *P. oligandrum*. Needle's pine and carrots pieces can be alternative baits to isolate *P. aphanidermatum*.

The optimum temperature for the development of *P. aphanidermatum* is comprehended in between 30 and 35°C. It is not developed in temperatures under 10°C or over 42°C. The variability of *P. aphanidermatum* respecting temperature is very low in these greenhouses. The development reached by *P. irregulare* and *P. ultimum* es at its best between 25 and 30°C. *P. irregulare* develops better than *P. ultimum* in temperatures under 20°C and over 30°C. Although variability in each species is considerable, none of the species, *P. irregulare* and *P. ultimum*, are developed in temperatures under 7°C. The maximum and minimum and optimum cardinal temperatures of *P. oligandrum* are very similar to the ones of *P. ultimum* y *P. irregulare*.

Key words: Baits, *Pythium aphanidermatum*, *P. deliense*, *P. irregulare*, *P. ultimum*, *P. paroecandrum*, *P. oligandrum*, *P. rostratum*.

REFERENCIAS

- DANCE, M. H.; NEWHOOK, F. J. y COLE, J. S., 1975: Bioassay of *Phytophthora* spp. in soil. *Plant Disease Reporter*, **59**: 523-527.
- DEACON, J. W. y BERRY, L. A., 1992: Modes of action of mycoparasites in relation to biocontrol of soilborne plants pathogens. In *Biological Control of Plant Diseases*. De. E.S. Tjanos. Plenum Press.
- HENDRIX, F. F. y CAMPBELL, A., 1973: *Pythium* as plant pathogens, *Annu. Rev. Phytopathol.*, **11**: 77-98.
- MANSILLA, J. P.; PINTOS, C. y SALINERO, M. C., 1993: Aislamiento e identificación en la provincia de Pontevedra de *Phytophthora cinnamomi* Rands. como patógeno de viña. *Bol. San. Veg. Plagas*, **19**: 541-549.
- MARTIN, F. N. y HANCOCK, J. G., 1987: The use of *Pythium oligandrum* for Biological Control of preemergence damping-off caused by *P. ultimum*. *Phytopathology*, **77**: 1013-1020.
- MARTIN, F. N., 1992: *Pythium*. In *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. APS Press. St Paul, Minnesota.
- MEQUILKEN, M. P.; WHIPPS, J. M. y COOKE, R. C., 1990: Control of damping-off in cress and sugar-beet by commercial seed-coating with *Pythium oligandrum*. *Plant Pathology*, **39**: 452-462.
- PALAZÓN, C. y PALAZÓN, I., 1989: Estudios epidemiológicos sobre la tristeza del pimiento en la zona del Valle Medio del Ebro. *Bol. San. Veg. Plagas*, **15**: 293-262.
- PONCHET, J.; RICCI, P.; ANDREOLI, C. y AUGE, C., 1972: Methods selectives disolement du *Phytophthora nicotianae* f. sp. *parasitica* (Dastur) Waterh. A partir du soil. *Ann. Phytopathol.*, **4**: 97-108.
- SCOTT, D. B., 1987: Identification and pathogenicity of *Pythium* isolates from wheat field soil in South Africa. *Phytophylactica*, **54**: 499-504.
- SINOBAS, J. y SANTOS, C., 1995: Prospección de las micosis en semilleros de tabaco en la comarca de La Vera (Cáceres) y determinación de la capacidad parasitaria. *Phytoma*, **74**: 25-31.
- STENGHELLINI, M. E. y KRONLAND, W. C., 1985: Bioassay for cuantificatium of *Pythium aphanidermatum* in soil. *Phytopathology*, **75**: 1242-1245.
- TELLO, J. C., 1984: *Enfermedades criptogámicas en hortalizas*. MAPA-INIA.
- TELLO, J. C.; GÓMEZ, J.; CAMPOROTA, P. y LACASA, A., 1990: Capacidades Parasitarias de *Pythium aphanidermatum* y de *Rhizoctonia solani* (Kühn). Sobre pepino y melón. *Bol. San. Veg. Plagas*, **16**: 733-741.
- TELLO, J. C.; VARES, F. y LACASA, A., 1991: *Manual de laboratorio*. Capítulo 3. Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- THINGGAARD, K.; LARSEN, H. y HOCKENHULL, J., 1988: Antagonistic *Pythium* against pathogenic *Pythium* on cucumber roots. *Bulletin OEPP*, **18**: 91-94.
- VAN DER PLAATS-NITERINK, A. J., 1981: Monograph of the Genus *Pythium*. Centralbureau Voor Schimmelcultures Baarn. Institute of the Royal Netherlands Academy of Sciences and Letters.

(Recepción: 4 octubre 1998)

(Aceptación: 18 enero 1999)