

Fitopatogenicidad de *Pythium* spp. presentes en el agua de riego del Poniente almeriense (sureste de España)

José Sánchez y Eduardo Gallego

Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Universidad de Almería, La Cañada de San Urbano, Almería, España

Resumen

Se caracterizó la fitopatogenicidad de 55 aislamientos de *Pythium* spp. aislados de las aguas de riego de la comarca del Poniente Almeriense (Almería, sureste de España). Estos aislamientos fueron 16 de *Pythium catenulatum*, dos de *Pythium diclinum*, dos de *Pythium paroecandrum* y 35 de formas asexuales con esporangios filamentosos. Con cada aislamiento de *Pythium* se realizaron tres tipos de ensayos de fitopatogenicidad por ahogamiento sobre pepino var. *Ashley*, en macetas a 25 °C, en los que se varió el momento de la inoculación (pre-siembra, pre-emergencia y post-emergencia). Un 83,64% de los aislamientos fueron fitopatógenos. Se encontraron aislamientos fitopatógenos en todas las especies identificadas. Las mortalidades (%) disminuyeron con el retraso de la fecha de la inoculación después de la siembra. Los aislamientos con mayor desarrollo *in vitro* fueron más fitopatógenos.

Palabras clave

Pythium, Pepino, Fitopatogenicidad, Ahogamiento, Agua, Almería

Phytopathogenicity of *Pythium* spp. from the irrigation water of the Poniente Almeriense (south-eastern Spain)

Summary

Phytopathogenicity was assessed of 55 isolates of *Pythium* spp. from the irrigation water of the district of the Poniente Almeriense (Almería, south-eastern Spain). The isolates were 16 of *Pythium catenulatum*, two of *Pythium diclinum*, two of *Pythium paroecandrum* and 35 of asexual forms with filamentous sporangia. Each *Pythium* isolate was tested with three types of damping-off phytopathogenicity tests with cucumber var. *Ashley*, in pots at 25 °C, varying the inoculation time (pre-seeding, pre-emergence and post-emergence). 83.64% of the isolates were found to be phytopathogenic. Phytopathogenic isolates were detected in all of the identified species. Mortality rates (%) decreased with the delay in inoculation time after the seeding. The isolates showing most growth *in vitro* were the most phytopathogenic.

Key words

Pythium, Cucumber, Phytopathogenicity, Damping-off, Water, Almería

Dirección para correspondencia:

Dr. José Sánchez
Departamento de Biología Vegetal y Ecología
Universidad de Almería
Ctra. Sacramento, s/n
E-04120 La Cañada de San Urbano
Almería, España
Tel.: +34 950 015 551
Fax: +34 950 015 069
E-mail: josanche@ual.es

Aceptado para publicación el 23 de Julio de 2002

©2002 Revista Iberoamericana de Micología
Apdo. 699, E-48080 Bilbao (Spain)
1130-1406/01/10.00 Euros

Son diversos los autores que en el estudio de la población *Pythium* en el agua de riego han incluido diversos ensayos de fitopatogenicidad como causante del ahogamiento de semillas y plántulas [1-3]. En este sentido, se han diseñado ensayos estándares para climas templados (cuya especie predominante es *Pythium ultimum*) que utilizan plantas de pepino (*Cucumis sativus*) como cebos para la evaluación del potencial infeccioso de un suelo debido a *Pythium* [4], o del poder fitopatógeno de determinados aislamientos [5-8]. Posteriormente, estas técnicas se han modificado para aplicarlas a los aislados de climas más cálidos, como los del sur de España (Andalucía, Islas Canarias) [9,10].

Material y métodos

Origen de los aislamientos de *Pythium*. Se utilizaron 55 aislados de *Pythium* aislados del agua de riego del Poniente almeriense durante el período entre octubre de 1994 y agosto de 1997. Se aislaron del río Adra, de acequias y de albercas de la comarca [11]. Pertenecen a las especies *Pythium catenulatum* (16 aislamientos), *Pythium diclinum* (2 aislamientos), *Pythium paroecandrum* (2 aislamientos) y formas asexuales con esporangios filamentosos (35 aislamientos) [12].

Ensayos de fitopatogenicidad. En estos ensayos se intentó ver la fitopatogenicidad como resultado de la inoculación con aislamientos de *Pythium* en diferentes momentos de su desarrollo: pre-siembra, pre-emergencia y post-emergencia.

Los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Fitopatología de la Escuela Politécnica Superior de la Universidad de Almería, a una temperatura de 25 °C, humedad relativa del 60 %, iluminación media de 1.000 lux con 12 h de iluminación diurna y 12 h de iluminación nocturna. Se utilizaron semillas de pepino (*Cucumis sativus*) cv. 'Ashley' desinfectadas mediante inmersión en lejía durante 15 min en agitación y lavadas con agua del grifo (clorada, libre de especies del género *Pythium*). Se utilizaron maceteros de plástico esterilizados (lejía comercial 1:5, durante 24 h) y con forma tronco-cónica invertida de 300 ml de capacidad, de 10 cm de diámetro en la parte superior y 8 cm de diámetro en la base, 5,5 cm de altura y con tres pequeños agujeros para drenaje a 1 cm de la base y equidistantes. Como sustrato se utilizó vermiculita esterilizada (120°C, 30 min). Los riegos se efectuaron con agua del grifo. Para cada aislado de *Pythium* se emplearon nueve repeticiones y el triple para el testigo, distribuidas en tres ocasiones diferentes.

Inoculación en pre-siembra. Los maceteros se rellenaron con 200 ml de vermiculita del nº 3, que se regó con agua del grifo hasta capacidad de retención. Sobre la vermiculita se situó el medio agarizado (15 ml) de una placa de Petri de 9 cm de diámetro, con la colonia de *Pythium* dejada crecer a 25 °C en oscuridad hasta que alcanzara el borde de la placa. A este disco se le quitó previamente con la ayuda de un sacabocados un disco central de 2 cm de diámetro con objeto de eliminar posibles contaminaciones bacterianas. Se recogió el disco de medio agarizado y se situó boca arriba y de forma centrada en el macetero. Se situaron 10 semillas de pepino cv. 'Ashley' sobre el borde del medio agarizado, es decir, dentro de una circunferencia con distancia de 1 cm al borde geométrico y equidistantes entre sí. Se recubrieron con aprox. 1 cm de vermiculita esterilizada y se regó con agua del grifo hasta su capacidad de retención. Se repitieron los riegos diariamente para mantener el sustrato al 70- 80 % de su capacidad de retención [10]. Se contaron las plántulas sanas a los 15 días después de la siembra, aunque se expresó en porcentaje de mortalidad sobre el total de semillas.

Inoculación en pre-emergencia. Se utilizaron 10 semillas pregerminadas a 30 °C durante 24 h en oscuridad. Se contaron las plántulas sanas a los 15 días después de la siembra, aunque se expresó en % de mortalidad sobre el total de semillas.

Inoculación en post-emergencia. En este caso, los maceteros se rellenaron con 200 ml de vermiculita y situaron equidistantes sobre la misma 10 semillas de pepino cv. 'Ashley' que se recubrieron con 60 ml de vermiculita. Se regó hasta la capacidad de retención. El 5º día después de la siembra, cuando las plántulas de pepino se encontraron con los cotiledones desarrollados recién desplega-

dos, se realizó la inoculación. Se hizo con 50 ml de una mezcla triturada (10 segundos) de 100 ml de agua y el medio agarizado con la colonia de *Pythium* crecida, a la que se le había quitado un disco central de 2 cm de diámetro, como en los ensayos anteriores. Por tanto, había la mitad de inóculo por maceta que en los ensayos anteriores. Se hizo el recuento de las plántulas muertas a los 15 días después de la siembra (caída de plántula, "cinturilla") y se expresó como porcentaje de mortalidad sobre el total de plántulas nacidas.

Los resultados de cada ensayo se analizaron con la ayuda del programa estadístico Statgraphics Plus versión 3.0.

Resultados y discusión

Fitopatogenicidad de la población de *Pythium*. Se observan unas mortalidades medias en pepino (Figura 1) de 63,47% si se inoculan en pre-siembra, de 43,44% si en pre-emergencia y de tan sólo un 8,59% si se inoculan en post-emergencia.

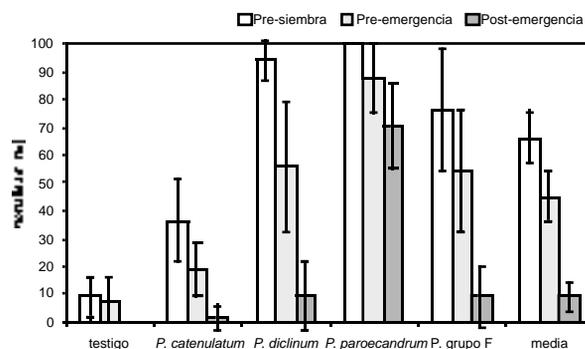


Figura 1. Fitopatogenicidad de las especies de *Pythium* aisladas del agua de riego del Poniente almeriense, según el momento de inoculación sobre pepino cv. 'Ashley'. *: media de valores corregidos según transformación trigonométrica (arcsen√%).

En los ensayos de fitopatogenicidad con inoculación en pre-siembra (Figura 2) se observa como 26 aislamientos de *Pythium* producen entre 80-100 % de marras de nascencia, 21 aislamientos producen del 30-80 % y los 8 restantes entre el 10-30%. Por el contrario, en los testigos se observan marras de nascencia inferiores al 10%. Con inoculación en pre-emergencia (Figura 2), 26 aislamientos de *Pythium* producen más de un 50% de marras de nascencia, de entre ellos cinco aislamientos superan el 80%, además otros 26 aislamientos alcanzan a producción 10-30% y en los testigos, inoculados sólo con medio agarizado, no se llega al 10%, siendo en todo momento inferior a cualquier aislado. Con inoculación en post-emergencia (Figura 2), sólo dos aislamientos de *Pythium* superan el 30% de plántulas caídas (sobre el total de plántulas emergidas), se sitúan entre el 60-80%. Por otro lado, 17 aislamientos producen entre el 10-30% de plántulas caídas y el resto no alcanza el 10%. En este caso, los testigos y 19 aislamientos no produjeron ningún caso de plántula caída.

Con inoculaciones en pre-siembra y pre-emergencia (Figura 2) parecen observarse, en cada uno de los casos, dos niveles de fitopatogenicidad diferenciados y, asimismo, distintos de los niveles alcanzados por los testigos. Sólo nueve aislamientos en el primer caso y 26 aislamientos en el segundo, no se diferencian estadísticamente de los testigos (resultado de un test de Newman-Keuls).

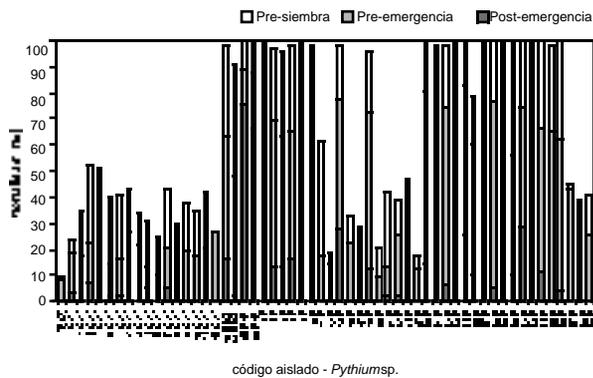


Figura 2. Fitopatogenicidad de los aislamientos de *Pythium* del agua de riego del Poniente almeriense, según el momento de inoculación sobre pepino cv. *Ashley*. (TEST: testigo, CAT: *P. catenulatum*, DICL: *P. diclinum*, PAR: *P. paroecandrum*, F: *P. grupo F*; *: corregida según transformación trigonométrica: $\arcsen\sqrt{\%}$).

Con inoculaciones en post-emergencia (Figura 2), se observan dos aislamientos con niveles muy altos y cuatro aislamientos con un valor diferenciado de los testigos. La fitopatogenicidad del resto (49 aislamientos) no se diferencia de los testigos, lo que indica la ocasionalidad de la aparición de plántulas caídas en las nueve repeticiones del bioensayo. De todas formas, sólo los testigos y 19 aislamientos no produjeron en ninguna de las repeticiones la caída de ninguna plántula.

Las mortalidades (marras de nascencia o plántulas caídas) son menores cuanto más tardía es la inoculación con el fitopatógeno (Figura 1) después de la siembra. Esta diferencia varía según la especie (Figura 1). Los tejidos de las plántulas (excepto los ápices radicales y las raíces absorbentes) se vuelven resistentes a *Pythium* a partir de una edad crítica [13]. El pepino (*Cucumis sativus*) cv. *Ashley* parece haber alcanzado esta edad crítica de aparición de resistencia a los cinco días de su siembra (plántula con cotiledones recién extendidos). Por tanto, parece recomendable tener protegida la plántula hasta esa fecha.

La explicación más común para la resistencia de las plántulas al ataque de *Pythium* spp. es el engrosamiento de la pared celular secundaria [14]. Sin embargo, también existen otra serie de mecanismos de resistencia para esta enfermedad: formación de depósitos de calosa, formación de lignina alrededor del tejido infectado, una reacción hipersensible de los tejidos infectados (p.ej. en colza y lechuga), fitoalexinas, etc. [15].

Variación inter e intraespecífica de la fitopatogenicidad. Las diferentes especies de *Pythium* obtenidas del agua de riego del Poniente almeriense se distinguieron por las mortalidades que produjeron en pepino (Figura 1, Tabla 1) y a la distribución de esta característica entre sus aislamientos (Figura 2): los aislamientos de *P. catenulatum* provocan unas mortalidades bajas, siendo más bajas cuando más tardía es la inoculación (36,55%, 18,78% y 1,65%), lo que se repitió en los demás casos; los aislamientos de *P. diclinum* provocaron altas mortalidades en pre-emergencia (94,44% y 56,06%, según inoculación), pero en post-emergencia resultan bajas (9,32%); los aislamientos de *P. paroecandrum* provocan siempre mortalidades elevadas (100%, 87,88% y 70,97%); los aislamientos de *Pythium* 'grupo F' presentan una variabilidad propia de la heterogeneidad de este grupo, aunque son más frecuentes los aislamientos con una altas mortalidades en pre-emergencia (76,59% y 54,48% de media) y muy baja en post-emergencia (8,90%). Por su parte, la mortalidad en pre-emergencia de los testigos fue resultado de la falta de poder germinativo de las semillas.

Tabla 1. Fitopatogenicidad, expresada en porcentajes de mortalidad*,** de las especies de *Pythium* aisladas del agua de riego del poniente almeriense, según el momento de inoculación sobre pepino cv. *Ashley*.

Especie inoculada	n	Momento de inoculación		
		Pre-siembra	Pre-emergencia	Post-emergencia
Testigo		8,95 ^a	8,11 ^a	0,00 ^a
<i>P. catenulatum</i>	16	36,55 ^b	18,78 ^a	1,65 ^a
<i>P. diclinum</i>	2	94,44 ^c	56,06 ^b	9,32 ^{ab}
<i>P. paroecandrum</i>	2	100,00 ^c	87,88 ^c	70,97 ^c
<i>Pythium</i> 'grupo F'	35	76,59 ^d	54,48 ^b	8,90 ^b

*: media de valores corregidos según transformación trigonométrica ($\arcsen\sqrt{\%}$)
**: diferente letra (en la misma columna) indica la existencia de diferencias significativas según el test de Newman-Keuls a $p < 0,05$
n: número de aislamientos.

La variación de las fitopatogenicidades dentro de la misma especie (Figura 2) es lo suficientemente grande como para que se observen algunos aislamientos patógenos en especies de fitopatogenicidad media reducida, o al contrario.

Teniendo en cuenta esta variación, propia de una población de microorganismos, se observa que aparecen diferencias (test de Newman-Keuls, $p < 0,05$) entre algunas especies (Figura 1, Tabla 1). Todas causaron mortalidad cuando se inocularon en pre-siembra. Sin embargo, *P. catenulatum* no causó mortalidad cuando se inoculó en pre-emergencia, ni posteriormente. Asimismo, *P. diclinum* tampoco la causó cuando la inoculación se efectuó en post-emergencia.

Por tanto, la especie más fitopatógena fue *P. paroecandrum*, seguida de *P. diclinum* y de aislamientos de *Pythium* 'grupo F' y, por último, de *P. catenulatum*.

Relación de la fitopatogenicidad con el desarrollo in vitro de la colonia de *Pythium* spp. Se observó una correlación positiva (Figura 3) entre la velocidad de crecimiento *in vitro* (PCA, 25°C en oscuridad) de los aislamientos de *Pythium* y las diferentes fitopatogenicidades medidas. Se observó una mayor correlación cuando la inoculación se realizó en pre-siembra ($R = 0,87$) y en pre-emergencia ($R = 0,88$) y algo más baja cuando en post-emergencia ($R = 0,62$). Si observamos los valores concretos de las mortalidades obtenidas (Figura 3), cuando las inoculaciones fueron en pre-siembra y en pre-emergencia, aumentaron sustancialmente en el momento en que las velocidades de crecimiento superaron los 0,7 mm/h y cuando fueron en post-emergencia a los 0,9 mm/h. Por otro lado, los aislamientos con colonias de mayor desarrollo aéreo se observaron entre las de mayor fitopatogenicidad para la misma velocidad de crecimiento, pero no fue una característica determinante [11].

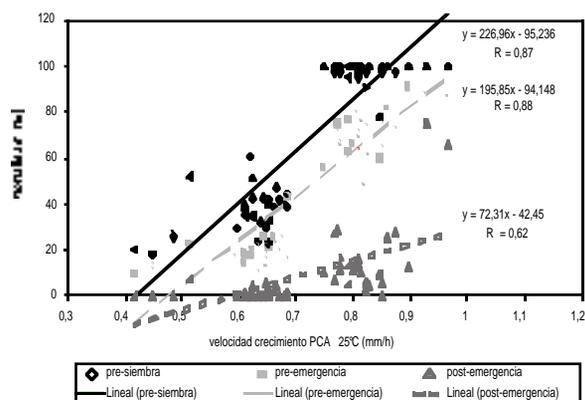


Figura 3. Relación entre la velocidad de crecimiento en PCA a 25°C y la fitopatogenicidad de los aislamientos de *Pythium* del agua de riego del Poniente almeriense, según el momento de inoculación sobre pepino cv. *Ashley* (*: corregida según transformación trigonométrica: $\arcsen\sqrt{\%}$).

Esta correlación positiva entre desarrollo *in vitro* y fitopatogenicidad es explicable, puesto que la gravedad de esta enfermedad parece estar intensamente relacionada con la capacidad de competencia saprofítica del fitopatógeno [16]. El desarrollo *in vitro* estaría relacionado con las actividades degradativas de sustancias que son los principales mecanismos implicados en esta enfermedad: producción de enzimas pectolíticas, enzimas celulolíticas y toxinas [14] y, en concreto, la transeliminasa de la fracción péctica [17] y, de manera más patente, endogalacturonasas y celulasas Cx, que ablandan los tejidos pero que desarrollan pequeña desintegración [18].

Para los aislamientos de *Pythium* de suelos de una zona concreta, la velocidad de crecimiento y otras características de la colonia nos sirven para predecir la fitopatogenicidad de un aislado determinado [5]. En el agua de riego de una comarca, también parece resultar útil la velocidad de crecimiento para esta predicción.

Conclusiones

Un 83,64% de los aislamientos de *Pythium* resultaron fitopatógenos. Tanto las tres especies identificadas como los aislados de esporangios filamentosos resultaron tener aislamientos fitopatógenos. La mortalidad observada en las plantas de pepino fue menor cuanto más tardía fue la inoculación con *Pythium* después de la siembra. Los aislamientos de mayor velocidad de crecimiento *in vitro* causaron una mayor mortalidad.

Bibliografía

- Gill DL. Pathogenic *Pythium* from irrigation ponds. Plant Disease Reporter 1970; 54: 1077-1079.
- Shokes FM, McCarter SM. Occurrence, dissemination, and survival of plant pathogens in surface irrigation ponds in southern Georgia. Phytopathology 1979; 69: 510-516.
- Pittis JE, Colhoun J. Isolation and identification of pythiaceous fungi from irrigation water and their pathogenicity to *Antirrhinum*, tomato and *Chamaecyparis lawsoniana*. Phytopath Z 1984; 110: 301-318.
- Bouhot D. Technique selective et quantitative d'estimation du potentiel infectieux des sols, terreaux et substrats infestés par *Pythium* sp. Ann Phytopathol 1975; 7: 155-158.
- Messiaen CM, Barriere Y, Belliard-Alonzo L, Delatullaye B, Bouhot D. Etude qualitative des *Pythium* dans quelques sols des environs de Versailles. Ann Phytopathol 1977; 9: 455-465.
- Ricci P. Moyens d'étude de l'inoculum d'un agent pathogène dans le sol à l'aide d'une technique d'isolement par "tout ou rien". Ann Phytopathol 1972; 8: 51-63.
- Ricci P. Mesure de la densité d'inoculum d'un agent pathogène dans le sol à l'aide d'une technique d'isolement par "tout ou rien". Ann Phytopathol 1974; 6: 441-453.
- Ricci P, Toribio JA, Messiaen CM. La dynamique des populations de *Pythium* dans les sols maraichères de Guadeloupe. I.-Méthodes d'étude. Ann Phytopathol 1976; 8: 51-63.
- Rodríguez R. *Pythium butleri* Subramanian aislado de plantitas de pepinos con "damping-off" ("cinturilla"). XOMA 1980; 3: 142-148.
- Sánchez J, Olivares JS, Gallego E. Occurrence and pathogenicity of *Pythium* spp. in the dust deposited on the greenhouse roofs in the Poniente region of Almería (south-east Spain). J Plant Pathol 2001; 83: 13-19.
- Sánchez J. *Análisis de la presencia del género Pythium Pringsh. en el agua de riego del Poniente almeriense (SE de España)*. Serie Tesis Doctorales nº 30. Almería, Servicio de Publicaciones de la Universidad de Almería, 1998.
- Sánchez J, Gallego E. *Pythium* spp. present in irrigation water in the Poniente region of Almería (south-eastern Spain). Mycopathologia 2001; 150: 29-38.
- Garret SD. Pathogenic root-infecting fungi. Londres, Cambridge University Press, 1970.
- Hendrix FF, Campbell WA. Pythiums as plant pathogens. Annu Rev Phytopathol 1973; 11: 77-98.
- Endo RM, Colt WM. Anatomy, cytology and physiology of infection by *Pythium*. Proc Am Phytopathol Soc 1974; 1:215-223.
- Bouhot D. Estimation of inoculum density and inoculum potential: techniques and their value for disease prediction. En: Schippers B, Gams W (Eds.) Soil-borne plant pathogens. Londres, Academic Press, 1979: 21-34.
- Turner MT, Bateman DF. Maceration of plant tissues susceptible and resistant to soft-rot pathogens by enzymes from compatible host pathogen combinations. Phytopathology 1968; 58: 1509-1515.
- Winstead NN, McCombs CL. Pectinolytic and cellulolytic enzyme production by *Pythium aphanidermatum*. Phytopathology 1961; 51: 270-273.