

## ANEXO A.6.2

# Protocolo de aislamiento de *Phytophthora cinnamomi* y *Pythium spiculum* a partir de muestras de raíz de suelo

marzo 2019

## INDICE

1 Aislamiento a partir de raíces .....	4
2 Aislamiento a partir de raíces y/o suelo en trampas de manzana: .....	4
3 Aislamiento a partir de suelo:.....	5
3.1 Segundo análisis .....	5
3.2 Observaciones .....	5
4 Medios de cultivo selectivos:.....	6
4.1 Medio de cultivo CMA-NARPH .....	6
4.2 Medio de cultivo CMA-PARPBH.....	6

# PROTOCOLO DE AISLAMIENTO DE *PHYTOPTHORA CINNAMOMI* Y *PHYTHIUM SPICULUM* A PARTIR DE MUESTRAS DE RAÍZ Y SUELO

Laboratorio de Producción y Sanidad Vegetal de Sevilla y Laboratorio de Patología Agroforestal de la Universidad de Córdoba

## 1 AISLAMIENTO A PARTIR DE RAÍCES

Seleccionar raicillas finas con síntomas de podredumbre.

Realizar un primer lavado con agua, con cuidado, para eliminar partículas de suelo.

A continuación, con objeto de eliminar los contaminantes del suelo, se puede proceder de una de las siguientes formas:

- Meter las raicillas en una bolsita de tul y lavarlas al chorro de agua durante al menos 2 h.
- Colocar las raicillas en una bolsa o contenedor de plástico provisto de tapón, añadir 50 ml de agua, agitar vigorosamente y tirar el agua, dejando retenidas las raicillas. Repetir el proceso varias veces hasta que el agua este clara. Secar las raicillas en papel de filtro estéril.

Cortar con escalpelo (bisturí) estéril trocitos pequeños (3-4 mm) y sembrar en medio de cultivo selectivo.

Incubar las placas durante 4-7 días entre 22 y 25º C en oscuridad, colocándolas boca abajo para evitar la condensación de humedad en la superficie del agar.

Paralelamente se escogen más raicillas y suelo para usarlo en trampas de manzanas.

## 2 AISLAMIENTO A PARTIR DE RAÍCES Y/O SUELO EN TRAMPAS DE MANZANA:

Se utilizan manzanas preferentemente de la variedad Granny Smith o en su defecto, Golden Delicious. Las manzanas deben estar más bien verdes (poco maduras) y sin manchas o heridas en la piel.

Limpiar y desinfectar ligeramente el exterior de la manzana con un algodón empapado en alcohol.

Cortar con escalpelo estéril (o con sacabocados estéril de unos 5-10 mm de diámetro) “cubitos” o cilindros de trocitos de manzana que extraeremos con cuidado y en el hueco introduciremos una mezcla de suelo y/o raicillas que luego taparemos con el trozo de manzana extraído, sellándolo con cinta adhesiva (fijo, cinta aislante o similar) para que conserve bien la humedad y no entre ningún otro microorganismo ajeno al suelo/raicillas.

Incubar entre 4 y 7 días entre 22 y 25° C. A partir del tercer día de incubación, se observarán las manzanas diariamente por si aparecen podredumbres en la piel de color marrón oscuro y consistencia dura (las podredumbres marrón claro y blandas se deben a bacterias del suelo). Cuando aparezcan las manchas oscuras, se procede a cortar trocitos de manzana del borde de la lesión con escalpelo estéril y se siembran en medio de cultivo selectivo, incubando las placas en las condiciones ya descritas en el apartado anterior.

### 3 AISLAMIENTO A PARTIR DE SUELO:

Homogeneizar, secar al aire o en estufa aireada a 35° C, y tamizar el suelo para eliminar partículas gruesas (tamiz de 2 mm de poro).

Preparamos las trampas vegetales cortando trozos de filodio de eucalipto de 4-5 mm<sup>2</sup> de superficie, eliminando los bordes y el nervio principal. Los filodios deben estar bien lavados con agua. Puede utilizarse *Eucalyptus globulus* o *E. camaldulensis*.

Poner 10 g de suelo en 120 ml de agua en vasos estrechos. Agitar con varilla y dejar reposar hasta que el agua esté clara. Colocar flotando en la superficie 5-10 trocitos de eucalipto por vaso. Prepararemos 5-6 vasos por muestra de suelo. Incubar los vasos a 22-25° C durante 4 días. Tras la incubación, las trampas de eucalipto se extraerán con pinzas estériles, se lavan tres veces con agua destilada estéril en cámara de flujo, se secan con papel filtro estéril y se siembran en medio de cultivo selectivo, incubando las placas en las condiciones ya descritas en el primer apartado.

#### 3.1 Segundo análisis

Si el primer análisis resulta negativo, dejar la muestra de suelo a temperatura ambiente y una vez transcurrido al menos 1 mes, volver a repetir el aislamiento usando sólo las trampas vegetales tanto de manzanas como de filodios de eucalipto.

#### 3.2 Observaciones

La recogida de las muestras se realizará preferentemente en otoño, aunque también se puede en primavera.

Las muestras de raíces se procesaran recién llegadas o en caso contrario se conservarán en frigorífico hasta su análisis. El suelo se dejara secar antes de procesarlo.

## 4 MEDIOS DE CULTIVO SELECTIVOS:

### 4.1 Medio de cultivo CMA-NARPH

Corn Meal Agar (CMA)	17 g
Nistatina 4980 UI/mg	30 mg
Ampicilina sódica	250 mg
Rifampicina	10 mg
Pentacloronitrobenzeno (PCNB)	100 mg
Himexazol	2 ml solución diluida
Agua desionizada	1 L

En un matraz de 2 l esterilizar 948 ml de agua desionizada con los 17 g de CMA. También esterilizar un matraz de 100 ml con 48 ml de agua desionizada.

Cuando el matraz pequeño esté frío, añadir los antibióticos y fungicidas, agitar y verter el contenido en el matraz grande cuando éste alcance la temperatura de 45º C. Agitar y verter en las placas.

Solución diluida de Himexazol: 5 ml del producto comercial Tachigaren en 67 ml de agua desionizada

### 4.2 Medio de cultivo CMA-PARPBH

Corn Meal Agar (CMA)	17 g
Pimaricina	10 mg
Ampicilina sódica	250 mg
Rifamicina	10 mg
Pentacloronitrobenzeno (PCNB)	100 mg
Himexazol	2 ml solución diluida
Benomilo (Benlate 50%)	20 mg
Agua desionizada	1 L

Solución diluida de Himexazol: 5 ml del producto comercial Tachigaren en 67 ml de agua desionizada.