

Estudio del síndrome de decaimiento en el cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Jack.: Fr.) P. Kumm

M. J. ZANÓN, J. ARMENGOL, J. C. VILASECA, C. JORDÁ

En este trabajo se estudió un cultivo de *Pleurotus ostreatus* que mostraba síntomas de decaimiento. Los carpóforos presentaban un desarrollo deprimido y, en la zona de cultivo, todas las setas morían en el mismo estado de desarrollo en todos los paquetes o unidades de cultivo conectadas, manifestándose ausencia de la segunda floración.

Pruebas realizadas con anterioridad determinaron la aparición de dobles cadenas de ARN (dsRNA) lo que podría estar relacionado con la presencia de virus.

Los principales objetivos de esta investigación fueron la determinación de un virus como posible agente causal de la enfermedad y la aplicación de termoterapia para la obtención de un cultivo con garantías de sanidad.

Observaciones realizadas por microscopía electrónica (M.E.) mostraron la presencia de partículas esféricas (20-30 nm). Los resultados obtenidos del estudio térmico indicaron que el mejor crecimiento miceliar se obtuvo a 24° C determinándose la temperatura letal en 38° C para un tratamiento de 10 días de duración. La aplicación de termoterapia para el saneamiento del micelio mostró que un tratamiento térmico durante 10 días a 36° C favoreció el crecimiento de todo el material lo que puede estar relacionado con una disminución de la infección.

M. J. ZANÓN, J. ARMENGOL, J. C. VILASECA, C. JORDÁ. Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n 46022, Valencia.

Palabras clave: *Pleurotus ostreatus*, termoterapia, infección viral, Microscopía Electrónica

INTRODUCCIÓN

Pleurotus ostreatus (Jacq.:Fr.) P. Kumm, es un basidiomiceto que pertenece a la familia de las Agaricáceas, de himenio con láminas o pliegues, pie lateral y esporas blancas. Se conoce bajo los nombres vulgares de seta de ostra, seta de concha, orellana o pleuroto ostreado (TOHARIA, 1985). Se trata de una especie saprofita o parásita débil de árboles caducifolios y que raramente aparece en coníferas (MORENO *et al.*, 1986). Es una seta comestible muy apreciada y, en los últimos años, se ha difundido mucho su consumo al cultivarse a gran escala.

El cultivo de este hongo es posible realizarlo con diferentes técnicas, pero en todas ellas se realiza la siembra del micelio sobre un sustrato leñoso-celulósico húmedo (casi siempre pasteurizado), se incuba a 20-25° C mientras se tiene envuelto en plástico y, por último, se mantiene descubierto en sitios muy húmedos y frescos, generalmente a menos de 15° C, hasta que se desarrollan las setas. Con este fin se han descrito distintos tipos de sustratos para el cultivo entre los que destacan el cultivo industrial sobre troncos cortados, el cultivo sobre tocones y el cultivo industrial sobre paja de cereales.

Las plagas más frecuentes en el cultivo de *P. ostreatus* son los dípteros y colémbolos. Las enfermedades pueden estar causadas por hongos patógenos o competidores, bacterias y virus (GARCÍA ROLLÁN, 1987). En cuanto a hongos, un estudio reciente (CORPAS y BASALLOTE, 2002) relaciona la ausencia de florada de *Pleurotus sp.* con la acidificación del sustrato producida por la contaminación con hongos del género *Trichoderma* que reduce el pH del mismo a niveles por debajo del requerido por *Pleurotus* para su desarrollo. En lo referente a bacterias, las enfermedades causadas por éstas están consideradas como la principal causa de pérdidas en el cultivo de hongos siendo las más fuertes cuando las infecciones están causadas por *Pseudomonas tolaasii* (Paine) y *Pseudomonas agarici* (Young) (IACOBELLIS y LO CANTORE, 1997). Respecto a virus, los micovirus fueron descubiertos como agentes causales de enfermedades de las setas en el año 1960 debido a la aparición de una enfermedad en *Agaricus bisporus* (J. Lange) Imbach llamada enfermedad de "La France" o "enfermedad X", que ocasionaba deformaciones en el cuerpo fructífero acompañadas de una disminución de la producción (MOORE, 1990). Según ROMAINE (2003), ya en 1950 Sinden y Hauser describieron un desorden infeccioso en una granja de Estados Unidos dedicada a la producción comercial de *A. bisporus*. Esta enfermedad, conocida hoy como la enfermedad de "La France", se dispersó por todo el mundo siendo un factor limitante muy importante en la producción comercial de las setas relacionándose esta manifestación con la observación por microscopio electrónico de partículas similares a virus ("virus like particles, VLPs").

Han sido descritas algunas enfermedades de hongos o alteraciones fenotípicas de hongos originadas por virus, considerándose que la naturaleza de tales anomalías sea viral por los resultados logrados en pruebas de infectividad con partículas libres o por anastomosis entre hifas compatibles. La mayoría de los micovirus son de dsRNA pero, investigaciones realizadas durante las últimas dos

décadas han permitido aislar y describir varios virus que se pueden relacionar con la enfermedad de "La France" localizándose entre éstos un único miembro de la familia de micovirus con ssRNA, los *Barnaviridae* (ROMAINE, 2003).

En el año 1993, en distintas zonas de Sicilia dedicadas al cultivo protegido de *P. ostreatus* se observaron distintas anomalías que afectaban a la morfología de los carpóforos. Estas anomalías consistían en el asurcado y rizado de los márgenes, concavidad del sombrero y distorsiones en el tallo. Se realizaron observaciones en el microscopio electrónico de muestras parcialmente purificadas de estos carpóforos infectados que revelaron la presencia de partículas virales isométricas con un diámetro de 20-25nm. Este fue el primer resultado de la posible presencia de micovirus en cultivos sicilianos de *P. ostreatus* concluyéndose que su cultivo debía basarse en el uso de micelio sano, que los cultivos infectados deberían ser eliminados y las estructuras que propagan el cultivo deberían ser desinfectadas (CANNIZARO y TORTA, 1994).

Entre los métodos para la obtención de material libre de virus se encuentra el tratamiento por termoterapia basada en la susceptibilidad diferencial entre el hospedante y sus parásitos internos o externos en relación con las altas temperaturas (GRATWICK y SOUTHEY, 1986; JARVIS, 1998). Un tratamiento del micelio de *A. bisporus* infectado por virus a 33° C ha repercutido en muchos casos en un crecimiento mejor y más rápido. Presumiblemente este tratamiento, que dura unas dos semanas, afecta al virus, pero nunca se ha podido comprobar el total saneamiento del micelio (DIELEMAN-VAN ZAA-YEN, 1972).

La realización del presente trabajo de investigación se fundamenta en el estudio de las causas que provocaron la aparición de anomalías en un cultivo comercial de *P. ostreatus* en una plantación de La Rioja. En Junio de 2000 se observaron distintas muestras de carpóforos que presentaban un desarrollo deprimido; entre los síntomas a desta-

car cabe citar los márgenes curvados, tono amarillento del micelio, tacto viscoso y un aspecto de aparente podredumbre. La intensidad de estos síntomas era variable.

Los síntomas observados en la zona de cultivo indicaban que las setas morían en el mismo estado de desarrollo en todos los paquetes o unidades de cultivo conectadas, ausencia de la segunda floración, parada del desarrollo y prevalencia de casos con el origen de la semilla.

Pruebas realizadas con anterioridad determinaron la presencia de dobles cadenas de ARN lo que planteó la hipótesis de un posible virus como agente causal del síndrome descrito. En este sentido se plantearon los siguientes objetivos:

1. Determinación de la posible implicación de un agente de etiología viral que pudiera explicar la sintomatología presentada.
2. Aplicación de termoterapia al micelio como medio para la obtención de un cultivo con garantías de sanidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de muestras fúngicas. En el conjunto de las experiencias de este trabajo se utilizaron tres aislados de *P. ostreatus* asignando un código de identificación a cada uno de ellos en función del grado de afección que presentaban. Así, el código 0 correspondía a material supuestamente sano en forma de granos de cereal inoculados con micelio preparado para el cultivo, el código 1 fue asignado a las muestras que presentaban una afección leve mostrando carpóforos ligeramente amarillentos, márgenes poco curvados y una disminución notable en su crecimiento. Por último, el código 2 fue asignado a las muestras con mayor nivel de afección (síntomas similares a los anteriores pero más severos).

De los granos inoculados (muestra 0) y de las zonas afectadas de los carpóforos del resto de muestras (1 y 2) se tomaron fragmentos que se sembraron en placas Petri usando como medio nutritivo Malt Extract Agar (MEA) al que se añadieron 500 mg L⁻¹ de sulfato de estreptomycin (MEAS). Las

placas así sembradas se mantenían a 27° C durante 7-10 días repicando sucesivamente en MEA hasta obtener la cantidad de micelio necesaria. A partir de este micelio se realizaba un nuevo cultivo en medio líquido preparando de 2 a 3 matraces (de 250 ml) para cada muestra usando como medio nutritivo Potato Dextrose Broth (PDB) dejando los matraces en agitación en baño y manteniendo la temperatura a 27° C durante 10 días.

Observación por Microscopía Electrónica (M.E.): se realizaron preparaciones del micelio para su observación por el Microscopio Electrónico de Transmisión, previo machacado del material (preparado directamente de placa) y resuspensión en tampón. Se prepararon las rejillas de cobre (300 mesh) recubriéndolas con film de carbono y colocándose una gota de la preparación fúngica sobre las mismas, procediendo tras 4 minutos de exposición y lavado posterior a su tinción con la sal sódica del ácido fosfotúngstico al 2% y pH 6,5. Posteriormente se lavó con agua destilada y la preparación, una vez seca, se observó con un microscopio electrónico (Philips 600).

Para mejorar la visualización de las partículas se procedió al repicado en medio líquido (PDB) extrayendo las bolas de micelio formadas a los 15 días y se sometió al material a un método de prepurificación y concentración de los posibles agentes patógenos presentes. El método de purificación seguido fue el de KITANO *et al.* (1961) que consistió en homogeneizar en tampón fosfato K 2,5 M y pH 6,8 añadiendo 0,8 (v) de una mezcla de 2-butoxi-etanol+2-etoxi-etanol en proporción 1:2, centrifugar a 6500 rpm (10 minutos) descartando el precipitado y sometiéndolo a un ciclo de centrifugación diferencial de 30.000 rpm. durante 1 hora y resuspensión en tampón fosfato 0,033 M, pH= 6,8 (0,2 ml/100), concluyendo con una centrifugación a 6.000 rpm. tras toda la noche en resuspensión. El sobrenadante (ligeramente opalescente) se separó para su observación al M.E. previa tinción con la sal sódica del ácido fosfotúngstico 2% pH 6,0. En el pro-

ceso de purificación se realizaron algunas modificaciones con el fin de mejorar el proceso. Una de estas consistió en la utilización de Triton-X en lugar de 2-butoxi-etanol + 2-etoxietanol en el primer paso, utilizando también una mezcla de cloroformo-butanol lavados previamente con bisulfito sódico sustituyendo dicha mezcla a los dos compuestos anteriores. Una vez realizada esta purificación, se procedió análogamente al método de M.E. anteriormente descrito, comparándose ambos métodos.

Influencia de la temperatura en el crecimiento miceliar. Los aislados se hicieron crecer en medio de cultivo MEA. Se prepararon 5 placas por aislado. Un fragmento circular de 8mm de diámetro del hongo, extraído con sacabocados de la zona de crecimiento activo (zona externa del micelio crecido en placas mantenidas hasta entonces a 27° C), se colocó en el centro y se mantuvo en estufa de temperatura regulable durante un tiempo aproximado de una semana. Las temperaturas estudiadas fueron: 24° C, 27° C, 30° C, 33° C y 36° C.

Se calculó el crecimiento radial diario para cada aislado realizando dos mediciones en cada una de las placas (10 por aislado). Estas medidas se hicieron sobre los ejes perpendiculares trazados previamente sobre las placas, midiendo los diámetros del crecimiento miceliar del hongo. El cálculo se efectuó con la fórmula:

$$\text{CRD} = (D-8) / (2xd)$$

donde:

CRD es el Crecimiento Radial Diario en mm.

D es el diámetro medido en mm.

d son los días de crecimiento a la temperatura en estudio

Búsqueda de la temperatura letal para el micelio de *P. ostreatus*. Tras el estudio térmico anterior se buscó la temperatura letal para el hongo. Se estudió la supervivencia del micelio tras diez días de tratamiento a las temperaturas de 36° C, 37° C, 38° C y 39° C continuando el rango de temperaturas ante-

riormente ensayado que iba de 24 a 36° C. Para ello se prepararon 5 placas Petri con MEA para cada aislado del modo descrito en el apartado anterior y tras incubarlo a la temperatura de estudio durante 10 días, se incubaban de nuevo a 27° C esperando una respuesta de supervivencia en forma de crecimiento miceliar o bien la muerte del micelio.

Aplicación de la termoterapia para el saneamiento del micelio de *P. ostreatus*. El efecto de la aplicación de termoterapia en el micelio se estudió por comparación del crecimiento miceliar del hongo entre placas tratadas a las diferentes temperaturas y placas sin tratar. Para ello, se sembraron 5 placas Petri en medio de cultivo MEA de los aislados aparentemente sano (muestra 0) y enfermo (muestra 2) permitiendo con su elección observar el efecto que se produce al tratar el material con diferente grado de infección. Los cultivos se mantuvieron 10 días en estufa regulable a las temperaturas de estudio (33° C, 34° C, 35° C, 36° C y 37° C) extrayéndose a continuación para ser repicadas en otras 5 placas Petri. Éstas se incubaban en estufa a 27° C y se comparaba el crecimiento radial diario con el experimentado para las 5 placas control de cada aislado que crecieron a 27° C sin ningún tratamiento térmico previo, estudiando así un posible saneamiento del material tratado por comparación entre el crecimiento radial del micelio tratado y no tratado para cada aislado. El material empleado para todos los aislados procedía de cultivos en placas Petri mantenidas hasta entonces a 27° C.

En el presente estudio térmico, tanto para la determinación de la temperatura letal para el micelio como para la aplicación de la termoterapia para el saneamiento del micelio de *P. ostreatus*, los días de tratamiento a las diferentes temperaturas se cifró en 10 de acuerdo con la bibliografía consultada que recoge ensayos sobre *A. bisporus*. Al tratarse de especies diferentes se realizaron los estudios térmicos anteriores variando el número de días de tratamiento, así se ensayaron menos días en el tratamiento a las temperaturas más elevadas para ver si la temperatura

letal seguía siéndolo, y más días a 36° C para conocer la variación experimentada entonces en el crecimiento o si podría incluso resultar letal para el micelio.

De este modo, se ensayaron otros tratamientos. Se sometió al material a 20 días a 36° C extrayendo las placas (5 por aislado) sucesivamente a partir del día 11 y, tras introducir las a 27 °C, se midieron los ratios de crecimiento. Del mismo modo, también se estudió el crecimiento de los tres aislados durante los 10 primeros días de tratamiento a 37 y a 38° C extrayendo las placas desde el primer día de tratamiento y midiendo su ratio de crecimiento de la misma manera.

Análisis estadístico. El análisis estadístico del crecimiento radial diario del micelio (C.R.D.) se realizó utilizando el paquete estadístico S.A.S , versión 6 (S.A.S. INSTITUTE, INC CARY NC) y las medias se compararon utilizando la prueba de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cultivo de muestras fúngicas. Se obtuvieron cultivos puros en placas Petri para los tres aislados observándose un crecimiento más rápido para el aislado procedente de la muestra 0 respecto a los aislados procedentes de las muestras 1 y 2, lo cual parece ser una respuesta lógica según la hipótesis inicial de las diferencias observadas en la incidencia de los síntomas y su posible relación

con una infección viral. Esta diferencia de crecimiento en medio de cultivo MEAS se puede observar en la Figura 1.

Observación por Microscopía Electrónica (M.E.). Debido a que en la observación directa de las muestras procedentes de placa y previo machacado de las mismas con tampón no se pudieron observar partículas sospechosas se procedió a realizar una prepurificación y concentración de los posibles agentes virales ya que este resultado negativo podría deberse a una baja concentración de los mismos en el tejido de los hongos.

Los mejores resultados en la observación directa en el microscopio electrónico de transmisión se obtuvieron tras machacar el material con una mezcla de cloroformo-butanol lavados previamente con bisulfito sódico, lo que supuso la introducción de una modificación en la purificación para virus en hongos de Kitano *et al.*(1961) en el primero de sus pasos empleando esta mezcla en lugar de 2-butoxietanol+2-etoxietanol.

Tras purificación y concentración de los posibles agentes virales (con las dos modificaciones ensayadas: la descrita en el apartado anterior y la que emplea Triton-X en el primer paso de la purificación) se detectaron partículas esféricas de 25-30 nm de tamaño en todas las muestras siendo menor en número en la supuestamente sana (muestra 0). Estas partículas se recogen en la Figura 2.

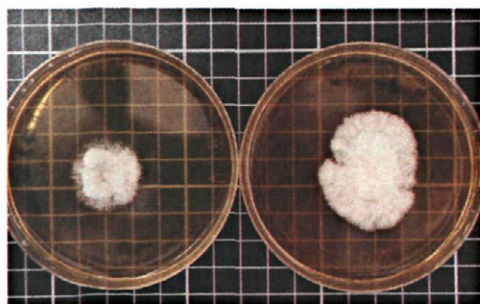


Figura 1: Crecimiento del micelio de *P. ostreatus* en placas Petri con medio de cultivo MEAS a los 4 días de la siembra (izquierda muestra número 2 y derecha muestra número 0)

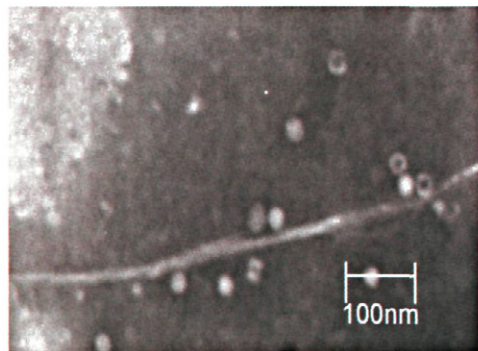


Figura 2: Partículas esféricas observadas tras purificación con cloroformo-butanol

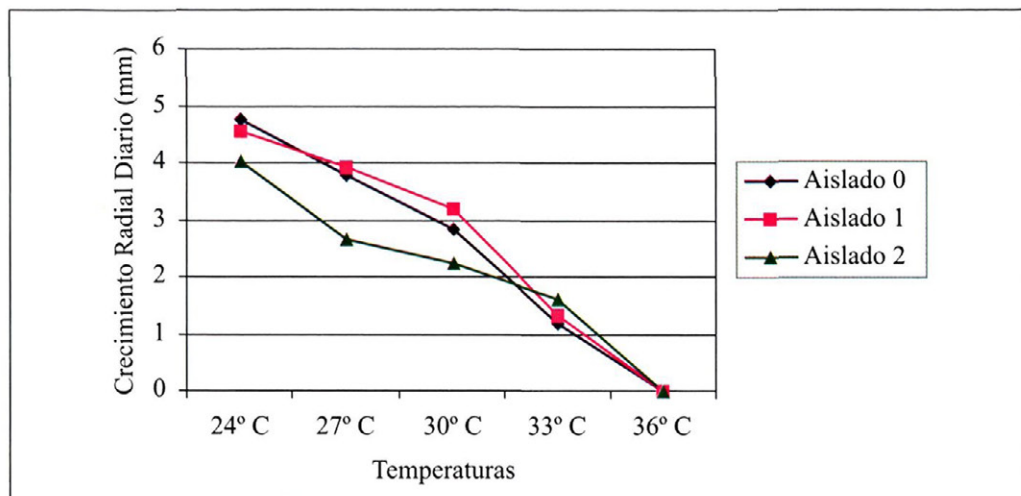


Figura 3: Diagrama de crecimiento de los distintos aislados de *P. ostreatus* a diferentes temperaturas

Este tipo de partículas son coincidentes con las descritas en la bibliografía como virus afectando a distintos hongos tales como: *A. bisporus* (Dieleman-van Zaayen, 1972) y *Penicillium stoloniferum* (Spire, 1971). Podría tratarse de un Chrysovirus o Partitivirus siendo probablemente el primero ya que éstas últimas se muestran como partículas vacías en la tinción negativa y no son así en el caso que nos ocupa (Murphy *et al.*, 1995).

Influencia de la temperatura en el crecimiento miceliar. En el Cuadro 1 se recogen los resultados del crecimiento radial diario de los aislados de las muestras 0, 1 y 2 para las temperaturas comprendidas entre 24° C y 36° C. Estos valores nos permitieron obtener las curvas de crecimiento mostradas

en la Figura 3 en la que se observa que el crecimiento radial diario disminuye a medida que aumenta la temperatura, hasta llegar a 36° C donde ya no se produce crecimiento miceliar.

De este modo, se observó que a 24° C el aislado considerado como sano fue el que presentó un crecimiento radial mayor y el más enfermo el menor. Conforme aumentó la temperatura, el ratio de crecimiento miceliar variaba, así a 27° C y a 30° C fue el aislado número 1 el que crecía más, pudiendo deberse a la acción de la temperatura sobre el micelio enfermo, resultando ésta inadecuada para el virus por lo que se desarrolla peor liberando al micelio y por ello éste es capaz de presentar un crecimiento igual o superior al aislado 0. Esto se observó también al llegar a 33° C donde el micelio del aislado 2 fue

Cuadro 1. Crecimiento radial diario (mm) de aislados de *P. ostreatus* en medio de cultivo MEA a diferentes temperaturas.

	24° C	27° C	30° C	33° C	36° C
Aislado 0	4,78 ^a	3,8	2,84	1,21	0
Aislado 1	4,56	3,92	3,21	1,34	0
Aislado 2	4,05	2,65	2,24	1,63	0

^a Los resultados indicados son media de 5 repeticiones

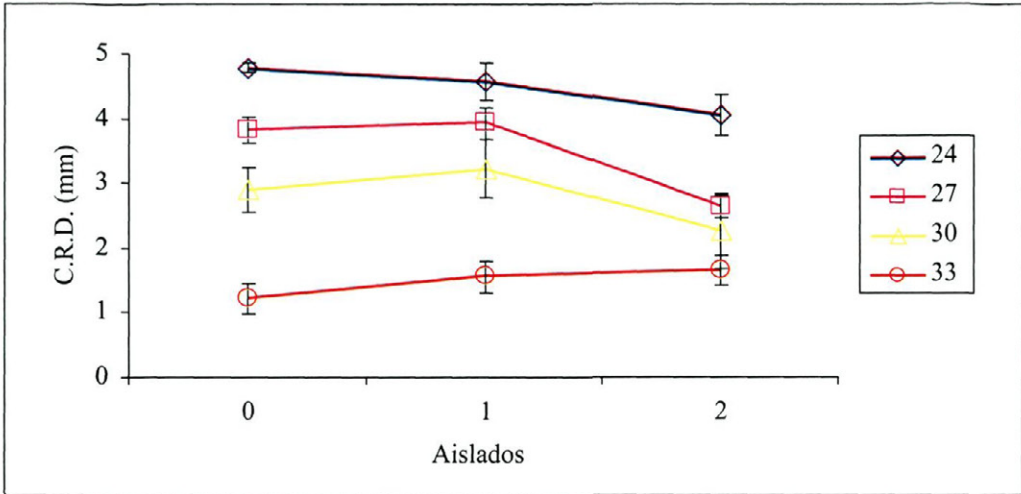


Figura 4: Comparación del crecimiento radial diario (mm) de aislados de *P. ostreatus* en medio de cultivo MEA a diferentes temperaturas

capaz de superar a los otros dos aislados, invirtiéndose el resultado inicial; a 33° C el aislado que más creció fue el número 2. El estudio concluyó a 36° C donde el micelio ya no crecía para ningún aislado. La temperatura de 36° C impedía el crecimiento, por lo tanto se consideró el umbral superior de temperatura.

La comparación de medias se realizó utilizando la prueba de Tukey de modo que para las distintas medidas realizadas en las placas se obtuvo una diferencia no significativa, en cambio para el resto de factores (temperatura, aislado y su interacción) sí existen diferencias ($P < 0,05$). La eficiencia obtenida a partir del modelo factorial (3 x 4) fue $R^2 = 0,94$. Considerando la interacción temperatura / aislado el mejor crecimiento se obtuvo a 24 °C para el aislado más sano mientras que el peor se obtuvo a 33 °C para el mismo aislado (Figura 4).

Búsqueda de la temperatura letal para el micelio de *P. ostreatus*. El resultado de la supervivencia de los diferentes aislados tras diez días de tratamiento se estudió a las temperaturas de 36° C, 37° C, 38° C y 39° C. La elección de estas temperaturas se hizo al

conocer los resultados del estudio anterior, donde el micelio dejó de crecer en las placas a 36° C, lo que llevó a buscar la temperatura letal justo por encima de ésta. Se obtuvieron resultados de supervivencia positivos para todos los aislados estudiados (0,1 y 2) a la temperatura de 36° C y 37° C, siendo todos

Cuadro 2. Crecimiento radial diario (mm) en medio de cultivo MEA a 27° C de los aislados 0 y 2 de *P. ostreatus* sin tratar y tras un tratamiento durante 10 días a diferentes temperaturas.

Tª Estudiada	Aislado	C.R.D. (mm) ^a
33° C	0	3,82 ^b
	2	3,4
34° C	0	3,57
	2	3,24
35° C	0	3,21
	2	2,77
36° C	0	4,16
	2	3,43
37° C	0	2,02
	2	1,99
No tratado (27° C)	0	3,8
	2	2,65

^a Tratado 10 días a la temperatura estudiada

^b Los resultados indicados son media de 5 repeticiones

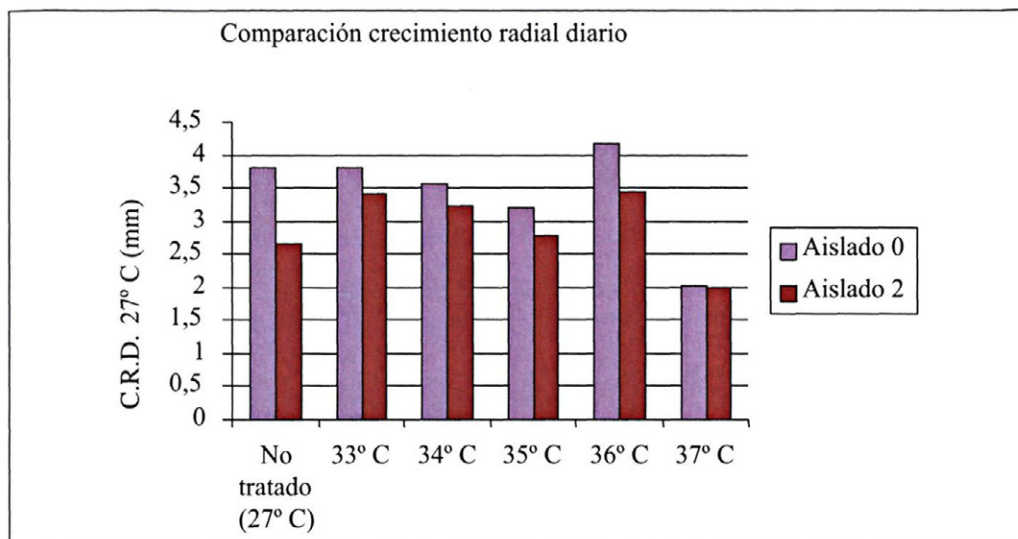


Figura 5: Comparación del crecimiento radial diario a 27° C entre aislados 0 y 2 de *P. ostreatus* (en mm) sin tratar y tras un tratamiento durante 10 días a diferentes temperaturas

los resultados de supervivencia negativos después del tratamiento de 10 días a 38° C y 39° C. Por lo tanto la temperatura letal para el micelio de *P. ostreatus* se obtuvo a partir de 38° C para un tratamiento de 10 días de duración.

Aplicación de la termoterapia para el saneamiento del micelio de *P. ostreatus*. La diferencia obtenida en el crecimiento radial diario medido en mm entre el material tratado durante 10 días a las temperaturas de 33, 34, 35, 36 y 37° C y recuperado posteriormente sometiéndolo a 27° C para los aislados aparentemente sano (0) y severamente afectado (2) de *P. ostreatus*, se recoge en el Cuadro 2 donde se compara con el crecimiento radial diario a 27° C de los mismos aislados sin tratar.

A partir de estos datos, en la Figura 5, se observa que el crecimiento en placa a 27° C después del tratamiento durante 10 días a 33, 34, 35 y a 36° C en el caso del aislado 2 mejora respecto al material sin tratar en todas las temperaturas. En el caso del aislado 0 esta mejoría no se produce salvo para la tempera-

tura de 36° C. El tratamiento durante 10 días a 36° C provoca el mayor crecimiento de todo el material resultando el más efectivo.

El progresivo descenso de crecimiento experimentado en la secuencia de temperaturas comprendidas entre 33 y 35° C estaría relacionado con el descenso que también se observa en la Figura 3, de modo que al alejarse de la temperatura de crecimiento óptimo (cercana a 24° C) el micelio se vería afectado en su ratio de crecimiento. Al alcanzar la temperatura de 36° C el aumento de crecimiento observado se debería a que esta temperatura resulta perjudicial para el virus produciéndose, supuestamente, una disminución en el número de partículas virales en su interior. El descenso observado a 37° C está directamente relacionado con la proximidad a la temperatura letal del hongo por lo que el micelio comienza a tener dificultades de crecimiento.

Se realizó un nuevo estudio estadístico del Crecimiento Radial Diario empleando la prueba de Tukey y existiendo de nuevo diferencias significativas entre los factores aislado y temperatura, así como en su interacción

($P < 0,05$) pero no existiendo en las distintas medidas realizadas en las placas. En este caso la eficiencia del modelo elegido (factorial 2×6) fue $R^2 = 0,67$. Considerando la interacción temperatura /aislado el mejor crecimiento se obtuvo a 36°C para el aislado 0 y el peor se obtuvo a 37°C para el aislado 2 (Figura 5).

De los resultados obtenidos se puede deducir que un tratamiento térmico durante 10 días a 36°C favoreció el crecimiento del micelio de todo el material, lo que puede estar relacionado con una disminución la infección. De hecho, estudios realizados por Dieleman-van Zaayen (1972) sobre el intento de obtener material fúngico libre de infección viral, demostraron que tratamientos del micelio de *A. bisporus* con calor (33°C), implicaban un crecimiento mejor y más rápido provocado por una disminución en el número de partículas infecciosas tras el tratamiento pero no consiguieron la total liberación del material tratado de partículas virales, con lo que los intentos de obtener material libre de virus fallaron.

El hecho de que el material tratado a 36°C sea el que más creció implicaría la mayor disminución del número de partículas infecciosas y que el material supuestamente sano se recuperase, podría indicar que también éste estaba infectado, lo que se comprobó por otros trabajos realizados paralelamente al aquí presentado así como por las observaciones al M.E. donde podían observarse partículas virales.

En la Figura 6 se recogen los resultados del crecimiento radial del micelio tras haber sometido al material a distintos ensayos complementarios variando los tratamientos citados en la bibliografía, cifrados en 10 días, referidos a *A. bisporus*. De este modo, un tratamiento térmico de 20 días a 36°C no llegó a ser letal y se observó un mayor crecimiento para el aislado 1 a lo largo de todo el ensayo excepto al llegar al último día donde es superado por el aislado 2. Durante los 10 primeros días de tratamiento a 37°C se observó un descenso en el crecimiento hasta llegar al día 5 donde los tres

aislados se igualan y a partir del día 7 empezaron a recuperarse. Al llegar al día 10 prácticamente los tres aislados volvieron a igualarse. Por último, tras someter al material a un tratamiento a 38°C durante los 10

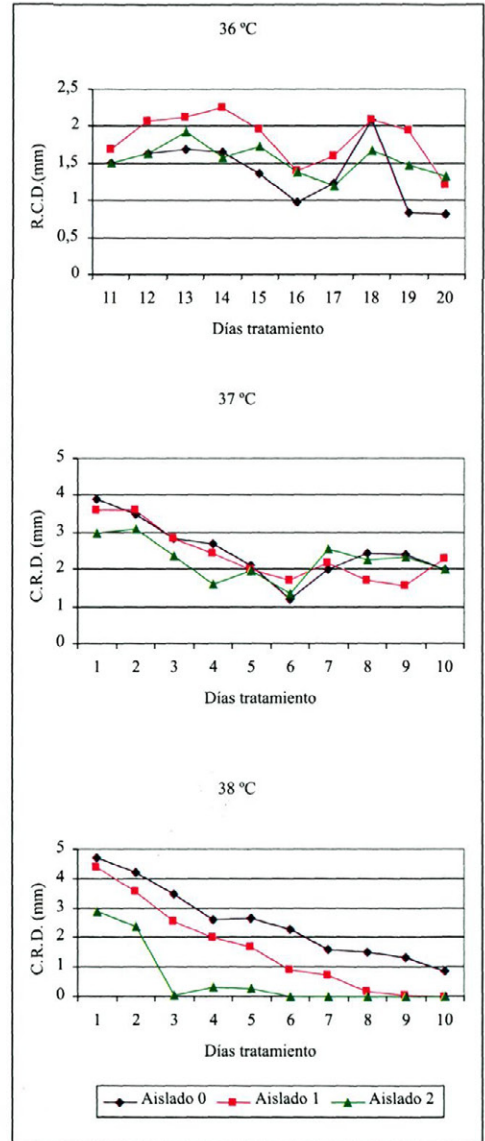


Figura 6: Desarrollo de crecimiento de los distintos aislados de *P. ostreatus* tras ampliar los días de tratamiento a diferentes temperaturas

primeros días se observó un descenso continuado hasta llegar a la muerte de los aislados 1 y 2 tras mantenerlos 9 y 3 días respectivamente a la temperatura de estudio. Cabe destacar el elevado ratio de crecimiento experimentado por todo el material durante los dos primeros días de tratamiento a 38° C pudiendo estar relacionado con una mejoría del micelio y quedando pendiente el estudio de la presencia de partículas virales a esta temperatura.

Tras el estudio térmico realizado se observó una adaptación del micelio a la tempera-

tura conforme ésta aumentaba; así, de los 36° C a los que el micelio dejaba de crecer sin ningún tipo de tratamiento se llegó incluso a los 38° C habiéndose conseguido crecimiento miceliar tanto a esta temperatura como a 37° C.

Por otra parte, la novedad que introduce el presente trabajo es la utilización de temperaturas más elevadas que las citadas en la bibliografía, al tratarse de *P. ostreatus* del que no se conoce información sobre estudios térmicos previos, lo que permitiría realizar el tratamiento de una forma más efectiva.

ABSTRACT

ZANÓN M. J., J. ARMENGOL, J. C. VILASECA, C. JORDÁ. 2005. Study of the decline syndrome in *Pleurotus ostreatus* (Jack.: Fr.) P. Kumm. *Bol. San. Veg. Plagas*, **31**: 431-441.

The purpose of this research was to study a culture of *Pleurotus ostreatus* that showed signs of decline, because the carpophores had a depressed development. In the growing area all the mushrooms died at the same moment of development in connected crop units and they showed absence of the second flowering.

Previous test demonstrated the presence of double strains of RNA (dsRNA) that could be related with the presence of virus.

The main objectives were the determination of a virus as a causal agent of the disease and the application of thermotherapy to obtain a healthy culture.

Electronic Microscope (EM) observations showed the presence of spherical particles (25-30 nm). The results of temperature study indicated that the best growth was found at 24° C and the lethal temperature was 38° C for 10 days of treatment. Related to the application of thermotherapy to obtain healthy cultures, the results showed that a treatment applied during 10 days at 36° C increased the growth rate of all the fungal cultures and it could be related with a decrease of the viral infection.

Key words: *Pleurotus ostreatus*, thermotherapy, viral infection, Electronic Microscope.

REFERENCIAS

- CANNIZARO, G. and TORTA, L., 1994. A virus-like alteration of carpophores of *Pleurotus ostreatus*. *Informatore-Agrario*, **33**: 51-52.
- CORPAS, C. y BASALLOTE, M. J., 2002. "Ausencia de florada en el cultivo de *Pleurotus ostreatus*". *Phytoma España*, **143** Noviembre 2002: 34-39.
- DIELEMAN – VAN ZAAYEN, A., 1972. Mushroom virus disease in the Netherlands: symptoms, etiology, electron microscopy, spread and control. Edit Centre for Agricultural Publishing and documentation. Wageningen. 130 pp.
- GARCÍA ROLLÁN, M., 1987. Cultivo de setas y trufas. Edit Mundi-Prensa, Madrid. 203 pp.
- GRATWITCK, M. and SOUTHEY, M. A., 1986. Hot-water treatment of plant material. *Bulletin* 201, 3rd edition, HMSO, London, 64pp.
- IACOBELLIS, N. S. and LO CANTORE, P., 1997. "Bacterial diseases of cultivated mushrooms in southern Italy" 10 th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union. June 1st-5th, 1997- Montpellier- Le Corum (France) Societé Française de Phytopatologie, pp. 33-37.
- JARVIS, W. R., 1998. Control de enfermedades en cultivos de invernadero. 3ª edición. Ed. Mundi-Prensa. 334 pp.
- KITANO, T., HARUNA, I. and WATANABE, I., 1961. Purification and concentration of viruses by an organic solvent system. *Virology*, **15**: 503-504
- MOORE, L. E., 1990. Fundamentals of fungi. Prentice Hall, 3ª Ed. New Jersey, USA. 578 pp.
- MORENO, G., G^a. MANJÓN J. L. y ZUGUAGA, A., 1986. La guía Incafo de los hongos de la Península Ibérica.

Tomo II. Edit. Incafo, Madrid, pp. 665-1276.
MURPHY, F. A., FANQUET C. M., BISHOP D. H. L., GHABRIAL S. A., GARVIS A. W., MARTELLI G. P., MAYO M. A. and SUMMERS. M. D., 1995. Virus Taxonomy-Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Virology. Ed. Springer-Verlag Wien, New York. 586 pp.
ROMAINE, C. P., 2003. Unravelling the viral complex in *Agaricus bisporus*. Departamento de Patología

Vegetal, Universidad de Pennsylvania, EE.UU. www.bspp.org.uk/icpp98/1.11/57.html (13/1/2003)
SPIRE, D., 1971. Virus des Champignons. *Physiol. Vég.*, **9** (4), 555-567, 1971.
TOHARIA, M., 1985. El libro de las setas. Edit. Alianza, Madrid. 205 pp.

(Recepción: 28 marzo 2005)
(Aceptación: 14 junio 2005)