

Efecto de la actividad de agua y de la temperatura sobre el comportamiento de *Penicillium oxalicum* frente a *Fusarium oxysporum*

María Pilar Santamarina Siurana¹, Josefa Roselló Caselles¹, Susana Barceló Cerdá² y Sonia Marín Sillué³

¹Departamento de Biología Vegetal (Botánica) y ²Departamento de Estadística e Investigación Operativa Aplicadas y Calidad, Escuela Técnica Superior del Medio Rural y Enología (ETSMRE), Universidad Politécnica de Valencia, Valencia; ³Institut de Recerca y Tecnologia agroalimentaries, Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària, Universitat de Lleida, Lleida, España

Resumen

En el presente trabajo se estudia in vitro la influencia de la actividad de agua (0,995; 0,98; 0,95; 0,90 y 0,85) y de la temperatura (15 y 25 °C) sobre el comportamiento de *Penicillium oxalicum*, como agente de biocontrol frente a dos especies de *Fusarium*: *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersici*, patógeno del tomate y *Fusarium oxysporum* fsp. *gladioli*, patógeno del gladiolo. La finalidad del mencionado estudio es conocer las posibles aplicaciones y utilización que pueden tener estos microorganismos en el control de estos agentes fitopatógenos. Se inocularon placas Petri en dos puntos, en uno de ellos *P. oxalicum* y en el otro, una de las especies de *Fusarium*. A partir de aquí se han tomado dos tipos de medidas: el grado de crecimiento y el Índice de Dominancia (I_D). Se observa que *P. oxalicum* muestra un grado de crecimiento superior en la mayor parte de las condiciones ensayadas, excepto la a_w 0,995, tanto a 15 °C como a 25 °C, y la a_w 0,98 a la temperatura de 15 °C. Asimismo, *P. oxalicum* presenta un mayor I_D a 25 °C y $a_w \leq 0,95$, y también a 15 °C y $a_w \leq 0,90$; para el resto de condiciones se observa una situación de mutua inhibición, lo que indica la posibilidad de que estas especies puedan concurrir en un amplio abanico de condiciones de temperatura y humedad, y el gran potencial de *P. oxalicum* para controlar a estas especies de *Fusarium*.

Palabras clave

Penicillium oxalicum, *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* fsp. *gladioli*, Ecofisiología, Biocontrol

Effect of water activity and temperature on competing abilities of *Penicillium oxalicum* against *Fusarium oxysporum*

Summary

The in vitro effect of water activity (0.995, 0.98, 0.95, 0.90 and 0.85) and temperature (25 and 15 °C) on competing abilities of the biocontrol agent *Penicillium oxalicum* against *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersici*, a tomato pathogen, and *Fusarium oxysporum* fsp. *gladioli*, a gladiolus pathogen, was evaluated. The aim of this study was to assess the suitability of *P. oxalicum* to be applied as a biocontrol agent against these phytopathogenic fungi. Plates were inoculated in two points with *P. oxalicum* and one of the *Fusarium* species. Two different approaches were taken into account: the growth rate of each isolate and the Dominance Index (I_D). *P. oxalicum* showed higher growth rates under most of the conditions tested except for 0.995 a_w at both temperatures and at 0.98 and 15 °C. Similarly, *P. oxalicum* was dominating at 25 °C and $\leq 0.95 a_w$, and at 15 °C and $\leq 0.90 a_w$, while under the other conditions studied, mutual inhibition situations were found. This indicates a high ability of this species to successfully compete over a wide range of conditions and consequently the potential of *P. oxalicum* as a biocontrol agent against these *Fusarium* species.

Key words

Penicillium oxalicum, *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* fsp. *gladioli*, Eco physiology, Biocontrol

Dirección para correspondencia:

Dra. M. Pilar Santamarina
Departamento de Biología Vegetal
Escuela Técnica Superior del Medio
Rural y Enología (ETSMRE)
Universidad Politécnica de Valencia
Avda. Blasco Ibáñez, 21
46010 Valencia
España
Tel.: +34-96 387 7414
Fax: +34-96 387 7149
e-mail: mpsantam@bvg.upv.es

Aceptado para publicación el 19 de septiembre de 2003

©2003 Revista Iberoamericana de Micología
Apdo. 699, E-48080 Bilbao (Spain)
1130-1406/01/10.00 Euros

En los últimos años se ha producido un avance importante en el descubrimiento de nuevos productos químicos que poseen interesantes actividades biológicas y que permiten utilizarlos como plaguicidas agrícolas o como antibióticos antifúngicos. Si bien el uso de plaguicidas químicos aún resulta necesario para controlar e incrementar los rendimientos agrícolas, el interés por el control biológico de las enfermedades fitopatógenas ha aumentado enormemente por parte de la comunidad científica; las noticias en la prensa por una agricultura más respetuosa con el medio ambiente y las exigencias de los consumidores por productos exentos de residuos químicos han contribuido a ello. Se hace necesario encontrar alternativas que sustituyan a los productos químicos de síntesis, utilizados como plaguicidas, para una mayor seguridad en la salud pública y una mayor protección del medio ambiente. Por ello, es preciso que se continúe y se incrementen las investigaciones en este campo, para encontrar nuevos agentes de biocontrol no contaminantes.

Cada vez son más los trabajos de investigación que demuestran la eficacia de los hongos como agentes de biocontrol frente a hongos, bacterias e insectos que causan enfermedades en los cultivos, incluso plagas, y por consiguiente importantes pérdidas económicas en la agricultura [1-3]. Entre las especies fúngicas cabe destacar al género *Penicillium* como uno de los agentes de biocontrol con mayor potencial para el control de las enfermedades de las plantas. Recientemente se ha demostrado que la especie *Penicillium oxalicum* es activa frente a *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersici*, que causa la fusariosis y la podredumbre de cuello y raíces en el cultivo del tomate [4,5].

Actualmente, también se está trabajando en la mejora de la capacidad antagonista de los agentes de biocontrol ya descubiertos y la combinación con otros sistemas de lucha. Los esfuerzos realizados en este campo se han incrementado de manera espectacular y esto se ve reflejado en el número de agentes de biocontrol ya disponibles en el mercado [6,7].

La competencia entre especies fúngicas se basa en dos estrategias [8]: la captura primaria de recursos y el combate. Así, la velocidad de crecimiento podría ser un índice de la captura primaria de recursos [9], mientras que el índice de dominancia [10] lo sería de la habilidad para el combate.

En el presente trabajo se estudia la ecofisiología del agente de biocontrol *Penicillium oxalicum* con el fin de conocer su comportamiento y desarrollo en diferentes condiciones de temperatura (15 y 25 °C) y actividad de agua (0,85-0,995 a_w), cuando interactúa con la cepa de *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersici* y la cepa de *Fusarium oxysporum* fsp. *gladioli*.

Material y métodos

Hongos. Las especies utilizadas son *Penicillium oxalicum* Currie and Thom, aislada de una muestra de maíz nacional procedente de un almacén de grano de la ciudad de Valencia en el año 1994; *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersici* (Saccardo) Snyder and Hansen CECT 2715 y *Fusarium oxysporum* fsp. *gladioli* (Massey) Snyder and Hansen CECT 2868, suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Todas las cepas fúngicas se mantuvieron en agar glucosado de patata (PDA).

Medio de cultivo y condiciones. Para determinar el efecto de la actividad de agua y la temperatura sobre el crecimiento de las cepas se realizaron 10 tratamientos

en los que se combinaron cinco valores de a_w y dos temperaturas. Para ello, se sembraron las colonias en crecimiento activo sobre el medio PDA con la actividad de agua ajustada a 0,995; 0,98; 0,95; 0,90 y 0,85 y se incubaron a las temperaturas de 15 y 25 °C. Todos los tratamientos se realizaron por duplicado.

Inoculación de los hongos. Las cepas fúngicas de *P. oxalicum*, *F. oxysporum* fsp. *lycopersici* y *F. oxysporum* fsp. *gladioli* se hicieron crecer en PDA a 25 °C. Transcurridos cinco días se obtuvieron discos de hongo de la zona periférica de las colonias con un diámetro de 8 mm. Posteriormente los discos se colocaron en placas Petri de 9 cm conteniendo el medio de cultivo para cada tratamiento, enfrentándose *P. oxalicum* con las cepas de *F. oxysporum* fsp. *lycopersici* y *F. oxysporum* fsp. *gladioli*, situando los discos a una distancia entre ellos de 4,4 cm.

Se guardaron en cajas herméticas de polietileno, en las que había recipientes de soluciones acuosas de glicerol a las a_w prefijadas, y fueron incubados a 15 y 25 °C de temperatura.

Determinación de la influencia de la temperatura y la a_w sobre el crecimiento de las colonias. Como parámetro para la cuantificación del crecimiento fúngico se ha utilizado el radio de la colonia fúngica sobre el medio de cultivo. Para cada colonia se dibujaron dos radios perpendiculares entre sí por la parte de detrás de la placa. Las medidas se realizaron con rapidez a fin de tener las cajas de polietileno abiertas el menor tiempo posible. Se representó el crecimiento radial en función del tiempo, para cada especie fúngica ensayada y cada una de las condiciones de a_w y temperatura (T). Los datos se ajustan a una recta correspondiente a la fase de crecimiento lineal, calculándose a partir de aquí la velocidad de crecimiento en mm/día.

Finalmente, para verificar la influencia de los factores a_w , T y especie (E), así como sus interacciones dobles ($a_w \times T$; $a_w \times E$ y $T \times E$) sobre el crecimiento de los hongos, se realizó el test de análisis de la varianza (ANOVA). Se utilizó el programa Statgraphics Plus 5.0 (Statistical Graphics Corp).

Estudio de las interacciones e Índice de dominancia (I_D). Después de ocho semanas de incubación se examinó macroscópicamente el tipo de interacción producido entre los micelios de las colonias enfrentadas. A cada hongo se le asignó un valor numérico utilizando el siguiente sistema descrito por Magan & Lacey [11]: crecimiento en común (1); inhibición mutua por contacto o con espacio entre colonias < 2 mm (2); inhibición mutua a distancia (3); inhibición de un microorganismo por contacto, la especie inhibidora continua creciendo a través de la colonia inhibida (4 para la especie dominante, 0 para la especie inhibida); inhibición de un microorganismo a distancia, la especie inhibidora continua creciendo a través de la colonia inhibida (5 para la especie dominante, 0 para la especie inhibida).

Resultados y discusión

Efecto de la temperatura y la actividad de agua sobre la velocidad de crecimiento. La influencia de la actividad de agua y la temperatura sobre el crecimiento fúngico tiene una gran importancia para comprender la ecología de las diferentes especies fúngicas, tanto en su comportamiento individual como en sus relaciones interespecíficas [10].

Los resultados del estudio del crecimiento de las tres cepas estudiadas *P. oxalicum*, *F. oxysporum* fsp. *lycopersici* y *F. oxysporum* fsp. *gladioli* bajo las diferentes condiciones ensayadas se pueden observar en la Figura 1. En estas gráficas se ha representado la ratio de crecimiento de cada especie fúngica para cada temperatura y actividad de agua, obtenidas a partir de la tendencia observada en la recta de regresión.

Las dos cepas estudiadas, en presencia de *P. oxalicum*, pertenecientes al género *Fusarium* tienen un comportamiento similar. La velocidad de crecimiento es máxima a 25 °C para valores de a_w de 0,995 y de 0,98, coincidiendo con los valores obtenidos por Lacey & Magan [10], que sitúan también en este intervalo a la mayoría de especies del género *Fusarium*. Por debajo de 0,95, a medida que disminuye la actividad de agua, el crecimiento fúngico sufre una importante caída siendo nulo a 0,85. Por lo tanto podemos considerar 0,90 como valor de a_w mínimo para las dos cepas ensayadas, resultados que coinciden con los encontrados por otros autores [9,12].

A la temperatura de 15 °C los valores de velocidad de crecimiento son siempre inferiores a los obtenidos para 25 °C, para todas las cepas estudiadas.

En la Figura 1 se reflejan también los valores de crecimiento radial de *P. oxalicum* cuando crece frente a *F. oxysporum* fsp. *gladioli* y *F. oxysporum* fsp. *lycopersici* bajo las diferentes condiciones de a_w y temperatura ensayadas.

El crecimiento óptimo para este microorganismo es a la temperatura de 25 °C y a_w de 0,98, donde llega a alcanzar valores de 6,5 mm/día cuando crece frente a *F. oxysporum* fsp. *gladioli*, y de 5,35 mm/día cuando se enfrenta con *F. oxysporum* fsp. *lycopersici*. Con a_w de 0,85 el crecimiento es muy lento con valores menores de 1 mm/día en ambas situaciones.

A la temperatura de 15 °C el crecimiento es menor que a 25 °C, siendo también la a_w de 0,98 con la que se obtiene la máxima velocidad de crecimiento con valores mucho más bajos (2,4 mm/día) que a 25 °C. De la misma manera, *P. oxalicum* tuvo una velocidad máxima menor en presencia de *F. oxysporum* fsp. *lycopersici* que de *F. oxysporum* fsp. *gladioli*, valores que coinciden con los reseñados por Sáenz [13].

Las velocidades de crecimiento de *P. oxalicum* fueron siempre superiores a las de *Fusarium* excepto a 25 °C y 0,995 a_w , y a 15 °C a 0,98-0,995 a_w , lo cual indica una mayor habilidad para competir bajo un amplio rango de condiciones y por lo tanto su potencial como agente de biocontrol.

El análisis estadístico de la varianza (ANOVA) representado en la Tabla 1 nos demuestra con un nivel de confianza del 95%, el efecto significativo que los factores

Tabla 1. Análisis de la varianza del crecimiento de *P. oxalicum* frente a *F. oxysporum gladioli* (2868) y *P. oxalicum* frente a *F. oxysporum lycopersici* (2715); significancia de los factores actividad de agua (a_w), temperatura (T), especie fúngica (E) y sus interacciones dobles ($a_w \times T$, $a_w \times E$ y $T \times E$).

| Factor | GL | <i>P. oxalicum</i> - <i>F. o. gladioli</i> | | <i>P. oxalicum</i> - <i>F. o. lycopersici</i> | |
|----------------|----|--|----------|---|----------|
| | | CM | F-Ratio | CM | F-Ratio |
| a_w | 4 | 3134,56 | 78,65 ** | 2612,19 | 52,22 ** |
| T | 1 | 642,693 | 16,13 ** | 3089,67 | 61,76 ** |
| E | 1 | 124,651 | 3,13 | 194,799 | 3,89 * |
| $a_w \times T$ | 4 | 114,897 | 2,88 * | 167,222 | 3,34 * |
| $a_w \times E$ | 4 | 899,12 | 22,56 ** | 814,446 | 16,28 ** |
| $T \times E$ | 1 | 504,773 | 12,66 ** | 425,286 | 8,50 ** |

GL: Grados de Libertad; CM: Cuadrado Medio; F-Ratio: F- Snedecor

** Significativo $p < 0.01$

* Significativo $p < 0.05$

simples (a_w , T y E) y sus interacciones dobles ($a_w \times T$; $a_w \times E$ y $T \times E$) tienen sobre el crecimiento de los hongos en las interacciones interespecíficas *P. oxalicum*-*F. oxysporum gladioli* y *P. oxalicum*-*F. oxysporum lycopersici* ($p < 0,05$); a excepción del factor especie que no muestra diferencias significativas en la primera de ellas.

Efecto de la actividad de agua y la temperatura sobre las interacciones fúngicas y el Índice de dominancia (I_D). Las interacciones juegan un papel importante determinando qué especies dominarán el ecosistema bajo las diferentes condiciones ambientales. Los resultados de las interacciones obtenidas en el presente estudio se pueden observar en la Tabla 2 y Figura 2.

Tabla 2. Efecto de la actividad de agua y la temperatura sobre las interacciones fúngicas (I_D).

| | Actividad agua | <i>P. oxalicum</i> | <i>F. oxysporum gladioli</i> | <i>P. oxalicum</i> | <i>F. oxysporum lycopersici</i> |
|-------|----------------|--------------------|------------------------------|--------------------|---------------------------------|
| 25 °C | 0,995 | 3 | 3 | 2 | 2 |
| | 0,98 | 3 | 3 | 2 | 2 |
| | 0,95 | 4 | 0 | 4 | 0 |
| | 0,90 | 5 | 0 | 5 | 0 |
| | 0,85 | * | - | * | - |
| 15 °C | 0,995 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | 0,98 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | 0,95 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | 0,90 | 4 | 0 | 5 | 0 |
| | 0,85 | * | - | * | - |

* Crecimiento de una sola cepa. No hay no hay interacción.

- No hay crecimiento.

A valores de a_w más elevados, 0,995 y 0,98 las cepas de *Fusarium* ensayadas, *F. oxysporum* fsp. *lycopersici* y *F. oxysporum* fsp. *gladioli*, establecen con *Penicillium* interacciones de tipo "2" (inhibición mutua por contacto) y "3" (inhibición mutua a distancia), como se refleja en las experiencias realizadas in vitro. Las cepas de *Fusarium* ensayadas presentan un incremento en su I_D a medida que se incrementa la a_w . Cuando las condiciones son de 25 °C y a_w de 0,98, *P. oxalicum* muestra ratios de crecimiento de 6,50 y 5,35 mm/día frente a los 4,59 mm/día que muestran ambas cepas de *F. oxysporum*. Este predominio de la ratio de crecimiento de *Penicillium* hacia *Fusarium* se mantiene en toda la experiencia a medida que disminuye la actividad de agua. A $a_w \leq 0,95$, las interacciones que se establecen son de dominancia a fuerte dominancia de *Penicillium*, alcanzando los valores máximos I_D (4 y 5), a 25 °C. A la temperatura de 15 °C también *P. oxalicum* llega a situarse por encima de *Fusarium*, y esto se produce cuando la actividad de agua desciende al valor de 0,90, por lo que nos encontramos frente a un hongo capaz de controlar a *F. oxysporum* fsp. *lycopersici* y *F. oxysporum* fsp. *gladioli* a 25 °C siempre que la actividad de agua sea $\geq 0,98$, siendo también capaz de controlar a estas dos cepas de *Fusarium* a 15 °C siempre que la actividad de agua sea menor de 0,95.

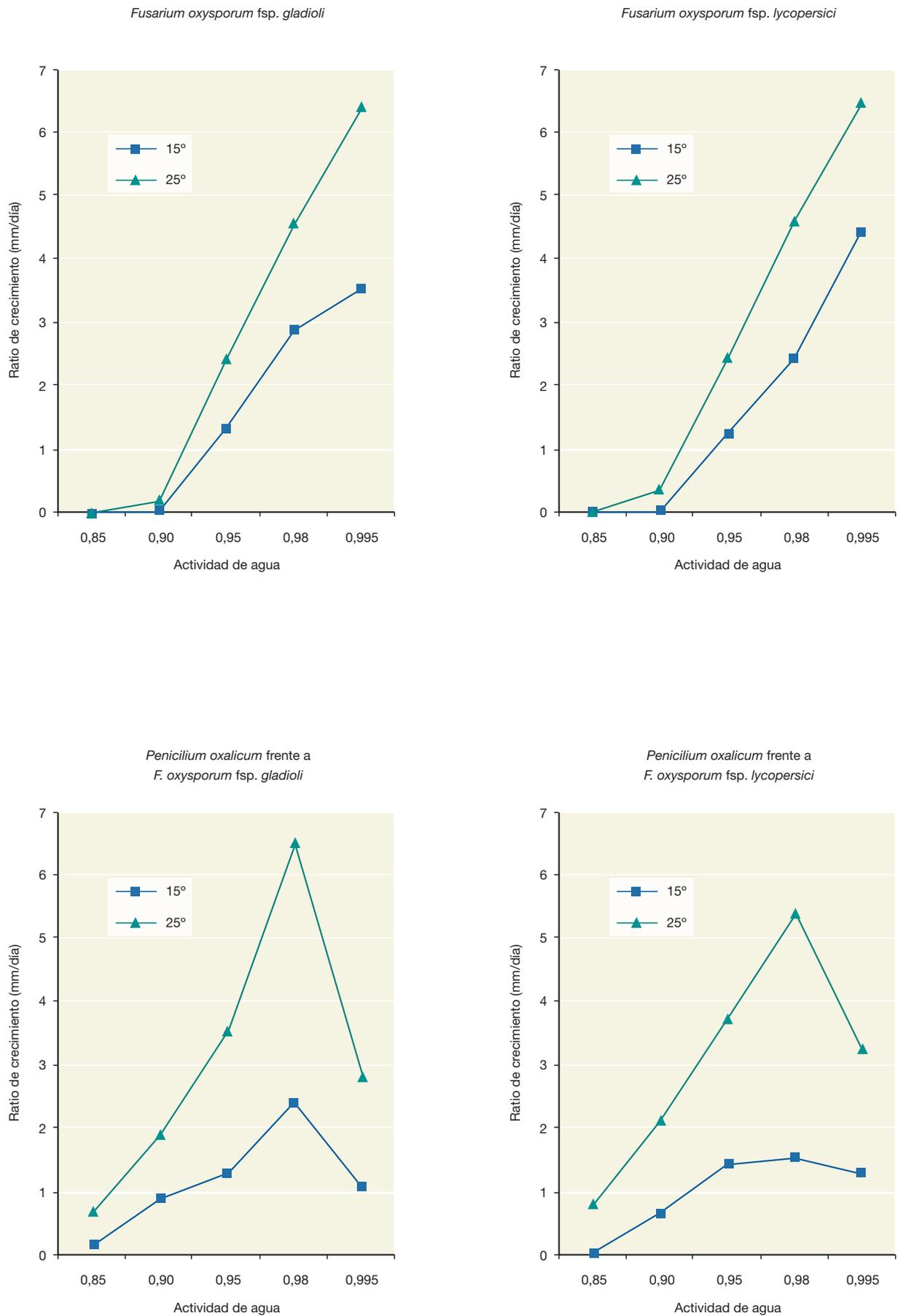
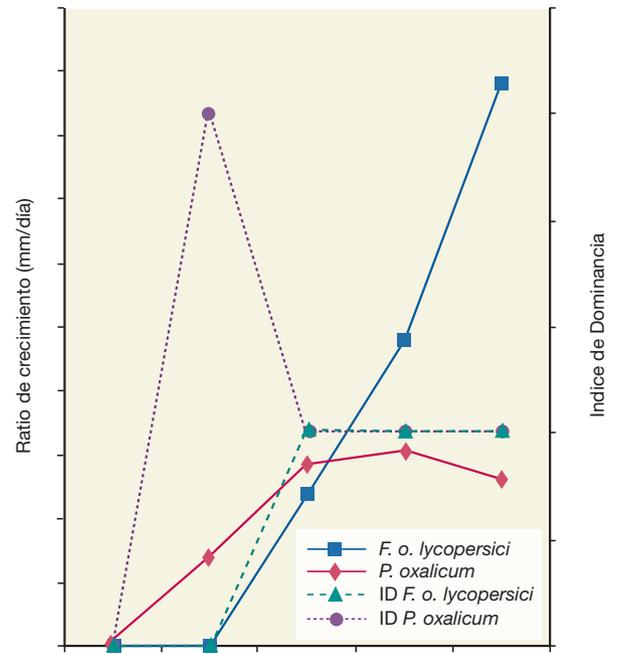
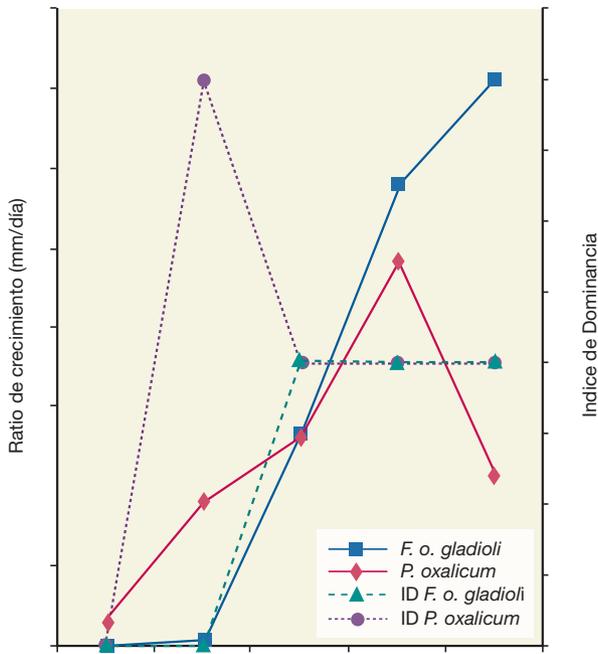


Figura 1. Efecto de la temperatura y de la actividad de agua sobre la velocidad de crecimiento de *F. oxysporum* fsp. *lycopersici*, *F. oxysporum* fsp. *gladioli* y *Penicillium oxalicum*.



Interacción *F. oxysporum gladioli* - *P. oxalicum* a 25°C

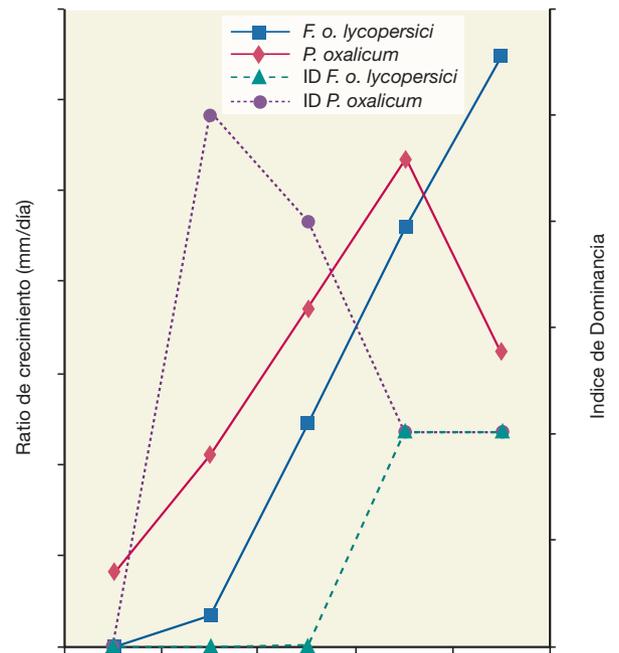
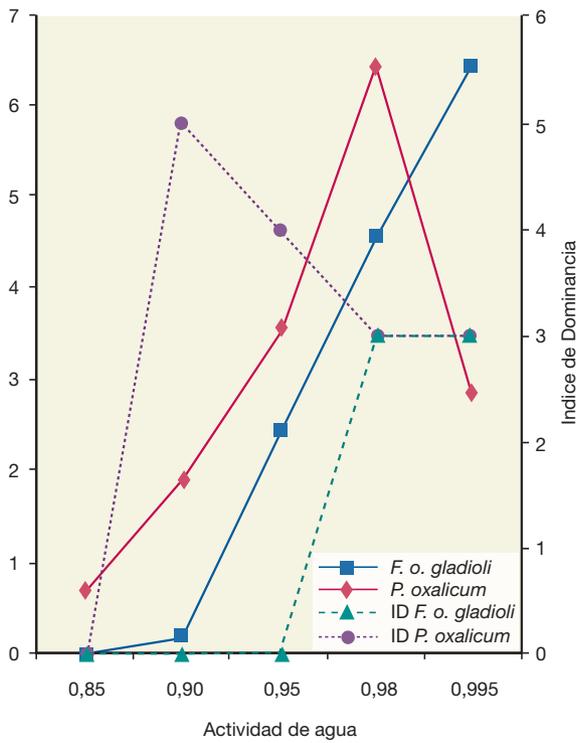


Figura 2. Efecto de la actividad de agua sobre la ratio de crecimiento y sobre el índice de dominancia, en las interacciones *Penicillium oxalicum* - *F. oxysporum* fsp. *lycopersici* y *Penicillium oxalicum* - *F. oxysporum* fsp. *gladioli*, a 25 y 15 °C.

Bibliografía

1. Altomare C, Bottalico A. A toxicological approach to the control of plant pathogens by *Trichoderma*. Bulletin OILB/SROP 1992; 15: 88-90.
2. Van Driesche RG, Bellows TS. Biological control. New York, Chapman & Hall, 1996.
3. Santamarina MP, Sanz I, Roselló J, Vañó J. Detección y aislamiento de metabolitos del hongo *Trichoderma harzianum* Rifai con actividad bactericida y fungicida. Phytoma España 2000; 122: 55-58.
4. Pascual S, Rico JR, Decal A, Melgarejo P. Ecophysiological factors affecting growth, sporulation and survival of the biocontrol agent *Penicillium oxalicum*. Mycopathologia 1997; 139: 43-50.
5. Decal A, García-Lepe R, Pascual S, Melgarejo P. Effects of timing and method of application of *Penicillium oxalicum* on efficacy and duration of control of *Fusarium* wilt of tomato. Plant Pathol 1999; 48: 260-266.
6. Rhodes DJ. Formulation of biological control agents. En: Jones DG (Ed.) Exploitation of microorganisms. London, Chapman & Hall, 1993: 411-439.
7. Butt TM, Harris JG, Powell DA. Microbial pesticides. En: Hall FR, Menn JJ (Eds.) Biopesticides. Use and delivery. Totowa, New Jersey, Humana Press, 1999: 23-43.
8. Cooke RC, Whipps JM. Ecophysiology of fungi. Cambridge, Blackwell Scientific publication, University Press, 1993.
9. Marín S, Sanchis V, Ramos AJ, Viñas I, Magan N. Environmental factors, in vitro interactions, and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize grain. Mycol Res 1998; 102: 831-837.
10. Lacey J, Magan N. Fungi relationships in cereal grains: their occurrence and water and temperature. En: Chelkowski, J. (Ed.) Cereal grains. Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage. Amsterdam, Elsevier, 1991: 77-118.
11. Magan N, Lacey J. Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. Trans Br Mycol Soc 1984; 82: 83-93.
12. Frisvad JC, Samson RA. Filamentous fungi in foods and feeds: Ecology, spoilage and mycotoxin production. En: Arora DA, Mukerji DK, Marth EH (Eds.) Handbook of applied mycology. Vol. 3. Foods and feeds. New York, Marcel Dekker, 1991: 31-68.
13. Sáenz R. Influencia de la actividad del agua y de la temperatura sobre la germinación y el crecimiento de seis cepas de hongos de almacén. ETSEAL, Universitat de Lleida, 1996.