



Interacciones competitivas entre *Fusarium sambucinum* Fuckel y *Phoma glomerata* (Corda) Wollenweber & Hochapfel en condiciones in vitro

Francisca Sempere Ferre, Josefa Roselló Caselles y M.^a Pilar Santamarina Siurana

Departamento de Ecosistemas Agroforestales, Escuela Técnica Superior del Medio Rural y Enología (ETSMRE), Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España

Resumen

Se estudió el efecto de la temperatura (15 y 25 °C), la actividad de agua (0,85; 0,90; 0,95; 0,98 y 0,995) y la interacción entre *Fusarium sambucinum* y *Phoma glomerata* sobre el crecimiento de estas especies en agar extracto de arroz. Además, a las interacciones se les asignó un valor numérico para obtener el índice de dominancia (I_b), analizando su posible variación al cambiar las condiciones de temperatura y actividad de agua (a_w). Ambas especies presentaron un máximo crecimiento –tanto individualmente como combinadas– a 0,995 a_w y 25 °C. Por otra parte, *F. sambucinum* tuvo ratios de crecimiento mayores que *P. glomerata* en todas las condiciones ensayadas, dominando sobre este cuando interaccionaron. La actividad de agua y la temperatura tuvieron un efecto significativo sobre el crecimiento.

Palabras clave

Fusarium sambucinum, *Phoma glomerata*, Arroz, Actividad de agua

Competitive interactions between *Fusarium sambucinum* Fuckel and *Phoma glomerata* (Corda) Wollenweber & Hochapfel under in vitro conditions

Summary

The effects of temperature (15 and 25 °C), water activity (0.85, 0.90, 0.95, 0.98 and 0.995) and the interaction between *Fusarium sambucinum* and *Phoma glomerata* in rice extract agar on fungus growth were investigated. Fungi interactions were given a numerical score to obtain an Index of Dominance (I_b) and to observe possible variations under different conditions of temperature and water activity (a_w) changed. *F. sambucinum* and *P. glomerata* grew most rapidly –both individually and paired– at 0.995 a_w and 25 °C. On the other hand, *F. sambucinum* presented higher growth rates than *P. glomerata* and it was dominant over *P. glomerata* under all the tested conditions. Water activity and temperature showed a significant effect on fungus growth.

Key words

Fusarium sambucinum, *Phoma glomerata*, Rice, Water activity

Cuando el grano de arroz es cosechado, su superficie está contaminada por diversos propágulos fúngicos. Si éste no es secado y almacenado correctamente, propiciará la germinación de las esporas y el desarrollo micelial, pro-

duciendo una pérdida de la calidad inicial del grano y un riesgo potencial por una posible contaminación de micotoxinas. Los hongos competirán por el espacio y por el sustrato e interaccionarán entre ellos.

La micoflora del grano de arroz es la principal causa de su deterioro, y su aparición viene determinada por varios factores, entre los que destacan la temperatura y la actividad de agua.

Conocer cómo se comportan las distintas especies cuando interaccionan y su ecofisiología es importante, ya que nos permitirá el control de las mismas y saber qué especie podrá dominar en un ecosistema concreto.

Fusarium sambucinum Fuckel [teleomorfo: *Gibberella publicaris* (Fr.:Fr.) Sacc.] es un hongo filamentoso de climas moderados, distribuido ampliamente en frutas, cereales, etc. Destaca por ser una especie toxigénica productora de micotoxinas entre las que se encuentran la zearalenona (ZEA), la fusarina C, el ácido fusárico, boberi-

Dirección para correspondencia:

Dra. Francisca Sempere Ferre
Departamento de Ecosistemas Agroforestales
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: frasemfe@yahoo.es

Aceptado para publicación el 6 de marzo de 2006

©2007 Revista Iberoamericana de Micología
Apdo. 699, E-48080 Bilbao (Spain)
1130-1406/01/10.00 €

cina (BEA) y los tricotecenos: diacetoxiescirpenol (DAS), monoacetoxiescirpenol (MAS), toxina T-2, neosolaniol (NEO) y deoxinivalenol (DON), como principal grupo [2,4,7,13]. Además, se ha descrito recientemente la producción de una nueva toxina: la sambutoxina [6].

Phoma glomerata (Corda) Wollenweber & Hochapfel es un hongo dematiáceo, conidial, ubicuo, de distribución mundial, aislado de una gran variedad de sustratos, que coloniza raíces y semillas.

La micobiota dominante del arroz de Valencia está representada por distintas especies, entre las que se encuentra *P. glomerata* en porcentajes que oscilan entre un 62-80% y un 36%, en variedades tan representativas como Senia y Bahía. Sin embargo, la incidencia de *F. sambucinum* es muy escasa, con porcentajes inferiores al 15% en las muestras analizadas [11]. Aunque son dos hongos de campo, pueden aparecer en el almacén cuando las condiciones les son favorables. No son dos especies fúngicas que producen enfermedades relevantes en el arroz, pero ocasionan una depreciación comercial del grano, produciendo cambios en sus propiedades físicas y químicas, como aparición de coloraciones indeseables, pérdida de propiedades nutricionales, disminución del poder germinativo, aparición de ciertos metabolitos, etcétera.

El objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto de la actividad del agua y la temperatura sobre el crecimiento de las especies mencionadas. Además, al ser enfrentadas, se examinó qué hongo era más competitivo en las distintas condiciones ensayadas y si la variación de estas producía un cambio en el tipo de interacción.

Materiales y métodos

Aislamientos. Las especies que se han utilizado en este trabajo fueron aisladas en el laboratorio de Ecosistemas Agroforestales de la Escuela Técnica Superior del Medio Rural y Enología, de muestras de granos de arroz de distintas parcelas y cooperativas de las principales zonas productoras de la provincia de Valencia.

Medio de cultivo. Se utilizó agar extracto de arroz como medio base. Para ajustar la actividad de agua se añadieron distintas cantidades de glicerol y agua destilada [12]. El medio se esterilizó a 121 °C durante 20 min, posteriormente fue enfriado a 45-50 °C y repartido asépticamente en placas petri de 90 y 150 mm.

Para mantener la actividad de agua durante el tiempo del experimento, placas con el mismo valor fueron puestas en cajas de polietileno conteniendo soluciones con la actividad de agua respectiva. Esta se comprobó en todo momento, utilizando un Aqualab (Decagon, Inc., Pullman, WA, EEUU).

Inoculación y medida del crecimiento individual. En total se realizaron diez tratamientos, combinando cinco actividades de agua (0,85; 0,90; 0,95; 0,98; 0,995) y dos temperaturas (15 y 25 °C). En el centro de cada una de las placas se dispusieron porciones de los cultivos de 8 mm de diámetro obtenidos de la periferia de colonias puras de *F. sambucinum* y *P. glomerata* crecidas en PDA a 25 °C durante 5 días, incubando en las mismas condiciones durante ocho semanas. En el centro de cada una de las placas se inocularon discos de 8 mm de diámetro obtenidos de la periferia de colonias puras de *F. sambucinum* y *P. glomerata* crecida en PDA a 25 °C durante 5 días y se incubaron a esta temperatura y a 16 °C durante un período de ocho semanas.

El experimento se repitió dos veces. El crecimiento fue registrado diariamente mediante la medición de dos diámetros perpendiculares por colonia fúngica (Figura 1).

Para calcular la ratio de crecimiento (mm/día) se realizó una regresión lineal de los radios (mm) frente al tiempo (días). El programa utilizado fue Excel 2003 (Microsoft, EEUU).

Tipo de interacción y establecimiento del I_b . El índice de dominancia (I_b) es un valor numérico que permite comparar la competitividad de las diferentes especies fúngicas bajo unas condiciones determinadas y es función del tipo de interacción producida entre ambas. De este modo, a mayor competitividad mayores valores numéricos.

Para su establecimiento en este ensayo, se combinaron las mismas temperaturas y actividades de agua que en el crecimiento individual salvo a 0,85 a_w , por ser nulo el crecimiento. En cada una de las placas se inocularon dos discos de cada una de las especies de estudio, separados por una distancia de 45 mm, obtenidos de la periferia de colonias crecidas en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior. Al igual que en el estudio individual, se midieron durante cinco días los diámetros para establecer la ratio de crecimiento. Se observó en todo momento su evolución macroscópica durante ocho semanas y, finalmente, se estableció el tipo de interacción recibiendo cada hongo un valor numérico para obtener el índice de dominancia, según el método descrito por Magan y Lacey [8] (Tabla 1, Figura 1). El experimento se hizo por duplicado.

Análisis estadístico. Para verificar la influencia de los factores actividad de agua (a_w) y temperatura (T), así como su interacción ($a_w \times T$) sobre el crecimiento fúngico individual y combinado, se realizó el test de análisis de la varianza (ANOVA) con valores de significación de $p < 0,05$. El programa utilizado fue STATGRAPHICS Plus 5.0 (Stat Point, Inc., Rendón, Virginia, EEUU).

Resultados y discusión

Efecto de la actividad de agua y la temperatura sobre el crecimiento. Tanto individualmente como asociada a *P. glomerata*, el máximo crecimiento de *F. sambucinum* se produjo a una temperatura de 25 °C (Figuras 2 y 4). Estos resultados coinciden con Brennan et al. [3] y con Velluti et al. [15], en estudios realizados con diversas especies del género *Fusarium* (*F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poae*, *F. proliferatum* y *F. moniliforme*). En todo el intervalo de actividades de agua ensayados, la ratio de crecimiento fue siempre mayor a esta temperatura.

Fusarium spp. requiere un alto contenido de humedad para su crecimiento y síntesis de micotoxinas [7]. En nuestro ensayo, un incremento de esta produjo un aumento en la ratio de crecimiento, siendo máxima a una actividad de agua de 0,995.

Durante los cinco días de medición, *F. sambucinum* experimentó un crecimiento nulo a 25 °C para valores iguales e inferiores a 0,85; sin embargo, a 15 °C, no creció para valores iguales e inferiores a 0,90.

P. glomerata, al igual que *F. sambucinum*, presentó un máximo crecimiento a una temperatura de 25 °C y una actividad de agua de 0,995 (Figuras 3 y 4). En este caso, también las máximas ratios de crecimiento se registraron siempre a 25 °C. Para valores iguales e inferiores a 0,90 el crecimiento fue nulo.

En ambas situaciones y en las dos temperaturas ensayadas, *F. sambucinum* creció más que *P. glomerata* en todas las actividades de agua ensayadas (Figuras 2, 3 y 4).

El análisis estadístico de la varianza (ANOVA) indicó que los factores a_w y T, y su interacción ($a_w \times T$) tuvieron un efecto significativo en el crecimiento de ambas especies cuando crecían individualmente o combinadas ($p < 0,05$) (Tablas 2 y 3). La importancia de estos factores

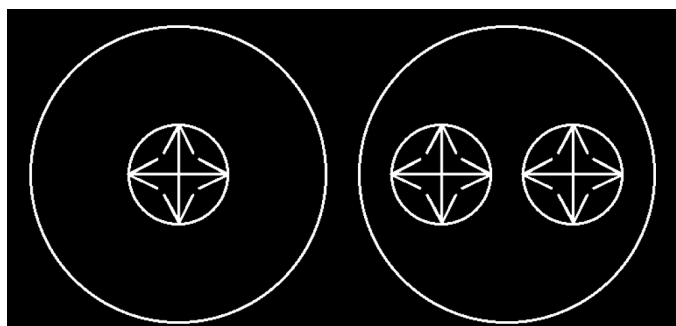


Figura 1. Dirección de las medidas realizadas en las distintas colonias fúngicas, crecidas individualmente y de forma combinada.

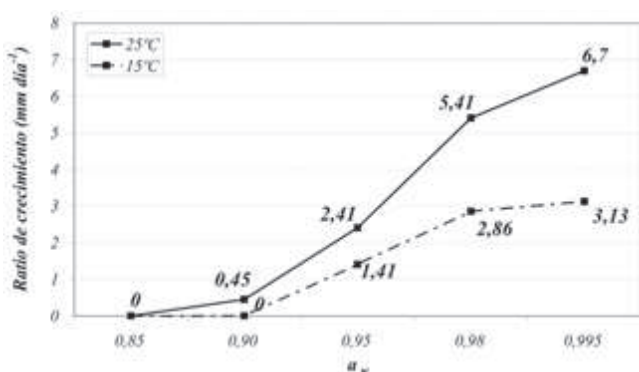


Figura 2. Influencia de la actividad de agua sobre la ratio de crecimiento de *F. sambucinum* en agar extracto de arroz (AEA) en función de la temperatura.

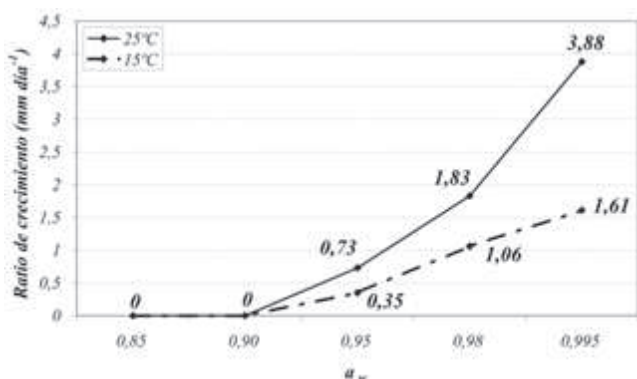


Figura 3. Influencia de la actividad de agua sobre la ratio de crecimiento de *P. glomerata* en AEA en función de la temperatura.

medioambientales sobre el crecimiento fueron también descritos por Plaza et al. [10], Abellana et al. [1] y Hope y Magan [5] en *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Geothrichum candidum*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium corylophilum*, *Aspergillus flavus* y *Fusarium culmorum*.

Índice de dominancia (I_D) y tipo de interacción. En todas las actividades de agua y temperaturas estudiadas se obtuvo el mismo tipo de interacción, siendo *F. sambucinum* dominante sobre *P. glomerata* (Tablas 4 y 5, Figura 5).

La interacción fue de tipo D (dominancia por contacto), recibiendo *F. sambucinum* un valor numérico de «4» y *P. glomerata* de «0» para obtener el I_D . Durante las

Tabla 1. Tipo de interacción descrito por Magan y Lacey [8].

| Tipo de interacción | Valor numérico |
|---------------------------------|---------------------|
| Crecimiento en común | A 1/1 |
| Inhibición mutua | por contacto B 2/2 |
| | a distancia C 3/3 |
| Inhibición de un microorganismo | por contacto D 4/0* |
| | a distancia E 5/0* |

*4 y 5: especie dominante. 0: especie inhibida.

Tabla 2. Análisis de la varianza del crecimiento de *F. sambucinum*; significancia de los factores actividad de agua (a_w), temperatura (T) y su interacción ($a_w \times T$).

| Crecimiento individual | | | |
|------------------------|----|---------|---------|
| Factor | GL | CM | F-ratio |
| a_w | 4 | 1379,09 | 65,11* |
| T | 1 | 1156,8 | 54,61* |
| $a_w \times T$ | 4 | 190,639 | 9,00* |
| Crecimiento combinado | | | |
| Factor | GL | CM | F-ratio |
| a_w | 4 | 2652,99 | 129,43* |
| T | 1 | 2527,58 | 123,31* |
| $a_w \times T$ | 4 | 454,537 | 22,81* |

*p < 0,05

Tabla 3. Análisis de la varianza del crecimiento de *P. glomerata*; significancia de los factores actividad de agua (a_w), temperatura (T) y su interacción ($a_w \times T$).

| Crecimiento individual | | | |
|------------------------|----|---------|---------|
| Factor | GL | CM | F-ratio |
| a_w | 4 | 329,783 | 68,86* |
| T | 1 | 173,911 | 36,00* |
| $a_w \times T$ | 4 | 47,2581 | 9,78* |
| Crecimiento combinado | | | |
| Factor | GL | CM | F-ratio |
| a_w | 4 | 665,579 | 137,75* |
| T | 1 | 455,822 | 94,34* |
| $a_w \times T$ | 4 | 113,599 | 23,51* |

*p < 0,05

primeras semanas, ambas especies fueron desarrollándose hasta tocarse. Finalmente, *F. sambucinum* siguió creciendo a través de *P. glomerata*.

Se descartó el estudio con un valor de actividad de agua de 0,90 por ser mínimo el crecimiento al final de las ocho semanas de experimentación.

La variación de las condiciones ensayadas no produjo cambios ni en el índice de dominancia, ni en el tipo de interacción.

Según Marín et al. [9], el tipo de interacción y el índice de dominancia son dependientes de condiciones medioambientales como la actividad de agua y la temperatura. Concretamente observaron que las especies del género

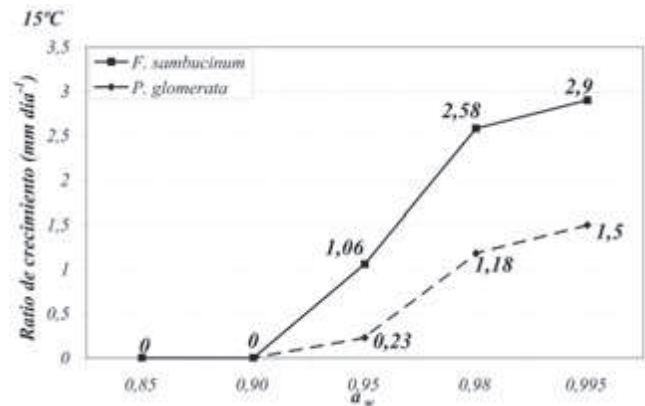
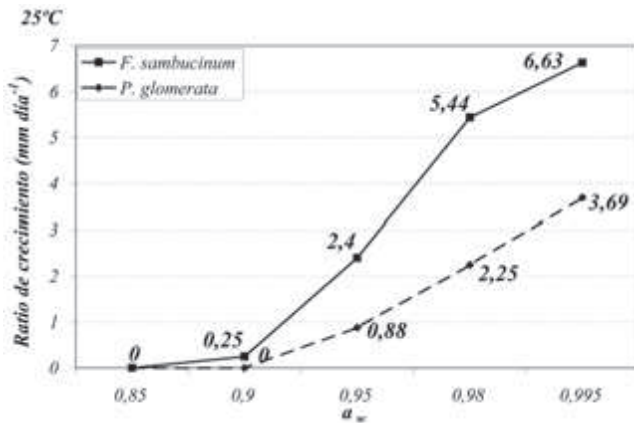


Figura 4. Influencia de la actividad de agua sobre la ratio de crecimiento de *F. sambucinum* y *P. glomerata* crecidos conjuntamente en AEA en función de la temperatura.

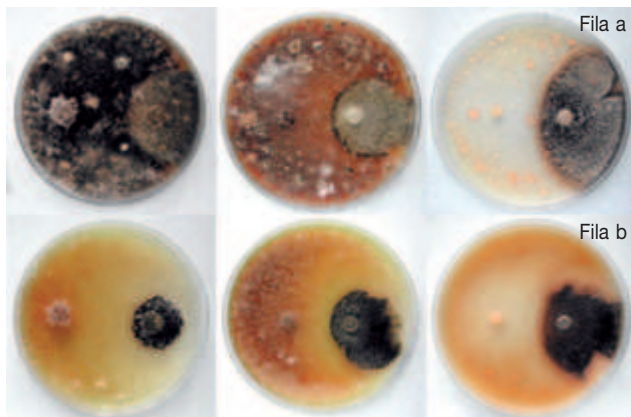


Figura 5. Interacción entre *F. sambucinum* (izquierda) y *P. glomerata* (derecha). Fila a: 25 °C y 8 semanas. Fila b: 15 °C y 8 semanas.

Fusarium (*F. graminearum*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans*) mostraban un incremento en el I_D cuando la actividad de agua aumentaba en el intervalo de 0,85 a 0,995.

F. sambucinum fue dominante en todas las condiciones ensayadas. Marín et al. [9] sugieren que la dominancia de las especies de *Fusarium* puede deberse fundamentalmente a su capacidad de crecer rápida e invasivamente.

En este estudio se observó que *F. sambucinum* fue una especie capaz de dominar a *P. glomerata* en una amplia variedad de condiciones. Además, altos valores de humedad propiciaron el desarrollo de ambas especies y, sin embargo, valores inferiores a 0,90 a_w evitaron su aparición.

Por otro lado, la interacción también afectó al crecimiento, aunque se vió condicionada por la velocidad de desarrollo de ambos hongos filamentosos. De esta forma, los radios medidos y las ratios de crecimiento finalmente obtenidas fueron muy similares cuando crecieron de forma separada y combinada en los primeros cinco días de crecimiento activo. Posteriormente, cuando ambas especies

Tabla 4. Tipo de interacción entre *F. sambucinum* y *P. glomerata*.

| | | 0,995 a_w | 0,98 a_w | 0,95 a_w | 0,90 a_w |
|--|------|-------------|------------|------------|------------|
| <i>F. sambucinum</i> - <i>P. glomerata</i> | 25°C | D | D | D | X |
| | 15°C | D | D | D | X |

X: El análisis de la interacción fue descartado.

Tabla 5. Índice de Dominancia (I_D). El I_D se obtuvo de sumar los valores asignados a cada especie según el tipo de interacción a las distintas temperaturas. Inhibición por contacto de *P. glomerata* (4 para la especie dominante -*F. sambucinum*-; 0 para la especie inhibida -*P. glomerata*-).

| Temperatura | Especies fúngicas | 0,995 a_w | 0,98 a_w | 0,95 a_w | 0,90 a_w | I_D |
|-------------|----------------------|-------------|------------|------------|------------|-------|
| 25 °C | <i>F. sambucinum</i> | 4 | 4 | 4 | X | 12 |
| | <i>P. glomerata</i> | 0 | 0 | 0 | X | 0 |
| 15 °C | <i>F. sambucinum</i> | 4 | 4 | 4 | X | 12 |
| | <i>P. glomerata</i> | 0 | 0 | 0 | X | 0 |

X: El análisis de la interacción fue descartado.

se tocaron, este crecimiento fue alterado, principalmente en el frente de interacción. Estos resultados, coinciden con los obtenidos por Torres et al. [14], que encontraron diferencias significativas entre las ratios de crecimiento de *Alternaria alternata* y *Fusarium verticilloides* crecidos aisladamente y enfrentados entre ellos, en maíz a un valor de a_w de 0,95 y 30 °C. Por otra parte, Plaza et al. [10] también observaron una variación significativa entre algunas interacciones de *P. digitatum*, *P. italicum* y *G. candidum* en Orange Serum Agar (OSA) a distintas temperaturas y actividades de agua.

Bibliografía

1. Abellana M, Sanchis V, Ramos AJ. Effect of water activity and temperature on growth of three *Penicillium* species and *Aspergillus flavus* on a sponge cake analogue. *Int J Food Microbiol* 2001; 71: 151-157.
2. Bottalico A, Logrieco A, Visconti A. *Fusarium* species and their mycotoxins in infected corn in Italy. *Mycopathologia* 1989; 107: 85-92.
3. Brennan JM, Fagan B, van Maanen A, Cooke BM, Doohan FM. Studies on *in vitro* growth and pathogenicity of European *Fusarium* fungi. *Eur J Plant Pathol* 2003; 109: 577-587.
4. Desjardins AE, Proctor RH. Biochemistry and genetics of *Fusarium* toxins. En: Summerell BA (Ed.) *Fusarium*. St. Paul, APS Press, 2001: 122-137.
5. Hope R, Magan N. Two-dimensional environmental profiles of growth, deoxynivalenol and nivalenol production by *Fusarium culmorum* on a wheat-based substrate. *Lett Appl Microbiol* 2003; 37: 70-74.
6. Kim YC, Lee YW. Sambutoxin, a new mycotoxin produced by toxic *Fusarium* isolates obtained from rotted potato tubers. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 4380-4385.
7. Logrieco A, Bottalico A, Mulé G, Moretti A, Perrone G. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *Eur J Plant Pathol* 2003; 109: 645-667.
8. 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.
9. Marín S, Companys E, Sanchis V, Ramos AJ. Effect of water activity and temperature on competing abilities of common maize fungi. *Mycol Res* 1998; 120: 959-964.
10. Plaza P, Usall J, Teixido N, Viñas I. Effect of water activity and temperature on competing abilities of common postharvest citrus fungi. *Int J Food Microbiol* 2004; 90: 75-82.
11. Santamarina P, Serna R, Asensi C, Roselló J. Evolución de la micoflora del arroz durante el periodo de almacenamiento. *Phytoma* 2002; 142: 113-117.
12. Sempere S, Santamarina MP. Ecofisiología de *Drechslera oryzae* Subram. & Jain en condiciones *in vitro*. *Phytoma* 2006; 178: 49-51.
13. Thrane U. Screening for fusarin C production by European isolates of *Fusarium* species. *Mycotoxin Research* 1988; 4: 2-10.
14. Torres MR, Ramos AJ, Soler J, Sanchis V, Marín S. SEM study of water activity and temperature effects on the initial growth of *Aspergillus ochraceus*, *Alternaria alternata* and *Fusarium verticillioides* on maize grain. *Int J Food Microbiol* 2003; 81: 185-193.
15. Velluti A, Marín S, Bettucci L, Ramos AJ, Sanchis V. The effect of fungal competition on colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* and on fumonisin B and zearalenone formation. *Int J Food Microbiol* 2000; 59: 59-66.