

PÓSTER TÉCNICO

## *Penicillium oxalicum* y *Phoma glomerata*: estudios de biocontrol

F. Sempere, M.P Santamarina (Departamento de Ecosistemas Agroforestales. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. Universitat Politècnica de València. Valencia. España. E-mail: frasemfe@yahoo.es).

Se investigó *in vitro* la especie *Penicillium oxalicum* como posible agente de biocontrol del patógeno del arroz *Phoma glomerata*. El experimento se realizó en distintas condiciones medioambientales. Los mecanismos desarrollados sinérgicamente por *Penicillium oxalicum* para antagonizar al patógeno fueron micoparasitismo y competencia por el espacio y nutrientes.

### INTRODUCCIÓN

*Penicillium oxalicum* es una especie que ha sido probada con éxito como antagonista de algunos patógenos del arroz (Sempere y Santamarina, 2008, 2011). Entre las especies pertenecientes a la microbiota dominante del arroz de Valencia se encuentra *Phoma glomerata* responsable del manchado del grano.

El objetivo de este estudio fue realizar una investigación en condiciones *in vitro* para determinar si *Penicillium oxalicum* actúa como agente de control biológico de *Phoma glomerata*.

### Materiales y métodos

**Aislados fúngicos.** *Phoma glomerata* fue aislada en el laboratorio de Ecosistemas Agroforestales de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural de muestras de granos de arroz de distintas parcelas y cooperativas de las principales zonas productoras de la provincia de Valencia. *Penicillium oxalicum* Currie & Thom perteneciente a la colección de este departamento, se aisló de granos de maíz.

**Medios de cultivo.** Inicialmente se utilizó Patata Dextrosa Agar (PDA) para la recuperación de las especies liofilizadas. Las cepas se sembraron en este medio y se incubaron a 25°C durante 5 días.

Posteriormente se extrajeron discos de 8 mm de diámetro de la periferia de las colonias de *P. oxalicum* y *P. glomerata* y se transfirieron en condiciones asépticas dos discos –uno de cada especie– en cada una de las placas Petri con Agar Extracto de Arroz a distintas actividades de agua, separados por una distancia de 45 mm. Las placas se incubaron a 25°C y a 15°C.

El medio de cultivo Agar Extracto de Arroz (AEA) se obtuvo a partir de granos de arroz cáscara y los distintos valores de agua experimentados (0.85, 0.90, 0.95, 0.98 y 0.995), se obtuvieron añadiendo al medio distintas cantidades de glicerol (Sempere y Santamarina, 2006a).

**Ratios de crecimiento.** El crecimiento de las especies *P. oxalicum* y *P. glomerata* inoculadas conjuntamente fue registrado diariamente mediante la medición por colonia fúngica de dos diámetros perpendiculares según el método descrito por Sempere y Santamarina (2007).

**Estudio macro y microscópico de la interacción.** Después de obtener los gráficos del estudio ecofisiológico de las cepas, las placas Petri se dejaron

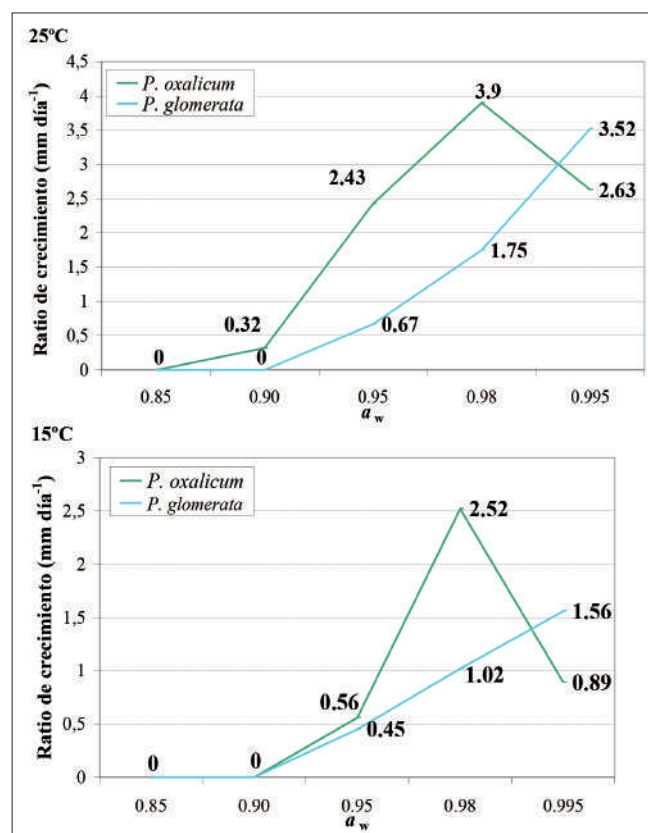


Figura 1. Influencia de la actividad de agua ( $a_w$ ) en función de la temperatura sobre el ratio de crecimiento de *P. oxalicum* y *P. glomerata* crecidos conjuntamente en Agar Extracto de Arroz.

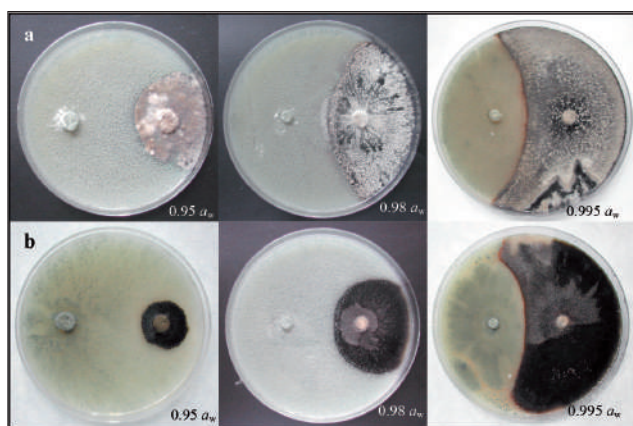


Figura 2. Interacción entre *p. oxalicum* y *p. glomerata* con un periodo de 8 semanas a distintas actividades de agua. fila a: 25°C. fila b: 15°C. izquierda: *p. oxalicum*, derecha: *p. glomerata*.

durante 8 semanas en las mismas condiciones, observando en todo momento la evolución macroscópica de las colonias. Al final de este periodo, se estableció el tipo de interacción y según este, a cada hongo se le asignó un valor numérico para obtener el Índice de Dominancia: 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 (4 para la especie dominante, 0 para la especie inhibida); inhibición de un microorganismo a distancia (5 para la especie dominante, 0 para la especie inhibida) (Magan y Lacey, 1984).

Para el ensayo microscópico se realizó un microcultivo dual que se analizó con un microscopio óptico Olympus PM-10AK3 y un microscopio electrónico de barrido de bajas temperaturas JEOL JSM 5410 (Sempere y Santamarina, 2006b).

**Análisis estadístico.** Para determinar el efecto de los factores abióticos actividad de agua ( $a_w$ ) y temperatura ( $T^3$ ) y su factor doble sobre el crecimiento medio de las dos cepas inoculadas conjuntamente, se realizó el test de análisis de la varianza (ANOVA) con valores de significación de  $P \leq 0.01$ . El programa utilizado fue STATGRAPHICS Plus 5.0 (Stat Point, Inc., Rendón, Virginia (EEUU)).

## Resultados y discusión

**Ecofisiología dual.** *Phoma glomerata* obtuvo su máximo crecimiento a 0.995  $a_w$  y 25°C, mientras que *P. oxalicum* lo hizo a 0.98  $a_w$  25°C (Figura 1). La mínima actividad de agua en la que crecieron ambas especies, independientemente de la temperatura, fue de 0.90  $a_w$  para *P. glomerata* y de 0.85  $a_w$  para *P. oxalicum*. Aunque durante los cinco días en los que se realizaron las medidas para obtener el estudio ecofisiológico no se registraron valores en estas últimas actividades de agua, posteriormente las cepas si que se desarrollaron.

La colonia de *Penicillium oxalicum* registró un incremento radial superior al de *Phoma glomerata* en todas las temperaturas y actividades de agua ensayadas, excepto en las condiciones de 0.995  $a_w$  a ambas temperaturas y a 0.95  $a_w$  25°C, en las cuales el crecimiento fue muy similar. La mayor diferencia entre las velocidades de crecimiento entre las dos especies se observó a la actividad de agua de 0.98.

El desarrollo inicial de las cepas en un mismo sustrato fue muy similar al que se produjo cuando se inocularon de forma individual (Sempere y Santamarina, 2007). Posteriormente, al interactuar ambas especies, sus velocidades de crecimiento se vieron alteradas.

Temperatura	Especie fúngica	0.995 $a_w$	0.98 $a_w$	0.95 $a_w$	0.90 $a_w$	$I_D$
25 °C	<i>P. oxalicum</i>	2	2	4	X	8
	<i>P. glomerata</i>	2	2	0	X	4
15 °C	<i>P. oxalicum</i>	2	4	4	X	10
	<i>P. glomerata</i>	2	0	0	X	2

Tabla 1. Análisis de la varianza del crecimiento dual de *P. oxalicum* y *P. glomerata*; significancia de los factores simples actividad de agua ( $a_w$ ), temperatura (T) y el factor dobles ( $a_w \times T$ ). GL: Grados de libertad. CM: cuadrado medio. F-Ratio: F-Snedecor. \*\* Indica que el factor tuvo un efecto significativo ( $P < 0.01$ ).

Temperatura	Especie fúngica	0.995 $a_w$	0.98 $a_w$	0.95 $a_w$	0.90 $a_w$	$I_D$
25 °C	<i>P. oxalicum</i>	2	2	4	X	8
	<i>P. glomerata</i>	2	2	0	X	4
15 °C	<i>P. oxalicum</i>	2	4	4	X	10
	<i>P. glomerata</i>	2	0	0	X	2

Tabla 2. 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 mutua por contacto (2 para cada especie). inhibición de *p. glomerata* por contacto (4 para la especie dominante –*p. oxalicum*–; 0 para la especie inhibida –*p. glomerata*–). x: el análisis de la interacción fue descartado.

El análisis estadístico de la varianza (ANOVA) nos indicó que los factores simples (actividad de agua y temperatura) y el factor doble ( $a_w \times T$ ) tuvieron un efecto significativo sobre el crecimiento medio de ambas especies cuando crecieron conjuntamente ( $P < 0.01$ ).

**Estudio de la interacción.** Al contactar en todas las condiciones ensayadas (excepto a 0.98  $a_w$  15°C y 0.95  $a_w$  a ambas temperaturas), *Penicillium oxalicum* y *Phoma glomerata* inhibieron su desarrollo. En las otras condiciones, *Penicillium oxalicum* inhibió por contacto a *Phoma glomerata*. Obsérvese el crecimiento del antagonista sobre su huésped (Figura 2).

La actividad de agua y la temperatura variaron el tipo de interacción que se produjo al inocular ambas cepas en un mismo sustrato (Tabla 2).

Competición por los nutrientes y el espacio fue uno de los mecanismos que ejerció *P. oxalicum* sobre *P. glomerata* a 0.98  $a_w$  25°C y 0.95  $a_w$  a ambas temperaturas. En el análisis microscópico sin embargo, se observó que *P. oxalicum* actuó como micoparásito del patógeno en las distintas condiciones medioambientales ensayadas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Magan, N.; Lacey, J. (1984) The effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. Transactions of the British Mycological Society 82, 83-93.
- Sempere, F.; Santamarina, M.P. (2006a) Ecofisiología de *Drechlera oryzae* Subram. & Jain en condiciones in vitro. Phytoma 178, 49-51.
- Sempere, F.; Santamarina, M.P. (2006b) In vitro biocontrol analysis of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler under different environmental conditions. Mycopathologia 163, 183-190.
- Sempere, F.; Roselló, J.; Santamarina, M.P. (2007) Interacciones competitivas entre *Fusarium sambucinum* Fuckel y *Phoma glomerata* (Corda) Wollenweber & Hochapfel en condiciones in vitro. Revista Iberoamericana de Micología 24(1), 29-33.
- Sempere, F.; Santamarina, M.P. (2008) Suppression of *Nigrospora oryzae* (Berk. & Broome) Petch by an aggressive micoparasite and competitor, *Penicillium oxalicum* Currie & Thom. International Journal of Food Microbiology 122(1-2), 35-43.
- Sempere, F.; Santamarina, M.P. (2011) Cryo-scanning electron microscopy and light microscopy for the study of fungi interactions. Microscopy Research and Technique 74: 207-2011