

INOCULACIÓ DE LLAVORS DE *DIGITARIA SANGUINALIS* AMB EL CARBÓ *USTILAGO SYNTHERISMAE*

MONTSERRAT GALLART GONZÁLEZ-PALACIO;

ANTONIO MARÍA VERDÚ GONZÁLEZ; MARIA TERESA MAS SERRA

ESCOLA SUPERIOR D'AGRICULTURA DE BARCELONA, DEPARTAMENT
D'ENGINYERIA AGROALIMENTÀRIA I BIOTECNOLOGIA, UNIVERSITAT
POLITÀCNICA DE CATALUNYA

montserrat.gallart@upc.edu; amc.verdu@upc.edu; maite.mas@upc.edu

Resum

Ustilago syntherismae és un patogen de *Digitaria sanguinalis*. Aquest fong podria ser utilitzat per al control biològic de la mala herba. No obstant això, la informació que es té sobre la interacció és molt limitada. L'objectiu d'aquest experiment és avaluar l'eficàcia d'un mètode d'inoculació al buit per a induir artificialment la interacció. La prova es va realitzar amb 1.000 llavors (500 inoculades + 500 control), posades a germinar en dos medis: paper de filtre humitejat i agar aigua. En estadi de cotilèdon, les plàntules es trasplantaren a alvèols amb terra. Les condicions de germinació i creixement van ser de 30 °C (12 h de llum) / 20 °C (12 h de foscor). La primera planta infectada es va observar als 47 dies de la germinació. Del grup inoculat, el percentatge de plantes que havien florit i estaven infectades va ser del 9,7% en les germinades en paper de filtre, i del 28,8% en les d'agar aigua.

1. Introducció

La forcadella, panissalla, pota de gall o xereix (*Digitaria sanguinalis* L. Scop.) és una mala herba important en cultius de regadiu (Carretero, 2004; Schroeder *et al.*, 1993). Aquesta espècie es reproduïx bàsicament per llavors que, en el moment de ser dispersades, presenten dormància (Toole i Toole, 1941). En climes temperats, un sol individu pot arribar a produir 150.000 llavors (Mitich, 1988). Així doncs, les diferents estratègies de control d'aquesta espècie anual se centren a evitar la producció de llavors en anys consecutius (Walker *et al.*, 1998).

Actualment, per controlar aquesta mala herba s'utilitzen mètodes culturals (treball del sòl) i químics (herbicides de preemergència i postemergència). No obstant això, ja s'han detectat diverses poblacions de *D. sanguinalis* resistents a herbicides a França, els Estats Units, Austràlia, Polònia, la República Txeca, Àustria i Hongria (Heap, 2007; Schroeder *et al.*, 1993). En aquest escenari, l'estudi de mètodes de control alternatius són especialment interessants. De fet, els darrers anys ja s'han començat a estudiar possibles estratègies de control biològic per al maneig de *D. sanguinalis* (Kong, 2004; Tilley i Walker, 2002; Chandramohan i Charudattan, 2001).

Ustilago syntherismae (Schweinnitz) Peck és una espècie de carbó (*O. ustilaginalis*) que parasita diferents espècies del gènere *Digitaria*, entre aquelles *D. sanguinalis* (Farr *et al.*, 2007). L'elevada especificitat del fong, així com l'efecte directe sobre la reproducció de la planta, ja que les inflorescències encarbonades d'aquesta espècie poques vegades produeixen llavors (Johnson i Baudoin, 1997), fan pensar que *U. syntherismae* podria ser susceptible d'ésser utilitzat com a agent biològic per al control de *Digitaria*. No obstant això, la informació que es té sobre la interacció és molt limitada (Johnson i Baudoin, 1997).

Un primer pas imprescindible per a poder estudiar la interacció i els seus efectes és conèixer un mètode d'inoculació que permeti infectar plantes de *D. sanguinalis* de manera controlada. Així doncs, l'objectiu d'aquest assaig és avaluar l'eficàcia d'un mètode d'inoculació al buit de llavors, per tal d'establir artificialment la interacció *D. sanguinalis* - *U. syntherismae*.

2. Material i mètodes

Al principi del setembre de 2005, es van recol·lectar espiguetes (unitats de dispersió) i inflorescències encarbonades de *D. sanguinalis* en un camp de la finca experimental de Torre Marimon (Caldes de Montbui, Vallès Oriental). Tres mesos després de la recol·lecció del material, les espores del fong es van separar de les restes d'inflorescències i es van col·locar a 4 °C, per a trencar la possible latència. En canvi, les espiguetes es van conservar en sec a temperatura ambient, fins a la utilització.

Al final de juny de 2006, 250 espiguetes i 250 cariòpsides (espiguetes sense glumes ni glumel·les) es van inocular al buit amb espores d'*U. syntherismae* seguint el mètode utilitzat per Willits i Sherwood (1999). Concretament, les llavors van ser inoculades amb una so-

lució de 25 mg d'espores d'*U. syntherismae* suspeses en 1 ml d'una solució de 0,5 mg de carboximetilcel·lulosa i 1 ml d'aigua destil·lada, que contenia 0,001 % de Tween 20. Les llavors van ser infiltrades al buit tres vegades durant 10 minuts. En el cas de les cariòpsides, prèviament a la infiltració es van col·locar en remull durant 5 minuts amb 1 ml de solució d'espores. En els tractaments controls (250 espiguetes i 250 cariòpsides) es va seguir el mateix protocol però utilitzant 1 ml d'aigua destil·lada en lloc de solució d'espores. Abans de realitzar els tractaments, en tots els casos les llavors es van rentar durant 5 minuts amb una solució al 5 % d'hipoclorit sòdic, per tal d'esterilitzar-ne la superfície.

Després de la inoculació, les espiguetes i les cariòpsides es distribuïren, respectivament, en plaques de Petri de 9 cm de diàmetre amb paper humitejat amb 3 ml d'aigua destil·lada i en plaques que contenien 10 ml d'agar aigua al 2 %. En ambdós casos, en estadi de cotilèdon, les plàntules es van trasplantar a safates d'alvèols de 75 cm³ que contenien una barreja de terra i vermiculita (4v:1v).

Les condicions de germinació i creixement van ser de 30°C (dotze hores de llum) / 20°C (12 h de foscor). En experiments anteriors s'havia constatat que en aquest règim les plantes de *D. sanguinalis* poden completar el seu cicle vital.

Com a mínim un cop per setmana es feia el seguiment de la supervivència dels individus dels diferents tractaments, així com el control de l'estadi de desenvolupament. A l'inici de la floració dels individus, s'observava la presència o absència d'inflorescències encarbonades. El seguiment es va allargar 130 dies, moment en què totes els individus supervivents havien florit.

Per avaluar les possibles diferències entre els tractaments i l'efecte del medi de germinació (agar aigua i paper de filtre) i de la inoculació (control i inoculades), es va realitzar una anàlisi de la variància i una separació de mitjanes amb el test de Tukey-HSD, utilitzant el procediment GLM del paquet estadístic SAS (SAS Institute Inc., 1999), considerant les safates de cada tractament com a repeticions. Prèviament a l'anàlisi estadística es van transformar les dades aplicant la funció arc sinus.

3. Resultats i discussió

Els resultats indiquen que el medi en què havien germinat els individus de *D. sanguinalis* va tenir un efecte significatiu tant en l'èxit de la inoculació, com en la taxa de mortalitat d'individus en estadi vegetatiu (des de la fase de cotilèdon fins a l'inici de la floració, taula 1).

La mortalitat mitjana dels individus que havien germinat a partir d'espiguetes col·locades en plaques amb paper de filtre humitejat va ser de 0,68, mentre que la dels individus que ho havien fet a partir de cariòpsides distribuïdes en agar aigua va ser de 0,50. D'altra banda, no es varen detectar diferències significatives en les taxes de mortalitat mitjanes dels individus control (0,62) respecte la dels inoculats (0,55).

El primer símptoma de la malaltia no es va observar fins que les plantes infectades no iniciaren la floració. Concretament, la primera planta infectada es va observar als 47 dies

Taula 1. Taxes de mortalitat en estadi vegetatiu i percentatges d'infecció de les plantes florides en la prova d'inoculació al buit realitzada per a establir artificialment la interacció *D. sanguinalis* - *U. syntherismae*

	Medi de germinació*			
	Paper de filtre		Agar aigua	
	Control	Inoculades	Control	Inoculades
Taxa de mortalitat - estadi vegetatiu**	0,67 b***	0,68 b	0,59 ab	0,43 a
% florides infectades	0,00 c	9,74 b	0,00 c	28,77 a
% florides no infectades	100 a	89,74 b	100 a	71,74 c

* En les plaques amb paper de filtre s’hi col·loquen espiguetes (unitat de dispersió de *D. sanguinalis*). En les plaques amb agar aigua es van col·locar cariòpsides (espiguetes sense glumes ni glumel·les)

** Es refereix a la taxa de mortalitat observada des de l’estadi de cotilèdon fins a l’inici de la floració.

No s’ha considerat la mortalitat a la germinació.

*** Lletres diferents indiquen diferències significatives en el test de Tukey-HSD ($P < 0,05$).

de la germinació, tot i que als 30 dies algunes de les plantes inoculades i control ja havien florit (figura 1). Cap de les plantes infectades observades no va produir cap llavor, tampoc cap planta dels tractaments control va desenvolupar la malaltia.

El percentatge d’infecció aconseguit en el tractament agar aigua va ser gairebé tres vegades superior al que es va assolir quan el medi de germinació era paper de filtre (taula 1). Tenint en compte la metodologia seguida, és probable que el principal factor que va comportar un major grau d’infecció en el tractament agar aigua fos l’absència d’estructures que recobrissin les cariòpsides (glumes i glumel·les), més que el medi de germinació.

D’altra banda, tot i que no s’han detectat efectes significatius de la inoculació del fong en la mortalitat dels individus, cal considerar que el nombre de plantes infectades en els diferents tractaments podria haver estat superior a l’observat, ja que el fong podria haver afectat la supervivència dels individus infectats abans de florir i, per tant, abans que s’hagués detectat la malaltia.

En conjunt, aquests resultats suggereixen que *U. syntherismae* té un efecte dràstic en la reproducció de *D. sanguinalis*, però en canvi no s’han detectat efectes significatius en la mortalitat. En general, els fongs patògens poden modificar indirectament o directament la *fitness* del seu hostatger i afectar-ne la supervivència, la reproducció, la capacitat competitiva, el creixement i la susceptibilitat a ser atacada pels herbívors o altres patògens (Jarosz i Davelos, 1995). En el cas dels carbons, s’han realitzat diversos treballs que mostren que la direcció i la magnitud dels efectes provocats pel fong són diferents segons la interacció de parasitisme concreta que s’estudia. Per exemple, en la interacció *Cynodon dactylon* - *Ustilago cynodontis* es va observar que les plantes infectades no produïen ni un sola llavor i

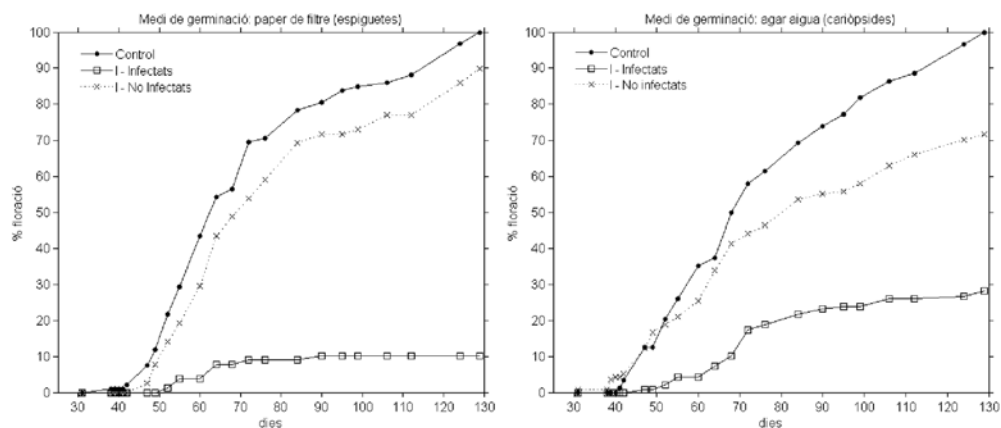


Figura 1. Evolució de la floració dels individus de *D. sanguinalis* no inoculats (control), inoculats no infectats (I- no infectats) i inoculats infectats (I- infectats) amb *U. syntherismae* en els dos medis de germinació avaluats: paper de filtre i agar aigua.

tenien una supervivència i creixement menor que les plantes sanes, però no es van detectar efectes sobre la germinació i l'emergència de plàntules (García-Guzman i Burdon, 1997). En canvi, en l'estudi de la interacció *Ustilago violacea* - *Silene alba*, Alexander i Antonovics (1988) no van trobar diferències significatives en el creixement i la supervivència de plantes sanes i plantes infectades. No obstant això, els factors ambientals poden influir de manera rellevant en els efectes detectats (Thrall i Jarosz, 1994).

Bibliografía

- ALEXANDER, H. M.; ANTONOVICS, J. (1988), «Disease spread and population dynamics of anther smut infection of *Silene alba* caused by the fungus *Ustilago violacea*», *Journal of Ecology*, núm. 76, p. 91-104.
- CARRETERO, J. L. (2004), *Flora arvense española: Las malas hierbas de los cultivos españoles*, València, Phytoma-España.
- CHANDRAMOHAN, S.; CHARUDATTAN, R. (2001), «Control of seven grasses with a mixture of three fungal pathogens with restricted host ranges», *Biological Control*, núm. 22, p. 246-255.
- FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y.; PALM, M. E.; MCCRAY, E. B., *Fungal Databases, Systematic Botany & Mycology Laboratory* [en línea], ARS, USDA, <<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases>> [Consulta: 8 maig 2007].
- GARCÍA-GUZMAN, G.; BURDON, J. J. (1997), «Impact of the flower smut *Ustilago cynodontis* (Ustilaginaceae) on the performance of the clonal grass *Cynodon dactylon* (Gramineae)», *American Journal of Botany*, núm. 84, p. 1565-1571.
- HEAP, I., *The International Survey of Herbicide Resistant Weeds* [en línea], <<http://www.weedscience.org>> [Consulta: 8 maig 2007].
- JAROSZ, A. M.; DAVELOS, A. L. (1995), «Effects of disease in wild plant populations and the evolution of pathogen aggressiveness», *New Phytologist*, núm. 129, p. 371-387.
- JOHNSON, D. A.; BAUDOUIN, A. B. A. M. (1997), «Mode of infection and factors affecting disease incidence of loose smut of crabgrass», *Biological Control*, núm. 10, p. 92-97.
- KONG, C. H.; LIANG, W. J.; HU, F.; XU, X. H.; WANG, P.; JIANG, Y.; XING, B. S. (2004), «Allelochemicals and their transformations in the *Ageratum conyzoides* intercropped citrus orchard soils», *Plant and Soil*, núm. 264, p. 149-157.
- MITICH, L. W. (1988), «Intriguing world of weeds: crabgrass», *Weed Technology*, núm. 2, p. 115.
- SAS INSTITUTE INC. (1999) SAS OnlineDoc®, version 8. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- SCHROEDER, D.; MUELLERSCHAEFER, H.; STINSON, C. S. A. (1993), «A European weed survey in 10 major crop systems to identify targets for biological control», *Weed Research*, núm. 33, p. 449-458.
- THRALL, P. H.; JAROSZ, A. M. (1994), «Host-pathogen dynamics in experimental populations of *Silene alba* and *Ustilago violacea*. I. Ecological and genetic determinants of disease spread», *Journal of Ecology*, núm. 82, p. 549-559.
- TILLEY A. M.; WALKER H. L. (2002), «Evaluation of *Curvularia intermedia* (*Cochliobolus intermedius*) as a potential microbial herbicide for large crabgrass (*Digitaria sanguinalis*)», *Biological control*, núm. 25, p. 12-21.
- TOOLE, E. H.; TOOLE, V. K. (1941), «Progress of germination of seed of *Digitaria* as influenced by germination temperature and other factors», *Journal of Agricultural Research*, núm. 63, p. 65-90.
- WALKER, R. H.; WEHTJE, G.; RICHBURG, J. S. III (1998), «Interference and control of large crabgrass (*Digitaria sanguinalis*) and southern sandbur (*Cenchrus echinatus*) in forage bermudagrass (*Cynodon dactylon*)», *Weed Technology*, núm. 12, p. 707-711.
- WILLITS, D. A.; SHERWOOD, J. E. (1999), «Polymerase chain reaction detection of *Ustilago hordei* in leaves of susceptible and resistant barley varieties», *Phytopathology*, núm. 89, p. 212-217.

