



UNIVERSITAT POLITÈCNICA
DE CATALUNYA

**Estudio y caracterización del
crecimiento sistémico y la formación
de soros de *Ustilago syntherismae* en
plantas de *Digitaria sanguinalis*.**

Trabajo Final de grado
Ingeniería de Sistemas Biológicos

Autora: Alba Abia Hernandez

Tutor: Antoni M. Claret Verdú González

Castelldefels, 9 junio de 2017

Resumen

Digitaria sanguinalis es considerada una de las peores malas hierbas que existen por las grandes pérdidas económicas que provoca en los cultivos. *Ustilago syntherismae* es un hongo formador de carbón que infecta dicha mala hierba, con la capacidad de sustituir las flores de la planta en soros de carbón. De esta manera el hongo reduce la capacidad reproductiva de la planta.

Este estudio pretende enfocarse en el avance del hongo una vez infectada la planta, con el fin de esclarecer algunas dudas de como el hongo interactúa con la planta dentro de ella.

Se hizo un experimento para estudiar en profundidad y esclarecer como el micelio de hongo, una vez se ha producido la infección, crece y coloniza los diversos tejidos de la planta. De igual manera se estudia cómo llega a colonizar los ápices vegetativos y reproductivos, y cómo se produce la transformación de las estructuras reproductivas de la planta en estructuras reproductivas del hongo.

Se utilizaron espiguillas de dos individuos diferentes y mezcla de soros de esporas, dichas espiguillas fueron infectadas con la mezcla, posteriormente, se autopolinizaron ambas espiguillas. Tras la germinación de dichas espiguillas se obtuvieron la siguiente generación de espiguillas y de soros de ambas plantas. Se infectaron y pusieron a germinar de manera cruzada la nueva generación de espiguillas con la se soros, obteniendo así los cuatro tipos de espiguillas con los que se trabajaron.

Esto se realizó con el fin de determinar la importancia y valorar capacidad de infección según individuo. Para ello se observaron los cuatro tipos de espiguillas germinadas según el estadio de crecimiento, su origen tanto de planta como del hongo con el que fue infectada y la combinación de ambos.

Dicha infección se llevó a cabo con un proceso de infiltración en vacío para facilitar el contacto *in vitro* de las espiguillas con las esporas y así inducir artificialmente la interacción entre la planta y el hongo. Las plántulas inoculadas se tiñeron y se observaron en el microscopio óptico para comprobar la existencia del hongo en sus tejidos y seguir su avance en las diferentes fases de crecimiento de la planta.

Con este estudio se constatan diferencias significativas ($P < 0,05$) para la resistencia a la infección de *U. syntherismae* de las plantas de *D. sanguinalis*, en todos los estadios estudiados. Los porcentajes de infección de cada tipo de espiguilla han sido drásticamente diferente según el estadio.

Por lo que respecta a la virulencia de las esporas los resultados muestran diferentes grados de virulencia de los hongos según el estadio. Conforme se estudian, se manifiesta que los estadios más avanzados se expresan diferencias más significativas ($P < 0,05$) con respecto a la virulencia.

Palabras clave: Mala hierba, Espiguillas, Carbón, Telióspora, *D. sanguinalis*, *U. syntherismae*, Gramínea.

Abstract

Digitaria sanguinalis is considered one of the worst weeds because the high economic losses it generates in harvesting crops. *Ustilago syntherismae* is a fungus which infects the weed and has the capability of substitute the flowers of the weed by smut sori, so it reduces the reproductive capacity of the weed. With this method, the fungus reduce the reproductive capacity of the plant.

The objective of this study is to analyse the evolution of the fungus once the plant is infected with a proposal of clarify some doubts on how the fungus interacts with the plant inside it.

An experiment is realized to analyse in detail how the fungus mycelium grows and colonises the different tissues, once the infection is done. In the same manner is studied how it colonises the vegetative and reproductive apices, more over how the transformation of the reproductive structures of the plant takes place in reproductive structures of the fungus.

Spikelets from 2 different individuals were used and a mixture of spore sera. These spikelets were infected with the mixture, later through the self-pollination of both spikelets. After their germination, the following generation of spikelets and of sera of both plants were obtained. The new generation of spikelets and sera were infected and germinated crosswise, obtaining the four types of spikelets which it has been worked with.

The infection is performed through a vacuum infiltration process in order to facilitate the *in vitro* contact of the spikelets with the spores, and in this way induce the plant fungus interaction artificially. The inoculated seedlings are dyed and observed through the optic microscope to prove the fungus existence in its tissues to follow its progress through the plant different growing phases.

This study shows significant differences ($P < 0,05$) of the *D. sanguinalis* plants infection resistance for *U. syntherismae* during all the studies stages. The percentage of the infection of each type of spikelet according to the study made are drastically different.

As far as the virulence of the spores is concerned the obtained data shows different results depending on the stage. As more advanced stages are studied more significant differences ($P < 0,05$) regarding the virulence appear.

Key words: Large crabgrass, Spikelets, Smut, Teliospore, *D. sanguinalis*, *U. syntherismae*, Grass.

Resum

Digitaria sanguinalis es considerada una de les pitjors moles herbes que existeixen per les grans pèrdues econòmiques que provoquen als cultius. *Ustilago syntherismae* es un fong formador de carbó que infecta l'esmentada mala herba, amb la capacitat de substituir les flors de la planta en sorus de carbó. D'aquesta manera el fong redueix la capacitat reproductiva de la planta.

Aquest estudi pretén enfocar-se en l'avanç del fong una vegada infectada la planta, amb la finalitat d'aclarir alguns dubtes de com el fong interactua amb la planta dintre d'ella.

Es va fer un experiment per estudiar en profunditat i aclarir com el miceli de fong, un cop ha produït la infecció, creix i colonitza els diferents teixits de la planta. De la mateixa manera, s'estudia com arriba a colonitzar els àpexs vegetatius y reproductius i com es produeix la transformació de les estructures reproductives de la planta en estructures reproductives del fong.

Es varen utilitzar espiguetes de dos individus diferents y barreja de sorus d'espores, aquestes espiguetes van ser infectades amb la barreja, posteriorment es van autopol·linitzar de les dues espiguetes. Després de la germinació de les espiguetes es va obtenir la següent generació d'espiguetes i de sorus de les dues plantes. Es van infectar i posar a germinar de forma creuada la nova generació d'espiguetes amb la se sorus, obtenint així els quatre grups d'espiguetes amb les que es treballaran.

Aquesta infecció es va portar a terme amb un procés de infiltració a vuit per facilitar el contacte in vitro de les espiguetes amb les espores i així induir artificialment la interacció entre la planta i el fong. Les plàntules inoculades es van tenyir i es van observar al microscopi òptic per comprovar l'existència del fong als seus teixits i seguir el seu avanç en les diferents fases del creixement de la planta.

Amb aquest estudi es constaten diferències significatives ($P < 0,05$) per a la resistència a la infecció de *U. syntherismae* de las plantes de *D. sanguinalis*, en tots els estadis estudiats. El percentatge d'infecció de cada tipus de espigueta ha sigut dràsticament diferent segons l'estadi.

Pel que respecta a la virulència de les espores, els resultats mostren diferents graus de virulència dels fongs segons l'estadi de la planta. A mesura que s'estudia estadis mes avançats, s'expressen diferències més significatives ($P < 0,05$) amb respecte de la virulència.

Paraules clau: Mala herba, Espigueta, Carbó, Teliòspora, *D. sanguinalis*, *U. syntherismae*, Gramínea.

Índice

Índice de tablas	9
Índice de figuras	10
Índice de figuras de los Anexos A.....	11
Índice de figuras de los Anexos B.....	¡Error! Marcador no definido.
1. Introducción.....	13
1.1. Interacción hongos de carbón-plantas	14
1.2. <i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.	17
1.2.1. Taxonomía	17
1.2.2. Morfología.....	17
1.2.3. Ciclo de vida	17
1.2.3.1. Patrón de germinación.....	18
1.2.4. Hábitat	19
1.3. <i>Ustilago syntherismae</i>	19
1.3.1. Taxonomía.....	19
1.3.2. Morfología.....	19
1.3.3. Hábitat	20
1.4. Interacción <i>Digitaria sanguinalis</i> - <i>Ustilago syntherismae</i>	20
1.4.1. Infección.....	20
1.5. Antecedentes	21
2. Objetivos.....	22
3. Material y métodos.....	23
3.1. Infección, crecimiento y colonización los diversos tejidos de la planta	23
3.1.1. Material biológico	23
3.1.2. Protocolo de infiltración	25
3.1.3. Protocolo de seguimiento de germinación	26
3.1.4. Protocolo de procesado y tinción de las plantas	28
3.2. Antecedentes	28
3.2.1. Material Biológico	28
3.2.1.1. Material vegetal	29
3.2.1.2. Material fúngico	29
3.2.2. Infiltración	29
3.2.3. Seguimiento de la germinación	29
3.2.4. Conservación del material	29
3.3. Imágenes	30
3.4. Tratamiento de los datos: capacidad de resistencia	30

4.	Resultados y discusión	32
4.1.	Datos de infección en estadio 1	33
4.1.1.	Espiguillas	33
4.1.2.	Esporas.....	33
4.1.3.	Origen	34
4.2.	Datos de infección en estadio 2	35
4.2.1.	Espiguillas	35
4.2.2.	Esporas.....	35
4.2.3.	Origen	36
5.	Conclusiones	37
6.	Bibliografía	38
7.	Anexo A	43
8.	Anexo B.....	47

Índice de tablas

<i>Tabla 1:</i> Tabla de abreviaturas.....	12
<i>Tabla 2:</i> Orígenes y estadios utilizados para el análisis de los datos.....	31
<i>Tabla 3:</i> Espiguillas germinadas utilizadas en el ensayo.....	32
<i>Tabla 4:</i> Incidencia de infección (tanto por uno) de las plántulas de <i>Digitaria sanguinalis</i> en estadio 1, estudiadas según el tipo de espiguillas utilizadas en la infección. Medias seguidas de letras diferentes mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).....	33
<i>Tabla 5:</i> Incidencia de infección (tanto por uno) de las plántulas de <i>Digitaria sanguinalis</i> en estadio 1, estudiadas según el tipo de esporas utilizado en la infección. Medias seguidas de letras diferentes mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).....	34
<i>Tabla 6:</i> Incidencia de infección (tanto por uno) de las plántulas de <i>Digitaria sanguinalis</i> en estadio 1 estudiadas según el origen utilizado para la infección. Medias seguidas de letras diferentes mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).....	34
<i>Tabla 7:</i> Incidencia de infección (tanto por uno) de las plántulas de <i>Digitaria sanguinalis</i> en estadio 2, estudiadas según el tipo de espiguillas utilizadas en la infección. Medias seguidas de letras diferentes mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).....	35
<i>Tabla 8:</i> Incidencia de infección (tanto por uno) de las plántulas de <i>Digitaria sanguinalis</i> en estadio 2, estudiadas según el tipo de esporas utilizado en la infección. Medias seguidas de letras diferentes mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).....	36
<i>Tabla 9:</i> Incidencia de infección (tanto por uno) de las plántulas de <i>Digitaria sanguinalis</i> en estadio 2 estudiadas según el origen utilizado para la infección. Medias seguidas de letras diferentes mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).....	36

Índice de figuras

<i>Figura 1:</i> Ciclo vital de <i>Ustilago maydis</i> hospedante de <i>Zea mays</i> (Agrios 1991).....	15
<i>Figura 2:</i> Secuencia de germinación de <i>Digitaria sanguinalis</i> desde la semilla hasta la primera etapa foliar (de izquierda a derecha). Los dibujos esquematizan el patrón radicular en la parte superior y el patrón coleoptilar abajo. cr: coleorhiza, le: lemna, ls: lemna de la flor estéril, pa: pálea, pe: pericarpio, ra: radícula, ug: gluma superior (Verdú & Mas, 2014).....	18
<i>Figura 3:</i> Descripción genealógica del material utilizado.....	24
<i>Figura 4:</i> Plántulas de <i>Digitaria sanguinalis</i> después de los diez días en la cámara de germinación establecidos en el protocolo de seguimiento de germinación. Fotografía tomada por la autora.....	27
<i>Figura 5:</i> Micelio del hongo <i>Ustilago syntherismae</i> en el tallo de <i>Digitaria sanguinalis</i> a 400 aumentos, tomada con el programa <i>TOUP VIEW</i> por la autora.....	30

Índice de figuras de los Anexos A

Figura 6: Plántula de *D. sanguinalis* infectada por *U. syntherismae*. Se pueden observar las hifas del hongo en lila oscuro. Fotografía tomada a 400 aumentos con el programa *TOUP VIEW* por la autora.....43

Figura 7: Plántula de *D. sanguinalis* infectada por *U. syntherismae*. Se puede apreciar la dificultad para diferenciar los tejidos vasculares del hongo. Fotografía tomada a 100 aumentos con el programa *TOUP VIEW* por la autora.....44

Figura 8: : Plántula de *D. sanguinalis* infectada por *U. syntherismae*. Se puede apreciar con facilidad las fíbulas características de los basidiomicetos. Fotografía tomada a 400 aumentos con el programa *TOUP VIEW* por la autora.....45

Figura 9 Plántula de *D. sanguinalis* infectada por *U. syntherismae*. Fotografía tomada a 400 aumentos con el programa *TOUP VIEW* por la autora.....46

Índice de figuras de los Anexos A

Figura 10: *D. sanguinalis* del grupo Plantas completamente con carbón (PCE) justo después de ser extraída del tiesto para ser vista en el microscopio después del proceso necesario. Fotografía tomada por la autora.....47

Figura 11: *D. sanguinalis* del grupo Plantas completamente con carbón (PCE), de la cual se han extraído las hojas. Fotografía tomada por la autora.....48

Figura 12: Aplicación del azul de metileno en un pocillo con muestra de *D. sanguinalis* para la tinción después de pasar por la estufa. Fotografía tomada por la autora.....48

Figura 13: Pocillos con el tallo y raíz principal de *D. sanguinalis* y azul de metileno en el transcurso del tiempo necesario para su tinción. Fotografía tomada por la autora.....50

Figura 14: Proceso de dilución y lavado del azul de metileno, una vez transcurrido el tiempo de tinción. Fotografía tomada por la autora.....51

Figura 15: Tallo de plántula de *D. sanguinalis* limpiándose después de ser teñido. Fotografía tomada por la autora.....52

Figura 16: Tallo de plántula *D. sanguinalis* una vez teñido y hecha la preparación para ser observado al microscopio. Fotografía tomada por la autora.....53

Con el fin de hacer más accesible y entendible este trabajo, se indican en la tabla 1 las abreviaturas utilizadas a lo largo de la redacción.

Nombre	abreviatura
Especie	spp
Milímetros	mm
Plantas de germinación radicular	Ra
Plantas de germinación coleoptilar	Co
Micrómetros	μm
Plantas aparentemente sanas	PAS
Plantas parcialmente con carbón	PPE
Plantas completamente con carbón	PCE
Mezcla de Soros (de varias plantas)	SCP

Tabla 1: Tabla de abreviaturas

1. Introducción

Mantener el cultivo en buen estado es de particular interés para muchos sectores de la industria como la agricultura pero también para los sectores derivados como el textil o la construcción. Las principales causas que hacen empeorar un cultivo son la aparición de patógenos (tanto internos como externos), la aparición de maleza no deseada, la ubicación en un clima no adecuado, el mal uso de fertilizantes, una cantidad inapropiada de riego, los ataques de depredadores, entre otros. Entre estos los más preocupantes son la maleza no deseada que baja el rendimiento del cultivo, las plagas y las patologías que puedan sufrir los cultivos, pudiendo clasificarlas en hongos, bacterias, micoplasmas, plantas superiores parasitas, virus y nematodos (Chaudhary 2003; Bragachini 2004).

La fitopatología ha sido una disciplina desarrollada en especies de plantas cultivadas, pero pocos autores han estudiado como los patógenos pueden afectar al tamaño y la estructura genética de las poblaciones silvestres, como es el caso de las especies arvenses (Dinoor y Eshed 1984; Burdon 1987). A pesar de esta realidad ampliamente reconocida, se ha avanzado mucho por otra línea desde las primeras contribuciones de los años 70 y 80, la investigación de enfermedades de plantas en comunidades naturales (Gilbert 2002). Actualmente, los esfuerzos continúan desde ambos puntos de vista (Burdon *et al.* 2006). No fue hasta 1729 que se vio que los hongos utilizaban esporas para su reproducción y hasta 1755 que se empezó a tratar los hongos como parásitos que podían padecer las plantas. Desde entonces se ha estudiado a través de la micología las causas de los hongos en plantas quedando actualmente mucho por estudiar y grandes incógnitas aún por resolver.

El conocimiento de la biología y la ecología de las especies herbáceas silvestres es una información básica que puede contribuir de manera relevante en el desarrollo de estrategias de manejo y control de malas hierbas. Es imprescindible encaminarse hacia aquellas tácticas que minimizan las pérdidas de rendimiento de los cultivos y a la vez son respetuosas con el medio ambiente. (Wyse 1992; Bhowmik 1997; Mortensen *et al.* 2000; Liebman *et al.* 2001; Radosevich *et al.* 2007; Fernández-Quintanilla *et al.* 2008). Por otro lado, este tipo de estudios también son de interés para la identificación y evaluación de posibles patógenos que puedan ser utilizados como bioagentes para disminuir las densidades de poblaciones de especies arvenses en campos de cultivo.

Diferentes trabajos han estudiado la historia, el desarrollo y los aspectos técnicos del uso de patógenos de plantas para el control biológico de las malas hierbas. McFadyen, 1998; Müller-Schärer *et al.* 2000; Charudattan 2001; Brimner y Boland 2003; El-Sayed 2005). Entre las diferentes clases de patógenos, los hongos son los que han recibido la mayor atención (Butt *et al.* 2001).

Este trabajo pretende dar luz a, específicamente, la relación de los hongos parásitos en las plantas consideradas como maleza, y contribuir a una eliminación de esta en los campos de cultivo de la forma más respetuosa con el medio posible.

1.1. Interacción hongos de carbón-plantas

El ciclo vital de *Ustilago maydis* que necesita a *Zea mays* en su ciclo vital, es una de las interacciones hongo-planta más estudiadas.

En este hongo dimórfico, la transición de la fase saprófita a la patógena está determinada por los alelos de tipo sexual a y b (Banuett 1995; Casselton y Olesnicky 1998). Cuando dos células haploides se encuentran sobre la superficie de la planta son capaces de reconocerse mediante un sistema feromona-receptor codificado por el locus a. Si ocurre este reconocimiento, es decir, si las células son compatibles para el locus a, cada una forma un tubo de conjugación que crece a favor del gradiente de feromona (Spellig *et al.* 1994; Snetselaar *et al.* 1996). Cuando los filamentos se encuentran se produce la plasmogamia, pero no la cariogamia, y se forma una estructura dicariótica que recibe el nombre de filamento infectivo (Snetselaar y Mims 1992). La formación de este filamento así como todos los eventos que ocurren a partir de este momento dependen de la expresión de los genes del locus b y de que las células sean también compatibles para este locus (Bölker *et al.* 1995; Feldbrügge *et al.* 2004). El filamento infectivo, que posee dos únicos núcleos que no se dividen, es la estructura que explora la superficie de la planta hasta encontrar un lugar apropiado para la penetración del tejido vegetal. Una vez dentro del tejido vegetal se produce el desarrollo de un micelio dicariótico. A los pocos días de la infección se pueden observar los síntomas clásicos de la enfermedad: clorosis, manchas de antocianina y finalmente la aparición de tumores (Agrios 1988). En los tumores, los filamentos se fragmentan en células individuales donde ocurre la cariogamia (Banuett y Herskowitz 1996). Estas células diploides, las teliósporas, se cubren de una gruesa pared que por su color negro da el nombre de carbón del maíz a esta enfermedad. Finalmente en las teliósporas ocurre la meiosis y la germinación de cuatro células haploides que crecen como levaduras completando el ciclo de vida.

El ciclo de *U. maydis* (esquemático en la figura 1) consta de dos esporas compatibles, dicarionización e infección por micelio secundario. El crecimiento del micelio secundario se lleva a cabo dentro de la planta parasitada, de esta forma una telióspora binucleada pasa por una fase de cariogamia seguida de una meiosis. Después se lleva a cabo la germinación de la espóra entrando en una fase binucleada seguida de un periodo tetranucleada. A continuación se forma el basidio con esporas sésiles sin estigmas. Las basidiósporas se multiplican por germinación. Si dichas esporas llegan a parar a otro huésped *Zea mays* el ciclo se repetirá. (Llimona *et al.* 1991).

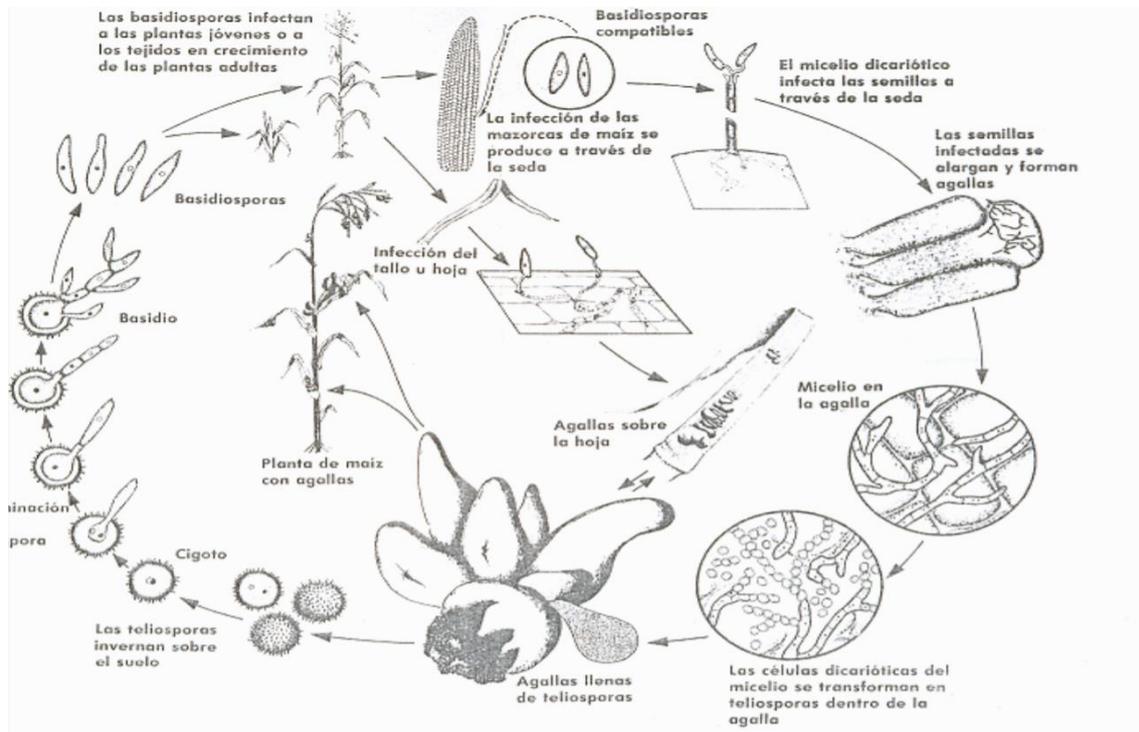


Figura 1: Ciclo vital de *Ustilago maydis* hospedante de *Zea mays* (Agrios 1991)

Los Ustilaginales son un orden parásito de plantas facultativas con carbón que consta de 1200 especies. Los carbones son habitualmente causados por los hongos Ustilaginales, los cuales son parásitos semiobligados que invaden principalmente el tejido de reservas de almidón de las plantas reemplazándolos por masas pulverulentas de color marrón oscuro a negro, que corresponden a las teliósporas del hongo.

Existen otros Ustilaginales con una fase de su ciclo en el que forman carbón, como *Urocystis cepulae* en *Allium ssp*, *Ustilago nuda* en *Hordeum vulgare*, *Microbotryum* en *Caryophyllaceae* (E. Hood et al. 2010) o *Ustilago synthetis* en *Digitaria sanguinalis* (Mas y Verdú 2014).

Existen múltiples interacciones de parasitismo en la naturaleza entre especies de carbones del género *Ustilago* y especies de plantas. La taxonomía del orden de los Ustilaginales ha sido muy estudiada sobre todo por el Dr. Kálmán Vánky (1994; 1999; 2002), micólogo del *Herbarium Ustilaginales Vánky* (HUV) y autor de muchas descripciones y asociaciones con sus hospedadores.

La sintomatología característica de los carbones es la producción de soros llenos de teliósporas en la parte aérea de la planta y sobretodo en las inflorescencias. Las células de los tejidos afectados pueden padecer dos efectos, el primero es ser destruidas y reemplazadas por esporas negras del carbón. Y el segundo, ser estimuladas para que se dividan y crezcan hasta que se produzca un inflamamiento o gala y posteriormente destruidas y reemplazadas por las teliósporas del hongo. También hay otros indicios externos de este tipo de enfermedades, pero no son comunes para todas las especies (Agrios, 1997)

La mayoría de los trabajos sobre especies de carbones se centran en aspectos relacionados con los efectos del ciclo de vida y los métodos de control de la enfermedad de las plantas cultivadas; las poblaciones silvestres y como controlarlas han sido mucho menores. El Dr. Jeremy J. Burdon (1987; 1993) es uno de los pioneros de estos estudios, trabajando a nivel poblacional los efectos de las interacciones hospedante-patógeno en plantas silvestres. Actualmente, el grupo que lidera, el *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation* (CSIRO Plant Industry, Australia), es uno de los centros líderes de referencia en esta materia (Barrett *et al.* 2008; Burdon y Thrall 2008)

Existen estudios previos con conceptos aún no desarrollados, que al ser descubiertos ampliaron la frontera de los conocimientos de los *Ustilago*. Una de estas publicaciones obtuvo que la emergencia de las plántulas y la biomasa de las plantas de *Bromus catharticus* infectadas por *Ustilago bullata* eran menores que en los casos de plantas sanas, y que la mayor capacidad competitiva de los individuos sanos y enfermos, se invertía dependiendo del nivel de nutrientes del suelo (García-Guzmán *et al.* 1996). Previamente se había observado que el hongo reducía la biomasa, la cantidad de hijuelos y la supervivencia de las plantas enfermas (Falloon 1976). Aunque también encontramos estudios, en el caso de la interacción entre *Ustilago violacea* y *Silene alba*, que no encuentran ninguna diferencia entre el crecimiento y la supervivencia de los individuos sanos y enfermos (Alexander y Antonovics 1988). En otros estudios se observa un aumento de la biomasa aérea de *Poa pratensis* infectada con *Ustilago striiformis* (Nus y Hodges 1990). Esto nos desvela que a pesar encontrar una misma sintomatología en diferentes parejas de hospedante-patógeno, cada especie reacciona de forma diferente a la infección, independientemente de la formación de carbón o no. Esto puede ser a consecuencia de las diferentes estrategias que cada especie de planta haya desarrollado contra el hongo que las infecta, para así asegurar su supervivencia (Gallart 2009).

Se ha observado la existencia de variabilidad genética en las poblaciones silvestres hospedante-patógeno, según la resistencia a ser infectadas y la capacidad de infección respectivamente (Carius *et al.* 2001). Otro dato importante sobre las diferencias e interacciones entre hospedante-patógeno es la posibilidad de que los ciclos de generación de las plantas sean similares al de sus patógenos, siempre que estas tengan un ciclo de vida corto. En estos casos la respuesta evolutiva de la dinámica de la interacción es muy importante (Gilbert 2002). Dicha variabilidad genética ha sido observada por varios científicos de la materia, muchos de ellos para el caso concreto de los efectos de la interacción hospedante-patógeno en la estructura genética de poblaciones silvestres de *Caryophyllaceae* infectadas por *Microbotryum violaceum*. (Alexander *et al.* 1996; Carlsson-Granér y Thrall 2002; Van Putten *et al.* 2005). Estos datos nos desvelan que no solo existe una diversidad entre las respuestas de las especies herbáceas ante este tipo de patógenos formadores de carbón, sino una diferencia entre respuestas dentro de cada especie.

Las diferentes estrategias de actuación de los hospedantes según la especie y dentro de esta, ante un hongo formador de carbón, puede ser muy amplia. Si se quiere, en un futuro proceder al control de plantas silvestres con hongos patógenos, concretamente formadores de carbón, ha de estudiarse bien las diferentes estrategias adoptadas por las especies e individuos en cada asociación hospedante-patógeno. Así como la efectividad de cada una de dichas estrategias, con el fin de evitar la crecida significativa de la población de la especie herbácea (Gallart 2009).

1.2. *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.

1.2.1. Taxonomía

Pertenece al orden de los Poales, familia de las Poáceas, subfamilia de las Panicoides y al género *Digitaria*.

Sus nombres comunes en castellano son: garranchuelo, pata de gallina, pasto cuaresma, pasto colchón, pata de gallo, fresadilla, frente de toro, azulita, gramilla o guarda rocío. En inglés popularmente se le llama; large crabgrass hairy crabgrass, crab grass o hairy fingergrass.

Otras nomenclaturas sinónimas que se han utilizado son *Digitaria fimbriata* Link. *Digitaria marginata* Link. *Digitaria velutina* (Forks.) P. Beauv. *Dactylon sanguinale* Vill. *Panicum adscendens* H.B.K. *Panicum sanguinale* L. *Syntherisma sanguinalis* Dulac. (Behrendt y Hanf 1979).

1.2.2. Morfología

El garranchuelo es una planta herbácea anual que puede formar macollas de 20 a 60 cm de altura. Su tallo es liso y glabro, aunque con nudos pilosos y ramificados por la base. Las hojas son liguladas, tienen el limbo de color verde a rojo-violeta recubierto de pelos. La vaina foliar presenta los mismos tonos, con pelos más largos. La lígula es membranosa y blanca de 1 a 3 mm de longitud (Behrendt y Hanf 1979).

Su unidad de dispersión es la espiguilla, que está formada por dos flores, de las cuales la inferior es estéril y está reducida a una gluma. Las espiguillas son elípticas y alargadas, su tamaño es de 2,5 a 3,5 mm x 1 mm. La inflorescencia tiene forma más o menos digitada y está formada por de 3 a 15 racimos unilaterales, a menudo violáceos. Tiene un sistema radicular muy desarrollado, capaz de profundizar hasta 2 m y extenderse hasta 2,5 m de radio en condiciones de alta fertilidad y humedad. (Bolòs *et al.* 2005; Aizpuru *et al.* 1993, 1999; Campos y Herrera 2009; Carretero 2004; Villarías 2000).

1.2.3. Ciclo de vida

El garranchuelo es una gramínea anual de verano C4, que inicia la germinación en primavera tardía y se prolonga hasta mediados del verano.

Es una gramínea cosmopolita, que se encuentra en campos de cultivo y bordes de caminos. Crece en cultivos de suelos arenosos hasta arcillosos de zonas cálidas y también, en cultivos tropicales y subtropicales. Tiene poblaciones adaptadas a temperaturas relativamente elevadas y a la sequía. Tolera pHs bajos y no resiste las heladas.

Hace miles de años el garranchuelo había sido cultivada en la India y en África para la alimentación humana. Entre el siglo XIX y el XX se introdujo en Estados Unidos como cultivo forrajero, aunque rápidamente fue sustituido por especies más productivas como el trigo y el maíz (Mitich 1988).

D. sanguinalis ha sido descrita como una de las peores malezas del mundo por su abundancia, su capacidad de proliferación, su elevada capacidad competitiva y las pérdidas económicas que causa (Holm et al 1977; Mordue 1995; Farr et al. 2009)..

1.2.3.1. Patrón de germinación

En la mayoría de casos el primer signo de germinación de una semilla es el crecimiento del largo y peso de la radícula (Bewley y Black, 1994). Existen algunas familias que tienen patrones de germinación diferentes, en las que la primera estructura en emerger no es la radícula.

En el caso de *D. sanguinalis*, sus semillas tienen dos patrones de germinación según el órgano que aparece primero, la radícula o el coleoptilo (Verdú y Mas, 2014), como puede observarse en la Figura 2.

Cuando la radícula es lo primero que emerge de la carióspside se dice que se trata de una germinación radicular (Ra), que se considera la más típica. Después de un cierto grado de desarrollo de la radícula, emerge el coleoptilo.

En el caso de la germinación coleoptilar (Co), la primera estructura que aparece es el coleoptilo. Una vez la zona coleoptilo-mesocotilo se ha alargado y solo cuando este ha desarrollado hasta cierto grado empieza a emerger la radícula.

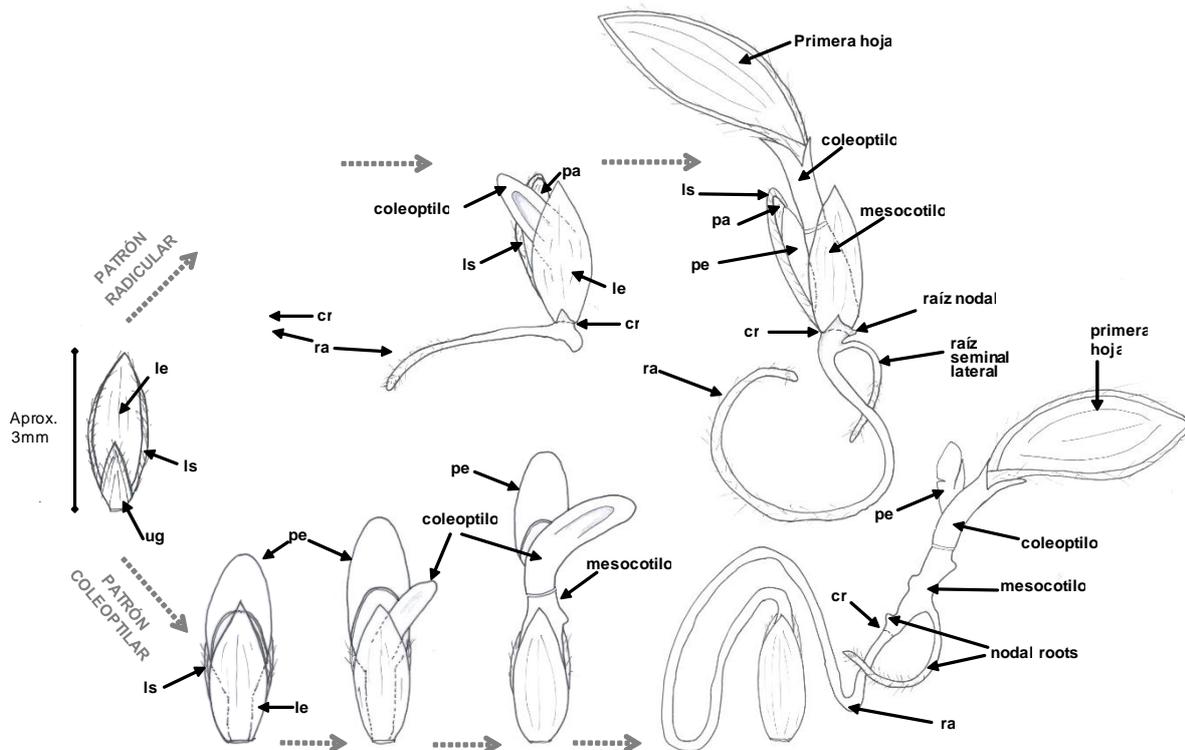


Figura 2: Secuencia de germinación de *Digitaria sanguinalis* desde la semilla hasta la primera etapa foliar (de izquierda a derecha). Los dibujos esquematizan el patrón radicular en la parte superior y el patrón coleoptilar abajo. cr: coleorhiza, le: lemna, ls: lemna de la flor estéril, pa: pálea, pe: pericarpio, ra: radícula, ug: gluma superior (Verdú & Mas, 2014).

1.2.4. Hábitat

El garranchuelo es una gramínea anual de verano extensamente distribuido, muy prolífico y con una elevada capacidad competitiva (Gallart 2009).

Esta ampliamente repartida, crece en terrenos removidos, bordes de camino, cultivos y suelos con cierta humedad. Algunos autores la describen como una de las peores malas hierbas que existen por la cantidad de países que la consideran mala hierba, su abundancia y las pérdidas económicas que causa. (Holm *et al.* 1977).

1.3. *Ustilago syntherismae*

1.3.1. Taxonomía

Ustilago syntherismae pertenece al Reino de los Hongos, a la clase Basidiomycota, a la subclase Teliomicétidos, al orden de los Ustilaginales, a la familia de las Ustilagináceas y al género *Ustilago*.

Las uredinales y los carbonos pertenecen a la clase de los basidiomycota y se caracterizan por la formación de unas esporas de resistencia llamadas teliósporas.

Todos los hongos carbonos son patógenos de plantas y se calcula la existencia de alrededor de 1100 especies que afectan a angiospermas de más de 75 familias (Gallego y Sánchez 2017)

Estas causan carbón en especies cultivadas como el maíz (*Ustilago maydis*), la avena (*Ustilago avenae*) y el trigo (*Tilletia caries*, *Ustilago tritici*), cosa que provoca grandes pérdidas económicas por todo el mundo.

Son capaces de infectar diversas partes de la planta hospedante, aunque suelen afectar a las flores (Alexopoulos y Mims, 1985).

Muchos representantes de la familia Ustilagináceas son sistémicos y sobreviven indefinidamente en el interior de sus hospedantes, manteniendo el micelio en íntimo contacto durante largos periodos de tiempo (Fullerton, 1970).

1.3.2. Morfología

La morfología de las esporas de resistencia, o teliósporas (o ustiloesporas), es de globular o subglobular hasta a ovoide. Su diámetro medio es de 10x12,5 µm, presentan paredes espesas, rugosas y marrones (Mas *et al.*, 2006). Cuando estas germinan, dan lugar a un promicelio septado y ramificado.

1.3.3. Hábitat

Ustilago syntherismae es una especie de carbón sistémico (Ustilaginales) que en Europa solo ha sido citado como parasito de especies del género *Digitaria* y *Panicum* (Vánky, 1994; Farr *et al.*, 2009). Aun así, en otros lugares del mundo, también ha sido observado como patógeno de otras especies de gramíneas. Concretamente ha sido citado en individuos de *Acroceras macrum*, *Andropogon* sp., *Cenchrus* spp., *Leptoloma cognatum*, *Hyparrhenia bracteata*, *Eleusine indica* y *Setaria viridis* (Farr *et al.*, 2009).

1.4. Interacción *Digitaria sanguinalis* - *Ustilago syntherismae*

La información recogida sobre la interacción del hongo patógeno *U. syntherismae* y la especie arvense *D. sanguinalis* es muy limitada. Los estudios que recogen dicha información, señalan que el hongo no se dispersa en el interior de la semilla, como suceden en otras especies de carbones como *Ustilago tritici* o *Ustilago nuda*. Sino que presumiblemente las esporas pasan el invierno en el suelo e infectan las plántulas como *Ustilago hordei* o *Ustilago maydis*; (Smith *et al.*, 1988). Los trabajos existentes recogen información principalmente sobre la interacción con datos cuantitativos (Johnson y Baudoin 1997; Norton 1896; Halsted 1899; Fischer y Holton 1957; Gaskin, 1958). La información general de estos trabajos, describe las plantas infectadas como individuos de tamaño más reducido que las plantas sanas, con entrenudos y hojas más cortas pero más frondosas. También se ha observado que *U. syntherismae* parece que retarda el inicio del periodo de senescencia de los individuos de *D. sanguinalis*.

Normalmente el patógeno causa la castración total de *D. sanguinalis*, aunque en una pequeña proporción también se han encontrado plantas con inflorescencia con carbón capaces de producir semilla. (Norton 1896; Johnson y Baudoin, 1997).

1.4.1. Infección

Según Verdú y Mas (2014), el hongo *U. syntherismae* entra en la planta *D. sanguinalis* en los primeros estadios de esta, más concretamente entre su germinación y el estadio de plántula a través del coleoptilo. Se observó que había plantas infectadas que tenían un micelio en el mesocotilo, lo que conduce a plantearse que esta también podría ser la zona por la que se introduce el hongo, pudiendo ayudarse de mecanismos químicos. Si el hongo consigue infectar la planta, sigue alargando sus micelios, se cree que la planta tiene mecanismos contra la infección que impediría, en algunos casos, que el hongo acabara infectando los órganos reproductivos. Si la infección consigue llegar a estos órganos, los recursos que la planta destina a la formación de las flores sirven al hongo en la formación de esporas (carbón). Si esto sucede en el momento de la dehiscencia el carbón cae de la planta hasta llegar al suelo, las esporas se disponen en el suelo hasta que se den las condiciones adecuadas para una nueva infección. Las esporas son capaces de mantenerse latentes sin perder capacidad de infección, al ser *D. sanguinalis* una planta anual, esto limita la posibilidad de una nueva infección. Para que esta infección se lleve a cabo es necesario la simultaneidad de diferentes factores.

Uno de ellos sería la cercanía y buena posición de la espora de *U. syntherismae* respecto a la semilla *D. sanguinalis* susceptible de ser infectada. Otro factor sería la simultaneidad entre la germinación de la espora con una semilla germinada pero sin haber sobrepasado el estadio de plántula. El tercer factor que se tendría que dar, sería la infección en si, la capacidad de la espora para poder penetrar en la plántula. Si todos estos factores se llevan a cabo a la vez, la infección tendría muchas posibilidades de tener éxito y seguiría su infección a través del tallo de la planta.

1.5. Antecedentes

En septiembre de 2004, se detectó la presencia de un carbón (causado por *Ustilago syntherismae* (Schweinitz) Peck) en plantas de *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop. en el margen de una parcela cultivada de la finca experimental de Torre Marimon (Caldes de Montbui, Vallès Oriental, Barcelona, 41°36'N 2°10'E). En aquella fecha era propiedad de la Diputación de Barcelona y en la actualidad pertenece al Institut de Recerca y Tecnologia Agroalimentaries, de esta se recogieron muestras de *D. sanguinalis* con el fin de ser tratadas posteriormente, como se describe en el apartado 3.2. de este trabajo (Mas *et al.* 2006). Esta enfermedad también se observó en 2005 en la misma parcela donde se había detectado inicialmente. La especie de hongo solo había estado citada una sola vez en España en 1880 (Almaraz 2002; Hernández-Crespo 2006). En aquel caso correspondía a material herbario recolectado en Málaga en 1875. A pesar de esta singularidad, la distribución geográfica de esta especie es bastante amplia i ha estado detectada en cinco continentes del mundo. (Mordue 1995; Farr *et al.* 2009).

2. Objetivos

Este estudio, en el marco de la interacción entre la planta anual *Digitaria sanguinalis* y el hongo del grupo de carbones que la puede infectar, *Ustilago syntherismae*, tiene la finalidad de esclarecer como el micelio de hongo una vez se ha producido la infección, crece y coloniza los diversos tejidos de la planta. De igual manera se estudia cómo llega a colonizar los ápices vegetativos y reproductivos, y cómo se produce la transformación de las estructuras reproductivas de la planta en estructuras reproductivas del hongo.

3. Material y métodos

3.1. Infección, crecimiento y colonización los diversos tejidos de la planta

3.1.1. Material biológico

El material utilizado para el experimento fue, 0.6g de eF1P25, 0.6g de eF1P11, 0.1g de scF1P25 y 0.1g de scF1P11 (Figura 4).

- eF1P25: Espiguillas obtenidas por autopolinización (F1) de unas plantas procedentes de espiguillas de la planta P25 (recolectadas en 2013) de las cuales una parte se destinó a ser infectadas con esporas de un pool de soros de carbón de una planta concreta (recolectado en 2013) y la otra parte que se utilizó como blancos en el experimento.
- scF1P25: Esporas de soros recolectadas en plantas con carbón obtenidas de unas plantas procedentes de espiguillas de la planta P25 (recolectadas en 2013) que se infectaron con esporas de un pool de soros de diversas plantas con carbón (recolectado en 2013).
- eF1P11: Espiguillas obtenidas por autopolinización (F1) de unas plantas procedentes de espiguillas de la planta P11 (recolectadas en 2013) de las cuales una parte se destinó a ser infectadas con esporas de un pool de soros de carbón de una planta concreta (recolectado en 2013) y la otra parte que se utilizó como blancos en el experimento.
- scF1P11: Esporas de soros recolectadas en plantas con carbón obtenidas de unas plantas procedentes de espiguillas de la planta P11 (recolectadas en 2013) que se infectaron con esporas de un pool de soros de diversas plantas con carbón (recolectado en 2013).

El material fue recolectado de las plantas madre conservadas en seco a temperatura ambiente por Verdú y Mas (2014).

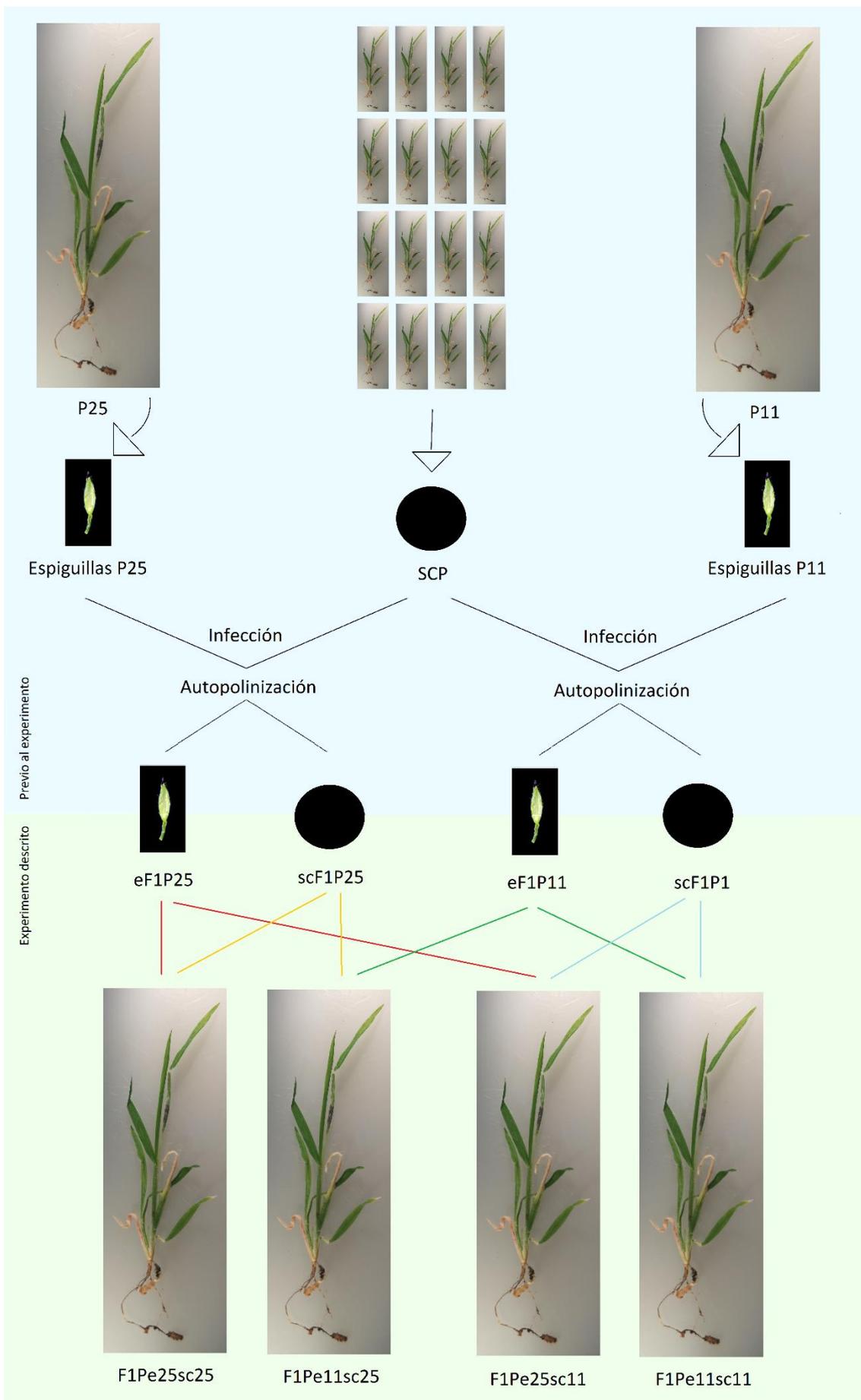


Figura 3: Descripción genealógica del material utilizado.

3.1.2. Protocolo de infiltración

En primavera de 2016 en el laboratorio L022 de DEAB, se procedió a la infección de las espiguillas eF1P25 con scF1P25. El procedimiento utilizado para infectar eF1P11 con scF1P11 fue el mismo en procedimientos paralelos.

Se procedió a desinfectar la superficie de las espiguillas de *D. sanguinalis*, se introdujeron en un tubo de Pirex con tapa de rosca autoclavado, con una solución de NaOCl al 5%, removiéndose con un agitador durante 10 minutos (ISTA, 1985). Con el fin de eliminar la solución de NaOCl, se lavaron las espiguillas en un filtro haciendo pasar 2 litros de agua destilada. Se pasaron a un tubo de Pirex con tapa de rosca autoclavado.

Previo a la infección, se verificó la capacidad de las esporas para germinar bajo condiciones de incubación con un régimen de luz de 30 °C durante 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad a 20 °C en un medio líquido. Se preparó una solución mineral completa estándar (Arnon y Hoagland 1940), diluida de Tween al 0,001 % a razón 1:200 ml (en lo sucesivo denominada solución nutritiva). Se preparó dicha solución tanto con esporas scF1P25 como con scF1P11 a razón de 0,01 g:1 ml y se mantuvieron bajo las condiciones de incubación. Una vez comprobada la germinación de las esporas en ambas muestras a vista de microscopio, dichas las soluciones se validaron para su posterior uso en el ensayo.

El procedimiento elegido para infectar las plantas con los patógenos fue inocular las espiguillas (cariósido con cascós) aplicando un método de vacío adaptado de Dhingra y Sinclair (1995). Se incorporó 0.05g de solución nutritiva con esporas según la infección deseada por cada 0.2g de espiguillas, se tapó el tubo de Pyrex y se agitó durante 10 minutos alternando la agitación manual con la de un agitador. Tras este proceso se le quitó el tapón, se sustituyó por un tapón de algodón y se puso en el desecador. Se sometieron a 3 tandas de vacío, de 10 minutos cada una a 800 mbars, con descansos de 2 minutos. Se decantó el tubo para quitar el sobrenadante (libre de espiguillas) y se vertió el resto de líquido sobre un papel de filtro asegurándose que las espiguillas no salieran del tubo.

Se trasladaron las espiguillas húmedas a placas de Petri, con un papel de filtro humedecido con la solución nutritiva y las esporas. Se incubaron las placas en semi-oscuridad a unos 25 °C, con el fin de alargar el mesocotilo y facilitar la entrada del hongo.

Tras 24 horas se separaron las espiguillas en las placas de Petri con papel de filtro para que cada placa contuviera un máximo de 25 espiguillas, y así garantizar un espacio mínimo para el crecimiento de las plántulas. Dichas placas se dejaron en la cámara de germinación con un régimen de luz de 30 °C durante 12 horas y 12 horas de oscuridad a 20 °C.

Se fueron preparando e incubando soluciones de esporas, en la misma cámara de germinación que las espiguillas. Dicha solución se utilizó para humedecer el papel de filtro de las placas de Petri, donde se encontraban las espiguillas y de esta forma evitar el secado de las mismas. La humidificación con la solución de esporas, se llevó a cabo durante 12 días, la concentración de esta fue de 0.01g/ml y se utilizaron 4mL de solución cada vez que se humedecía el papel de filtro.

Se aplicó el protocolo de infiltración infectando y renombrando las espiguillas:

- eF1P25 infectadas con scF1P25 como origen F1Pe25sc25
- eF1P11 infectadas con scF1P11 como origen F1Pe11sc11
- eF1P11 infectadas con scF1P25 como origen F1Pe11sc25
- eF1P25 infectadas con scF1P11 como origen F1Pe25sc11

Se formaron dos grupos de blancos. El proceso fue el mismo que del resto de las muestras sin haber infiltrado. Las espiguillas de las plantas eF1P25 y eF1P11 sin infectar germinadas fueron las utilizadas en el experimento como grupos blanco. Dichos grupos fueron nombrados por su como origen eF1P25 blanco y origen eF1P11 blanco.

3.1.3. Protocolo de seguimiento de germinación

Los orígenes de espiguillas tras la infiltración, F1Pe25sc25, F1Pe11sc11, F1Pe11sc25 y F1Pe25sc11, fueron sometidos al mismo protocolo de seguimiento de germinación.

Las placas fueron revisadas de forma diaria humedeciéndolas con la solución de esporas, si fuera necesario, y traspasando las espiguillas germinadas.

Se observaron dos patrones diferentes de germinación, dependiendo del órgano embrionario que emerge por primera vez, la radícula o el coleoptilo (Verdú y Mas 2014) (Figura 2).

Se separaron las espiguillas germinadas dependiendo de si siguieron una germinación coleoptera o radicular. Dichas espiguillas se traspasaron a nuevas placas de Petri, en las cuales se pusieron un máximo de 25 espiguillas por placa, con papel de filtro grueso. Cada papel se humedeció con 4 mL de solución nutritiva con esporas, se envolvió en papel de plata para evitar la entrada de luz directa a las espiguillas y se incubó durante 48 horas en la cámara de germinación en régimen de luz de 30 °C durante 12 horas y 12 horas de oscuridad a 20 °C.

Una vez finalizado este periodo de tiempo se desarrollaron las placas del papel de aluminio y se dejaron de nuevo en la cámara de germinación durante 10 días (Figura 5).



Figura 4: Plántulas de *Digitaria sanguinalis* después de los diez días en la cámara de germinación establecidos en el protocolo de seguimiento de germinación. Fotografía tomada por la autora.

Tras el periodo de 10 días en la cámara de germinación, se pasó a trasplantar las plántulas a tiestos. Cada tiesto contuvo 2 centímetros de grava, que sirvió para facilitar el drenaje del agua de riego y abono hasta alcanzar el centímetro por debajo de la parte superior del tiesto.

Se mantuvieron las plantas en el invernadero con un régimen de luz a 30 °C durante 12 horas y 12 horas de oscuridad a 20 °C hasta antes de la fase de floración. Las futuras inflorescencias se recubrieron con papel glassine (papel cristal liso neutro) para garantizar la autopolinización sin evitar el flujo de aire. Se observaron los tres tipos de plantas mencionados anteriormente, plantas aparentemente sanas (PAS), plantas con presencia de soros y de cariósides (PPE) y plantas completamente con carbón (PCE). Se extrajeron manualmente las espiguillas de las plantas PAS y de las PPE separándolas por su procedencia. Los soros de las plantas PPE y PCE se extrajeron manualmente con ayuda de una espátula, separando las masas de teliósporas conservadas dentro de cada espiguilla, también teniendo en cuenta su procedencia.

Con la finalidad de estudiar las muestras en diferentes estadios se dividió cada uno de los seis orígenes en 4 grupos y se asoció a un estadio:

- plántula: espiguillas desarrolladas en placa de Petri.
- flor sin hijuelo: espiguillas trasplantadas a tiestos y florecidas sin haber ahijado.
- flor con hijuelo: espiguillas trasplantadas a tiestos y florecidas habiendo ahijado.
- con hijuelo: espiguillas, trasplantadas a tiestos, no florecidas y ahijadas.

3.1.4. Protocolo de procesado y tinción de las plantas

El procesado y teñido de las plántulas se hizo según describe Parker (1982). Se procesaron de cinco en cinco, el resto de las muestras se procesaron individualmente.

En primer lugar se quitaron las hojas con pinzas (en el caso de las plántulas separando con facilidad los coleoptilo por el nudo, dejando el mesocotilo y la raíz). Se cortó la raíz un centímetro por debajo del mesocotilo.

Para ser transparentado, se pasó la plántula a un pocillo con KOH al 10%. El pocillo se tapó con un cristal se puso en una placa calefactora durante dos horas a una temperatura de entre 40 °C y 60 °C.

Transcurrido el tiempo, se pasó el material a otro pocillo con agua destilada, esta acción se repitió dos veces para garantizar un buen lavado. En la tercera repetición el pocillo contenía azul de toluidina al 0.05% y se dejó reposar durante 15 minutos. Se lavó la muestra, procediendo igual que en el lavado de KOH. La preparación al microscopio se hizo siguiendo la técnica *squash*. Finalmente se observaron las muestras a 400x aumentos para afirmar o negar la presencia del hongo.

3.2. Antecedentes

La recogida de muestras, así como los procedimientos y tratamientos sometidos al material biológico anterior al ensayo, ha sido realizada por Maite Mas y Antoni M.C Verdú del Departamento de Ingeniería Agroalimentaria y Biotecnología del Parque Mediterráneo de la Tecnología, UPC.

3.2.1. Material Biológico

Todo el material biológico utilizado fue recogido de una parcela en Torre Marimon (Caldes de Montbui, Barcelona, 46° 12' N, 4° 33' E).

Durante el experimento se trabajó con tres tipos de *Digitaria sanguinalis* diferentes,

- Plantas aparentemente sanas (PAS): sin presencia de carbón,
- Plantas parcialmente con carbón (PPE): con presencia tanto de espiguillas como de Soros de Carbón,
- Plantas completamente con carbón (PCE): únicamente con presencia de Soros de Carbón.

3.2.1.1. Material vegetal

En otoño de 2013, se recogieron en Torre Marimon, por separado, espiguillas de dos plantas *Digitaria sanguinalis* diferentes, aparentemente con carbón; estas fueron nombradas como P25 y P11. Estas se conservaron en seco a temperatura ambiente a la espera de la recolección.

3.2.1.2. Material fúngico

Se recolectaron mezcla de soros (de varias plantas) de *Ustilago syntherismae* del mismo campo en Torre Marimon, conglomerado de esporas procedentes de diferentes individuos enfermos de *Digitaria sanguinalis*; este conglomerado fue nombrado como SCP.

3.2.2. Infiltración

En primavera de 2014 en el laboratorio L022 de DEAB, se procedió a la infección de las espiguillas P25 y P11 con SCP. El procedimiento utilizado para infectar P25 y P11 con SCP fue el mismo.

La infección de P25 y P11 con SCP, siguió el mismo procedimiento de eF1P25 con scF1P25, explicado anteriormente.

Se formaron dos grupos de blancos. El proceso fue el mismo que del resto de las muestras sin haber infiltrado. Las espiguillas de las plantas P11 Y P25 sin infectar, pasaron por el proceso de autopolinización. Las espiguillas germinadas surgidas después de la autopolinización fueron las utilizadas en el experimento. Dichos grupos fueron nombrados por su origen como F1P25 y F1P11.

3.2.3. Seguimiento de la germinación

Los grupos de espiguillas P25 y P11, tras la infiltración fueron sometidos al protocolo de seguimiento de germinación, anteriormente descrito. El seguimiento de la germinación tuvo lugar de la misma forma que siguió posteriormente la germinación de F1Pe25sc25.

3.2.4. Conservación del material

Tras la germinación, el traspaso a tiestos y el crecimiento de las plantas hasta la fase de floración, estas se sacaron de los tiestos y se conservaron en seco a temperatura ambiente a la espera de la recolección.

3.3. Imágenes

Se fotografiaron preparaciones microscópicas de plántulas, infectadas y no infectadas a 400x aumentos. Estas fueron captadas con una videocámara ocular con salida USB acoplada al microscopio y se editaron con el programa TOUP VIEW.

3.4. Tratamiento de los datos: capacidad de resistencia

Para realizar el ensayo, cada plántula/planta se consideró como una unidad experimental y la variable analizada fue la proporción de plantas infectadas en cada estadio (número de plantas infectadas/número de plantas totales). Se consideraron infectadas todas aquellas unidades experimentales que tras ser examinadas en el microscopio se observó micelio del hongo en su interior de igual forma que en la figura 5.

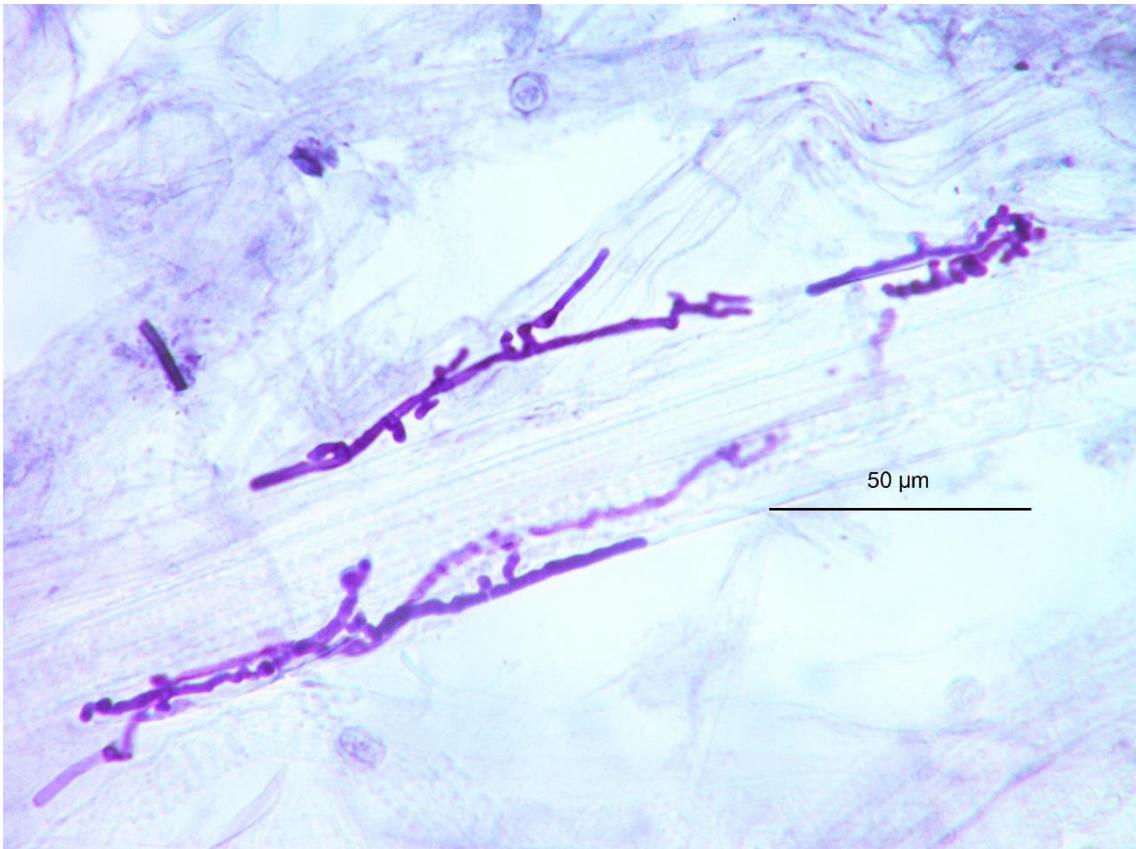


Figura 5: Micelio del hongo *Ustilago syntherismae* en el tallo de *Digitaria sanguinalis* a 400 aumentos, tomada con el programa TOUP VIEW por la autora.

Se utilizaron los estadios y orígenes presentes en la tabla 2.

Estadio	Origen
plántulas	espiguillas
	esporas
	origen
plantas con flor, sin hijuelos	espiguillas
	esporas
	origen

Tabla 2: Orígenes y estadios utilizados para el análisis de los datos

Para analizarlos se utilizó estadística descriptiva (Excel, Microsoft Office (2007), se hicieron tablas de infectividad según la espiguilla madre, el carbón madre y el origen de las plantas.

Los datos obtenidos se estudiaron en diferentes formas con el fin de identificar una relación entre los resultados. Primero se diferenció entre estadios. De estos sólo se hicieron los análisis estadísticos de los dos primeros, plántulas y flor sin hijuelos, por las bajas unidades obtenidas en el resto de estadios (Tabla 2).

Los análisis de la proporción de plántulas/plantas infectadas se realizaron utilizando un modelo lineal generalizado de distribución binomial. Se consideraron los efectos siguientes: origen espiguillas y origen esporas. Para el análisis solo se utilizaron las plántulas de germinación coleoptilar.

Se estimaron los parámetros utilizando la función “link” y el análisis del tipo III. Los estadísticos de la razón de verosimilitud se utilizaron para computar la significación de cada efecto. Finalmente, las medias de los niveles de los efectos se obtuvieron y compararon usando los valores de probabilidad de la distribución ji-cuadrado. Para realizar el análisis estadístico se usó el procedimiento GENMOD (SAS, 2002).

4. Resultados y discusión

Las plántulas y plantas estudiadas fueron tratadas analíticamente de tres formas diferentes y según el avance de su crecimiento (el estadio). Esta forma de analizar los datos permite identificar relación tanto entre las dos plántulas de diferentes procedencias, entre los dos hongos de diferentes procedencias, así como la relación que une cada planta con el hongo con el cual ha sido infectada.

La infección de cada espiguilla procedente de una misma planta, con el hongo de un mismo origen, genera una situación particular, en la que obtenemos cuatro grupos de espiguillas infectadas y relacionadas entre sí ya sea por compartir un hongo de mismo origen o por compartir espiguillas de un mismo origen.

Cuando los promedios de porcentaje de infección no fueron distintos a una $P < 0.05$, se consideró que los resultados no describían diferencias significativas para capacidad de infección de *U. syntherismae* de las plantas de *D. sanguinalis*.

En este experimento se pusieron a germinar 1598 espiguillas, de las cuales 345 fueron las muestras en blanco. Las muestras provenientes de espiguillas eF1P25 fueron nombradas como eF1P25 blanco, las provenientes de espiguillas eF1P11 fueron nombradas como eF1P11 blanco. Estas últimas siguieron el mismo proceso que el resto de espiguillas con la excepción de la descrita en el protocolo de infiltración. En la observación de las espiguillas germinadas según el protocolo de procesado y tinción de las plantas, ninguna de las plantas presento infección al hongo (Tabla 3).

Uno de los criterios para clasificar las muestras fue el patrón de germinación radicular o coleoptilar, el número de espiguillas germinadas con patrón radicular que llegaron al final del experimento no fue suficientemente grande como para hacer un estudio de los datos. Debido a esto en el análisis no se reflejan los diferentes patrones de germinación. En la tabla 3 se pueden observar la baja cantidad de individuos con el patrón radicular que justifican la decisión de no analizar los datos en función del patrón seguido en la germinación.

origen	eF1P11 blanco		eF1P25 blanco		F1Pe25sc11		F1Pe11sc11		F1Pe11sc25		F1Pe25sc25	
patron de germinación	co	ra	co	ra	co	ra	co	ra	co	ra	co	ra
numero de espiguillas	173	17	152	3	330	15	282	29	300	33	260	4
	190		155		345		311		333		264	
	1598											

Tabla 3: Espiguillas germinadas utilizadas en el ensayo

Otro factor que impidió un análisis más amplio de este trabajo, fue la gran cantidad de plántulas y plantas que pasaron por el proceso de infección y murieron antes de poder ser procesadas. El no poder observar las plántulas una vez muertas, por la deshidratación que sufren, imposibilitó hacer un diagnóstico de la causa de la muerte. Basándose en lo que Falloon (1976) expone, podemos argumentar que la baja supervivencia de las plantas durante el experimento podría deberse al efecto del hongo en la planta; sería necesaria otro estudio con una cantidad de individuos iniciales mayor para poder justificar este argumento.

4.1. Datos de infección en estadio 1

4.1.1. Espiguillas

Para el análisis de los datos del estadio 1 según la procedencia de las espiguillas, resumido en la tabla 4, se procesaron 259 plántulas. De estas 115 procedían de las espiguillas eF1P25 unas infiltradas con scF1P25 y otras con scF1P11. Las restantes 144, procedían de eF1P11 unas infiltradas con scF1P25 y otras con scF1P11.

En este estudio de las plántulas según las espiguillas utilizadas, un 80% de las plántulas procedentes de eF1P25 fueron infectadas por scF1P25 o scF1P11. Por otro lado entre las plántulas procedentes de eF1P11 solo un 54% fueron infectadas. Se constatan así, diferencias significativas ($P < 0,05$) para la resistencia a la infección de *U. syntherismae* de las plantas de *D. sanguinalis*, en estadio 1 (Tabla 4). Estos resultados indican como Van Putten *et al.* (2005) menciona, una diversidad entre respuestas dentro de cada especie.

Procedencia de espiguillas estadio 1	Media	Error estándar	población total
eF1P25	0,80a	0,04	115
eF1P11	0,54b	0,04	144

Tabla 4: Incidencia de infección (tanto por uno) de las plántulas de *Digitaria sanguinalis* en estadio 1, estudiadas según el tipo de espiguillas utilizadas en la infección. Medias seguidas de letras diferentes mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

4.1.2. Esporas

Para el análisis de los datos del estadio 1 según la procedencia de las esporas, resumido en la tabla 5, se procesaron 259 plántulas. De estas, 93 fueron infiltradas con scF1P25 unas plántulas procedentes de eF1P25 y otras con eF1P11. Las restantes 166, fueron infiltradas con scF1P11 unas procedentes de eF1P25 y otras de eF1P11.

Los datos muestran que un 58% de las plántulas eF1P25 y eF1P11 infiltradas con scF1P25 fueron infectadas. Por otro lado entre las plántulas infiltradas con scF1P11, un 70% fueron infectadas. Los resultados no describen diferencias significativas ($P < 0,05$) para capacidad de infección de *U. syntherismae* de las plantas de *D. sanguinalis*, en estadio 1 (Tabla 5).

Procedencia de esporas estadio 1	Media	Error estándar	población total
scF1P25	0,58a	0,05	93
scF1P11	0,70a	0,04	166

Tabla 5: Incidencia de infección (tanto por uno) de las plántulas de *Digitaria sanguinalis* en estadio 1, estudiadas según el tipo de esporas utilizado en la infección. Medias seguidas de letras diferentes mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

4.1.3. Origen

Para el análisis de los datos del estadio 1 según la procedencia de las plántulas y esporas, resumido en la tabla 6, se procesaron 259 plántulas. De estas, 94 procedían de plántulas eF1P25 y fueron infiltradas con scF1P11. 72 procedían de plántulas eF1P11 y fueron infiltradas con scF1P11. 72 procedían de plántulas eF1P11 y fueron infiltradas con scF1P25. 21 procedían de plántulas eF1P25 y fueron infiltradas con scF1P25.

Un 82% de las plántulas eF1P25 infiltradas con scF1P11, presentaron el hongo; entre las infiltradas con scF1P25, un 71% fueron infectadas. Tanto para las plántulas eF1P11 infiltradas con scF1P11 como con scF1P25, un 54% de ambos orígenes fueron infectadas por el respectivo hongo. Los resultados no describen diferencias significativas ($P < 0,05$) para la resistencia a la infección en plántulas de origen F1Pe25sc11 y F1Pe25sc25. Tampoco encontramos diferencias significativas ($P < 0,05$) para la resistencia a la infección en plántulas de origen F1Pe11sc11 y F1Pe11sc25, igualmente no existen diferencias entre estos dos orígenes con F1Pe25sc25 (Tabla 6).

origen estadio 1	Media	Error estándar	población total
F1Pe25sc11	0,82a	0,04	94
F1Pe11sc11	0,54b	0,06	72
F1Pe11sc25	0,54b	0,06	72
F1Pe25sc25	0,71ab	0,1	21

Tabla 6: Incidencia de infección (tanto por uno) de las plántulas de *Digitaria sanguinalis* en estadio 1 estudiadas según el origen utilizado para la infección. Medias seguidas de letras diferentes mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

El análisis de los datos en el estadio 1 de germinación de las espiguillas se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre la procedencia de las espiguillas pero no en la procedencia de las esporas. De esta misma manera cuando se analizan las diferencias significativas según el origen, encontramos diferencias en las plantas con la misma procedencia de las espiguillas tanto para las eF1P25 y eF1P11. Los resultados muestran una concordancia, aun así no se encuentran diferencias significativas entre F1Pe11sc11, F1Pe11sc25 y F1Pe25sc25. La falta de diferencias entre F1Pe11sc11, F1Pe11sc25 con F1Pe25sc25 podría ser cuestionada ya que el error estándar de estos valores es de 0,1, antes de hacer afirmaciones se sugeriría repetir el experimento con más muestras para verificar o desmentir los resultados obtenidos.

4.2. Datos de infección en estadio 2

4.2.1. Espiguillas

Para el análisis de los datos del estadio 2 según la procedencia de las espiguillas, resumido en la tabla 7, se procesaron 78 plántulas. De estas 59 procedían de las espiguillas eF1P25 unas infiltradas con scF1P25 y otras con scF1P11. Las restantes 19, procedían de eF1P11 unas infiltradas con scF1P25 y otras con scF1P11.

En este estudio de datos solo un 14% de las plántulas procedentes de eF1P25 fueron infectadas por scF1P25 o scF1P11. Por otro lado entre las plántulas procedentes de eF1P11 un 58% fueron infectadas. Se constatan así, diferencias significativas ($P < 0,05$) para la resistencia a la infección de *U. syntherismae* de las plantas de *D. sanguinalis*, en estadio 2 (Tabla 7). Estos resultados indican como Van Putten *et al.* (2005) menciona, una diversidad entre respuestas dentro de cada especie de la misma forma que en las espiguillas en estadio 1.

Procedencia de espiguillas estadio 2	Media	Error estándar	población total
eF1P25	0,14a	0,04	59
eF1P11	0,58b	0,12	19

Tabla 7: Incidencia de infección (tanto por uno) de las plántulas de *Digitaria sanguinalis* en estadio 2, estudiadas según el tipo de espiguillas utilizadas en la infección. Medias seguidas de letras diferentes mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

4.2.2. Esporas

Para el análisis de los datos del estadio 2 según la procedencia de las esporas, resumido en la tabla 8, se procesaron 78 plántulas. De estas, 29 fueron infiltradas con scF1P25 unas plántulas procedentes de eF1P25 y otras con eF1P11. Las restantes 49, fueron infiltradas con scF1P11 unas procedentes de eF1P25 y otras de eF1P11.

Los datos muestran que un 28% de las plántulas eF1P25 y eF1P11 infiltradas con scF1P25 fueron infectadas. Por otro lado entre las plántulas infiltradas con scF1P11, un 22% fueron infectadas. Los resultados no describen diferencias significativas ($P < 0,05$) para capacidad de infección de de las plantas de *D. sanguinalis*, en estadio 2 (Tabla 8).

Procedencia de esporas estadio 2	Media	Error estándar	población total
scF1P25	0,28a	0,08	29
scF1P11	0,22a	0,06	49

Tabla 8: Incidencia de infección (tanto por uno) de las plántulas de *Digitaria sanguinalis* en estadio 2, estudiadas según el tipo de esporas utilizado en la infección. Medias seguidas de letras diferentes mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

4.2.3. Origen

Para el análisis de los datos del estadio 2 según la procedencia de las plántulas y esporas, resumido en la tabla 9, se procesaron 78 plántulas. De estas, 40 procedían de plántulas eF1P25 y fueron infiltradas con scF1P11. 9 procedían de plántulas eF1P11 y fueron infiltradas con scF1P11. 10 procedían de plántulas eF1P11 y fueron infiltradas con scF1P25. 19 procedían de plántulas eF1P25 y fueron infiltradas con scF1P25.

Un 13% de las plántulas eF1P25 infiltradas con scF1P11, presentaron el hongo; entre las infiltradas con scF1P25, un 16% fueron infectadas. Un 67% de las plántulas eF1P11 infiltradas con scF1P11 fueron infectadas y un 50% las infiltradas con scF1P25. Los resultados no describen diferencias significativas ($P < 0,05$) para la resistencia a la infección en plántulas de origen F1Pe25sc11 y F1Pe25sc25. Tampoco se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) para la resistencia a la infección en plántulas de origen F1Pe11sc11 y F1Pe11sc25. De igual manera no se encontraron grandes diferencias entre F1Pe11sc25 y F1Pe25sc25 (Tabla 9).

origen estadio 2	Media	Error estándar	población total
F1Pe25sc11	0,13a	0,05	40
F1Pe11sc11	0,67b	0,17	9
F1Pe11sc25	0,50cb	0,17	10
F1Pe25sc25	0,16ac	0,09	19

Tabla 9: Incidencia de infección (tanto por uno) de las plántulas de *Digitaria sanguinalis* en estadio 2 estudiadas según el origen utilizado para la infección. Medias seguidas de letras diferentes mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

El análisis de los datos en el estadio 2 de germinación de las espiguillas se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre la procedencia de las espiguillas pero no en la procedencia de las esporas; igual que muestran los resultados de los datos en estadio 1. Cuando se analizan las diferencias significativas según el origen, no se encontraron diferencias en las plantas con la misma procedencia de las espiguillas tanto para las eF1P25 y eF1P11; siguiendo la misma línea otra vez, que en los resultados del estadio 1. A diferencia de los resultados del primer estadio, no se encuentran diferencias significativas entre F1Pe11sc11 y F1Pe25sc25. Se vuelven a tener datos insuficientes que generan un error estándar del 0,17 tanto en el caso de F1Pe11sc11 (9 muestras) como de F1Pe11sc25 (10 muestras).

5. Conclusiones

Existen diferencias significativas en la virulencia de las esporas entre los individuos procedentes de diferentes espiguillas, pero no se observan dichas diferencias entre las espiguillas infectadas con diferentes esporas.

En la infección de diferentes plantas con un mismo hongo (independientemente de cual) se han encontrado diferencias significativas en la virulencia del hongo en ambas plantas. Sin embargo en la infección de una planta con dos esporas diferentes no se han visto dichas diferencias.

Estos resultados sugieren una variabilidad genética en la resistencia a la infección del hongo dependiendo del individuo planta.

No se puede afirmar la existencia de esta variabilidad dentro de *Digitaria sanguinalis* por las pocas muestras estudiadas y por haber hecho el estudio con únicamente dos individuos genéticamente diferenciables, a pesar de ello, el trabajo desvela una línea de investigación interesante y respalda la continuidad de estas investigaciones.

De la realización del trabajo se pueden extraer conclusiones secundarias:

La tendencia general de ambas espiguillas de *Digitaria sanguinalis* estudiadas es una germinación coleoptilar.

La esperanza de vida de *Digitaria sanguinalis* infectadas con *Ustilago syntherismae* en las condiciones del experimento son muy bajas ya que solo un 6% de las espiguillas germinadas pudieron ser observadas al microscopio.

Las plantas supervivientes en los estadios más avanzados no fueron infectadas, lo que sugiere que con el paso del tiempo (y conforme llega a estadios más avanzados), los individuos de *Digitaria sanguinalis* estudiados tienen una tendencia a morir si son infectas. Los datos del estudio para hacer esta afirmación son insuficientes por lo que sugiere seguir investigando en esta línea.

6. Bibliografía

- Agrios GN (1988) *Plant Pathology*. London: Academic Press.
- Agrios GN (1997) *Plant Pathology*. 4a ed. Academic Press, San Diego.
- Agrios GN (1991) Fitopatología. Versión Española. Manuel Guzmán Ortiz. *Editorial Limusa S.A. de C.V.*, pp, 440-443.
- Aizpuru I; Aseginolaza C; Catalán P y Uribe-Echebarría PM (1993). *Catálogo florístico de Navarra. Informe técnico*. Dpto. de Medio Ambiente, Gobierno de Navarra. Pamplona.
- Aizpuru I; Aseginolaza C; Uribe-Echebarría PM; Urrutia P y Zorrakin I (1999). *Claves ilustradas de la Flora del País Vasco y Territorios Limítrofes*. Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco. Vitoria-Gasteiz.
- Alexander HM y Antonovics J (1988) Disease spread and population dynamics of anther smut infection of *Silene alba* caused by the fungus *Ustilago violacea*. *Journal of Ecology* 76, 91-104.
- Alexander HM; Thrall PH; Antonovics J; Jarosz AM y Oudemans PV (1996) Population dynamics and genetics of plant disease: A case study of anther-smut disease. *Ecology* 77, 990-996.
- Alexopoulos CJ y Mims CW (1985) *Introducción a la micología*. X. Llimona (traductor). Edición española. Barcelona: Ediciones Omega.
- Almaraz T (2002) Bases corológicas de flora micológica Ibérica. A: Pando, F (ed.) *Cuadernos de trabajo de flora micológica ibérica*, Vol. 17. Publicaciones CSIC, Madrid.
- Arnon DI y Hoagland DR (1940). Crop production in artificial solutions and in soils with special reference to factors affecting yields and absorption of inorganic nutrients. *Soil Science* 50, 463-484
- Banuett F (1995) Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induce tumors in maize. *Annu. Rev. Genet.* 29: 179-208.
- Banuett F y Herskowitz I (1996) Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* 122: 2965-2976.
- Barrett LG; Thrall PH; Burdon JJ y Linde CC (2008) Life history determines genetic structure and evolutionary potential of host-parasite interactions. *Trends in Ecology & Evolution* 23, 678-685.
- Behrendt S. y Hanf M. (1979). Malezas gramíneas en los cultivos agrícolas. Su determinación en el estado de no floración. Alemania. Ed. BASF.
- Bewley JD y Black M 1994. *Seeds: physiology of development and germination*. Plenum Press, N.Y.
- Bhowmik PC (1997) Weed biology: Importance to weed management. *Weed Science* 45, 349-356.

- Bölker M, Genin S, Lehmler C y Kahmann R (1995) Genetic regulation of mating and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Can. J. Bot.* 73: S320- S325.
- Bolòs O, Vigo J, Masalles RM y Ninot JM (2005) *Flora manual dels països catalans*. 3ª ed. Barcelona: PÒRTIC.
- Bragachini M y Peiretti J (2004) *INTA [Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria]* [Consulta: 15/05/2017] Disponible en: <<http://www.agriculturadeprecision.org/descargaItem.asp?item=/articulos/cosecha/Eficiencia-Cosecha-Granos-2004.pdf>>
- Brimner TA y Boland GJ (2003) A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. *Agriculture Ecosystems & Environment* 100, 3-16.
- Burdon JJ (1987) *Diseases and plant population biology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Burdon JJ (1993) The structure of pathogen populations in natural plant communities. *Annual Review of Phytopathology* 31, 305-323.
- Burdon JJ y Thrall PH (2008) Pathogen evolution across the agro-ecological interface: Implications for disease management. *Evolutionary Applications* 1, 57-65.
- Burdon JJ; Thrall PH y Ericson L (2006) The current and future dynamics of disease in plant communities. *Annual Review of Phytopathology* 44, 19-39.
- Butt TM; Jackson CW y Magan N (2001) *Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential*. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Campos JA y Herrera (2009). *Diagnosis de la flora alóctona invasora*. Departamento de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio. Gobierno Vasco. Bilbao. [Consulta: 26/05/2017] Disponible en: < http://www.ingurumena.ejgv.euskadi.eus/r49-6172/es/contenidos/libro/flora_invasora/es_doc/indice.html >
- Carius HJ; Little TJ y Ebert D (2001) Genetic variation in a host-parasite association: Potential for coevolution and frequency-dependent selection. *Evolution* 55, 1136-1145.
- Carlsson-Granér U y Thrall PH (2002) The spatial distribution of plant populations, disease dynamics and evolution of resistance. *Oikos* 97, 97-110.
- Carretero JL (2004) *Flora arvense española. Las malas hierbas de los cultivos españoles*. Phytoma. Valencia.
- Casselton L y Olesnicky N (1998) Molecular genetics of mating recognition in basidiomycete fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 55-70.
- Charudattan R (2001) Biological control of weeds by means of plant pathogens: Significance for integrated weed management in modern agro-ecology. *Biocontrol* 46, 229-260.
- Chaudhary RC, Nanda JS y Tran DV (2003) Guía para identificar las limitaciones de campo en la producción de arroz. *Depósito de documentos de la FAO*. [Consulta:

- 26/05/2017] Disponible en: <<http://www.fao.org/docrep/006/y2778s/y2778s03.htm>>.
- Dhingra OD, Sinclair JB, 1995. *Basic Plant Pathology Methods*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Dinoor A y Eshed N (1984) The role and importance of pathogens in natural plant communities. *Annual Review of Phytopathology* 22, 443-466.
- El-Sayed W (2005) Biological control of weeds with pathogens: Current status and future trends. *Journal of Plant Diseases and Protection* 112, 209-221.
- Falloon RE (1976) Effect of infection by *Ustilago bullata* on vegetative growth of *Bromus catharticus*. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 19, 249-254.
- Farr DF; Rossman AY; Palm ME y McCray EB. (2009) [en línea]: *Fungal databases, systematic botany & mycology laboratory, ARS, USDA*. [Consulta: 21/04/2017]. Disponible en: < <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/index.cfm>>
- Feldbrügge M, Kämper J, Steinberg G y Kahmann R (2004) Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Curr. Opin. Microbiol.* 7: 666-672.
- Fernández-Quintanilla C; Quadranti M; Kudsk P y Bàrberi P (2008) Which future for weed science? *Weed Research* 48, 297-301.
- Fischer GW y Holton CS (1957) *Biology and control of the smut fungi*. Ronald Press, New York.
- Fullerton RA (1970) An electron microscope study of the intracellular hyphae of some smut fungi (Ustilaginales). *Australian Journal of Botany* 18, 285-92.
- Gallart M (2009) Estudi de la dinàmica poblacional de *Digitaria sanguinalis* i de l'efecte del fong *Ustilago synthetis*. Tesis doctoral. Escuela Superior de Agricultura de Barcelona (UPC). [Consulta: 08/03/2017] Disponible en: < <http://upcommons.upc.edu/handle/2117/94379>>
- Gallego E y Sánchez J (2017) [en línea]: MYCO-UAL. Universidad de Almería. Web de micología. Filo Basidiomycota. [Consulta: 19/04/2017]. Disponible en: <<https://w3.ual.es/GruposInv/myco-ual/basidis.htm>>
- García-Guzmán G; Burdon JJ y Nicholls AO (1996) Effects of the systemic flower infecting smut *Ustilago bullata* on the growth and competitive ability of the grass *Bromus catharticus*. *Journal of Ecology* 84, 657-665.
- Gaskin TA (1958) Studies on crabgrass smut, *Ustilago synthetis*. *Plant Disease Reporter* 42, 735-736.
- Gilbert GS (2002) Evolutionary ecology of plant diseases in natural ecosystems. *Annual Review of Phytopathology* 40, 13-43.
- Halsted BD (1899) Mycological notes. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 26, 12-20.
- Hernández-Crespo JC. (2006) [en línea]: SIMIL, Sistema de información micológica ibérica. [Consulta: 09/01/2017]. Disponible en: <<http://www.rjb.csic.es/fmi/sim.php>>.

- Holm LG; Plucknett DL; Pancho JV y Herberger JP (1977) *The world's worst weeds: Distribution and biology*. University of Hawaii Press, Honolulu.
- Hood ME, Mena-Alí JI, *et al.* 2010 Distribution of the anther-smut pathogen *Microbotryum* on species of the Caryophyllaceae ; *New Phytologist* 187: 217–229
- International Seed Testing Association (ISTA), 1985. International rules for seed testing. Rules and annexes, 1985. *Seed Science and Technology* 13, 299–515.
- Johnson DA y Baudoin A (1997) Mode of infection and factors affecting disease incidence of loose smut of crabgrass. *Biological Control* 10, 92-97.
- Liebman M; Mohler CL y Staver CP (2001) *Ecological management of agricultural weeds*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Llimona X, Hafellner J, *et al.* (1991) Història Natural dels PPCC. Volum 5: Fongs i Líquens. *Enciclopèdia Catalana*.
- Mas MT; Verdú AMC y Girbal J (2006) New report of loose smut (*Ustilago syntherismae*) on *Digitaria sanguinalis* in Spain. *Plant Pathology* 55, 298-298.
- McFadyen REC (1998) Biological control of weeds. *Annual Review of Entomology* 43, 369-393.
- Mitich LW (1988) Intriguing world of weeds: Crabgrass. *Weed Technology* 2, 114-115.
- Mordue JEM (1995) *Ustilago syntherismae*. IMI Descriptions of fungi and bacteria. Sheet 1249. CABI International.
- Mortensen DA; Bastiaans L y Sattin M (2000) The role of ecology in the development of weed management systems: An outlook. *Weed Research* 40, 49-62.
- Müller-Schärer H; Scheepens PC y Greaves MP (2000) Biological control of weeds in European crops: Recent achievements and future work. *Weed Research* 40, 83-98.
- Norton JBS (1896) A study of the Kansas *Ustilagineae*, especially with regard to their germination. *Transactions of the Academy of Science of St. Louis* 7, 229-241.
- Nus JL y Hodges CF (1990) Tiller and rhizome growth of water-stressed *Poa pratensis* 'Merion' infected by *Ustilago striiformis* or *Urocystis agropyri*. *Plant Disease* 74, 886-888.
- Parker AJ, Haskins EF y Deyrup-Olsen I. (1982). *Toluidine blue: a simple, effective stain for plant tissues*. *The American Biology Teacher*, 44 (8) 487-489.
- Radosevich SR; Holt JS y Ghera CM (2007) *Ecology of weeds and invasive plants: Relationship to agriculture and natural resource management*. 3a. ed. Wiley Interscience, New Jersey.
- SAS [*Statistical Analysis Systems*] (2002), *software version 9.2*. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc.
- Smith IM; Dunez J; Lelliott RA; Phillips DH y Archer SA (1988) *European handbook of plant diseases*. Blackwell Publishing, Oxford.
- Snetselaar KM y Mims CW (1992) Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia*, 84, 193- 203.

- Snetselaar KM, Bölker M, y Kahmann R (1996) *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward pheromone sources. *Fungal Genet. Biol.* 20, 299-312.
- Spellig, T, Bölker M, lottspeich F, Frank R W, y Kahmann R (1994). Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J.*13,1620-1627.
- Van Putten WF; Biere A y Van Damme JMM (2005) Host-related genetic differentiation in the anther smut fungus *Microbotryum violaceum* in sympatric, parapatric and allopatric populations of two host species *Silene latifolia* and *S. dioica*. *Journal of Evolutionary Biology* 18, 203-212.
- Vánky K (1994) *European smut fungi*. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, Alemania.
- Vánky K (1999) Taxonomical studies on Ustilaginales. XIX. *Mycotaxon* 73, 135-161.
- Vánky K (2002) *Illustrated genera of smut fungi*. 2a ed. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Mas MT y Verdú AMC (2014). Within-population variation in resistance of *Digitaria sanguinalis* to *Ustilago syntherismae* resulting from different modes of seed germination and environment. *Plant Pathology* 63, 140–147
- Verdú AMC y Mas MT (2014). *Digitaria sanguinalis* seedling development pattern: Relationship with seed origin. *Plant Biosystems* 148(1): 42-48.
- Villariás JL (2000) *Atlas de malas hierbas*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- Wyse DL (1992) Future of weed science research. *Weed Technology* 6, 162-165.

7. Anexo A

Imágenes donde se pueden ver las hifas del hongo *U. syntherismae*, en *D. sanguinalis*, tomadas con el programa TOUP VIEW a 100 aumentos y 400 aumentos por la autora Alba Abia.

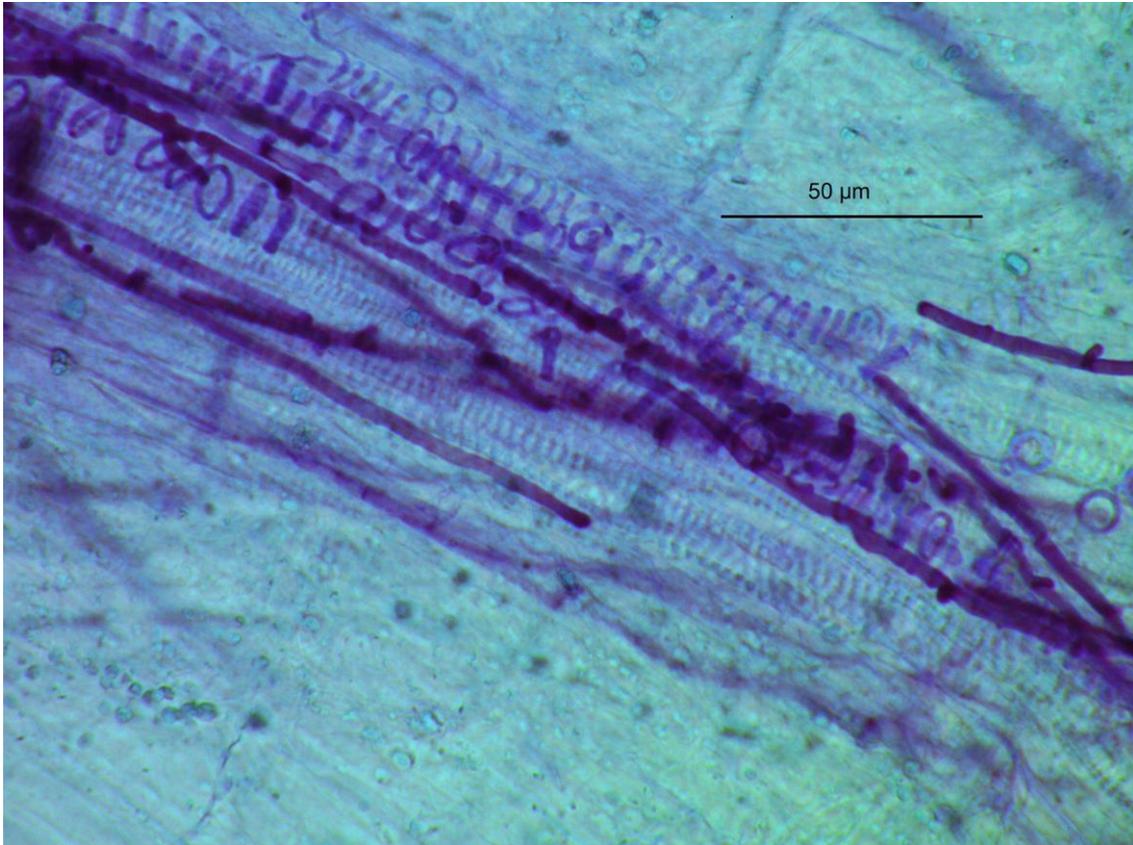


Figura 6: Plántula de *D. sanguinalis* infectada por *U. syntherismae*. Se pueden observar las hifas del hongo en lila oscuro. Fotografía tomada a 400 aumentos con el programa *TOUP VIEW* por la autora.

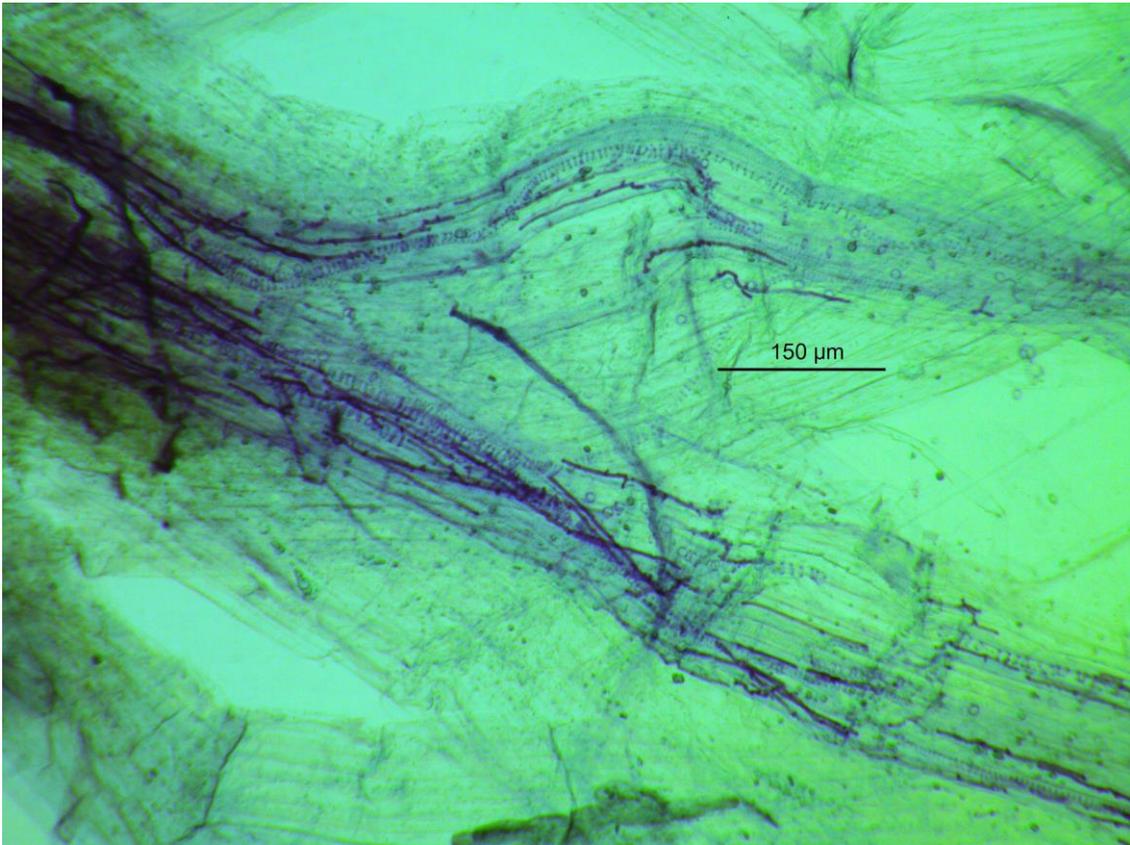


Figura 7: Plántula de *D. sanguinalis* infectada por *U. syntherismae*. Se puede apreciar la dificultad para diferenciar los tejidos vasculares del hongo. Fotografía tomada a 100 aumentos con el programa *TOUP VIEW* por la autora.

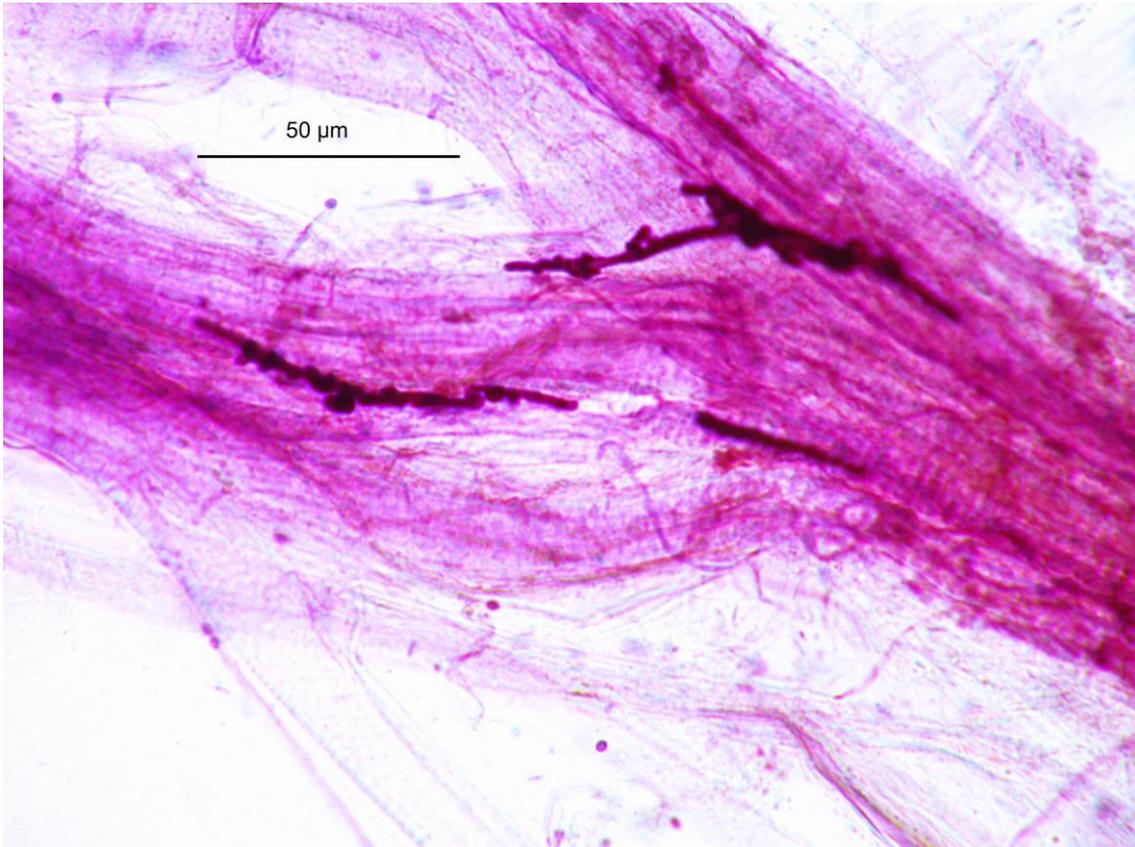


Figura 8: Plántula de *D. sanguinalis* infectada por *U. syntherismae*. Se puede apreciar con facilidad las fibulas características de los basidiomicetos. Fotografía tomada a 400 aumentos con el programa *TOUP VIEW* por la autora.

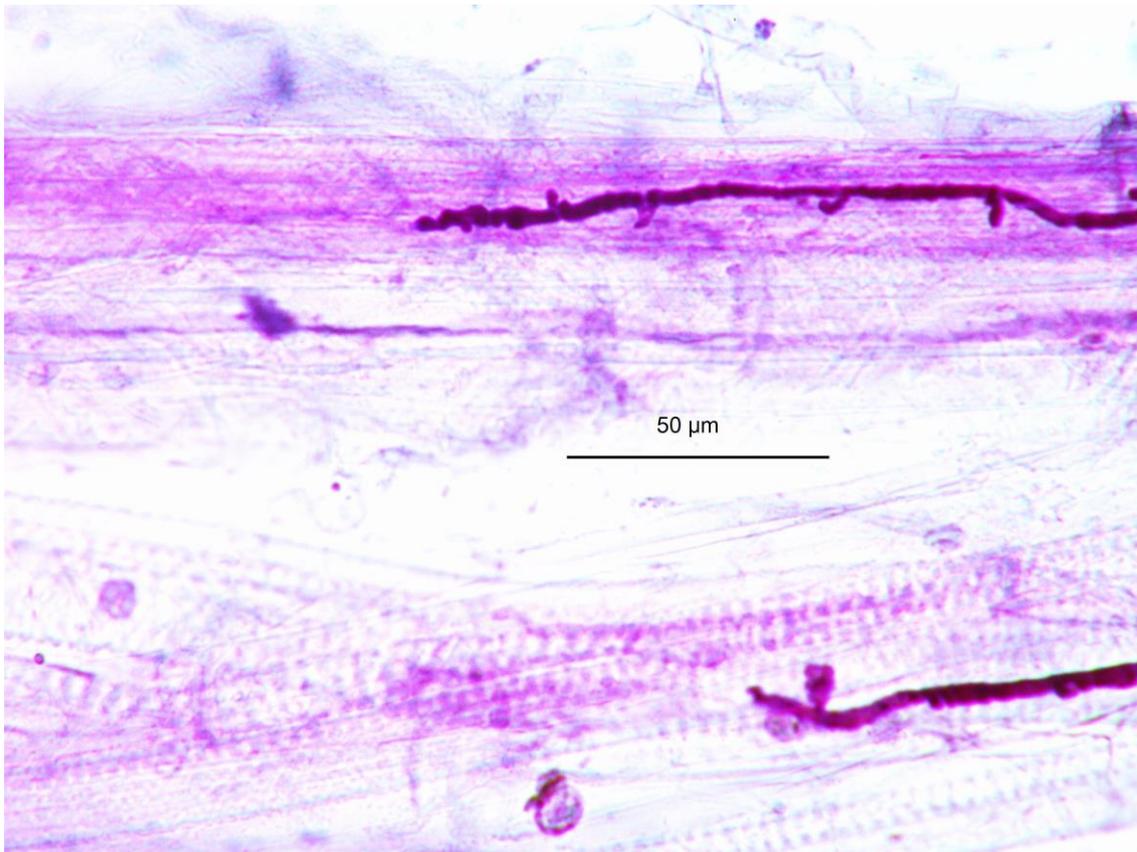


Figura 9: Plántula de *D. sanguinalis* infectada por *U. syntherismae*. Fotografía tomada a 400 aumentos con el programa *TOUP VIEW* por la autora.

8. Anexo B

Imágenes donde se pueden ver los diferentes pasos para realizar la tinción y preparación de muestras para ser vistas en el microscopio.



Figura 10: D. sanguinalis del grupo Plantas completamente con carbón (PCE) justo después de ser extraída del tiesto para ser vista en el microscopio después del proceso necesario. Fotografía tomada por la autora.



Figura 11: *D. sanguinalis* del grupo Plantas completamente con carbón (PCE), de la cual se han extraído las hojas. Fotografía tomada por la autora.

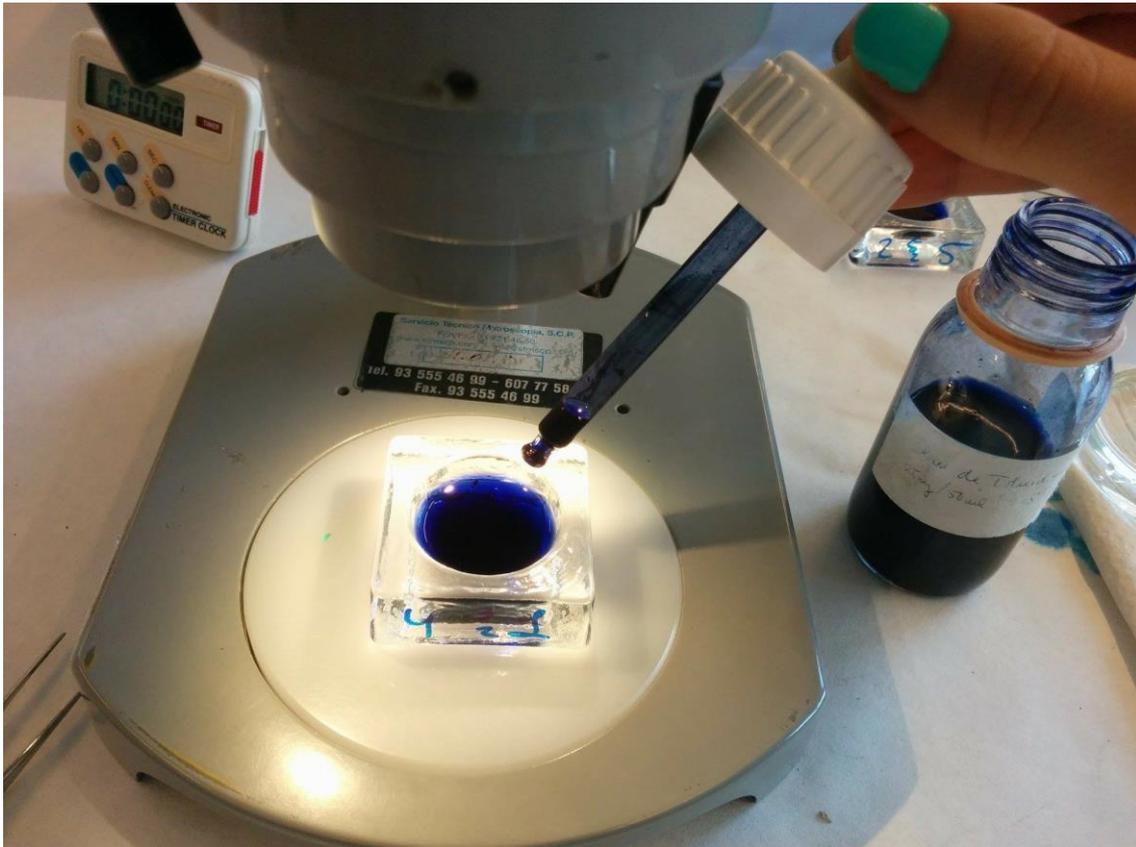


Figura 12: Aplicación del azul de metileno en un pocillo con muestra de *D. sanguinalis* para la tinción después de pasar por la estufa. Fotografía tomada por la autora.

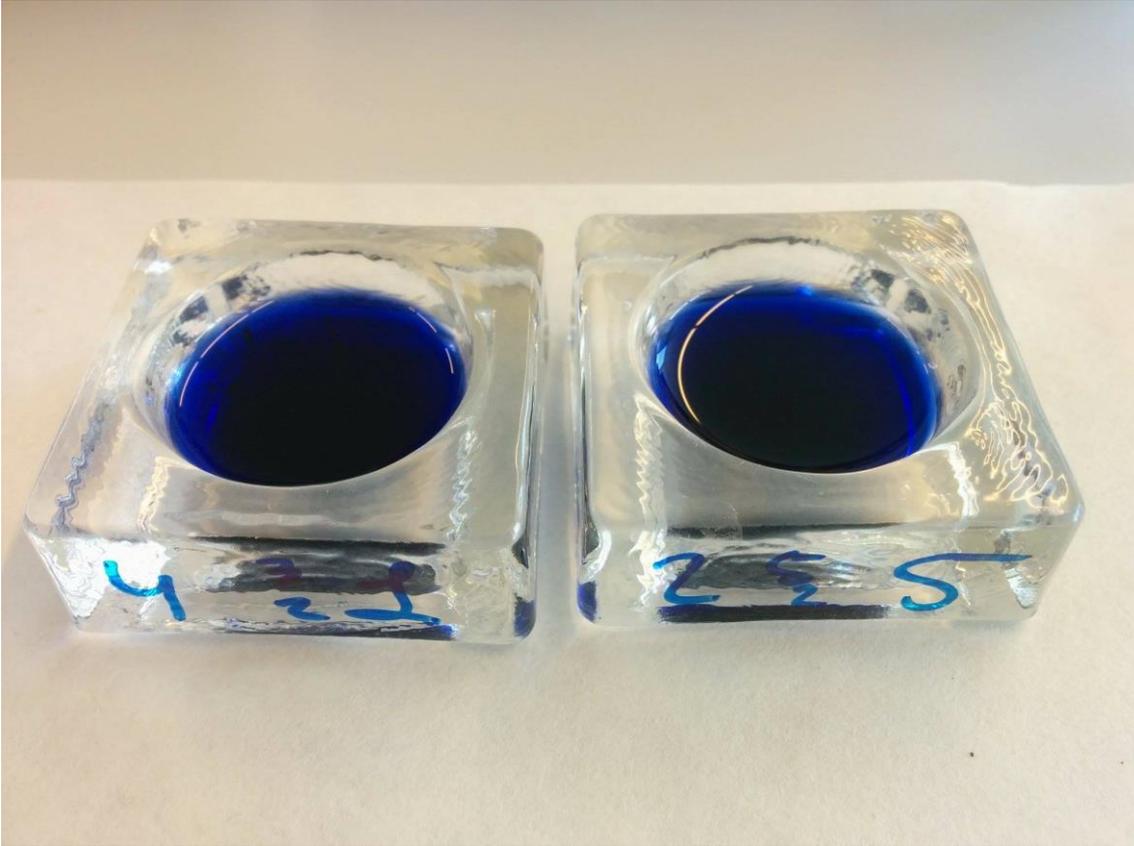


Figura 13: Pocillos con el tallo y raíz principal de *D. sanguinalis* y azul de metileno en el transcurso del tiempo necesario para su tinción. Fotografía tomada por la autora.



Figura 14: Proceso de dilución y lavado del azul de metileno, una vez transcurrido el tiempo de tinción.
Fotografía tomada por la autora.



Figura 15: Tallo de plántula de *D. sanguinalis* limpiándose después de ser teñido. Fotografía tomada por la autora.

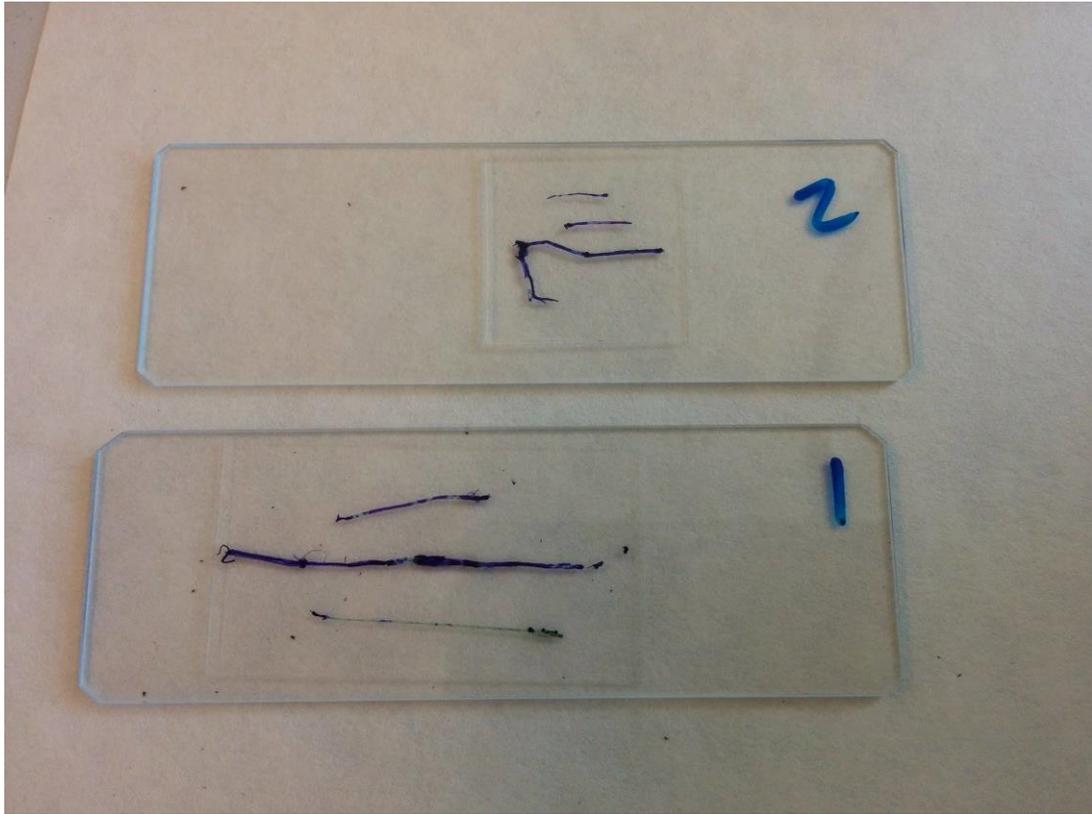


Figura 16: Tallo de plántula *D. sanguinalis* una vez teñido y hecha la preparación para ser observado al microscopio. Fotografía tomada por la autora.