

C. García, D. Palmero, M. De Cara, A. Cruz y M. González Jaén

**MICROBIOTA ASOCIADA A LA ENFERMEDAD DE LA PUNTA NEGRA
DEL TRIGO DURO. EFECTOS DEL RIEGO, EL ABONADO NITROGENADO
Y LA VARIEDAD CULTIVADA EN LA INCIDENCIA DE LA ENFERMEDAD**

Separata ITEA

INFORMACIÓN TÉCNICA ECONÓMICA AGRARIA, VOL. **108** N.º 3 (343-356), 2012

Microbiota asociada a la enfermedad de la punta negra del trigo duro. Efectos del riego, el abonado nitrogenado y la variedad cultivada en la incidencia de la enfermedad

C. García*, D. Palmero^{*,1}, M. De Cara**, A. Cruz*** y M. González Jaén***

* Departamento de Producción Vegetal. EUIT Agrícola. Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria s/n. 28040 Madrid, Spain

** Departamento de Producción Vegetal. Universidad de Almería. Cañada de San Urbano s/n. 04120 Almería, Spain

*** Departamento de Genética. Universidad Complutense de Madrid. José Antonio Nováis 2, 28040 Madrid, Spain

Resumen

La enfermedad fúngica de la punta negra del trigo se caracteriza por provocar en las semillas afectadas un oscurecimiento de la zona del embrión que en ocasiones puede extenderse hacia la hendidura central dejando el grano completamente ennegrecido. Su incidencia en el cultivo de trigo es extremadamente variable y depende en gran medida de las condiciones ambientales, así pues, condiciones de alta humedad pueden incrementar la punta negra. Su presencia en el trigo duro repercute en el rendimiento semolero. Además la pasta elaborada a partir de semilla enferma presenta machas negras y adquiere color y olor desagradable. Esta enfermedad es poco conocida a nivel europeo, sin embargo existen numerosos estudios para conocer su etiología y los factores que afectan a su aparición en países como Nueva Zelanda, Australia, Estados Unidos o Canadá. El presente trabajo pretende dar a conocer esta patología en España, determinando la influencia del riego, el abonado nitrogenado y la variedad cultivada en la incidencia de la enfermedad. Para ello se ha contado con un diseño experimental basado en 10 cultivares sembrados en parcelas con dos tratamientos de riego y dos de abonado nitrogenado. El análisis de las semillas infectadas en cámara húmeda y medios de cultivo PDA y K reveló 12 géneros fúngicos diferentes, de los cuales *Alternaria alternata* y *Fusarium proliferatum* estaban presentes en todas las muestras. El estudio del riego y abonado nitrogenado mostró diferencias significativas en la incidencia de punta negra pero fueron los 10 cultivares incluidos en el ensayo los que mayor importancia cobraron desde el punto de vista de la aparición de la enfermedad. El genotipo resultó determinante a la hora de establecer los niveles de afectación ya que las muestras encuadradas botánicamente como *Triticum turgidum* subsp. *turgidum* convar. *turgidum* presentaron una mayor susceptibilidad. Las pruebas de patogenicidad con los tres principales hongos asociados a la punta negra dieron resultados negativos para la germinación-nascencia de las plántulas de trigo duro inoculadas.

Palabras clave: *Fusarium proliferatum*, *Alternaria alternata*, *Triticum turgidum*.

Summary

Fungal microbiota associated with black point disease on durum wheat. Effects of irrigation, nitrogen fertilization and cultivar

Black point disease on durum wheat is defined as the discoloration of the embryo end. The embryo tip shows a black to brown discoloration that may extend into the crease of the kernel. Its incidence in the

1. Autor para correspondencia: daniel.palmero@upm.es

crop is extremely variable and depends largely on environmental conditions, thus, high humidity can increase black point. Their presence in durum wheat affects yield. Furthermore, pasta made from infected seed get black spots and odor. Black Point disease is not known at European level, but there are numerous studies to know their etiology and factors affecting its appearance in countries like New Zealand, Australia, the United States or Canada. This paper tries to present this disease in Spain, determining the influence of irrigation, nitrogen fertilization and cultivar on the incidence of the disease. An experimental design based on 10 cultivars planted in plots with two irrigation treatments and two nitrogen fertilization treatments has been conducted. Analysis of infected seeds in moist chamber and culture media PDA and K revealed 12 different fungal genera, including *A. alternata* and *F. proliferatum* that were present in all samples. The study of irrigation and nitrogen fertilization showed significant differences in the incidence of black point but it was the 10 cultivars included in the trial which took greater importance from the point of view of the onset of the disease. The genotype was decisive in setting the disease level. Samples botanically described as *Triticum turgidum* subsp. *turgidum* convar. *turgidum* showed greater susceptibility. Pathogenicity tests with the three main fungi associated with black tip were negative for germination and plant emergence of wheat seedlings.

Key words: *Fusarium proliferatum*, *Alternaria alternata*, *Triticum turgidum*.

Introducción

La enfermedad de la punta negra del trigo se caracteriza por la aparición en los granos afectados de un típico oscurecimiento en la zona del embrión que da nombre a la enfermedad. Los síntomas más frecuentes consisten en una decoloración del extremo embrionario, que vira desde el marrón oscuro al negro. En infecciones más drásticas dicha decoloración puede avanzar por la hendidura central hasta la parte distal de la semilla, dejándola completamente ennegrecida. Tanto el trigo duro (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) como el trigo blando o harinero (*Triticum aestivum* L.) se ven afectados por esta patología, aunque también aparece citada en cultivos de cebada (*Hordeum vulgare* L.) (Walker et al. 2008).

Algunos autores atribuyen la enfermedad únicamente a agentes abióticos (Williamson, 1997; Desclaux, 2000), mientras que otros mencionan hongos como *Alternaria alternata* (Fries) Keissler. *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker o *Fusarium proliferatum* (T. Matushima) Nirenberg (Conner and Kuzyk, 1988; Cromey and Muholland, 1988; Fernández et al. 1994; Conner et al. 1996; Özer, 2005). Otros

muchos géneros fúngicos como *Cladosporium*, *Stemphylium*, *Epicoccum*, *Aspergillus*, *Rhizopus* o *Penicillium* han sido aislados de granos sintomáticos.

A. alternata es la especie que con mayor frecuencia ha sido asociada a la enfermedad. Cromey y Muholland (1988) lo aislaron en porcentajes cercanos al 83% frente a valores del 20% de presencia de *Fusarium* spp. Southwell et al. (1980) en un ensayo al sureste de Australia obtuvo un 85% de aislamientos de *A. alternata* y algo menos del 1% de *B. sorokiniana* a partir de granos de trigo duro afectados por punta negra. Otro estudio llevado a cabo en Saskatchewan (Canadá) por Fernández et al. (1994) reveló porcentajes de *Alternaria* sp. próximos al 74% y presencia de *B. sorokiniana* entre el 8 y el 13%. Aunque Cromey and Muholland (1988) y Conner and Kuzyk (1988) ya citaban especies de *Fusarium* como posibles causantes de la punta negra, Conner et al. (1996) fue el primero en identificar la especie *F. proliferatum* y sugerir que este hongo es patógeno en trigo, reproduciendo los síntomas en plantas sanas, pues las semillas recogidas de las plantas inoculadas presentaban el característico oscurecimiento

en la zona del embrión. Según diferentes estudios, semillas sintomáticas con elevada presencia de *A. alternata* no ven afectada su germinación (Rees *et al.* 1984; Cromey and Muholland, 1988; Özer, 2005), sin embargo, altos porcentajes de *B. sorokiniana* pueden reducir el poder germinativo (Watkins, 2005).

Puesto que los síntomas no se hacen patentes hasta los últimos estadios de desarrollo del grano, se ha atribuido un papel fundamental, en la epidemiología de la enfermedad, a la época y disposición del riego. Así pues, condiciones de alta humedad durante grano lechoso y grano pastoso (estados de crecimiento 11.1 y 11.2 según la escala de Feekes) incrementan en gran medida la punta negra (Conner, 1987; 1989). Las bajas temperaturas y las heladas durante este estado de crecimiento también pueden contribuir a aumentar la infección por parte de los hongos (Fernández *et al.* 1994; 2000).

Existen pocos artículos que hayan estudiado la influencia de los fertilizantes nitrogenados en la incidencia de la enfermedad. Conner *et al.* (1992) demostraron en trigo blando, que, bajo condiciones favorables para el desarrollo de los patógenos, altas cantidades de nitrógeno incrementaban la punta negra, sin importar si éste se encuentra residual en el suelo o es incorporado, bien en presiembra o con el agua de riego. Esta circunstancia puede deberse a que el aporte de abonos nitrogenados contribuye a aumentar el tamaño del grano lo cual podría facilitar la entrada de los patógenos y por consiguiente el incremento de punta negra (Cromey and Muholland, 1988). Además las plantas que disponen de mucho nitrógeno en el suelo desarrollan mayor masa vegetal formando un microclima húmedo en las espigas que permite un mejor desarrollo de los hongos (Conner, 1987).

Se han citado diferencias entre los porcentajes de afección de la enfermedad en trigo blando (*T. aestivum*) y en trigo duro (*T. turgi-*

dum var. *durum*), mostrando los primeros menores niveles de semilla oscurecida que los segundos (Southwell *et al.* 1980b; Conner and Thomas, 1985; Wang *et al.* 2002). Sin embargo, Fernández *et al.* (2000) estudiaron la incidencia de la enfermedad en seis cultivares de trigo duro y otros seis de trigo blando, ambos en regadío, sin poder establecer diferencias significativas entre ellos.

Varios autores confirman la existencia de cultivares de trigo tolerantes a la punta negra y coinciden en señalar la importancia que tiene para el control de la enfermedad la correcta elección de la variedad. Conner and Thomas (1985) demostraron que mediante la sustitución de cultivares sensibles de trigo blando por otros tolerantes podía reducirse la incidencia de punta negra en tres cuartas partes. Gooding *et al.* (1993) encontraron un 19% más de semilla oscurecida en trigos susceptibles y concluyeron que el uso de cultivares susceptibles podía ser incluso más influyente que las condiciones climáticas del año o el manejo del cultivo.

Altos niveles de punta negra repercuten en la elaboración de la harina y el salvado, ambos muestran pigmentos oscuros y desprenden olor desagradable (Dexter and Edwards, 1997). El pan procedente de semillas con presencia de la enfermedad tiene color grisáceo y mala calidad (Rees *et al.* 1984). En trigo duro puede verse ligeramente reducido el rendimiento semolero, además las cualidades estéticas y culinarias de la pasta se ven afectadas por manchas negras y pérdida de peso y textura (Dexter and Edwards, 1998; Rees *et al.* 1984). Parámetros de calidad química como el índice de sedimentación (SDS) también puede verse influido (Gordún *et al.* 2008). Por este motivo Canadá, en su Comisión Nacional del Grano, incluye tablas con susceptibilidad a la enfermedad en los lotes cosechados. De esta forma niveles superiores al 10% de semillas con punta negra suponen la devaluación del lote de la categoría 1 a la 2

en trigo blando. En trigo duro, este porcentaje queda reducido al 5%. Para valores superiores al 35% en ambos casos la producción se desvía al consumo animal. En los Estados Unidos se permite solo el 2% de la semilla con presencia de punta negra para poder ser considerada de primera categoría, un 4% de semillas afectadas suponen una depreciación hasta la cuarta categoría (Watkins, 2005). En Australia el límite que fija la primera categoría está en el 5% para el trigo harinero y en el 3% para el trigo duro (Australian Wheat Board, 2000). En Europa, por el contrario, no hay hasta la fecha, legislación al respecto por lo que el presente trabajo trata de aportar conocimientos sobre los hongos que se asocian a la enfermedad en nuestras condiciones, al mismo tiempo que se evalúa el efecto que el riego, el abonado o el propio genotipo de la variedad cultivada pueda tener sobre la aparición de la enfermedad.

Materiales y métodos

Diseño experimental

El ensayo de campo se realizó en la campaña 2006-2007, en la finca experimental "Casa Concha" de Aranjuez (Madrid) perteneciente al INIA UTM (40° 03' N, 3° 31' O). La parcela tiene 828 m² de superficie y se utilizó un diseño de parcelas subdivididas con tres repeticiones. Para determinar el efecto del abonado, el riego y la variedad sobre la aparición de la enfermedad se utilizó un diseño experimental factorial 10x2x2x3, donde las variedades 1 a 10 era el primer factor, el abonado el segundo factor, el riego el tercer factor, cada combinación de cultivar, riego y abonado se repitió tres veces en microparcels de 6 surcos espaciados 28 cm (2,5 x 1,4 m) con una densidad de siembra de 150 kg ha⁻¹. La siembra tuvo lugar en la segunda quincena de noviembre de 2006 y la cosecha se realizó

en el mes de julio de 2007 de forma manual para evitar mezclas entre variedades.

Tres de los cultivares, Bolo, Regallo y Sula, son de buena calidad, Don Pedro es de calidad media y Antón es de mala calidad semolera. Las cinco variedades indígenas o tradicionales provienen del Centro de Recursos Fitogenéticos del INIA y han sido seleccionadas por su homogeneidad de ciclo con los cultivares anteriormente citados (Bartolomé, 2010) (Tabla 1).

Se realizaron tres riegos durante todo el ciclo distribuidos según el normal desarrollo del cultivo de cereal en la zona: el primero de ellos se aportó en el estado fenológico 4 (ahijamiento) en la escala de Feekes, incorporando 128 kg ha⁻¹ urea (1,8 U de urea al 46%) al agua de riego; el segundo y tercer riego se realizaron antes de la fase de espigado. En los bloques con nitrógeno se incorporaron 64,3 kg ha⁻¹ de un abono complejo de fondo (NPK 15-15-15). En los bloques sin nitrógeno solo se aportó 64,3 kg ha⁻¹ de superfosfato (0,9 U) y 64,3 kg ha⁻¹ de KCl (60%) como abonado de fondo.

A partir del grano recolectado manualmente en 2007, se prepararon 120 muestras divididas en dos lecturas de 100 semillas cada una. El ensayo quedó constituido por un total 24.000 semillas a evaluar. Para estudiar el efecto del riego, el nitrógeno y la variedad en cada uno de estos lotes, se diferenciaron y contabilizaron mediante observación directa el número de las semillas con síntomas de punta negra. Dichas semillas fueron pesadas para obtener también el porcentaje en peso y su incidencia sobre la enfermedad.

Influencia sobre el poder germinativo

La determinación del poder germinativo se realizó siguiendo el procedimiento específico propuesto por la ISTA (1976) para ensayos de germinación en trigo. Se depositaron 100 semillas con punta negra de cada variedad sobre un papel de filtro empapado en

Tabla 1. Material vegetal utilizado en los ensayos
 Table 1. Tested plant material

Variedades comerciales				Variedades tradicionales			
Código	Variedad	Clasificación botánica	Conservadores	Código	Nº de entrada CRF	Clasificación botánica	Lugar de origen
1	Antón	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>turgidum</i> convar. <i>durum</i>	Agrar. Semillas, S.A.	7	BGE013701	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>turgidum</i> convar. <i>durum</i>	Alicante
2	Bolo	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>turgidum</i> convar. <i>durum</i>	Irta (G. Cataluña) Semillas Fito, S.A.	9	BGE018620	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>turgidum</i> convar. <i>turgidum</i>	Islas Baleares
3	Don Pedro	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>turgidum</i> convar. <i>durum</i>	Varios conservadores	10	BGE021786	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>turgidum</i> convar. <i>durum</i>	Badajoz
4	Regallo	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>turgidum</i> convar. <i>durum</i>	Diputación General Aragón Agromonegros, S.A.	11	BGE018660	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>turgidum</i> convar. <i>turgidum</i>	Barcelona
5	Sula	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>turgidum</i> convar. <i>durum</i>	Varios conservadores	12	BGE018262	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>turgidum</i> convar. <i>durum</i>	Cádiz

agua destilada y se cubrieron con otro papel humedecido. El conjunto se enrolló sobre sí mismo y se metió en bolsas de plástico. Los rollos se mantuvieron en cámara a 20°C y se realizaron dos lecturas a los 4 y 8 días. A la vez, este mismo proceso se repetía con 100 semillas asintomáticas de cada variedad a modo de testigo.

Identificación de los micetos

Se analizaron 200 semillas sintomáticas por cultivar sin desinfección previa sobre placas con medio agar patata dextrosa (PDA), en cámara húmeda y sobre un medio específico para el género *Fusarium* (Komada, 1975; medio K). Las placas de Petri se incubaron a 25°C en condiciones de 14 h de luz, $18.8 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y 10 h de oscuridad entre 6 y 8 días, realizándose lecturas periódicas al microscopio óptico y anotando el número de especies presentes en cada semilla. Para la determinación de las

especies fúngicas asociadas a los granos de trigo con punta negra se utilizaron las obras de Barnett and Hunter (1972) y Mathur and Kongsdal (2003). Para la asignación de especies del género *Fusarium* se siguieron los criterios taxonómicos de Nelson *et al.* (1983) y Leslie and Summerell (2006).

Identificación molecular de *Fusarium*

Además de la identificación morfológica, en el caso de los aislados de *Fusarium sp.* se llevó también a cabo la identificación molecular. Para ello, se sembraron cinco aislados codificados como 301-a, 301b, 301c, 9R2 y 5R3, provenientes de diferentes muestras de *Fusarium* en medio PDA y se incubaron de 3 a 5 días a 25°C en condiciones de oscuridad hasta obtener suficiente masa miceliana de cada uno de ellos. A continuación se llevó a cabo la extracción de ADN de cada aislado, recogiendo cuatro discos de micelio con un

crecimiento de 5 a 7 días y depositándolos en tubos Eppendorf de 2 ml. El ADN se extrajo a continuación con el kit DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) según las instrucciones del fabricante.

La amplificación parcial por PCR del gen EF-1 α del factor de elongación cuyo tamaño es de alrededor de 700 pb, fue realizada en las cinco cepas de *Fusarium* analizadas. Se utilizaron los cebadores EF1T y EF2T (O'Donnell et al., 1998). La reacción de amplificación se realizó en un volumen de 25 μ l con 50 ng de ADN muestra en 1,5 μ l, 0,25 μ l de cada cebador (20 μ M), 0,25 μ l de AmpliTaq Gold polimerasa (5U/ μ l), 2,35 μ l de tampón de PCR 10x, 1,6 μ l de MgCl₂ (50 mM), y 1,85 μ l de dNTPs (100 mM) (Applied Biosystems, EEUU). La PCR se realizó en un termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient, Eppendorf, Hamburg, Germany). Los productos amplificados se detectaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio utilizando un tampón 1x de 40mM Trisacetato y EDTA 1,0 mM.

Los productos de la amplificación parcial del gen EF-1 α se aislaron con el kit UltraClean™ PCR Clean-Up™ (MoBio Laboratories Inc., EEUU). Se llevó a cabo la secuenciación de estos fragmentos amplificados utilizando el secuenciador ABI 3730 (Applied Biosystems, EEUU) según las instrucciones del fabricante en la Unidad de Genómica de la Universidad Complutense of Madrid (Madrid, España). Las secuencias obtenidas se editaron y alinearon por el método ClustalW mediante los programas Dnastar (Lasergene, Wisconsin, EEUU) y BioEdit Sequence Alignment Edition (Ibis Therapeutics, Carlsbad, California). Las secuencias se compararon con la base de datos del GenBank (NCBI).

Pruebas de patogenicidad sobre la nascencia de plántulas

Debido a su posible vinculación con la muerte de plántulas en campo, se seleccionaron

tres aislados de *A. alternata* y tres de *F. proliferatum* de entre los obtenidos de los análisis microbiológicos de semillas sintomáticas. Se incubaron en medio PDA hasta que el micelio del hongo alcanzara el borde de la placa de Petri (9 cm de diámetro). A continuación, se elaboraron los inóculos homogeneizando el contenido de una placa Petri en 500 ml de agua destilada. La preparación del testigo se realizó igualmente mezclando en la misma cantidad de agua destilada una placa de PDA sin hongo.

La aplicación se llevó a cabo repartiendo los 500 ml de inóculo en 100 semillas pregerminadas (10 macetas con 10 semillas por maceta) y colocadas, previamente, en macetas de plástico sobre sustrato vermiculita. Para ello se dispuso de semilla previamente desinfectada en lejía durante 15 minutos y posterior aclarado con agua limpia y puesta a germinar en toallas húmedas dos días antes. Se utilizó el cultivar de trigo duro 03E2606 procedente de la colección de referencia del INIA, garantizando así la ausencia de sintomatología de punta negra.

El ensayo se mantuvo en condiciones de laboratorio a temperatura ambiente entre 23 y 25°C y luz natural. El proceso contó con dos repeticiones en el tiempo, en cada una de las cuales se analizaron 100 plántulas por aislado y testigo, lo que supone un total de 700 plántulas estudiadas por repetición.

El conteo y observación de los daños producidos sobre las plántulas emergidas se efectuaron tras un periodo de crecimiento de 14 – 16 días, momento en el que las plántulas mostraban sus dos primeras hojas. Su evaluación se realizó conforme a las indicaciones del "Manual para la Evaluación de Plántulas en Análisis de Germinación" editado por el Instituto Nacional de Semillas y Plantas de Vivero (MAPA, 1992).

Análisis estadístico

Los resultados del conteo de semillas con punta negra y las pruebas de patogenicidad de los aislados, se sometieron a un análisis de varianza unifactorial utilizando el software estadístico StatsGraphics Centurion XV.II (Statistical 195 Graphics Corp., Herndon, VA). La comparación de las medias se realizó utilizando la diferencia significativa mínima, LSD, para el nivel de significación elegido ($p = 0,05$). Antes del análisis de varianza se realiza la transformación del $\arcsen \sqrt{x}$, de los porcentajes. Las comparaciones posteriores entre las medias deben hacerse en la escala transformada. En las tablas se observan los resultados sin transformar, para mayor comodidad, aunque las diferencias mínimas significativas se refieren a las transformadas.

Resultados

Identificación de los hongos

El análisis fúngico de los distintos micromicetos fue llevado a cabo sobre muestras de semillas de trigo duro con síntomas de punta negra, obteniéndose un total de 12 géneros fúngicos diferentes (Tablas 2 y 3): *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Drechlera*, *Fusarium*, *Gonatotrium*, *Pleuropragmium*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Ulocladium*.

Las siembras sobre medio PDA muestran presencia de *A. alternata* con porcentajes de aparición en el 98% de las semillas de las variedades comerciales analizadas. Estos resultados coinciden con los expuestos por Cromey and Muholland (1988) y Southwell *et al.* (1980a) en cuyos trabajos *A.alternata* estaba presente en el 83% y el 85% de las semillas respectivamente. Otros muchos géneros fúngicos de común aparición en las semillas de cereales como *Aspergillus*, *Ulocladium*, *Rhizopus*, *Cladosporium* o *Fusarium* fueron aislados de granos con punta negra, aunque sus porcentajes de aparición fueron siempre inferiores al 4% de las semillas analizadas.

Cabe destacar el cultivar Don Pedro, cuyas semillas presentan la mayor carga fúngica al aparecer otros cuatro géneros además de *Alternaria*, si bien ninguno de ellos supera el 3% del porcentaje total de semillas afectadas. Es importante reseñar el 2,5% de semillas afectadas por *Fusarium* por su posible vinculación como uno de los posibles hongos causantes de la enfermedad.

En las variedades tradicionales el hongo aislado con mayor frecuencia fue nuevamente *A. alternata* con porcentajes en torno al 98%. La presencia en estas semillas de cuatro géneros fúngicos nuevos y la mayor frecuencia de aparición de éstos, indica un estado sanitario inferior, debido a que se trata de cultivares antiguos donde la mejora genética no es tan patente o por el mero hecho de su conservación. Los hongos más repetidos en las diferentes muestras son *Cladosporium*, *Gonatotrium*, *Rhizopus* y *Fusarium*, que rondan porcentajes de aparición próximos al 2%. *Ulocladium botrytis* está presente en cuatro de las cinco variedades estudiadas con porcentajes entre el 2% o el 3%.

En la tabla 3 se resumen los hongos aislados en las semillas de cultivares mantenidos sin riego suplementario en campo.

Los resultados obtenidos en los análisis de las semillas realizados en cámara húmeda no difieren de los obtenidos en medio de cultivo PDA. Podría por tanto haberse usado uno u otro método analítico para la evaluación de la microbiota fúngica.

La realización de ensayos en medio Komada (K), se justifica por elevada presencia de hongos con alta tasa de crecimiento como *A.alternata*, que en los análisis realizados en medios no selectivos invadía rápidamente la placa

imposibilitando la correcta determinación taxonómica de los *Fusaria*. Todas las semillas de todas las muestras analizadas revelaron presencia *Fusarium* (100% de semillas afectadas en todos los lotes) lo que implica que el enmascaramiento del patógeno estaba sucediendo y podría explicar en parte la ausencia de especies de *Fusarium* en muchos de los estudios sobre la punta negra del trigo en los cuales sólo se habían utilizado medios generales para el aislamiento del agente patógeno.

Las colonias de *Fusarium* presentaban cadenas de microconidios unicelulares nacidos en mono o polifiálidas, con macroconidios con tres a cinco septos y una curvatura marcada. Los aislados fueron identificados como *Fusarium proliferatum* (T. Matsushima) Nirenberg (Nirenberg and O'donnell 1998). Conner *et al.* (1996) también asociaron dicha especie con la enfermedad de la punta negra, aislando en

primer lugar el hongo de granos infectados para después reproducir los síntomas en semillas sanas. Otros autores (Cromey and Muhlolland, 1988 y Conner and Kuzyk, 1988a) ya citaban anteriormente el género *Fusarium* como posible causante de la enfermedad, pero no llegaron a identificar la especie.

Identificación molecular de *Fusarium proliferatum*

Tras la amplificación del gen del factor de elongación EF-1 α y la posterior comparación con la base de datos del GenBank, la tabla 4 muestra los resultados obtenidos. Los cinco aislamientos corresponden a la especie *F. proliferatum*. Además en la tabla se indican los número de acceso (Accession Numbers) asignados para la base de datos GenBank (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Tabla 4. Aislamientos de *Fusarium sp.* identificados mediante métodos moleculares. En la tabla se presentan especie y número de acceso de la base de datos GenBank de cada aislamiento
 Table 4. Isolation of *Fusarium sp.* identified by molecular methods. The table presents species and accession number from the GenBank database of each isolate

Aislamiento	Especie	Número de acceso
301-a	<i>F. proliferatum</i>	JF747027
301-b	<i>F. proliferatum</i>	JF747028
301-c	<i>F. proliferatum</i>	JF747028
9R2	<i>F. proliferatum</i>	JF747029
5R3	<i>F. proliferatum</i>	JF747030

Influencia sobre el poder germinativo

El porcentaje de germinación de las semillas sintomáticas que presentaban decoloración en el embrión respecto a las semillas sanas fue siempre similar, sin mostrarse diferencias significativas en ninguna de las variedades ensayadas. Los resultados experimenta-

les muestran unos porcentajes de germinación medios de cultivares comerciales del 79 \pm 4.14, inferiores a los del testigo (82.4 \pm 2.33) pero sin que las diferencias sean estadísticamente significativas en el análisis de la varianza. Lo mismo ocurre con las variedades tradicionales donde los porcentajes medios de germinación de semillas sintomáticas se sitúan en

el $83 \pm 6.63\%$ frente al $85.4 \pm 5.88\%$ de semillas germinadas del testigo.

Influencia del riego, el abonado nitrogenado y el cultivar

La importancia del riego (Tabla 5) queda demostrada con valores de aparición de punta negra cercanos al 8% cuando las parcelas son regadas frente al 5,7% de las parcelas que se mantienen en seco, resultados que coinciden con los obtenidos por varios autores: Conner (1987), Conner *et al.* (1992) y Fernández *et al.* (2000). Los porcentajes de semillas afectadas crecen hasta niveles del 10,2% y 6,8% cuando observamos los valores expresados en peso. Este hecho indica que los

granos más pesados son más susceptibles a la punta negra y concuerdan con lo dicho por Ellis *et al.* (1996) y Wang *et al.* (2002) que asocian el elevado peso del grano con niveles superiores de punta negra.

Conner *et al.* (1992) demostraron que bajo condiciones favorables para el desarrollo de los patógenos, altas cantidades de nitrógeno incrementan la presencia de semillas con punta negra. Estos resultados no coinciden con dichos resultados, ya que los porcentajes más altos (7,8%) corresponden con las parcelas sin aplicación de nitrógeno. No obstante la comparación de estos datos muestra que la influencia del abonado nitrogenado parece ser menos definitiva que las condiciones de riego de la parcela de ensayo (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentajes medios de semillas de trigo duro con sintomatología de punta negra según tratamiento de abonado y el riego de la parcela elemental
Table 5. Average percentages of durum wheat seeds with Black Point symptoms according to fertilizer and irrigation treatment of the experimental plot

Tratamiento de la parcela	Semillas con punta negra (% en número)	Semillas con punta negra (% en peso)
Sin riego	$5,73 \pm 4,11$ a*	$6,83 \pm 5,14$ a*
Con riego	$7,96 \pm 6,29$ b	$10,2 \pm 9,42$ b
Sin nitrógeno	$7,82 \pm 5,98$ b	$9,93 \pm 9,02$ b
Con nitrógeno	$5,87 \pm 4,61$ a	$7,06 \pm 5,95$ a

Letras diferentes indican diferencias significativas para una probabilidad de error $p \leq 0,05$.

Los resultados concernientes a la influencia del cultivar se presenta en la Figura 1 y ofrecen diferencias entre los cinco cultivares comerciales y los cinco tradicionales. Los primeros marcan porcentajes de punta negra no superiores el 4,7% de semillas (contenidos de semillas sintomáticas inferiores al 6% de la muestra en peso), menos Don Pedro que alcanza niveles del 8,25% (9.53% en peso). En las variedades tradicionales, salvo BGE013701, estos

valores superan el 6% de semillas con presencia de síntomas. A excepción de los dos cultivares mencionados, puede sugerirse que las variedades más antiguas son más susceptibles a expresar el "black point" (punta negra).

Un posible motivo de esta susceptibilidad varietal puede ser la altura de la planta, genotipos antiguos de elevada longitud del tallo resultan ser más sensibles a la enfermedad

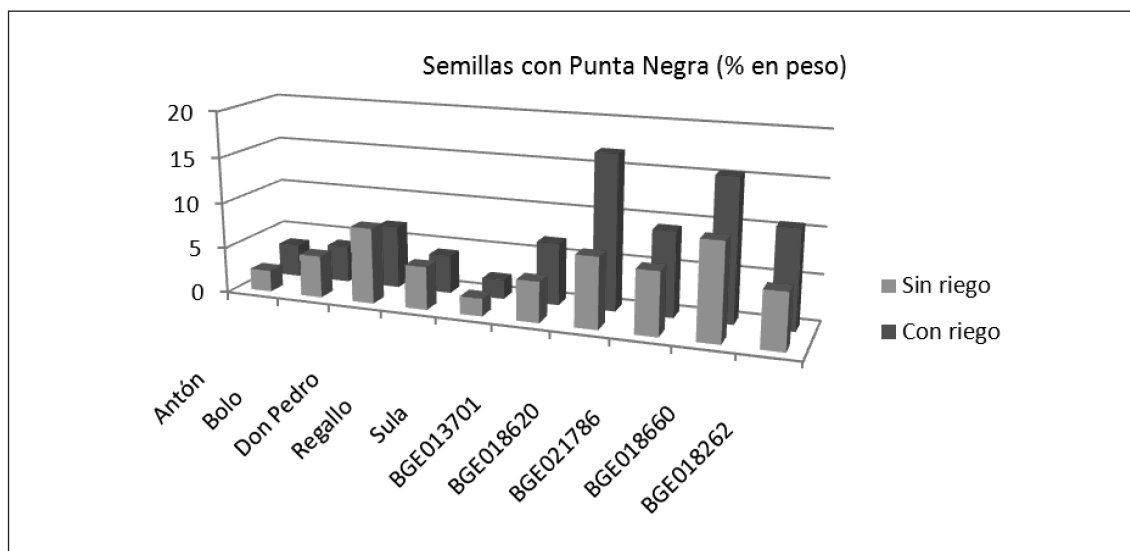


Figura 1. Número y peso de semillas de trigo duro (% respecto al total) con síntomas de punta negra según la variedad de cultivo.

Figure 1. Number and weight of durum wheat seed (% in total) with symptoms of Black Point according to the cultivar.

que trigos mejorados de estatura semi-ana. Estos resultados se contradicen con los expuestos por Fernández *et al.* (1994). Las semillas de Sula (2%) y Antón (2,96%) han resultado ser las menos afectadas, frente a BGE018620 y BGE018660 que, con 12,25% y 12,96% de semillas sintomáticas, reflejan el mayor porcentaje de afectación.

Pruebas de patogenicidad

Las inoculaciones con aislados de los dos hongos de mayor presencia cuantitativa del inventario fúngico no muestran diferencias significativas respecto al testigo para ninguno de los tratamientos estudiados. Las raíces principales no presentaron síntoma alguno tras las inoculaciones y en algunos casos se consiguieron longitudes de raíz y de parte aérea incluso mayores al testigo. El porcentaje de emergencia de las semillas inoculadas con *F. proliferatum* aunque ligeramente in-

ferior al testigo no representa diferencias significativas (tabla 6).

A la vista de los resultados puede afirmarse que ninguno de las dos especies inoculadas ha tenido influencia sobre la nascencia de plántulas de trigo duro.

Discusión

A la vista de los resultados obtenidos, se puede afirmar que no hay diferencia en la microbiota fúngica encontrada entre los distintos cultivares y que, en nuestras condiciones, los hongos que se aíslan con mayor frecuencia asociados a la enfermedad de la punta negra son *A. alternata* y *F. proliferatum*, hongos de común aparición en la microbiota aérea (Palmero *et al.*, 2010) y que previamente habían sido asociados a la enfermedad de la punta negra del trigo en anteriores trabajos

Tabla 6. Porcentaje de semillas germinadas, longitud de la raíz principal y longitud de la parte aérea de las plántulas inoculadas con aislados de *Alternaria alternata* y *Fusarium proliferatum*
 Table 6. Percentage of germinated seeds, length of main root and shoot length of seedlings inoculated with isolates of *Alternaria alternata* and *Fusarium proliferatum*

Aislados	Porcentaje de germinación	Longitud raíz principal (cm)	Longitud parte aérea (cm)
Testigo	85,0 ± 5,92 a	19,35 ± 1,06 a	16,16 ± 0,87 a
Alt 1	79,0 ± 9,43 a	20,59 ± 1,20 a	16,32 ± 0,93 a
Alt 2	87,5 ± 6,42 a	20,41 ± 0,86 a	16,10 ± 0,90 a
Alt 3	84,0 ± 7,68 a	21,66 ± 0,71 a	16,84 ± 0,78 a
Fus 1	74,0 ± 17,15 a	18,53 ± 1,50 a	16,14 ± 0,81 a
Fus 2	73,0 ± 8,72 a	19,73 ± 1,01 a	16,43 ± 0,79 a
Fus 3	69,0 ± 11,58 a	19,59 ± 1,20 a	16,86 ± 1,00 a

Letras diferentes indican diferencias significativas para una probabilidad de error $p \leq 0,05$.

(Southwell *et al.* 1980; Conner y Kuzyk, 1988; Cromey and Muholland, 1988; Fernández *et al.* 1994; Conner *et al.* 1996 and Özer, 2005).

Los análisis de la germinación de las semillas afectadas por la enfermedad de la punta negra sugieren poca influencia de la misma sobre la viabilidad de las semillas y coinciden con las observaciones hechas por otros autores (Rees *et al.* 1984; Cromey and Muholland, 1988; Özer, 2005). Rees *et al.* (1984) matizaron que lotes con altos porcentajes de aislamientos de *B. sorokiniana* podían reducir el poder germinativo y el vigor de las plántulas. Para Conner *et al.* (1996) *F. proliferatum* tiene un efecto similar a *B. sorokiniana* y puede afectar negativamente a la germinación de la semilla, conclusión que no se ajusta a nuestros resultados experimentales.

Puesto que los síntomas no se hacen patentes hasta los últimos estadios de desarrollo del grano, constituye un papel fundamental en la epidemiología de la enfermedad la época y disposición del riego. Su importancia queda demostrada en el estudio presentado,

donde la aparición de la enfermedad es siempre superior en las parcelas regadas que en las que se mantienen en secano. Estos resultados coinciden con los de Conner, (1987), Conner *et al.* (1992) y Fernández *et al.* (2000), quienes afirman que condiciones de alta humedad, ya sea por el riego o debido a fuertes lluvias, durante los estados de grano lechoso y grano pastoso incrementan en gran medida la aparición de la punta negra. Hemos de tener en cuenta además que cuando los niveles de punta negra son tan altos como para que la cosecha tenga que ser destinada a la alimentación animal, los propios hongos o las micotoxinas que éstos producen pueden causar problemas de salud al ganado si son consumidos en cantidades suficientes (Cromey and Muholland, 1988).

Los cultivares BGE018620 y BGE018660 están encuadrados botánicamente como *Triticum turgidum* subsp. *turgidum* convar. *turgidum* y, a diferencia de los ocho restantes, que pertenecen a la convar. *durum* presentan porcentajes medios de semillas afectadas por la enfermedad (12,6%) muy superiores a las del

resto de cultivares (5,4%). Los cultivares no sometidos a mejora genética parecen presentar una mayor incidencia de la enfermedad.

Bibliografía

- Australian Wheat Board, 2000. Wheat receival standards 2000/01. Australian Wheat Board Limited, Victoria, Australia.
- Barnett HL and Hunter BB, 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess publishing company. Minneapolis, Minnesota, USA. 241 p.
- Bartolomé A, 2010. Estudio del efecto de las condiciones ambientales (agua y nitrógeno) y del genotipo sobre la calidad tecnológica de los trigos duros. Proyecto fin de carrera EUITA. UPM. 133 p.
- Conner RL, 1987. Influence of irrigation timing on black point incidence in soft white spring wheat. *Can. J. Plant Pathol.* 9: 301-306.
- Conner RL, 1989. Influence of irrigation and precipitation on incidence of black point in soft white spring wheat. *Can. J. Plant Pathol.* 11: 388-392.
- Conner RL and Kuzyk AD, 1988. Black point incidence in soft white spring wheat in southern Alberta and Saskatchewan between 1982 and 1987. *Can. Plant Dis. Surv.* 68: 27-31.
- Conner RL and Thomas JB, 1985. Genetic variation and screening techniques for resistance to black point in soft white spring wheat. *Can. J. Plant Pathol.* 7: 402-407.
- Conner RL, Carefoot JM, Bole JB and Kozub GC, 1992. The effect of nitrogen fertilizer and irrigation on black point incidence in soft white spring wheat. *Plant Soil*, 140: 41-47.
- Conner RL, Hwang SF and Stevens RR, 1996. *Fusarium proliferatum*: a new causal agent of black point in wheat. *Can. J. Plant Pathol.* 18: 419-423.
- Cromey MG and Mulholland RI, 1988. Black point of wheat: fungal associations, cultivar susceptibility, and effects on grain weight and germination. *N. Z. J. Agric. Res.* 31: 51-55.
- Desclaux D, 2000. Environmental conditions inducing black-point symptoms in durum wheat. Seminar on Durum Wheat Improvement in the Mediterranean Region: New Challenges, 12-14 Apr 2000, Zaragoza, Spain.
- Dexter JE and Edwards NM, 1997. The Implications of Frequently Encountered Grading Factors on the Processing Quality of Common Wheat. The 101st Association of Operative Millers Trade Show, 1997, Nashville, Tenn. Grain Research Laboratory, Canadian Grain Commission, Winnipeg, Man. Contrib. M212.
- Dexter JE and Edwards NM, 1998. The Implications of Frequently Encountered Grading Factors on the Processing Quality of Durum Wheat. The 102nd Association of Operative Millers Trade Show, 1998, Phoenix, Ariz. Grain Research Laboratory, Canadian Grain Commission, Winnipeg, Man. Contrib. M231.
- Ellis SA, Gooding MJ and Thompson AJ, 1996. Factors influencing the relative susceptibility of wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) to black point. *Crop Prot.* 15: 69-76.
- Fernandez MR, Clarke JM, DePauw RM, Irvine RB and Knox RE, 1994. Black point and red smudge in irrigated durum wheat in southern Saskatchewan in 1990-1992. *Can. J. Plant Pathol.* 16: 221-227.
- Fernandez MR, Clarke JM and DePauw RM, 2000. Black point reaction of durum and common wheat cultivars grown under irrigation in southern Saskatchewan. *Plant Dis.* 84: 892-894.
- Gooding MJ, Thompson AJ, Collingborn FMB, Smith SP and Davies WP, 1993. Black point on wheat grain: Influences of cultivar, management and season on symptom severity. *Aspects Appl. Biol.* 36: 391-396.
- Gordún E, Salis L, Ojeda S, Robles Y, Goula M, Giunta F and Valero J, 2008. Wheat Sunn pest, blackpoint, kernel smudge and quality factors in Spanish durum wheat. International Durum Wheat Symposium, 30 June – 3 July 2008, Bologna, Italy.
- ISTA (International Seeds Testing Association), 1976. International rules for seed testing. *Seed Sci. Technol.* 43, 3-77.

- Komada H, 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. Rev. Plant. Prot. Res. 8: 14-125.
- MAPA, 1992. Manual para Evaluación de Plántulas en Análisis de Germinación. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Secretaría General Técnica. Madrid. 130 p.
- Leslie JF and Summerell BA, 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing. Ames, Iowa, USA.
- Mathur SB and Kongsdal O, 2003. Common laboratory seed health testing methods for detecting fungi. International Seed Testing Association. ISTA. Copenhagen, Denmark. 425 p.
- Nelson PE, Toussoun TA and Marasas WFO, 1983. *Fusarium* species. A manual for identification. Ed. The Pennsylvania State University Press.
- Nirenberg HI and O'donnell K, 1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia. 90(3): 434-458.
- Özer N, 2005. Determination of the fungi responsible for black point in bread wheat and effects of disease on emergence and seedling vigour. Trakya Univ. J. Sci. 6: 35-40.
- Palmero D, Rofriguez JM, De Cara M, Camacho F, Iglesias C and Tello Marquina JC, 2010. Fungal microbiota from rain water and pathogenicity of *Fusarium* species isolated from atmospheric dust and rainfall dust. J Ind Microbiol Biotechnol (2011) 38: 13-20.
- Rees RG, Martin DJ and Law DP, 1984. Black point in bread wheat: effects on quality and germination, and fungal associations. Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb. 24: 601-605.
- Southwell RJ, Brown JF and Wong PTW, 1980a. Effect of inoculum density, stage of plant growth and dew period on the incidence of black point caused by *Alternaria alternata* in durum wheat. Ann. Appl. Biol. 96: 29-35.
- Southwell RJ, Wong PTW and Brown JF, 1980b. Resistance of durum wheat cvs. To black point caused by *Alternaria alternata*. Aust. J. Agric. Res. 31: 1097-1101.
- Walker RK, Able JA, Mather DE, Able AJ, 2008. Black point formation in barley: environmental influences and quantitative trait loci. Aust. J. of Agric. Res. 59(11) 1021-1029
- Wang H, Fernandez MR, Clarke FR, DePauw RM and Clarke JM, 2002. Effects of foliar fungicides on kernel black point of wheat in southern Saskatchewan. Can. J. Plant Pathol. 24: 287-293.
- Watkins JE, 2005. Black Point Disease of Wheat. University of Nebraska-Lincoln Extension, Institute of Agriculture and Natural Resources and United States Department of Agriculture.
- Williamson PM, 1997. Black point of wheat: in vitro production of symptoms, involved, and association with *Alternaria alternata*. Aust. J. of Agric. Res. 48: 13-19.

(Aceptado para publicación el 20 de marzo de 2012)