



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA

INGENIERÍA TÉCNICA AGRÍCOLA

ESPECIALIDAD

INDUSTRIAS AGRARIAS Y ALIMENTARIAS

TRABAJO MONOGRÁFICO

**TÍTULO: MICROBIOTA FÚNGICA Y TRATAMIENTOS DE LAS SEMILLAS DE
JUDÍA: IMPORTANCIA DE LA SANIDAD**

ALUMNA: FATIMA ZAHRA JEOUAL

DIRECTORAS: Dra. REYES BLANCO PRIETO.
Dra. MARIA LUISA GARCÍA BALAGUER

Almería, Julio de 2011

AGRADECIMIENTOS

Antes de todo me gustaría agradecer a las personas que me han ayudado a llevar a cabo este trabajo fin de carrera:

En primer lugar agradezco mucho a las directoras del presente proyecto fin de carrera: Dra. Reyes Blanco Prieto (departamento de Producción Vegetal de la Universidad de Almería), por sus valiosos consejos, por su plena disponibilidad, por su comprensión, por su inmensa paciencia, por haberme proporcionado los medios necesarios para llevar a buen fin este trabajo, por todas sus ideas y por su ayuda en todo momento. Dra. María Luisa García Balaguer, no sólo por su colaboración, sino también por su apoyo, por animarme y por el interés que mostró para que aprenda lo máximo posible y por supuesto por su plena disponibilidad en cada momento.

También me gustaría agradecer a la Dra. Ana Jesús González Martínez (SERIDA) por aceptar proporcionarme sus conocimientos acerca del tema tratado en este proyecto fin de carrera con toda amabilidad.

Finalmente agradezco a la Dra. Celia de la Cuadra, la Dra. Isaura Martín Martínez y la Dra. Marta Guerrero (Alcalá de Henares, Madrid) y Dra. Cristina Nieto del CRF-INIA (Madrid) por los datos necesarios de las semillas. También agradecer al Ministerio de Educación y Ciencia la financiación del proyecto RF2007-00016-C04.

Sin olvidar agradecer a Manuela y César, los técnicos de los laboratorios su ayuda procurando que no falten materiales de trabajo en los laboratorios, y todo el personal del departamento de Producción Vegetal de la Universidad de Almería.

Y, por último agradezco muchísimo a mis padres que han sufrido bastante estando lejos, que me aguantaron en mis malos momentos y que no han dejado de animarme y apoyarme durante todos mis años de carrera. Sin olvidar a todos mis amigos por todo el cariño y al apoyo que me dieron en mis peores momentos.

RESUMEN

TITULACIÓN: INGENIERÍA TÉCNICA AGRÍCOLA

ESPECIALIDAD: INDUSTRIAS AGRARIAS Y ALIMENTARIA.

DIRECTORAS: Dra. REYES BLANCO PRIETO.

Dra. MARIA LUISA GARCÍA BALAGUER.

AUTORA: FATIMA ZAHRA JEOUAL.

TÍTULO: MICROBIOTA FÚNGICA Y TRATAMIENTOS DE LAS SEMILLAS DE JUDÍA: IMPORTANCIA DE LA SANIDAD.

En el presente proyecto fin de carrera se analizó la microbiota fúngica de nueve entradas de judía de la colección del banco de semillas CRF-INIA que presentaron germinación baja después de diez años de conservación a -18°C . Se evaluó la eficacia de varios tratamientos físicos de termoterapia que pudieran controlar o reducir la microbiota fúngica sin afectar la viabilidad de las mismas con el objetivo de evitar así la posible erosión genética debida a la presencia de microorganismos en las semillas.

Después de aplicar tratamientos de termoterapia en semillas de judía comerciales y comprobar su germinación y otros parámetros en el CRF, se comprobó su micobiota (100 semillas por tratamiento y variedad más los controles sin tratar). Los tratamientos fueron: Calor seco, calor húmedo y saturación a temperaturas entre 40°C y 70°C con duraciones desde 8h a 7 días. Aquellos que no afectaron a la germinación y redujeron la micobiota fueron seleccionados, para ensayarlos en parte de las entradas de la colección de judía cuya microbiota fúngica y bacteriana se había analizado previamente.

En vista de los resultados se seleccionaron dos tratamientos de calor seco a 60 y 70°C durante 3 días y 8h respectivamente para aplicarlos en tres de las entradas del CRF elegidas por su carga fúngica, bacteriana y por su germinación. Los resultados del análisis de la microbiota fúngica mostraban una reducción de la misma pero no su control total lo cual nos sugiere la necesidad de continuar investigando-optimizando dichos tratamientos y mientras tanto se deberá cuidar la regeneración, recolección del material y analizar su sanidad antes de introducirlo en los bancos de semillas.

ÍNDICE

1. INTERÉS Y OBJETIVOS.....	1
2. REVISION BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. <u>Importancia de los recursos fitogenéticos y los bancos de germoplasma</u>5
2.2. <u>La judía (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)</u>	25
2.2.1. Introducción general.....	25
2.2.2. Importancia económica: producción mundial, en España y otros países.....	25
2.2.3. Descripción botánica y característica generales de la planta y de la semilla.....	26
2.2.4. Sistema de cultivo, enfermedades y plagas del cultivo.....	30
2.2.4.1. <i>Sistemas de cultivo</i>	30
2.2.4.2. <i>Enfermedades y plagas del cultivo</i>	33
• <i>Micosis</i>	33
• <i>Bacteriosis</i>	37
• <i>Virosis</i>	39
• <i>Nematodos</i>	41
• <i>Plagas</i>	42
2.3. <u>Sanidad de semillas</u>	43
2.3.1. Introducción general.....	43
2.3.2. Técnicas de análisis de semillas para detectar patógenos y microbiota.....	45
2.3.3. Patógenos y daños en semillas de judía.....	49
• <i>Hongos</i>	49
• <i>Bacterias</i>	52
• <i>Virus</i>	52
• <i>Daños por insectos y otros</i>	

2.3.4. Obtención de semilla sana y tratamientos de semillas.....	54
2.3.4.1. <i>Introducción general</i>	54
2.3.4.2. <i>Tratamiento de semillas</i>	55
• <i>Tratamientos físicos</i>	56
• <i>Tratamientos químicos</i>	64
• <i>Tratamientos biológicos</i>	67
• <i>Tratamientos combinados</i>	69
3. MATERIAL Y MÉTODOS	70
3.1. Material vegetal	71
3.2. Preparación de medios de cultivo	72
3.3. Ensayo 1. Análisis de la microbiota fúngica de entradas de semillas de judía de la colección del banco de germoplasma	73
3.4. Ensayo 2. Análisis de la microbiota fúngica de de semillas de judía comerciales después de los tratamientos físicos	75
3.5. Ensayo 3. Análisis de la microbiota fúngica de tres entradas de semillas de judía del banco de germoplasma después de los tratamientos físicos escogidos	76
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	78
4.1. Ensayo 1. Análisis de la microbiota fúngica de entradas de semillas de judía de la colección del banco de germoplasma	79
4.2. Ensayo 2. Análisis de la microbiota fúngica de semillas de judía comerciales después de tratamientos físicos	85
4.3. Ensayo 3. Análisis de la microbiota fúngica de tres entradas de semillas de judía de germoplasma después de los tratamientos físicos escogidos	89
5. CONCLUSIONES	97
6. BIBLIOGRAFÍA	99
7. ANEXOS	101

INTERÉS Y OBJETIVOS

1. INTERÉS Y OBJETIVOS.

Según el tratado internacional sobre los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura adoptado por la FAO en 2009 (Resolución 3/2001), se intenta asegurar la disponibilidad constante de los recursos fitogenéticos que los países necesitarán para la alimentación de su población.

Ya en 1994 la FAO/IPGRI (*International Plant Genetic Resources Institute*) recomendaba para los bancos de germoplasma que las semillas se deben almacenar en condiciones de temperatura y humedad muy específicos, y además se debe asegurar y garantizar que “estén libres de semillas infectadas, malas hierbas, plagas y enfermedades en lo posible.

En el Centro de Recursos Fitogenéticos (CRF) del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria (INIA) de Alcalá de Henares (Madrid), en revisiones rutinarias recientes del material conservado durante 10 años, en la colección de semillas de judía (*Phaseolus vulgaris* L.) se detectó un descenso de la germinación en un porcentaje de entradas mayor del esperado (Martín y De la Cuadra, 2008). Esta colección constituida por más de 3000 entradas es una de las más extensas de esta institución. La judía también conocida como habichuela, alubia, frijol, etc., es una de las especies de leguminosas más usada para el consumo humano con una producción mundial cercana a 20 millones de toneladas (FAOSAT, 2009).

Por todo ello se consideró importante indagar si una de las posibles causas de la baja germinación de las entradas de judía, pudiera ser la presencia de microorganismos potencialmente patógenos que, además de suponer un riesgo en los intercambios de material, puede tener un papel negativo en la supervivencia de las semillas. En el marco de un proyecto de CRF-INIA, con la Universidad de Almería y el SERIDA de Asturias se ha llevado a cabo la búsqueda de tratamientos físicos de semillas que controlen o reduzcan los microorganismos y evitar así la posible erosión genética debida a su presencia. En el presente trabajo fin de carrera se muestra una parte de los resultados de dicho proyecto del CRF-INIA en cuanto a microbiota fúngica, dejando para el SERIDA la parte de bacterias.

Es de reconocimiento general entre los especialistas y organizaciones internacionales que las semillas pueden ser una importante vía de transmisión de plagas y patógenos en el ámbito nacional e internacional mediante el intercambio de germoplasma (McGee, 1997) pudiendo causar grandes pérdidas si se desarrolla la enfermedad en los cultivos. En general

las condiciones de almacenamiento de semillas también prolongan la supervivencia de su microbiota, que incluye patógenos por contaminación de semillas y que pueden reducir su longevidad. Entre los posibles patógenos transmitidos por semillas existen hongos, bacterias y virus reconocidos en la bibliografía (Neergaard, 1988; Kaiser, 1987; Richardson, 1991). En España en diferentes especies de judía, González *et al.* (2004) y Palmero e Iglesias (2007) entre otros han encontrado determinados hongos y bacterias con patogenicidad a tener en cuenta como por ejemplo: *Aspergillus* spp., *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Penicillium* spp.

Para controlar los patógenos en semillas de leguminosas, se ha utilizado tratamientos de diferentes tipos: químicos mediante antifúngicos, desinfectantes, antibióticos, etc. (González *et al.*, 2004), físicos (Burth *et al.* 1991., Tylkowska *et al.* 2010) y biológicos con antagonistas naturales (Luque y Scandiani, 2009). El tratamiento de las semillas de los bancos de germoplasma requiere especial atención en su elección ya que pueden tener un efecto negativo sobre la viabilidad de la semilla. Por otra parte, los tratamientos químicos de las semillas no son recomendables en los bancos de germoplasma debido al efecto tóxico que puedan tener durante una conservación a largo plazo.

En diversos casos, se han podido aplicar tratamientos efectivos de termoterapia sobre semillas de diferentes especies vegetales sin afectar a su germinación (Trigo *et al.* 1998, Clear *et al.* 2002, Whitaker *et al.* 2004), por ello en el presente trabajo fin de carrera se ensaya la utilización de tratamientos físicos, como la termoterapia.

Por todo lo anteriormente dicho, los objetivos del presente trabajo fin de carrera son realizar un inventario de la microbiota asociada a las semillas de judía después de su conservación a largo plazo en el CRF-INIA, y evaluar la eficacia de varios tratamientos físicos de termoterapia que puedan controlar o reducir la microbiota fúngica sin afectar la viabilidad de las mismas. Esto permitiría seleccionar algunos tratamientos con buenos resultados para aplicarlos en el CRF y otros bancos de semillas de judía, que contribuirían a paliar problemas en la conservación además de mejorar el estado sanitario de las semillas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Importancia de los recursos fitogenéticos y los bancos de germoplasma

El suelo, el agua y los recursos genéticos constituyen el fundamento en el que se basan la agricultura y la seguridad alimentaria. De los tres elementos, el menos conocido y menos valorado son los recursos fitogenéticos. También son los que más dependen de nuestros cuidados y nuestra salvaguardia, y tal vez sean los más amenazados (FAO, 2006). Según el segundo informe sobre el estado de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura en el mundo de la FAO 2010, para 2050, el mundo necesitará producir el doble de los alimentos generados en el 2000, pero tendrá que hacerlo con la misma cantidad de tierra y con menos agua y otros insumos por lo que una mejor conservación y utilización de la diversidad vegetal para los alimentos puede ayudar a abordar eficientemente estas cuestiones. Esto posiblemente sea un mito puesto que consideramos que el reparto de los alimentos también hay que mejorarlo.

Según este informe, una mejor conservación y utilización de la diversidad vegetal para los alimentos puede ayudar a abordar eficientemente estas cuestiones. La diversidad genética de los granos, legumbres, vegetales y frutas como recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura, son los cimientos para la producción, y la base biológica para la seguridad alimentaria, los medios de vida y el desarrollo económico. Los recursos fitogenéticos siguen siendo por tanto fundamentales para ayudar a los agricultores a adaptarse a los desafíos actuales y futuros, incluso a los efectos del cambio climático. Es esencial que conservemos esta diversidad y que aumentemos su utilización de manera sostenible y eficiente.

En algunos países, la comercialización de productos identificados geográficamente es un incentivo adicional para que los agricultores conserven y utilicen la diversidad genética de los cultivos locales, por ejemplo, la Comisión Europea adoptó una norma (2008/62/CE) en 2008 para “proteger las variedades de semillas de los cultivos agrícolas que pueden estar amenazados por la erosión genética”, y permitir a las empresas fitomejoradoras de semillas abastecer a los mercados locales con variedades de semillas adaptadas en forma natural. Sin embargo, aun hay mucho por hacer respecto de la realización sistemática de inventarios y relevamientos de los recursos fitogenéticos *in situ*. Actualmente hay escasez de fondos dedicados a estas tareas, recursos humanos, conocimientos y coordinación, y se le ha dado una baja prioridad a esta cuestión a nivel nacional. Existen limitadas estrategias específicas

para conservar los recursos fitogenéticos *in situ* o para ordenar la diversidad de los cultivos en las explotaciones, con la participación de las comunidades locales.

Según el tratado internacional sobre los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura adoptado por la FAO en 2009 (Resolución 3/2001), se entiende por recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura, cualquier material genético de origen vegetal de valor real o potencial para la alimentación y la agricultura y se entiende por material genético, cualquier material de origen vegetal, incluido el material reproductivo y de propagación vegetativa, que contiene unidades funcionales de la herencia.

El tratado obliga a las partes contratantes, con arreglo a la legislación nacional, y en cooperación con otras partes contratantes cuando proceda, a promover un enfoque integrado de la prospección, conservación y utilización sostenible de los recursos filogenéticos para la alimentación y la agricultura y en particular:

1. Realizar estudios e inventarios de los recursos fitogenéticos y cuando sea viable, evaluar cualquier amenaza para ellos.
2. Promover la recolección de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura y la información pertinente relativa sobre aquellos que estén amenazados o sean de uso potencial.
3. Promover la conservación *in situ* de plantas silvestres afines de las cultivadas y las plantas silvestres para la producción de alimentos, incluso en zonas protegidas, apoyando, entre otras cosas, los esfuerzos de las comunidades indígenas y locales.
4. Cooperar en la promoción de la organización de un sistema eficaz y sostenible de conservación *ex situ*, prestando la debida atención a la necesidad de una suficiente documentación, caracterización, regeneración y evaluación, y promoverá el perfeccionamiento y la transferencia de tecnologías apropiadas al efecto, con objeto de mejorar la utilización sostenible de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura.
5. Supervisar el mantenimiento de la viabilidad, el grado de variación y la integridad genética de las selecciones de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura.
6. Adoptar medidas para reducir al mínimo o, de ser posible, eliminar las amenazas para los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura.

Durante años, la diversidad vegetal en la forma de semillas, bulbos o tubérculos se ha coleccionado y conservado en bancos de genes y en jardines botánicos. Hasta la actualidad, los principales cambios han sido según FAO (2010):

- la cantidad total de muestras en las colecciones de los bancos de genes de todo el mundo ha aumentado un 20% aproximadamente desde 1996, para alcanzar los 7,4 millones.

-Se estima que el 25-30% de estas son muestras distintas, mientras que el resto son duplicados. Desde 1996, se han recolectado e incorporado a los bancos de genes *ex situ* al menos 240.000 materiales de plantación nuevos.

-Tanto la cantidad como el tamaño de los bancos de genes han aumentado. Existen unos 1750 bancos de genes individuales en todo el mundo, de los cuales aproximadamente 130 con más de 10.000 muestras.

- La cantidad de jardines botánicos ha aumentado de 1.500 aproximadamente a más de 2.500. Estos jardines son importantes depósitos de plantas silvestres afines a las cultivadas.

Según el Real Decreto 2129/2008, de 26 de diciembre, por el que se establece el Programa nacional de conservación, mejora y fomento de las razas ganaderas, el banco de germoplasma es una instalación con carácter autónomo o dependiente de un centro de reproducción o de un centro de almacenamiento, constituido con el fin de almacenar material genético de forma indefinida. A efectos de preservar el patrimonio genético nacional según el Manual de Manejo de semillas en bancos de germoplasma (*Manual of Seed Handling in Genebanks* (2006)), los bancos de germoplasma son los depósitos de los recursos fitogenéticos, proporcionando la materia prima para la mejora de los cultivos, además juegan un papel importante en el desarrollo sostenible de la agricultura, ayudando en el incremento de la producción de alimentos y por lo tanto para superar el hambre y la pobreza.

Ya desde 1956, Hodge y Erlanson, y posteriormente Hyland (1977) consideraron que la introducción de plantas, en numerosos países ha jugado un importante papel en el desarrollo de una fuente de diversidad en la agricultura y la introducción de nuevos germoplasmas de nuevas especies de plantas sigue siendo muy importante en la mejora del rendimiento en muchos países sobre todo los que tienen problemas de alimentación, por lo que muchos países han establecido programas para la conservación de sus propias germoplasmas de diferentes especies de plantas, además de intentar desarrollar otros

programas de investigación para mejorar el rendimiento y desarrollar resistencias frente a enfermedades y plagas.

Muchos países han ido recibiendo ayudas para desarrollar sus propios sistemas nacionales de germoplasma vegetal por el Consejo Internacional de Recursos Filogenéticos (IBPGR: *International Board of Plant Genetic Resources*) que se estableció en 1974 con el cuartel general de la FAO, Roma, Italia (**Plucknett, 1974**). El IBPGR, se esfuerza para construir una red mundial de instituciones para recopilar, conservar, evaluar, documentar y distribuir germoplasmas de plantas de importancia económica y sus parientes silvestres. En octubre 1991, el IBPGR se convirtió en el IPGRI (*International Plant Genetic Resources Institute*), y en enero 1994, comenzó a funcionar de manera independiente como uno de los centros del grupo consultivo sobre la investigación agrícola internacional (CGIAR: *Consultative Group on International Agricultural Research*). En 2006, el IPGRI y el INIBAP (*International Network for the Improvement of Banana and Plantain*) se convirtieron en una misma organización y posteriormente cambio su nombre a *Bioversity International* (Bioversity International, 2011).

La mayoría de los países, si no todos, tienen reglamentos que rigen la importación de material vegetal dentro y fuera de su territorio. Algunos han promulgado legislación para prevenir la entrada de plagas y enfermedades, y medidas para controlar plagas y patógenos endémicos importados (**Baker, 1972**). La información relativa a la transmisión de patógenos de plantas mediante semillas de diferentes especies de plantas ha sido (y es) de gran importancia para los países que exportan o importan con fines comerciales y de investigación (Baker, 1972).

Las semillas que se almacenan en los bancos de germoplasma son un recurso vital e irremplazable, una herencia que se debe conservar para proveer opciones a la agricultura en el futuro, en un mundo que afronta el cambio climático y otros desafíos. La conservación sostenible de los recursos genéticos depende del trabajo eficaz del personal de los bancos de germoplasma, cuyo papel es crítico para garantizar que el germoplasma se conserve de manera efectiva y eficiente. Este personal debe aplicar procedimientos adecuados al manejo de las semillas para garantizar que éstas sobrevivan y estén disponibles para las generaciones actuales y futuras (Rao *et al.* 2007).

En el campo de los recursos fitogenéticos, el comportamiento fisiológico en almacenamiento de las semillas de una especie y su longevidad determinan cómo conservarlas

para su uso posterior. Por tratarse de un método práctico y económico, el almacenamiento en forma de semilla es el preferido para conservar el 90% de los seis millones de accesiones (entradas) mantenidos en colecciones *ex situ* en todo el mundo. Éste es el principal método de conservación de las especies que producen semillas ortodoxas, es decir, que resisten la desecación a contenidos de humedad bajos y al almacenamiento a temperaturas muy bajas. La mayoría de las especies cultivables y forrajeras, y muchas especies arbóreas producen este tipo de semillas. Las técnicas para conservar semillas ortodoxas se han venido perfeccionando durante varias décadas e incluyen el secado de las semillas hasta lograr un contenido de humedad bajo (3-7% de peso fresco, dependiendo de las especies) y el almacenamiento en recipientes herméticos, a bajas temperaturas, preferiblemente a -18°C o menos (FAO/IPGRI, 1994).

Muchas especies importantes de árboles tropicales y subtropicales producen semillas que no sobreviven la desecación ni toleran temperaturas bajas. Por esta razón, estas semillas, conocidas como recalcitrantes, no son fáciles de almacenar. Si bien existen técnicas para almacenar algunas semillas recalcitrantes, éstas por lo general son de corta vida y cada especie requiere su propio método. Se ha reconocido una tercera categoría de semillas que muestran un comportamiento intermedio, es decir, que toleran combinaciones de desecación y bajas temperaturas (Rao *et al.* 2007).

Según la FAO (2006), el almacenamiento de semillas ortodoxas se trata en bancos de germoplasma. Las operaciones básicas de banco de germoplasma de semillas incluyen la colecta, el procesamiento, la conservación, la regeneración y la distribución del germoplasma. Las principales actividades y procedimientos para el funcionamiento de un banco de germoplasma son prácticamente los mismos en todos los bancos, aunque pueden variar en alguna manera. Los bancos de germoplasma pueden ser muy especializados; por ejemplo, el Banco Internacional de Germoplasma de Arroz en los Baños, Filipinas, únicamente conserva arroz y sus parientes silvestres. Sin embargo, la mayoría de los bancos nacionales de germoplasma de semillas almacenan semillas de todo tipo de cultivos. El mantenimiento de la viabilidad y de la integridad genética de las semillas continúa siendo el principio básico en el manejo de los bancos. La calidad y sostenibilidad de cualquier esfuerzo de conservación de recursos genéticos depende de cómo se procesan y conservan las semillas. Manejar las semillas con procedimientos inapropiados acelera el deterioro de éstas y hace más costosa la conservación.

Según dicho manual (FAO en su última versión (2006)), detallaremos las diferentes operaciones realizadas por los bancos de germoplasma dado que cada etapa tiene su importancia para una utilización sostenible de los recursos fitogenéticos.

El primer paso hacia la conservación *ex situ* de la diversidad cultivada es la **recolección** del germoplasma en aéreas de conocida diversidad genética o mediante donaciones de otros centros, las principales razones para adquirir germoplasma son para prevenir la erosión genética, llenar vacíos en una colección, satisfacer necesidades actuales y futuras, aprovechar una oportunidad cuando se presenta de hacer una colecta fortuita de especies definida como ‘no objetivo’. Idealmente las semillas se deben colectar cuando alcanzan la madurez óptima; es decir, cuando su vigor, tolerancia a la desecación y longevidad se encuentran en los niveles más altos, para ello se pueden usar indicadores visuales tales como el color del fruto, el color de las semillas, la formación de capas negras sobre todo en los cereales, variación en la madurez de las semillas. Para la recolección de muestras se usan recipientes especiales para cada tipo de semillas como por ejemplo bolsas de tela que permitan la circulación del aire para colectar panículas o frutos secos...etc.

A menudo, las semillas recientemente colectadas tienen un contenido de humedad alto (10-20%) y son susceptibles de contaminarse con hongos y bacterias. Los frutos y las semillas húmedos tienen altas tasas de respiración, y si el oxígeno se reduce debido a una aireación inadecuada, se fermentan. Tanto la respiración como la fermentación crean calor, lo cual deteriora el material colectado. Cuando la adquisición de germoplasma es por intercambio, los bancos de germoplasma pueden requerir documentación de los países o de entidades para certificar que el material está libre de organismos modificados genéticamente (OMG).

El riesgo de introducir nuevas plagas y patógenos es bajo para el germoplasma que ha sido colectado o producido en el área o país en donde el banco de germoplasma está ubicado, medio para el germoplasma colectado o producido en la misma región geográfica o continente en donde está ubicado y alto para el germoplasma colectado o producido en otros continentes y para material vegetativo.

El equipo de colecta debe garantizar la seguridad del material colectado hasta el momento en que termine la expedición y éste se transporte al banco de germoplasma. Exponer

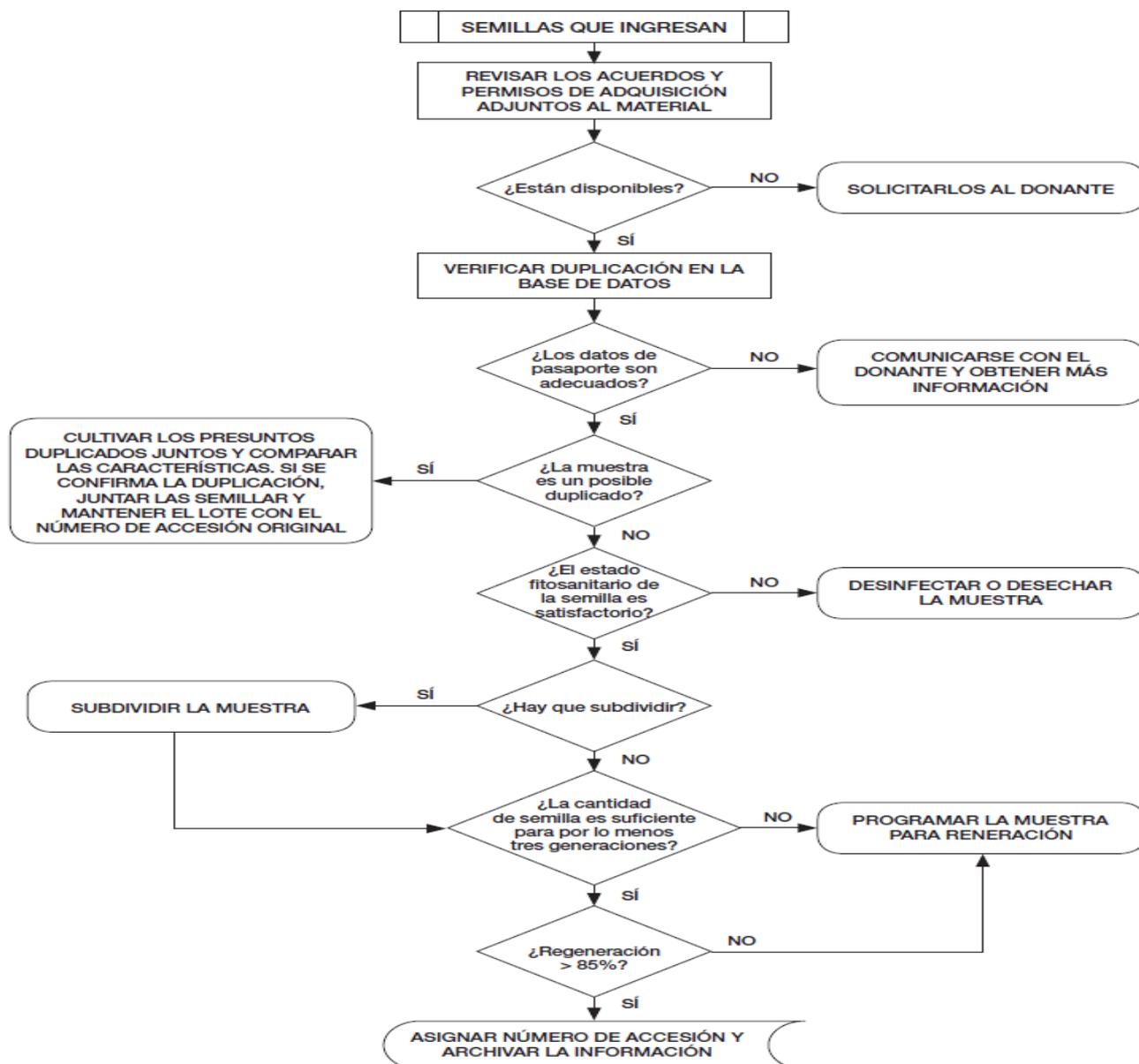
las semillas a condiciones ambientales desfavorables durante el traslado puede ser muy dañino.

Una vez se reciben las muestras en el banco de germoplasma, las semillas se registran y se incorporan a la colección, siempre y cuando cumplan con los estándares requeridos de cantidad y calidad, y con la información asociada a ellas, es decir, la asignación de un número de identificación único llamado *numero de accesión o entrada* que permite ubicar cada muestra de semilla recibida en un banco de germoplasma y distinguirla de las demás. El registro se hace con el fin de permitir a los bancos de germoplasma mantener registros precisos de muestras y preparar listas de inventarios para conservación, distribución y otros aspectos de manejo del germoplasma. La operación del registro se realiza según muestra el diagrama de flujo 1.2.

Un aspecto importante del proceso de registro es documentar la información recibida con una muestra. La información documentada en el registro contiene los datos de pasaporte, es decir, la información básica que permite identificar y manejar las accesiones. Gran parte de esta información se registra cuando la muestra se colecta, o viene con la muestra cuando ésta se recibe de otras fuentes. El uso de listas de descriptores internacionalmente aceptados para documentar los datos de pasaporte simplifica el intercambio de datos entre bancos de germoplasma.

El procedimiento para integrar una entrada a un banco de germoplasma implica limpiar, es decir, la eliminación de desechos, materia inerte, semillas dañadas e infectadas y semillas de otras especies con el fin de mejorar la calidad de las muestras para almacenamiento.

Diagrama de flujo 1.2. Registro del germoplasma (FAO, 2006).



La limpieza reduce el volumen durante el transporte porque se eliminan materiales extraños, mejora la pureza de la muestra porque se eliminan las semillas dañadas e inmaduras y optimiza el espacio de almacenamiento y reduce los costos. Las semillas se deben limpiar inmediatamente después de colectarse o tan pronto llegan al banco de germoplasma. El procedimiento de la limpieza se realiza según se muestra en el diagrama de flujo 1.3.

-La limpieza mecánica puede resultar en un proceso de selección de accesiones genéticamente heterogéneas (debido a que el paso por aberturas mecánicas excluye las semillas muy pequeñas o muy grandes).

-Los equipos requieren una limpieza rigurosa y un ajuste cuidadoso entre tandas de accesiones.

Después de la limpieza de semillas viene el proceso de la determinación del contenido de humedad y del secado. El contenido de humedad de las semillas (CHS) es la cantidad de agua que hay en una semilla. El agua está presente tanto de forma libre como combinada con los compuestos químicos de las células. El contenido de humedad es el factor más importante para determinar la velocidad a la cual las semillas se deterioran, y tiene un impacto considerable en la longevidad de las semillas en almacenamiento en un banco de germoplasma. Incluso pequeños cambios en el contenido de humedad tienen un gran efecto en la vida en almacenamiento. Es importante determinar el contenido de humedad antes de almacenar las semillas para predecir con exactitud el potencial de vida en almacenamiento que tendrá cada accesión. El procedimiento de la determinación de la humedad de las semillas se realiza tal y como muestra el diagrama de flujo 1.4 (Anexo II).

En cuanto al secado de las semillas, es la reducción del contenido de humedad de las semillas a los niveles recomendados para el almacenamiento, utilizando técnicas que no deterioran la viabilidad de las semillas como lo muestra el diagrama de flujo 1.5 (Anexo II).

El secado se da porque las semillas recién cosechadas pueden tener contenidos de humedad altos, lo cual contribuye a que respiren, a que los embriones crezcan y a que los insectos y hongos se desarrollen. Por ello las semillas se deben secar para obtener un contenido de humedad seguro que evite el deterioro, el calentamiento y la infestación durante el almacenamiento.

El contenido de humedad de las semillas que se van a almacenar en colecciones base debe estar entre 3 y 7%, dependiendo de la especie. El contenido de humedad de las semillas que se van a almacenar en colecciones activas debe estar entre 3y 8% si las semillas no tienen buenas características de almacenamiento (como las oleaginosas) y entre 7 y 11% si tienen buenas características de almacenamiento (como los cereales), dependiendo de la temperatura utilizada para el almacenamiento. Hay que tener mucho cuidado para que no se alcanzara el

contenido de humedad crítico que por debajo del cual la reducción adicional en el contenido de humedad ya no aumentaría la longevidad de las semillas en almacenamiento hermético.

Someter las semillas a pruebas de tolerancia a la desecación es un prerrequisito para seleccionar el régimen de secado apropiado si no se conoce aun cómo se comportan frente a la desecación. La sensibilidad a la desecación se puede valorar midiendo el porcentaje de germinación a diferentes intervalos de secado. Una prueba de germinación se realiza para determinar qué proporción de las semillas de una accesión germinara en condiciones favorables y producirá plántulas normales (plántulas con estructuras esenciales- raíces, brotes y suficiente reserva de alimento- capaces de desarrollarse en plantas reproductivamente maduras). El paso siguiente consiste en la determinación de la calidad de las semillas realizando primero unas pruebas de su viabilidad, seguida de otras de sanidad. La viabilidad es la medida de cuantas semillas de un lote están vivas y pueden llegar a convertirse en plantas capaces de reproducirse en condiciones de campo adecuadas. Es muy importante que las semillas almacenadas en un banco de germoplasma puedan producir plantas cuando se las siembre en un campo, por tanto, las semillas deben tener una viabilidad alta al inicio del almacenamiento y mantenerla durante el almacenamiento. Las pruebas de germinación se realizan según el diagrama de flujo 1.6 Pruebas de germinación (Anexo II), y según figuras 2.1 y 2.2.

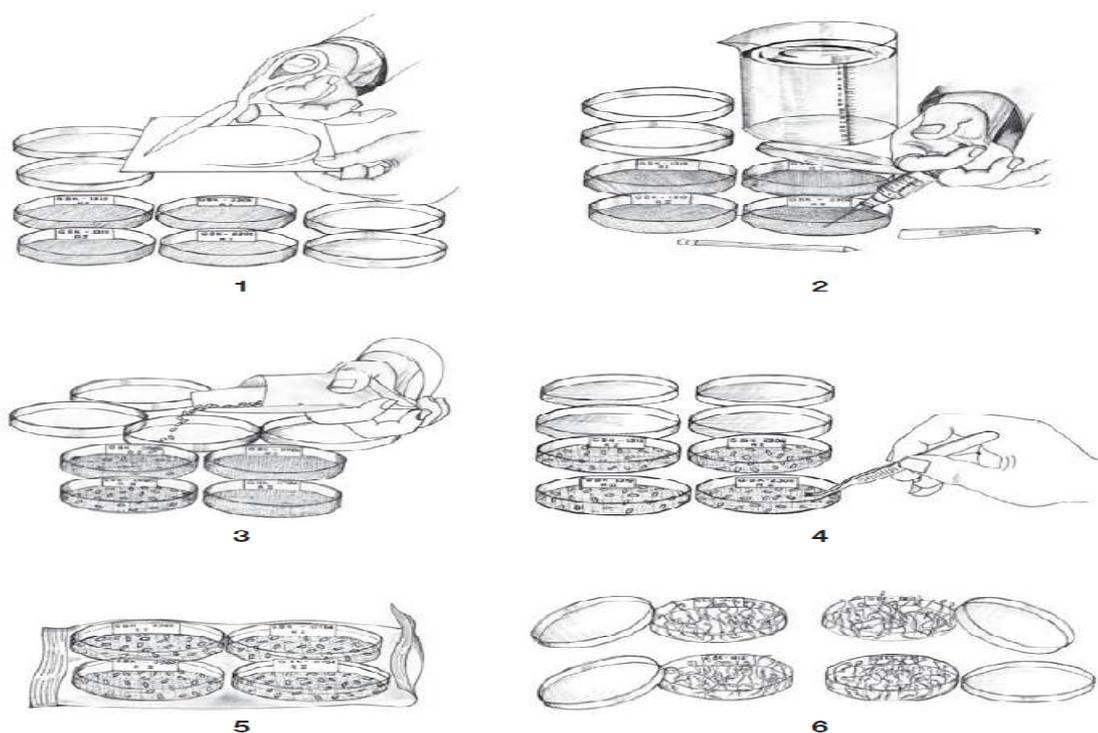


Figura 2.1. Prueba de germinación sobre papel absorbente, en cajas de petri. (FAO 2006). En 1 paso 3 recomendamos que las semillas se dispongan en una placa o papel estéril previamente y desde ahí se distribuyan con pinzas desinfectadas colocando de una en una las semillas en la placa de incubación (paso 4).

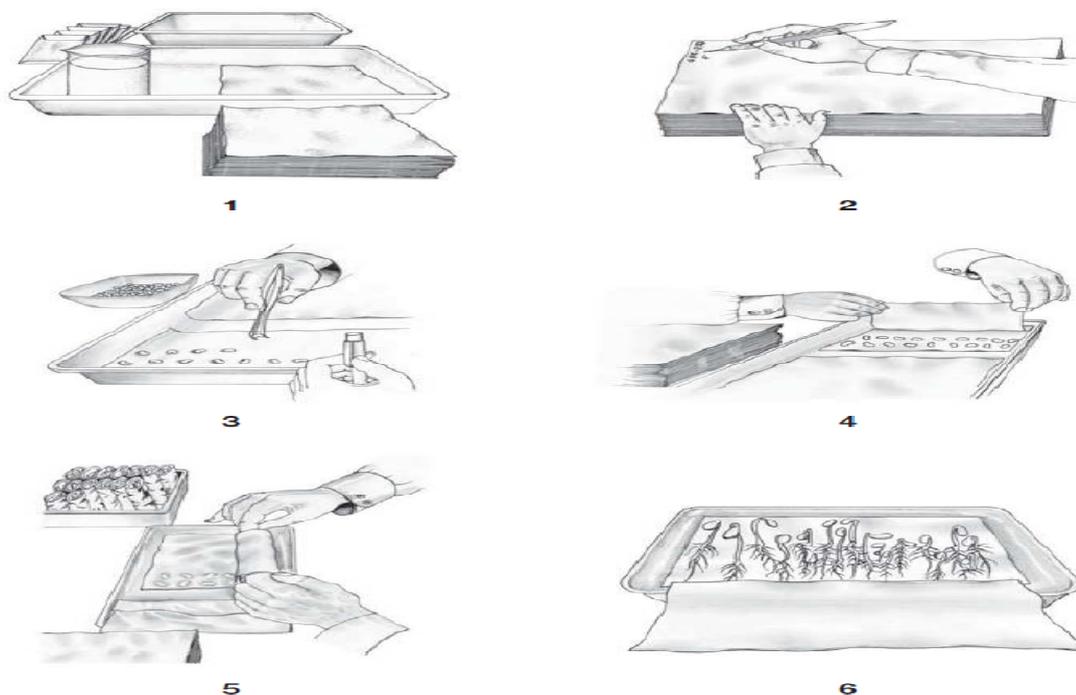


Figura 2.2. Prueba de germinación de semillas mediante el método entre papel (FAO 2006)

La contaminación por hongos es un evento común durante las pruebas de germinación, en especial con las semillas de leguminosas, por lo general, se asocia con la presencia de semillas inmaduras, dañadas o viejas. Esta también se puede presentar durante los tratamientos previos como la extracción de semillas o como resultado de problemas de higiene en el área donde se realizan las pruebas de semillas. Para minimizar el riesgo de contaminación por hongos, se puede adoptar las siguientes prácticas de laboratorio (FAO 2006):

-Limpiar y desinfectar el área de prueba (esterilizando las superficies con alcohol a 70-95% o blanqueador doméstico a 20%) al igual que las incubadoras, entre tandas de procesamiento, para limitar la dispersión de los hongos. Una técnica simple, pero efectiva, para reducir la contaminación es lavar las manos, los módulos de trabajo y el interior de las incubadoras con jabón y agua caliente.

-Distribuir las semillas adecuadamente y asegurarse de que no se toquen unas con otras. Si es necesario, utilizar más repeticiones.

-Proporcionar un ambiente óptimo para la germinación de manera que las semillas germinen rápidamente. El régimen de temperatura debe ser adecuado y el ambiente de prueba debe estar bien ventilado.

-Asegurarse de que los recipientes y medios de las pruebas de germinación estén limpios de manera que no constituyen fuentes de inóculo. Esterilizar la superficie de los recipientes frotándolos con alcohol a 70-95%, o sumergiéndolos en blanqueador a 20% o agua caliente, a 55°C, durante 10-15 minutos.

-Evitar el daño por imbibición (mediante la humificación previa de las semillas) que podría conducir al escape de contenido celular, el cual provee nutrientes para los hongos.

-Eliminar rápidamente las semillas en descomposición para prevenir la dispersión de hongos hacia las semillas vecinas. Si la contaminación está en aumento, se debe lavar bien las semillas en blanqueador al 1-10% y reiniciar la prueba en un recipiente limpio sobre un sustrato nuevo.

-Cuando se descubra que las estructuras que recubren la semilla (como las glumas) son fuentes de infección, hay que eliminarlas antes de realizar las pruebas.

-Eliminar las semillas que han germinado antes de la cosecha y se han secado, ya que pueden ser fuentes de infección”.

Así como estas prácticas minimizan el riesgo de contaminación por hongos, cubrir las semillas con fungicidas como Tiram o Benlate, o esterilizar las superficies con hipoclorito de sodio, reduce el ataque de hongos durante las pruebas de germinación. Sin embargo, el uso de fungicidas puede afectar los resultados de las pruebas de germinación, y puede constituir una amenaza para la salud de quienes analizan esencial aunque son muy útiles durante la siembra en el campo para la regeneración.

La sanidad de las semillas se refiere al estado de enfermedad de una muestra de semillas y a la presencia o ausencia de organismos y plagas que causan enfermedades. Las pruebas de sanidad determinan el estado de una muestra, de un lote de muestras o de una accesión con respecto a enfermedades que afectan ese cultivo. Estas pruebas son importantes porque con frecuencia, los cultivos se infectan con una variedad de patógenos comunes transmitidos a través de las semillas, que pueden no ser visibles o reconocidas con facilidad durante la colecta.

Después de la determinación de la sanidad de las semillas, se debe de hacer pruebas para verificar la introducción inadvertida de transgenes. Los transgenes son genes que se introducen en otro organismo o especie mediante técnicas de ADN recombinado. Las plantas transgénicas portan en sus genomas y los transmiten a su progenie a través de la reproducción normal. Uno de los componentes más importantes en el manejo adecuado de un banco de germoplasma es la realización de pruebas para verificar la presencia de un gen o fenotipo por varias razones:

-Problemas de reglamentación, en especial relaciones con fitosanidad o bioseguridad, en donde el país de importación, y potencialmente el país de exportación, requieren informes sobre la presencia de dichos genes.

-Situaciones en las cuales la presencia de dicho gen o transgen podría afectar los derechos de propiedad intelectual bien sea en el país en donde el banco de germoplasma se encuentra localizado o en el país a donde se enviará la accesión.

-Problemas sociales que requieren que se declare la identidad genética o que se limiten ciertos genes o transgenes.

Después de asegurarse del estado de sanidad de las semillas, viene la etapa del empaque. El **empaque** de las semillas se refiere a la colocación de una muestra de semillas, contada y pesada, en un recipiente, que luego se cierre herméticamente para almacenamiento posterior (diagrama de flujo 1.7. Anexo II).

Las semillas se empacan para:

- Evitar que absorban agua de la atmósfera después del secado.
- Mantener las accesiones separadas y evitar que se mezclen.
- Prevenir la contaminación de las muestras con insectos y enfermedades.

Para el empaque se pueden utilizar recipientes de diferentes tipos, la selección depende de las condiciones de almacenamiento y de la especie. Es importante que el material de empaque sea totalmente impermeable al agua y adecuado para el uso a largo plazo. De acuerdo con las Normas para Bancos de Genes publicadas por la FAO y el IPGI (1994), 3.000 semillas son un número aceptable para representar materiales que muestran poca variación morfológica (accesiones genéticamente homogéneas), aunque se prefieren 4.000 por accesiones. Para los materiales que muestran gran variación morfológica (accesiones heterogéneas genéticamente), deben mantenerse por los menos 4000 semillas por accesión aunque preferiblemente 12.000. En los bancos es más fácil trabajar con unidades de peso, pero el número de semillas se puede convertir fácilmente a partir del peso si se conoce el peso de 100 semillas.

El **almacenamiento** de las semillas es la preservación de las semillas en condiciones ambientales controladas para que mantengan la viabilidad durante periodos prolongados.

Muchos de los recursos fitogenéticos que pueden ser vitales para el desarrollo agrícola y la seguridad alimentaria en el futuro se ven amenazados por la erosión genética (pérdida de diversidad), por lo que la FAO (2006) consideró necesario disponer de mejores inventarios de los recursos presentes todavía *in situ* y de evaluaciones detalladas de la diversidad genética de las colecciones *ex situ* para tener informaciones con vistas a las actividades futuras y medir los progresos que se vayan realizando en la conservación de los recursos fitogenéticos.

Los métodos de conservación de recursos fitogenéticos pueden clasificarse en dos grandes categorías: métodos de conservación *ex situ* y métodos de conservación *in situ*. Estos últimos consisten en preservar las variedades o poblaciones vegetales en sus hábitats

originales, mientras que en los primeros la conservación se realiza en los bancos de germoplasma (Martín Martínez. I.).

- Conservación *ex situ* (Martín Martínez, CRF-INIA. 2001).

La conservación *ex situ* implica el desarrollo de colecciones de recursos fitogenéticos y presenta ventajas de tipo práctico frente a la conservación *in situ* ya que, al concentrarse el material genético y la información asociada al mismo, se reducen costes, se mejora el control y se facilita enormemente el suministro de material a científicos y usuarios en general. Sin embargo, este tipo de conservación, por su carácter estático, tiene el inconveniente intrínseco de no permitir la continuación de los procesos evolutivos. Asimismo, no se puede dejar de tener en cuenta el riesgo de pérdida de materiales por accidentes o por erosión genética dentro del propio banco, aspecto que puede ser muy importante si no existen medios suficientes para un adecuado desarrollo del trabajo y que ha de producir pérdidas irremplazables en las colecciones. La conservación puede clasificarse en las categorías siguientes:

- Conservación del organismo completo: conservación en campo.
- Conservación de parte del organismo.
- Conservación de semillas.
- Conservación de otros órganos con capacidad de regeneración: conservación de tejidos *in vitro* (colecciones de germoplasma que se conservan como tejido vegetal en un rango que se va desde los protoplastos y las suspensiones celulares hasta los cultivos de callos, meristemas y embriones (Rao *et al.* 2007).

La conservación de semillas es la más utilizada en los bancos de germoplasma, resultando el método más eficiente, económico y seguro para la conservación *ex situ* de la mayoría de las especies de las zonas templadas, cuyas semillas son capaces de permanecer viables largo tiempo bajo determinadas condiciones (semillas ortodoxas) (Rao *et al.* 2007). En el CRF la judía se conserva *ex situ*.

- Conservación *in situ* (Martín Martínez, CRF-INIA. 2001).

Idealmente, la forma más apropiada de conservar una entidad biológica es dentro del ecosistema del que naturalmente forma parte. En la conservación *in situ* no solo se preservan cada uno de los componentes del ecosistema sino también todas sus relaciones recíprocas y se permite la continuación de los procesos evolutivos de las plantas. La conservación *in situ* resulta especialmente adecuada en las especies silvestres y presenta menos problemas que en

las plantas cultivadas debido a que sus hábitats son ecosistemas naturales en los que no interviene la acción humana.

Existen dos modalidades de conservación de los recursos genéticos almacenados en forma de semilla: las *colecciones base* y las *colecciones activas* (Rao *et al.* 2007).

- Colecciones de base: se define como un conjunto de adhesiones, las cuales deberán ser distintas y, en términos de integridad genética, lo más cerca posible a la muestra prevista originalmente, que se conserva para el futuro a largo plazo. Normalmente, las semillas no se distribuyen directamente a los usuarios de las colecciones base.
- Colecciones activas: comprenden las adhesiones que están disponibles inmediatamente para la multiplicación y distribución para su uso.

Las condiciones de almacenamiento para colecciones base se pueden resumir que las temperaturas aceptables son: temperaturas bajo cero ($<0^{\circ}\text{C}$) con un contenido de humedad de las semillas 7,3% (dependiendo de la especie y periodo de almacenamiento). Preferentemente a -18°C o más fría con un contenido de humedad de las semillas 3,7% (dependiendo de la especie y periodo de almacenamiento). El contenido de la humedad planteado pueda que haya una necesidad de cambiarlo en algunos casos excepcionales cuando haya una evidencia de que pueda haber problemas con el contenido de humedad como por ejemplo en el caso de rotura de semillas. No hay que exagerar los beneficios de la reducción de la temperatura en comparación con los contenidos de humedad, es decir que la longevidad se incrementa en un factor de casi 3 si la temperatura de almacenamiento se reducirá de 20°C a 10°C , un 2,4 de 10°C a 0°C , un 1,9 de 0°C a -10°C , pero solo un 1,5 de 10°C a -20°C . Por lo contrario, el beneficio relativo a la longevidad de la reducción del contenido de la humedad: varía entre especies (en relación de equilibrio entre el contenido de humedad de la semilla y la humedad relativa) y se convierte en mayor de cada una de las reducciones sucesivas en el contenido de humedad. Si las semillas se almacenan en seco o extremadamente seco, es necesario que todas las semillas estén acondicionadas o humedecidas (mediante la colocación en un ambiente muy húmedo, generalmente durante la noche, pero de vez en cuando un poco más en el caso de las semillas de gran tamaño) antes de la prueba para la germinación. En cuanto a las colecciones activas, éstas se mantienen en condiciones que aseguran que la viabilidad de la adhesión se mantendrá por encima del 65% de 10 a 20 años, siendo la única norma que debería estar garantizada (FAO/IPGRI. 1994).

Es importante tener un duplicado de seguridad, es decir una submuestra genéticamente idéntica de la accesión que esta almacenada en otro sitio (preferiblemente fuera del país) a manera de seguro contra la medida del material. El duplicado de seguridad incluye tanto el material como la información que se relaciona con él. Los bancos de germoplasma pueden decidir almacenar muestras de germoplasma que no necesitan estar representadas en una colección base o distribuirse, como una 'colección archivo'. Estas muestras se mantienen en condiciones optimas para supervivencia a largo plazo, pero sin inversión adicional en monitoreo y regeneración.

La **distribución** de germoplasma es el suministro de muestras representativas de accesiones de semillas de un banco de germoplasma, en respuesta a solicitudes de los usuarios del germoplasma. En general, las semillas se distribuyen únicamente a partir de colecciones activas (diagrama de flujo 1.8) (Rao *et al.* 2007) (Anexo II).

El último paso es el **monitoreo y regeneración** del germoplasma. El monitoreo es la verificación regular de la calidad (viabilidad) y cantidad (número o peso) de las accesiones de germoplasma almacenadas en un banco. El objetivo del monitoreo es determinar si hay que regenerar o multiplicar una accesión. Las semillas se monitorean porque (Rao *et al.* 2007):

- La viabilidad de las semillas almacenadas en un banco de germoplasma disminuye durante el almacenamiento y es necesario monitorearla para garantizar que las semillas no pierdan su capacidad de producir plantas viables cuando se requiera.
- Retirar semillas para distribución y para pruebas de germinación en el tiempo disminuye la cantidad de semilla disponible.

Las normas para Bancos de Genes publicadas por la FAO y el IPGRI (1994) recomiendan que la primera prueba de monitoreo se haga después de haber almacenado las semillas durante 10 años, en colecciones base mantenidas en condiciones preferenciales (-18°C), con una viabilidad inicial alta (germinación superior a 90 %). Las semillas de especies que se sabe son de poca longevidad, incluyendo la mayoría de los cultivos oleaginosos y las accesiones con una viabilidad inicial relativamente baja (germinación de 85-90 %), al igual que todas las semillas almacenadas en colecciones base y activas en condiciones preferenciales, se deben monitorear a los cinco años para verificar la viabilidad. El monitoreo se realiza tal y como se muestra en el diagrama de flujo 9.1 (Anexo II).

La **regeneración** del germoplasma es la renovación de sus accesiones mediante la siembra y la cosecha de semillas con las mismas características de la muestra original. Es la operación más crítica en el manejo de un banco de germoplasma. Implica riesgos para la integridad genética de las accesiones procedentes de presiones de selección, polinización cruzada, mezclas mecánicas y otros factores. Por lo general, el riesgo de pérdida de la integridad genética es alto cuando se regeneran accesiones genéticamente heterogéneas. Es una etapa muy costosa. Rao *et al.* (2006) resume en tres párrafos las razones por las que el germoplasma se regenera:

- Incrementar la cantidad inicial de semilla: en las colecciones o materiales nuevos que se reciben como donaciones, la cantidad de semillas que recibe el banco de germoplasma es con frecuencia insuficiente para conservarla directamente.
- Recuperación de las reservas de semillas de colecciones base y activas.
- Cumplimiento de requerimientos especiales: puede haber requerimientos especiales para regenerar accesiones con caracteres especiales que los fitomejoradores e investigadores utilizan con frecuencia -como accesiones de alto rendimiento, resistentes a enfermedades y plagas, y reservas genéticas- o si no hay semilla suficiente para hacer un duplicado de seguridad y repatriar.

2.2. La judía (*Phaseolus vulgaris* L.)

2.2.1. Introducción general

Las plantas conocidas como “leguminosas grano” tienen un gran interés en la alimentación humana por su gran contenido en proteínas que podría ser un excelente sustituyente de las proteínas animales para muchos países con problemas de alimentación, además de su gran contenido en hidratos de carbono que proporcionan un bajo índice glicémico debido a la composición de almidón y de fibra dietética, hierro y calcio, bajo contenido en grasas (Información extraída de una reunión de expertos de LINK (*Red interactiva de Leguminosas, legume Interactive Network*) organizado por la AEP (Asociación Europea para la Investigación de Leguminosas de Grano, *European Association for Grain Legume Research*) y el INRA (Instituto Nacional de Investigación Agronómica, *Institut national de la recherche agronomique*), agrupada en folleto: Legumbres, alimentos sanos).

En este trabajo fin de carrera nos concentraremos en las semillas de la *Phaseolus vulgaris* L. o la conocida con el nombre común de “judía”. Su origen americano parece claro, aunque ha habido controversia al respecto. Su propio nombre, “faseolus”, es de origen griego; sin embargo, Koernicke (1885) y Penzig (1905) (cf. Fronés, 1982), entre otros, consideran que la semilla descrita por autores griegos como Dioscórides y Theofasto, y la que cita Homero en la Iliada corresponde a *Vigna sinensis*, mientras que la judía se conocería en Europa desde 1597 (Puerta, 1961). A los restos más antiguos, encontrados en México, se les atribuye una antigüedad de 4000 años a de C., precediendo en 1000 años al maíz (MAPA, 1984). Hoy en día se considera que existen dos centros de origen, el andino y el mesoamericano (Gepts, 1988, cf González 2000).

2.2.2. Importancia económica: producción mundial, en España y otros países

De las leguminosas grano, la judía es una de las más usadas para el consumo humano con una producción mundial en el año 2009 cercana a 20 toneladas algo inferior a la del año 2008 (FAOSTAT), mientras que la producción de semillas de judía para cultivar ha sido en el año 2009 de 1.082.494 t, siendo la producción en África de un total de 247.664 t de semillas mientras que la producción en Europa no llega a 32 mil toneladas de semillas.

España ocupa el cuarto puesto en la producción de las leguminosas mientras que en la judía no llega a ser una de los 20 primeros países productores. La producción de judía no ha sido estable siendo ésta en el año 2000 de 13.279 t decreciendo en el año 2008 a 7.000 t y en el año 2009 de 12.500 t según las últimas estadísticas de la FAO, y según la encuesta sobre superficies y rendimiento de cultivos (Resultados Nacionales y Autonómicos) hecha por el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MARM), la superficie cultivada en España en el año 2009 creció un 3% dividida entre las judías secas con una superficie de 4187 ha y la judía verde con un total de 2959 ha, siendo las cuatro primeras comunidades con mayor superficie total dedicada al cultivo de la judía, sea en secano, en regadío o bien en invernadero las siguientes: 1-Comunidad Castilla León. 2-Comunidad de Galicia. 3-Comunidad de Cataluña. 4- Comunidad Andaluza.

En cuanto a la superficie de invernadero cultivada, Andalucía ocupa el primer lugar con un total de 286 ha de judía verde. Pero si hablamos de la cantidad de semillas para cultivar en el año 2009, fue de 5.000 toneladas (FAOSTAT).

Con el fin de disminuir riesgos y aumentar la productividad, es imprescindible sembrar semillas sanas para empezar una cadena de obtención de productos sanos que incluya todos los cultivos del sistema extensivo (Luque y Scandiani, 2009).

2.2.3. Descripción botánica y características generales de la planta y de la semilla (Mármol, 2005)

- **Planta**

La judía verde es una planta anual y herbácea, de vegetación rápida, cuyas variedades se clasifican generalmente por su porte: de enrame con crecimiento indeterminado, con tallos que pueden alcanzar los 3 metros de altura y que necesitan durante su crecimiento soporte por medio de tutores, alcanzado fácilmente la techumbre del invernadero; y las de porte bajo o enanas, 50 cm de altura y menos productivas.

La raíz es el órgano que sirve de sostén a la planta y encargada de la absorción de los alimentos. La judía verde presenta un sistema radicular muy ligero, con una raíz principal (axonomorfa), que no alcanza gran profundidad y numerosas raíces secundarias. En terreno arenado presenta una o dos raíces pivotantes que se ramifican en otras tantas de las que

surgen otras raicillas secundarias, y de éstas otras aun más delgadas. Con ello se conforma un sistema radicular que alcanza 30-35 cm de profundidad y un desarrollo horizontal de 20- 25 cm, ocupando, aproximadamente, un volumen de tierra de 15.000-25.000 cm^3 . En la base del tronco se observa un alto porcentaje de raicillas, consecuencia de la mayor concentración de fertilizantes y de agua. El desarrollo radicular depende del sistema de cultivo, siendo más superficial en los terrenos enarenados, las características del suelo, su contenido en nutrientes y su disponibilidad van a determinar la conformación del volumen radicular.

En cuanto al tallo, es el eje principal de la planta y se origina a partir del meristemo terminal del embrión de la semilla, generando durante su desarrollo nudos que son el punto de inserción de las hojas. Su alargamiento tiene lugar únicamente en las zonas terminales donde radican los meristemos. Además de órgano de sostén, permite que a su a través y por los vasos conductores circule la savia que ha de nutrir la planta. En variedades enanas es erguido, con una altura que no llega a los 50 cm. En variedades de enrame su tallo voluble alcanza en cultivo los 3 m de altura.

La judía verde posee un tallo principal herbáceo, delgado, flexible, ramificado, voluble y áspero al tacto. En un orden ascendente aparece primeramente el nudo de los cotiledones. El siguiente nudo lo constituye el de las hojas primeras que son opuestas. En las axilas de las hojas aparecen las yemas que desarrollaran después las ramas laterales y las inflorescencias.

En las hojas se realizan las funciones de nutrición (respiración, fotosíntesis, transpiración, etc.), así como la formación de las sustancias de reserva que se acumularan posteriormente en los frutos. Las hojas son grandes, alternas, sencillas, lanceoladas, acuminadas, pinatrfoliadas con pequeños estipulas en la base, trifoliadas con peciolo largo que termina en tres foliolos grandes, acabados en punta y de superficie ligeramente áspera; acorazonados y unidos por la base, con zarcillos enrollados y de tamaño variable según le edad.

El primer par de hojas verdaderas son simples, opuestas, acorazonadas y aparecen en el segundo nudo de tallo, desprendiéndose antes del desarrollo de la planta. El resto de hojas son trifoliadas, dispuestas de forma alterna con peciolo largo e insertado en los nudos del tallo t de las ramas laterales.

El color de las hojas va del verde claro al verde oscuro, dependiendo de la variedad. Se observa, a veces, manchas pequeñas y blanquecinas como consecuencia de la existencia de

genes que determinan una demonomancia sobre el color verde uniforme de la hoja. Esto es consecuencia de una deficiencia clorofílica que se manifiesta por pequeñas manchas circulares amarillas, que pueden cubrir caso toda la hoja. El gen que determina este carácter no es dominante no recesivo con el gen del verde normal, pero se halla en estado homocigótico las manchas son grandes, y si es heterocigótico son pequeñas y menos numerosas. Cuando falta por estar en el gen del color verde normal en estado puro, las manchas desaparecen.

Al final de cada tallo (variedades enanas) o en la axilas (variedades de enrame), nacen las inflorescencias. La judía verde tiene flores hermafroditas, generalmente autógamas, de simetría bilateral, con periantio doble, y flores de diferentes colores: blancas, rosadas, o blanquecinas, violetas, etc., dependiendo de la variedad cultivada, aunque en las variedades más importantes suele ser de color blanca, inflorescencias en racimos sencillos de 2- 8 flores, cuyo pedúnculo nace en las axilas de las hojas en las variedades trepadoras y con inflorescencias terminales en las variedades enanas, observándose en ella tres partes: el eje de la inflorescencia, las brácteas primarias y los botones florales.

El pedúnculo floral une la flor al tallo y termina en el receptáculo floral. En él se encuentran los verticilos florales: cáliz y corola.

La polinización de la judía verde es, principalmente, autógama o directa, por lo cual el polen se deposita en el estigma de la propia flor. Para ello el androceo y gineceo maduran al mismo tiempo, de tal modo que cuando se produce la deshidratación de las anteras el estigma está en condiciones de recibir el polen.

Los frutos de la judía están formados por una vaina bivalva o legumbre, en cuyo interior están las semillas. De textura carnosa y superficie lisa. El color de las vainas es de color verde liso hasta la época de la maduración; luego, dependiendo de la variedad, pueden, ser amarillas, verdes, jaspeadas de color marrón sobre verde o rojo, aunque el color verde domina sobre el amarillo. No obstante, el color más apreciado por los consumidores es el verde. Las vainas son también de forma diferente: cilíndricas, planas, alargadas, y sus dimensiones varían igualmente con la variedad: 5, 10, 15, 20, 30 cm de longitud e incluso mas, y de 0,5 cm a 1,5 cm de grosor las cilíndricas, y 1-3 cm de ancho las variedades planas.

Por regla general, los frutos o vainas suelen contener de 4-10 semillas, pero en tiempos fríos, con temperaturas muy bajas, fecundan pocas semillas y las vainas suelen engancharse,

depreciándose para el mercado. Las vainas suelen ser más o menos dehiscentes, correspondiendo a las variedades de judías que se consumen en verde la característica de ser fuertemente indehiscentes.

- Semillas

La semilla se puede definir de varias formas: “es la parte del fruto que colocada en condiciones adecuadas, da origen a una nueva planta”, otra forma: “es el óvulo fecundado y maduro”. O bien según Besnier (1989), “las semillas son unidades de diseminación y reproducción sexual de las plantas superiores, procedentes del desarrollo de los óvulos de sus flores”. También se considera semilla a: “un fragmento o parte de un vegetal, provisto de yemas como: tubérculos, bulbos, esquejes, varetas”, entre otros (Guía Técnica de Semilleros y Viveros Frutales, Ministerio de Agricultura y ganadería: Programa Nacional de Frutas de El Salvador. 2005).

Según el BOE (Ley 30/2006, de 26 de julio, de semillas y plantas de vivero y de recursos fitogenéticos, BOE nº 178, de 27 de julio 2006), se entiende por semillas los elementos que, botánica o vulgarmente, se designan con este nombre y cuyo destino es el de reproducir la especie o establecer cultivos, así como los tubérculos, bulbos y otros órganos y material vivo que se utilicen con tales fines.

Las semillas de judía tienen una forma arriñonada y globosa (figura 2.2.3), cuya estructura está formada por dos cotiledones gruesos, y cuyo albumen o endospermo sirven de reserva alimenticia a la planta en su primera fase de desarrollo, así como de protección al embrión cuando se abre camino entre la tierra.

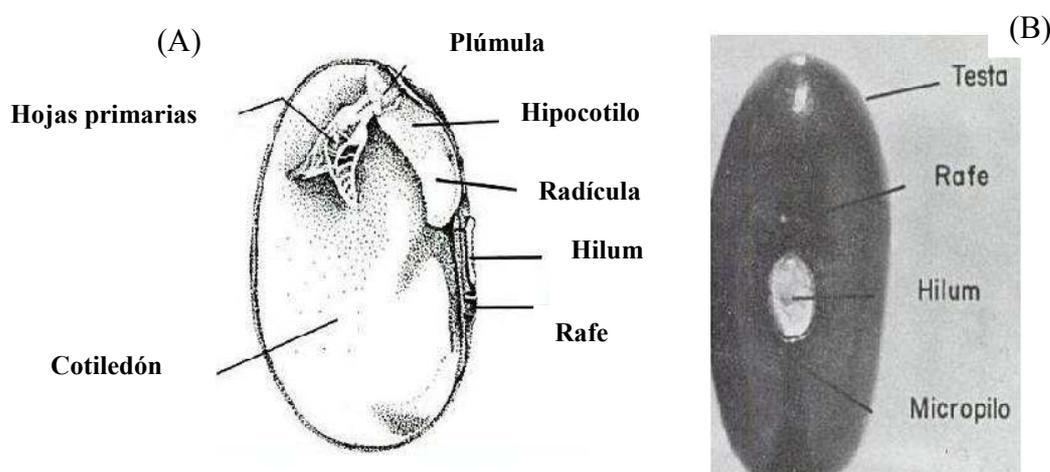


Figura 2.2.3. Partes de semilla de judía. (A) Partes internas. (B) Partes externas.

Si observamos una semilla externamente, por su parte central y cóncava aparece el hilo o cicatriz del panículo que lo unía a la placenta, el micropilo a través del cual penetra el agua en la semilla. La semilla contiene un embrión ya diferenciado en hoja, tallo y raíz, siendo las primeras hojas embrionarias o cotiledonales muy distintas a las hojas ordinarias (Mármol, 2005).

Su poder germinativo habitual suele durar de 2-3 años. Cien gramos de semillas contiene, normalmente, entre 150 y 350 semillas. La germinación varía entre 4-8 días dependiendo de la temperatura y del ciclo de cultivo.

2.2.4. Sistema de cultivo, enfermedades y plagas del cultivo. (Llanos 1998).

2.2.4.1. Sistemas de cultivo.

- Alternativas y preparación del suelo

Puede convenirle casi cualquier posición respecto a otras plantas en la alternativa, siempre que no se repita en dos o tres años. Las que menos le convienen son las combinaciones con coles, coliflores y rábanos, y no es recomendable que suceda a guisantes y habas.

La preparación del suelo, previa a la siembra, empieza por una labor semiprífunda (25 a 30 cm), con la que se envuelva el estiércol. Si se desinfecta el suelo, una vez transcurrido el tiempo preceptivo, se vuelve a labrar a menos profundidad. Sigue el aporte del abonado de fondo y a continuación se dan dos labores superficiales (15 cm) con grada o cultivador.

Para el cultivo en invernadero, después de limpiar el suelo de los restos de la cosecha anterior, se deshacen los lomos dejando llana la superficie enarenada. Sigue la desinfección del suelo (facultativa) y la incorporación del abonado de fondo. El paso de una grada de púas sirve para mullir la arena, antes de hacer los tablares y las regueras, necesario solo si se va a regar por gravedad.

- Fertilización

La judía necesita bastante materia orgánica que se debe aportar en forma de estiércol bien fermentado, ya que el estiércol fresco la perjudica. E no disponer de estiércol bastante

hecho. Puede aportar al cultivo anterior o, en cualquier caso y como mínimo, 2 meses antes de la siembra. La dosis puede variar entre 20 y 30 t/ha. En los enarenados, con el tranqueo, el primer estiércol, si es abundante y sobre todo si no está bastante fermentado, puede perjudicar la germinación de las semillas y comprometer el resultado del cultivo. En cualquier caso, en los enarenados, el mayor beneficio para la cosecha cabe esperarlo dos años después de la primera estercoladura. La judía es muy exigente en nitrógeno (N) y potasio (K), y menos en fósforo (P). El primero favorece el rápido desarrollo vegetativo de la planta y el potasio mejora la calidad del fruto. El nitrógeno en forma asimilable debe estar disponible en el suelo en los primeros estados de crecimiento (cuando las raíces todavía no han desarrollado las nudosidades fijadoras) u en periodos fríos en los que la nitrificación es nula o poco activa.

- Riego

El cultivo de judía es exigente en agua, por lo que en la mayoría de nuestros climas solo con el riego se pueden conseguir cosechas económicamente rentables. Las necesidades de agua son muy elevadas poco antes de la floración y después de esta, o lo que es lo mismo, aproximadamente a partir de la cuarta semana. En los primeros estadios de desarrollo conviene mantener el suelo con poca humedad.

El exceso de humedad puede provocar clorosis y pérdida de cosecha. Sobre todo en suelos pesados. Un aporte desequilibrado de agua puede ser igualmente dañino, repercutiendo negativamente sobre la calidad de los frutos. Un riego consecutivo a la siembra puede crear costra en el suelo y dificultar el nacimiento de las plantas, por lo que el primer riego solo deberá darse después de nacidas las plantas. Dos a cuatro días antes de sembrar se dará un riego para facilitar la siembra, la germinación de las semillas y la naciente de las plantas.

En suelos arenosos, la cadena de los riegos puede variar entre los 4 y los 6 días. En suelos de consistencia media, entre los 6 y 10, y en los suelos pesados (arcillosos) de los 10 a los 15 días. Se aconseja regar después de cada recogida de vainas, con el fin de reponer rápidamente a la planta de las pérdidas debidas a la cosecha y acelerar el crecimiento y la maduración de los frutos que quedan.

En cultivos en invernadero no conviene regar en las horas de máximo calor; ya que el exceso de evapotranspiración puede deshidratar las plantas. Con temperaturas elevadas conviene ventilar el invernadero antes de regar. El riego por aspersión en los invernaderos puede perjudicar la vegetación y producir pérdidas de frutos. El riego localizado es, e,

cualquier caso, el más recomendable debido a la facilidad con que se puede dosificar el agua, según las necesidades del cultivo, y la que supone poder aportar los abonos por medio del agua de riego adaptándolos con gran aproximación al estado del suelo y de las plantas.

- Siembra y labores durante el cultivo

Se siembra directamente a golpes de 2/4 semillas, a una profundidad aproximada de 3 cm. Se vienen a gastar de 120 a 140 kg de semillas por hectárea. El terreno debe estar en buen tempero para recibir la semilla, para lo que se dará un riego previo. El empajado, después de la siembra, puede mejorar el nacimiento y posterior desarrollo de las plantas. Al producirse la nascencia hay que retirar la paja de encima de las plantitas para evitar que se “ahoguen”. El cultivo de judías de enrame, con un marco de plantación amplio, puede permitir un acolchado parcial que solo cubra las interlineas entre las plantas después de nacidas. El acolchado únicamente es eficaz en siembras de otoño o invierno.

Inmediatamente después de nacidas las plantas conviene dar una labor de bina con la que se rompe la capa superficial, más o menos endurecida, y de eliminan las malas hierbas. Las demás labores superficiales tienen por objeto mantener el suelo limpio de plantas adventicias.

En cultivo enarenado, conforme las plantas van creciendo, se van aporcando los huecos que dejaron los “golpes” de la siembra. Si se sombro en amelgas se hizo en surco, los aporcados dejarán las plantas sobre un pequeño lomo o caballón.

En las judías de enrame, cultivadas en invernadero, es conveniente hacer un aclareo de hojas para mejorar la ventilación y la iluminación en el interior de las plantas. Esta práctica puede mejorar la floración, el cuajado de los frutos y reducir el riesgo de enfermedades criptogámicas. Precisan de entutorado y en los invernaderos la mejor forma de guiar las plantas es mediante cuerdas o rafia suspendidas del techo. Las paredes o empalizadas verticales y las pirámides con cañas u otros tipos de tutores son igualmente eficaces.

- Recolección

La recogida debe iniciarse antes de que las semillas empiecen a destacar a través de la vaina. Si se cosecha antes de que las vainas lleguen a su máximo tamaño, se puede incluso conseguir más rendimiento, ya que al descargar la planta se estimula la floración y se producen más vainas por planta. Hay que tener en cuenta que al cosechar las judías mas

tiernas se puede producir más porcentajes de rendimiento final. Las condiciones y tiempo de almacenaje, así como la resistencia de la variedad una vez cosechada, decidirán sobre la conveniencia de anticipar o no la recogida de las vainas.

Si las vainas se cosechan pasado el punto de madurez comercial, pierden calidad y valor, debido a ser más duras y fibrosas (vainas con hebra). Los retrasos en la recolección resultan doblemente perjudiciales debido a que a la pérdida de valor comercial hay que añadir la pérdida de peso. Las reservas que la planta destina a engrosar las semillas se pierden para la formación de más floras y vainas.

La recolección no debe hacerse con rocío, ni durante las horas de más calor. Desde que salen las primeras flores hasta que se recolectan sus vainas transcurren entre 7 y 12 días, dependiendo de la época, el clima del lugar y la variedad. En variedades de porte bajo, la recolección puede durar de 50 a 90 días y en judías de enrame de 65 a 95.

La producción de vainas de judías enanas puede variar entre 1 kg/m² en cultivos de otoño –invierno sin calefacción, y de 2 a 3 en cultivos de verano. En variedades de enrame, la producción por m² puede acercarse a los 4 kg. Un cosechador puede coger de 80 a 100 kg de vainas por jornada

2.2.4.2. Enfermedades y plagas del cultivo

Según las fichas de diagnóstico en el laboratorio de organismos nocivos de los vegetales (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, MARM) las enfermedades indicadas en la judía son las siguientes:

- **Micosis**
 1. Antracnosis, cuyo agente incitante es el hongo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc y Magn.) Scribner, diagnosticado por González Fernández, A. J y Landeres Rodríguez, E. Ficha 32. (Teleomorfo: *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld y Schrenk.

Este hongo también afecta a varios cultivos además de a *P. vulgaris* a otras especies de *Phaseolus* como *P. coccineus*, *P. aureus*, *P. lunatus*, *P. mungo* y *P. radiatus*, *Vicia faba*, *Vigna unguiculata*. Aunque sólo tiene importancia en *P. vulgaris*.

Los daños más característicos y distinguibles se encuentran en las vainas, en las que el hongo produce lesiones hundidas, redondas u ovaladas, de color oscuro sobre las que, a veces, se pueden observar acérvulos del hongo de color rosa salmón (González, 1996). Manchas similares se pueden encontrar en tallos y cotiledones de planta joven. La infección de las vainas afecta a las semillas en las que se pueden apreciar manchas oscuras, aunque no siempre ocurre así.

Las medidas más efectivas para combatir la enfermedad, son en primer lugar, emplear semillas sanas, seguir una rotación adecuada de cultivos. Un campo atacado por antracnosis debe dejarse por lo menos 2 años sin sembrar de judías, no dar labor alguna y no penetrar en el campo mientras las plantas están húmedas, para no extender la enfermedad a las matas sanas (Puerta, 1961). También se puede optar por el uso de cultivares resistentes al hongo. En el caso de las variedades que no pueden ser sustituidas, como es la judía granja asturiana, hay que abordar un programa de mejora para la introducción de dicha resistencia (González *et al.*, 2004). Según Puerta (1962), los tratamientos químicos eran diversos, desde pulverizar con caldos cúpricos (caldo bordelés al 1%) dando dos tratamientos: el primero cada 15 ó 20 días nacidos, y el segundo a los 10 ó 15 días después de la floración, hasta tratamientos que incluyen benomilo y tiofanato de metilo según Hall (1991).

2. Mildiu de la judía, agente causal *Phytophthora phaseoli* Thaxter diagnosticado por Berra Lertxundo, D. Ficha 192.

Afecta exclusivamente a especies del género *Phaseolus*. Ataca la parte aérea del vegetal; en el envés de las hojas, en los tallos jóvenes y en los frutos se observa una vellosidad blanquecina que corresponde al micelio y fructificaciones del hongo.

3. Roya de la judía, causada por el hongo *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger, diagnosticado por Berra Lertxundi, D y Mendia Isusi, E. Ficha 266.
(*Uromyces phaseoli* (Pers.) Winter.)

U. appendiculatus afecta a muchas especies *Phaseolus* y algunas del género *Vigna*. Los síntomas iniciales aparecen en el envés de las hojas como pequeñas manchas blanquecinas que van virando a color marrón a medida que se expanden, llegando a alcanzar las pústulas maduras un diámetro de 1-2 mm.; posteriormente, la infección llega a invadir el haz foliar y, más raramente las vainas. En infecciones graves se producen defoliaciones y pérdidas en cosecha.

Otras enfermedades causadas por hongos según Messiaen *et al.* (1995), Smith *et al.* (1992), no incluidas entre las fichas proporcionadas por el MARM, se consideran importantes en el cultivo de la judía, de las cuales citamos:

1. Fusariosis

Es el nombre común para todas las diversas enfermedades causadas por el hongo del género *Fusarium*. Distinguiéndose dos patologías, una vascular y otra radicular dependiendo de su habilidades parasitaria de ocasionar síntomas marchitez y amarilleamiento o pudrición radicular (González *et al.*, 2004).

Los síntomas iniciales de *Fusarium oxysporum* son leves con un ligero amarilleamiento y senescencia prematura de las hojas inferiores. Los síntomas cloróticos a continuación aparecen inmediatamente en las hojas superiores del tallo y continúan progresivamente en toda la planta (Hall, 1991). Poca información es disponible para el control de la enfermedad. Se recomienda cultivos tolerantes o resistentes donde es posible, rotaciones de cultivos, reducción de la compactación del suelo y el tratamiento de las semillas puede ser útil (Hall, 1991).

En cuanto a *Fusarium solani*, es el causante de la podredumbre de la raíz, la enfermedad generalmente causa pocos daños en la planta que no sufre estrés. Sin embargo, en condiciones de reducción del crecimiento de raíces causado por la sequía o el estrés de oxígeno, la pudrición de raíz casi puede destruir el cultivo de judía (Hall, 1991). Para combatir la enfermedad es importante tratar a las semillas (Puerta, 1961), porque el tratamiento químico de un cultivo infectado no suele tener éxito judía (Hall, 1991).

2. Podredumbre blanca

El hongo causante de la enfermedad es *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary. Las flores infectadas pueden desarrollar una apariencia blanca, algodonosa como un micelio que crece sobre la superficie. Las lesiones en las vainas, hojas, ramas y tallos son inicialmente pequeñas, circulares, de color verde oscuro pero rápidamente aumentan de tamaño y pueden llegar a matar a toda la planta. El control químico es difícil cuando las plantas desarrollan abundantemente. La rotación con cereales o con maíz puede reducir el inóculo inicial (Hall, 1991).

3. Rizoctoniosis

En judía lo provoca el hongo *Rhizotocnia*. La infección causada se manifiesta por unas pequeñas manchas necróticas con centro de color marrón y márgenes de color verde olivo. Las lesiones pueden aumentar de tamaño con rapidez, volviéndose irregulares. Las partes infectadas de la planta tales como las hojas, los peciolo, las flores y vainas se cubren rápidamente por unos pequeños esclerocios y micelio de color marro. La semilla puede ser infectada en el endospermo y radícula del embrión o también puede ser infestada por el micelio y esclerocios en la capa superficial (Hall, 1991). El tratamiento químico puede reducir la presión de la enfermedad y las pérdidas en el cultivo.

4. La vaina negra

Una enfermedad provocada por *Alternaria*. Sobrevive entre cultivos como conidios en cultivos infestados y en restos de malezas y como un patógeno de judía y otras plantas durante el siguiente año. El hongo ha sido aislado de plantas de judía en todas las etapas de crecimiento y también de la mayoría de las malezas asociadas a la judía. El hongo afecta a la judía, la enfermedad causa pequeñas manchas o pequeñas manchas acuosas en hojas infectadas de color verde y en las vainas. Las lesiones en las hojas aparecen como circulares a irregulares y las manchas con un centro de color marrón claro y un margen de color marrón oscuro, rodeado por un halo clorótico (Hall, 1991).

5. *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich

Causa lesiones de color pardo oscuro en raíces, tras lo cual las plantas, infectadas pueden mostrar un plateado característico en las capas epidérmicas y subepidérmicas, de la base del tallo y la raíz pivotante. El hongo se extiende a los tejidos vasculares, formando esclerocios. Las plantas se enanizan y maduran prematuramente (Melgarejo *et al.*, 2010).

6. Pitiosis

Las infecciones por *Pythium* pueden provocar la podredumbre de la semilla, la podredumbre de preemergencia y poseemergencia, pudrición del tallo, pudrición de la raíz, plaga o retraso de crecimiento. Una vez el patógeno está distribuido en el suelo, estas enfermedades pueden ocurrir en cualquier parte donde haya cultivo de judía. Las semillas o plántulas infectadas vuelven blandas y descoloradas. Las plántulas infectadas que emergen pueden marchitarse y morir en la primera semana del crecimiento, en general muestran lesiones, con aspecto de mojadas por agua que posteriormente se vuelven necróticas, extendiéndose desde las raíces hasta el hipocotilo. Las plantas infectadas a menudo producen raíces adventicias desde el hipocotilo. Una de las enfermedades causadas en planta de judía es la caída de plántulas y necrosis radicular causada por *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. y otras por *P. ultimum* Trow y *P. debaryanum*. (Hall, 1991).

- **Bacteriosis**

1. La grasa de la judía, agente causal *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (Burk.) Garden *et al.* *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Van Hall, diagnosticado por González Fernández, A. J. y Landeres Rodríguez, E. Ficha 232. (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Burkholder) Young *et al.* *Pseudomonas syringae*).

Denominada así por las características de sus manchas de aspecto similar al de una mancha de aceite en una hoja de papel, que constituyen el punto de partida de futuras y muy rápidas podredumbres secundarias (Messiaen *et al.*, 1995). Los

síntomas foliares aparecen varios días después de la infección en forma de manchas pequeñas, empapando de agua la superficie inferior. Afecta a la judía común y otras especies de *Phaseolus*. Es una bacteria estrictamente aeróbica. En el caso de infección foliar severa, las plantas desarrollan una clorosis sistémica generalizada (Hall, 1991). Los síntomas sistémicos a menudo se limitan a achaparramiento, marchitez reversible, clorosis, mosaico foliar y malformación de hojas, especialmente cuando se deben directamente a una infección a partir de semillas (González Fernández, 2000).

En hojas, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* causa lesiones pequeñas con halo clorótico (aunque la producción de halo depende de la temperatura). En las vainas se ven manchas con aspecto graso que evolucionan hacia una coloración parda; en ocasiones se presenta también un exudado cremoso. En las semillas no siempre son visibles los daños, los más frecuentes son cambios de color. Para el control, semillas libres del patógeno pueden ser utilizadas (Hall, 1991).

2. Mancha parda de la judía, agente causal *P. syringae* pv. *syringae*:

Los síntomas son similares a los de la grasa, pero en este caso no hay halo alrededor de las manchas. Se conoce que se transmite por semilla de judía desde hace más de tres décadas (Harrison y Freeman, 1965; Hoitink y Hagedorn, 1966; Hoitink, Hagedorn y McCoy, 1968) (Descripción CMI n°46).

3. Marchitez bacteriana de la judía, agente incitante *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges) Collins y Jones:

En el campo se ha visto sobrevivir en el suelo durante al menos dos inviernos entre los cultivos de judía en rotación con el trigo. Una vez dentro de la planta, la bacteria coloniza los tejidos vasculares. Las plántulas jóvenes de *Phaseolus* pueden ser atacadas y muertas por lo general. Si las plantas sobreviven a un ataque temprano, o se infectan en una etapa posterior de crecimiento, pueden vivir durante toda la temporada y llevar la semilla madura. La enfermedad se caracteriza por un marchitamiento de las hojas o partes de ellas durante el momento más caluroso del día y se recuperan cuando baja la temperatura por la noche. Como resultado del ataque de las bacterias que provocan un taponamiento de los vasos, el suministro de agua de

corta y las hojas se vuelven marrones. En ocasiones, estos síntomas típicos de marchitamiento, pueden ser ausentes y reemplazados por lesiones en las hojas de color amarillo dorado necrótico.

La Organización Europea y Mediterránea para la Protección de Plantas (OEPP/EPPO) recomienda que las semillas importadas de *P. vulgaris* desde países con presencia de esta bacteria, sean traídas de zonas protegidas donde no haya esta enfermedad o de cultivos libres de la enfermedad durante el periodo de crecimiento (OEPP/EPPO, 1990).

4. Quema bacteriana de la judía, agente causal *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* (Smith):

La infección sistémica da lugar a síntomas generalizados, cuya importancia depende de la proporción de sistema vascular afectado y puede llegar a causar la muerte de la planta (González *et al*, 2004).

- **Virosis**

1. Enfermedad del rizado amarillo del tomate (*Tomato yellow leaf curl disease* (TYLCD) diagnosticado por Sáez Alonso, E.; Aguilar García, L.; Alfarez García, M. y Martínez Narváez, M.M. Ficha 278. (Virus de la cuchara del tomate. Dos especies: TYLCV, TYLCSV y un recombinante natural TYLCV-Mld).

Afecta a los cultivos de tomate, pimiento y judía (sólo la especie TYLCV). En general, produce enanismo, clorosis apical y crecimiento arbustivo y ramificado. En judía provoca reducción del crecimiento de las plantas, llegando a no producir frutos si la infección es en planta pequeña. Deformación y fruncido de las hijas adultas y proliferación anormal de brotes que le da un aspecto arbustivo. La transmisión del virus se realiza por la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Genn.). Los síntomas pueden aparecer a los 15-20 días después de ser inoculado el virus por el vector.

2. Virus del mosaico común de la judía (*Bean Common Mosaic Virus* (BCMV)). Diagnosticado por Berra Lertxundi, D.; Sáez Alonso, E. ficha 88. (Bean mosaic virus, Bean virus 1, Phaseolus virus 1.).

Pertenece al grupo *Potyvirus* (Potato y virus). El virus se encuentra en la naturaleza en plantas del género *Phaseolus* y afecta principalmente a la judía. Se distinguen dos tipos de síntomas, según la cepa de BCMV y la variedad atacada:

- Mosaic common (Reducción del crecimiento, decoloraciones en mosaico, adquiriendo las nerviaciones y tejidos adyacentes una tonalidad verde oscura; es la sintomatología normal que aparece en los cultivos). –Necrosis sistémica (Oscurecimiento de tallos, amarilleo y decaimiento de hojas comenzando por las más jóvenes, marchitamiento general y muerte de la planta). El proceso se realiza en sentidos descendente, de los brotes hacia la raíz; se debe a la reacción de hipersensibilidad de cultivares con el gen de resistencia I frente a cepas necróticas de BCMV. El virus se transmite a través de semilla y polen, por varias especies de pulgón de manera no persistente, y por inoculación mecánica. Fue descrito como infección vírica en EEUU en 1917 (Stewart y Reddick). Los síntomas son muy variables y dependen del cultivar, la edad de la planta, las condiciones ambientales y la cepa del virus. (Silbernagel, 1969; Hubbeling, 1972, Drijfhout, 1978).

3. Virus del mosaico común necrótico de la judía (BCMNV):

Es el responsable de los se denominó “raíz negra” descrita por Klinkowski y Behr en 1953 (cf. Neergaard, 1988) como una necrosis externa de hojas, tallos y raíces producida en ciertos cultivares; las plantas afectadas tienen decoloración vascular marrón y, en el campo, un frecuente marchitamiento con el subsiguiente colapso de la planta (Quantz, 1961, cf. Neergaard, 1988). La necrosis sistemática puede pasar a las hojas más altas son matarlas o puede concentrarse en las partes vasculares del tallo matando toda o parte de la planta. La muerte por necrosis sistemática puede ser rápida o retrasarse hasta el periodo de llenado de vainas. El tipo de síntomas y su severidad depende del cultivar, la cepa del virus y las condiciones ambientales. En general, el virus causa una considerable reducción de la producción y, en algunos casos, la pérdida total del cultivo.

- *Nematodos*

1. Nematodos del nódulo de la raíz

Aparecen en todo el mundo y tiene una amplia gama de huéspedes incluyendo cultivos agronómicos y las malas hierbas que representa a muchas familias de plantas. Las pérdidas de producción resultantes de los daños causados por los nematodos del nódulo de la raíz son más severas en suelos de textura ligera y con buen drenaje. Los síntomas aéreos exhibidos por las plantas infectadas por el nematodo no están especificados y no permiten un diagnóstico positivo. Las plantas gravemente infectadas pueden aparecer cloróticas, retraso del crecimiento durante periodos de estrés hídrico y temperaturas altas. En las plantas infectadas los síntomas aparecen en las raíces y también los hipocotilos en forma de gallas o nudos (Hall, 1991).

La aplicación de los principios y prácticas de manejo integrado de plagas es esencial para mantener los nematodos del nódulo de la raíz por debajo de los niveles de umbral de daño y de reducir las posibilidades de su introducción en zonas no infestadas. La amplia gama de huéspedes de los nematodos del nódulo de la raíz hace que sea difícil seleccionar una rotación adecuada para su control. Los cultivos que son antagonistas a los nematodos tales como *Tagetes minuta* L. (caléndulas), pueden reducir la presencia de los nematodos. El control con los nematicidas pueden ser efectivos en algunos cultivos. El uso cultivos de judía con alta resistencia a los nematodos es la manera más efectiva y económica para el control del nematodo (Hall, 1991).

2. Nematodos de lesiones

Son endoparásitos migratorios y, a la diferencia de los nematodos del nódulo de la raíz, son vermiformes durante todas las etapas de desarrollo. Las plantas de judía que están muy infectadas con nematodos de lesión, tienen las raíces poco desarrolladas que pueden tener lesiones pequeñas de color marrón- negro. Las lesiones resultan de la penetración de los nematodos y de las actividades alimenticias en los tejidos epidérmicos y corticales pueden matar a pequeñas raíces fibrosas. La prueba del

diagnostico de los nematodos de lesiones, requiere la extracción de dichos nematodos de las raíces y de los suelos que los rodean (Hall, 1991).

- **Plagas**

El cultivo de la judía podría ser atacado por varios insectos, tales como:

1. La mosca de los sembrados al principio se presenta como una larva de color blanco, luego en su estado adulto tiene una apariencia semejante a la de la mosca doméstica (Amoros y Amoros 1980). Las larvas destruyen las plántulas de todo tipo de vegetales y sobre todo al maíz y judía.
2. La mosca blanca *Bemisia tabaci*, es la responsable de la transmisión del virus del desorden de amarillo de la judía (BnYDV) en judía en cultivos intensivos (invernadero). Produce amarilleo en las hojas, reduce el crecimiento de la planta y causa deformaciones en los frutos (Janssen *et al* 2011).
(Dominguez Garcia-Tejero. 2004)
3. Gorgojo de la judía (*Acanthoscelides obtectus*), las larvas una vez nacidas penetran en las judías, varias en cada semilla, en el interior de las cuales pasan a ser adultas. Nuevamente se producen en el interior y depositan los huevos sobre las judías almacenadas.

Ademas de las citadas, existe más variedad desde pulgones (Pulgón negro de las habas, Garcia *et al* 1994), dípteros (Minador de las hortícolas, Belda 2000), ácaros (Araña roja Belda 2000) y otros más.

2.3. Sanidad de semillas

2.3.1. Introducción general

La sanidad de semillas se refiere a la presencia o ausencia de organismos causantes de daños (como insectos) o de enfermedades (como hongos, bacterias, virus y nematodos) además de algunas condiciones fisiológicas como deficiencias o fitotoxicidades. La transmisión de patógenos por semilla es el método más efectivo de distribución al azar del inóculo primario de los mismos en los diferentes cultivos.

Puesto que las semillas son portadoras de patógenos y de otros organismos, muchas veces no producen síntomas, para su detección es necesario que se utilicen técnicas de laboratorio específicas.

La contaminación por hongos es un evento común durante las pruebas de germinación, en especial con las semillas de leguminosas; por lo general, se asocia con la presencia de semillas inmaduras, dañadas o viejas. Esta también se puede presentar durante los tratamientos previos como la extracción de semillas o como resultado de problemas de higiene en el área donde se realizan las pruebas de semillas.

El objetivo general de cualquier técnica de análisis fitopatológico es determinar la condición fitosanitaria de una manera representativa de semillas y, por inferencia, del lote del cual se extrajo. Los análisis específicos de laboratorio pueden servir para (Arriagada, 2000).

- Detectar infecciones de fitopatógenos cuarentenarios y de importancia económica que no fueron observados en el campo.
- Estudiar la condición fitosanitaria, como uno de los factores que determinan el valor de la semilla.
- Decidir la necesidad de efectuar un tratamiento.
- Evaluar la prevalencia de una infección transmitida por semilla o investigar, en algunas ocasiones, las causas de una baja emergencia, cuando está afectada la germinación.

Muchos de los organismos que producen daños considerables a las semillas son graves parásitos de semillas y reducen el rendimiento cualitativo y cuantitativamente, mientras que otros, incluidos saprófitos facultativos y parásitos de debilidad, pueden bajar la

calidad de las semillas al causar decoloración o manchas, lo cual deprecia seriamente el valor comercial de aquellas. Estos daños pueden ser producidos por hongos, por bacterias, por virus o bien por otros organismos como pueden ser los nematodos (González *et al*, 2004).

En términos generales, los patógenos de semillas inciden de la siguiente forma (González *et al*, 2004).

- Daños por hongos: los tipos de daños y sus combinaciones, producidos por los hongos en las semillas son los siguientes: 1) aborto, 2) semillas arrugadas y/o de tamaño reducido, 3) podredumbre blanda, 4) esclerotización o estromatización, 5) necrosis, 6) decoloración, 7) reducción o eliminación de la capacidad de germinar.

Para sobrevivir en la semilla los hongos deben ser capaces de resistir a la deshidratación. Así hay dos grupos ecológicos distintos, los hidrofilacios (mildius) y los xerofilicos o xerotolerantes que producen propágulos tales como clamidosporas, conidios u otras estructuras durmientes incluyendo micelio quiescente, esclerocios o microesclerocios.

- Daños por bacterias: el efecto patogénico de las bacterias sobre las semillas puede englobarse en cuatro manifestaciones básicas: 1) aborto, 2) podredumbre, 3) decoloración, 4) producción de mucilago mucoso. Según las condiciones ambientales puede darse una o varias de ellas combinadas.
- Daños por virus: en algunos casos se producen semillas de tamaño menor o deformado como consecuencia de la manifestación de la enfermedad de la planta. Schippers (1963) encontró que BCMV producía cierta cantidad de abortos en algunos casos. La capacidad de transmisión por semilla tiene una cierta especificidad hospedador-parásito.

Para que se quede bien clara la importancia que tienen las semillas infectadas y contaminadas en la dispersión de las enfermedades y cómo afectan la productividad, veremos a continuación algunos ejemplos.

En EEUU la media anual de perdidas en judía desde 1951 a 1960 fue del 20%, de las cuales el 16-17% fueron atribuidos a enfermedades transmitidas por semilla; un tercio de ellas

a podredumbres de raíz por *Fusarium*. También causó fuertes pérdidas *Sclerotinia sclerotiorum*, sin embargo, los problemas debidos a la antracnosis cuyo agente causal es *Colletotricum lindemuthianum* fueron menores debido a la producción de semillas certificadas en zonas semiáridas (Zaumeyer y Thomas, 1957). En cuanto a la bacteriosis y virosis, se estimó que *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* y *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* causaron pérdidas de aproximadamente el 2% y el virus del mosaico común de la judía (BCMV) un 3% de pérdida de la producción total en el periodo 1951-1960 (USDA, 1965).

En Bangladesh, más del 16% de los cultivos se pierden debido a las enfermedades de las plantas y al menos 10% se debe a las enfermedades transmitidas por las semillas (Fakir 1983).

En el norte de España las pérdidas anuales de judía en los años 80, debidas a micosis fueron del 15%, aproximadamente; mientras que las atribuidas a bacterias fitopatológicas causaron una pérdida anual del 20%. En toda España fue del 2-3% y del 1-2%, respectivamente (Sagasta, cf. Neergaard, 1988).

Más recientes, en el cultivo de la soja, *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* pudo causar pérdidas hasta del 50% y además se estableció en los lotes y sobrevivió en los restos de cultivos (Pioli *et al.*, 2003, Van Rensburg *et al.*, 2006).

Otro ejemplo es la mancha en ojo de rana (MOR) causada por *Cercospora sojina* en el cultivo de la soja. En los últimos años este patógeno se ha diseminado en la región pampeana de Argentina, siendo la semilla infectada la vía más probable de entrada en los lotes; sin descartar la utilización de implementos agrícolas sucios, con materia inerte contaminada. En la campaña 2006/2007 la MOR se detectó en 9 partidos de la provincia de Buenos Aires causando síntomas foliares con muy baja incidencia y severidad (BASF, 2007). En 2008/2009 tuvo lugar una sorpresiva epifitias de la MOR en la zona sur de Córdoba y de Santa Fe produjo reducción del rendimiento de 1000 kg/ha (Carmona *et al.*, 2009 a, b).

2.3.2. Técnicas de análisis de semillas para detectar patógenos y microbiota

Antes de empezar cualquier análisis se necesita una muestra representativa que pueda dar un resultado a su vez representativo, y para ello se deben seguir algunas reglas específicas

formulados por la *International Seed Testing Association* (ISTA). El problema fundamental en el muestreo de semillas es que es casi imposible obtener un lote perfectamente uniforme.

Según el artículo 2. 2.5.1.5, tabla 2.1, ISTA 2008, la muestra deberá ser almacenada por un tiempo determinado en la cámara destinada a ese propósito, a 20°C o menor temperatura para conservar la viabilidad de la semilla y el patógeno con el objetivo de facilitar una posible repetición del análisis de la muestra.

Los métodos de detección de patógenos de semillas se pueden clasificar en (ISTA, 2008, Machado *et al.*, 2002; Mathur y Kongsdall, 2003)

- Métodos de examen directo:

Un examen directo de semillas secas, en algunos casos, pueden permitir detectar los signos de los patógenos (fructificaciones, micelio, conidios, esclerocios, etc.) y los síntomas (semillas arrugadas, manchadas, etc.) de modo que puede resultar orientativa (Luque y Scandiani, 2009).

Los análisis de semilla seca proporcionan las siguientes funciones (Arriagada, 2000)

- Detectan impurezas como esclerocios, agallas de nematodos, masas de carbón, semillas de malezas.
- Detectan manchas, decoloraciones y malformaciones indicativas de la presencia de bacterias u hongos: observación con luz de día o luz artificial ordinaria. Observaciones con luz ultravioleta.
- Detecta fructificaciones fungosas tales como acérvulos, picnidios, peritecios, restos de hifas o masas de esporas sobre la cubierta de la semilla.
- Detecta la presencia de pesticidas.

Sin embargo, algunos patógenos no se encuentran en la superficie de la semilla o bien se encuentran en cantidad muy baja que no se pueden detectar. Dependiendo de la localización de las envolturas de los patógenos, existen varios métodos para identificarlos. Las pruebas del lavado se usan bastante para enfermedades que provocan esporas sueltas sobre la superficie de la semilla como es el carbón parcial en el trigo. En general, los procedimientos de la prueba de lavado incluye el remojo de las semillas en un líquido para eliminar las esporas situadas en la superficie de la semilla para su posterior centrifugación. La

masa de las esporas se concentra para identificarla después con el microscopio (Arriagada, 2000).

Para evaluar los hongos contaminantes que se transmiten en la superficie de las semillas tales como el tizón, los tizoncillos, el moho, el mildew polvoso y la roya se recurre a las técnicas del lavado de la semilla (Rao *et al.* 2007). Los análisis del líquido resultante del lavado de la semilla ayudan a (Arriagada, 2000):

- Detectar esporas o micelios.
 - Detectar nematodos.
 - Detectar presencia de pesticidas evidenciado por sustancias colorantes.
- Pruebas de incubación

Los métodos con incubación se usan cuando los patógenos no generan estructuras visibles identificables a simple vista así posibilitan la observación de los signos producidos por los patógenos, tanto en semillas sintomáticas como en aquellas asintomáticas. En consecuencia, para conocer el porcentaje de semillas contaminadas es necesario realizar las pruebas de incubación.

En estos casos se emplean claves para identificar el patógeno teniendo en cuenta el color y las formas de las estructuras de fructificación, la forma, textura, forma de los bordes y el color de las colonias y otras estructuras físicas. La determinación de la sanidad de una muestra debería ser un análisis complementario de todos los índices que determinan la calidad (poder germinativo, vigor, peso de 1000 semillas, pureza físico-botánica y otros) pero en general la semilla se comercializa conociendo solo el poder germinativo (Luque y Scandiani, 2009).

El análisis se realiza empleando la metodología más adecuada a criterio del analista, siguiendo protocolos recomendados o sugeridos por normativas internacionales (ISTA, 2008, Machado *et al.*, 2002; Mathur y Kongsdall, 2003).

Los métodos de incubación más comúnmente utilizados son:

- El *blotter test* o método con papel húmedo: Es un método rápido y directo para obtener esporulación y ayudar a identificar los agentes causales de algunas enfermedades. Son de especial utilidad con microorganismos que crecen rápidamente

sobre el hospedero y compiten bien con los saprofitos dentro de la cámara húmeda (Gilchrist-Saavedra *et al.* 2005).

Se pueden usar placas Petri (permite el grado de aireación adecuado para la respiración pero reduce la probabilidad de contaminación) o bandejas rectangulares de distintos tamaños acondicionados con papel filtro o absorbente. La distancia a la que se colocan las semillas en el disco o bandeja dependerá del tamaño de las mismas, de las características del patógeno que se espera determinar, especialmente de su capacidad de dispersión y prevalencia, y de la duración de la prueba (Arriagada, 2000).

El objetivo de la cámara húmeda es el de crear condiciones favorables de humedad para el desarrollo rápido de hongos o bacterias que pueden estar involucrados en la producción de síntomas de enfermedad, pero cuya presencia no es conspicua en el momento de la primera observación. Como los saprofitos pueden ser favorecidos por las condiciones creadas, debe procederse con cautela al interpretar los resultados. El material enfermo que se introduzca a la cámara húmeda debe estar lo más limpio posible (French y Hebert, 1982).

- Método de agar: Es un medio de cultivo sólido, contiene nutrientes necesarios para el crecimiento de las bacterias, se usa el agar como agente solidificante (García, 1995). Se coloca el papel de germinación o de filtro por bandeja y se vierte en cada bandeja una media de 30 a 40 mL de agar caliente (Scandiani, 2009).
- Medio de cultivo: los medios de cultivo se utilizan para diferentes propósitos: la enumeración, el aislamiento de ciertos tipos de bacterias, el mantenimiento de los cultivos para su uso posterior y para facilitar el reconocimiento de algún tipo de bacteria en particular (García, 1995), se puede realizar en las bandejas pero habitualmente se hace en placas de Petri de 9 cm de diámetro (Scandiani, 2009).

En cuanto a los métodos de análisis, hoy en día, existe una gran variedad de métodos para testar la salud de las semillas. Estos métodos varían desde los métodos clásicos hasta los más innovadores (Luque y Scandiani, 2009).

➤ Métodos clásicos:

- Monitoreo de lote: especialmente en campos semilleros.
- Observación de la muestra directa tal cual: en soja es útil para observar semillas con signos de los patógenos como mancha purpura, corrimiento del hilo, costras de oosporas de mildiu, esclerocios de *Sclerotinia*, etc.
- Lavado de semillas: se puede emplear para detectar oosporas de mildiu.
- Observación de semillas incubadas: sobre papel o en medios de cultivo agarizados, ambos con diversas variantes.
- Observación de embriones: requiere la extracción y el recuento de embriones infectados.
- Análisis de plántulas: se emplean para hacer estudios de daños, transmisión y control.

➤ Métodos innovadores:

- Serología ELISA e inmunofluorescencia: se usa principalmente en la detección de virus y de bacterias.
- DNA: recombinante-Dot blot.
- PCR-RFLP-RAPD: se encuentran descritos algunos métodos para identificar el complejo *Diaporthe/Phomopsis* (Jaccoud Fo y Reeves, 1993. Machado *et al.*, 2003; Riccioni *et al.*, 2005).
- Ultrasonido: para detectar infecciones asintomáticas (Walcott *et al.*, 1998).
- Perfiles metabólicos (ómicas) (Barros, 2008).

2.3.3. Patógenos y daños en semillas de judía.

- **Hongos**

La mayor parte de los patógenos transmitidos por semillas son hongos. Recordamos que los hongos que causan las enfermedades en judía son organismos microscópicos cuyas células se asemejan a hilos o pequeños tubos (llamados hifas), que en masa, forman el micelio. las hifas pueden tener tabiques, y se alimentan de los nutrientes de la planta. El hongo se reproduce mediante la formación de células especializadas llamadas esporas, que sirven a los hongos en algunas condiciones adversas de sobrevivir. Las esporas son transportadas a

menudo por toda la planta por el viento, el suelo, el agua u otros agentes. Una vez en el lugar de la infección, germinan para producir nuevas hifas que luego penetran en la planta de judía mediante heridas, aperturas naturales o la superficie intacta. Las esporas también pueden diferir genéticamente entre sí, permitiendo así a las nuevas formas del hongo a desarrollarse. Los hongos de judía se identifican sobre todo por el tamaño, la forma y el color de sus esporas (Hall, 1991).

Entre los hongos detectados en semillas de judía destacan los agrupados en el cuadro 2.3.3.1. aunque en total podrían llegar a ser unos 43 géneros de hongos.

Cuadro 2.3.3.1. Microbiota fúngica aislada de judía por distintos autores (Fernández-Corral *et al.* 2002. *Modificado por la autora del proyecto fin de carrera).

Género y/o especie de hongo	Autores	País
<i>Alternaria alternata</i> <i>Alternaria spp.</i>	Sinha <i>et al.</i> (1999) Tseng <i>et al.</i> (1995) González (2000) Moretto <i>et al.</i> (1997)	India España Canadá Brasil
<i>Ascochyta phaseolorum</i>	Beebe y Pastor (1991)	Colombia
<i>Ascochyta spp.</i>	Chupp y Arden (1960)	Reino Unido
<i>Aspergillus spp.</i>	González (2000) Chisholm y Coates-B. (1997) Tseng <i>et al.</i> (1995) Braccini y Dhingra (1996), Silva y Silva (2000), Leger <i>et al.</i> (2000)	España Jamaica Taiwan Brasil
<i>Botrytis cinerea</i>	González (2000)	España
<i>Cladosporium spp.</i>	González (2000)	España
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Cardenas y Engleman (1981) Tu (1983, 1986) González (2000) Moretto <i>et al.</i> (1997), Silva y Silva (2000)	México Canadá España Brasil
<i>Epicoccum purpurascens</i>	González (2000)	España
<i>Fusarium moniliforme</i> <i>F. oxysporum</i> <i>F. oxysporum f.sp. phaseoli</i> <i>F. solani f. sp. phaseoli</i> <i>Fusarium spp.</i>	González (2000) Chisholm y Coates-B. (1997) Silva y Silva (2000) Agarwal y Sinclair (1987) Morshed (1985) Michail <i>et al.</i> (1979) González <i>et al.</i> (2004)* Tseng <i>et al.</i> (1995) Sinha <i>et al.</i> (1999)	España Jamaica Brasil EEUU Bangladesh Irak Canadá India
<i>Macrophomina phaseolina</i>	Chisholm y Coates-B. (1997)	Jamaica
<i>Mucor spp.</i>	Sinha <i>et al.</i> (1999)	India
<i>Penicillium spp.</i>	Tseng <i>et al.</i> (1995)	Canadá, Taiwan

	González (2000)	España
<i>Phaseoisariopsis griseola</i> (= <i>Isariopsis griseola</i>)	Guzmán <i>et al</i> (1878)* Kulik (1984)	Italia Polonia
<i>Phytophthora phaseoli</i>	Thaxter (1889)*	Inglaterra
<i>Phomopsis</i> spp.	Dhingra (1978)	Brasil
<i>Rhizoctonia solani</i>	Nik y Yap (1979) Ploper (1981) Tylkowska (1984) Tello <i>et al.</i> (1990), González (2000) Moretto <i>et al.</i> (1997) Agarwal y Sinclair (1987)	Malasia Argentina Polonia España Brasil EEUU
<i>Rhizopus</i> spp.	González (2000) Tseng <i>et al.</i> (1995) Sinha <i>et al.</i> (1999)	España Canadá India
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Tseng <i>et al.</i> (1995), Kulik (1984), Tylkowska (1984)	Canadá Polonia
<i>Stemphyllium</i> spp.	González (2000)	España
<i>Trichoderma</i> spp.	González (2000) Sinha <i>et al.</i> (1999)	España India
<i>Uromyces phaseoli</i>	Tylkowska (1984)	Polonia
<i>Verticillium</i> spp.	González (2000)	España

De los citados en el cuadro 2.3.3.1, destacamos algunos como *Colletotricum lindemuthianum* (Sacc y Magn.). Este es el primer hongo con el cual se demostró la transmisión de patógenos por semilla (Frank, 1883 y Whetzel, 1906 cf. Neergaard, 1988) y tiene muchas razas patógenas descritas (Drijfhout y Davis, 1989; Pastor-Corrales, 1991). La semilla infectada aparece con manchas oscuras, pudiendo extenderse las lesiones por debajo de la piel de la misma (Puerta, 1961). Las podredumbres ocasionadas en las vainas pueden penetrar y contaminar la semilla, haciendo que el patógeno se encuentre desde el tegumento hasta el interior de los cotiledones (Chaves, 1980).

Fusarium oxysporum es el agente incitante de la fusariosis vascular en la judía, la forma especializada (f.sp.) es *phaseoli* mientras que *Fusarium solani*: es un patógeno ubicuo, se ha descrito que *F. solani* f. sp. *phaseoli* ((Burkholder) Snyder y Hansan).

Por otro lado *Sclerotinia sclerotiorum* puede acompañar a la semilla en forma de esclerocios fácilmente detectables (Noble y Richardson, 1968) y como infección miceliar (Steadman, 1975). Las lesiones en las vainas, hojas, ramas y tallos son inicialmente pequeñas, circulares, de color verde oscuro pero rápidamente aumentan de tamaño y pueden llegar a

matar a toda la planta. Solo el tratamiento de semillas puede ser efectivo (González *et al.*, 2004).

Rhizoctonia solani, Leach y Pierpoint (1956-1958) demostraron su transmisión por semilla en judía. *R. solani* es el estado asexual de la especie fúngica basidiomiceto-*Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk.

Alternaria afecta a las vainas de las semillas secas enfermas a menudo conllevan a un crecimiento de color gris, con moho y muestra una coloración gris a gris oscuro y tienen una geminabilidad ligeramente inferior a la de las semillas normales. La decoloración de las semillas es un resultado directo de la maduración de las vainas descoloración. El control de la enfermedad en judía depende se basa en la regulación del contenido de humedad de las semillas. las semillas deben ser cosechadas tan pronto, ya que están secas (Hall, 1991).

- **Bacterias**

Las bacterias que causan enfermedades en judía son microscópicas, incoloras o amarillas. Se encuentran en forma de varilla, móvil y generalmente son gran-negativas y no proceden a partir de esporas. Sobreviven bien en el material vegetal infectado, tales como las semillas. (Hall, 1991). De ellas citamos *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Burkholder) Young *et al.* y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, finalmente está *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) que tiene síntomas en las semillas como manchas de color mantequilla amarillas o marrones distribuidas por todo el tegumento de la semilla o restringidas a la zona del hilo. Las semillas gravemente afectadas están arrugadas y presentan con frecuencia baja germinación y poco vigor. La mejor manera de su control es utilizar semillas libres del patógeno (Hall, 1991). Una bacteria incluida en la lista de especies de cuarentena por la EPPO y que se transmite por semillas es *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges) Collins y Jones. Es muy resistente a la desecación y puede permanecer viable hasta 24 años en las semillas almacenadas en el laboratorio.

- **Virus**

Los virus de la judía son generalmente grandes, con moléculas complejas e infecciosas. Puede ser visto con un microscopio electrónico. Se reproducen solo en plantas

vivas y por lo general habitan en el floema. Pueden ser transmitidos por la savia de la planta, las semillas o por insectos (Hall, 1991).

Virus del mosaico común de la judía (BCMV) junto con el virus del mosaico común de la judía (BCMV) son transmitidos en alta pero variable proporción por las semillas, producidas por plantas afectadas y está en función del genotipo de la judía y cepa del virus y del estado fenológico en que las plantas han sido infectadas [Morales y Castaño (1987). El porcentaje de infección en semilla, es en algunos casos superior al 83% (Morales y Bos, 1988; Messiaen *et al.*, 1995).

- ***Daños por insectos y otros***

Los insectos pueden causar daños en la semilla pudiendo ser destruida durante la alimentación en sus diferentes etapas de desarrollo. Muchos son considerados insectos de almacenamiento (Neergaard, 1988).

De modo general, las leguminosas son atacadas por gorgojos conocidos como brúquidos, y por himenópteros. Los adultos ponen los huevos en las vainas jóvenes y éstas entran en las semillas en desarrollo donde se alimentan, crecen y se transforman emergiendo finalmente de ellas dejando un orificio característico (Besnier, 1989).

Destacamos que en la judía *Acanthoscelides obtectus* se reproduce en almacén; la respiración de las larvas eleva la temperatura de las semillas y puede dañar el embrión con la pérdida consiguiente de la capacidad germinativa.

Los daños causados por medios mecánicos que sufren las semillas son considerados, junto con las condiciones climáticas adversas antes de la cosecha y el contenido de agua de las semillas después de cosecharse, como uno de los factores que más contribuyen a bajar la calidad de las semillas. La máxima calidad de un lote de semillas depende directamente de las condiciones de producción en el campo, pero también los daños mecánicos pueden ser causados a las semillas por procesos mecánicos de manipulación, que se realizan durante la cosecha, durante el transporte y en las máquinas de limpieza. El daño puede ser provocado por choques o impactos y abrasiones de las semillas contra superficies duras o contra otras semillas. Todo equipo mecánico es causante de daños físicos (cosechadora, transportadores de semillas... etc). En el almacenamiento, las semillas mecánicamente deterioradas no mantienen su viabilidad y vigor, debido a que las lesiones que sufren (quebras, tegumento

rajado, daños del embrión) interfieren en la tasa de respiración y permiten o facilitan la penetración de microorganismos. En semillas de soja y frijol, el daño puede no provocar una fractura visible, pero debido a la posición sobresaliente del eje embrionario, éste puede recibir el impacto y el daño puede manifestarse después de que la semilla este colocada para germinar, originando una plántula anormal (Villela, 2009). En el caso de un banco de semillas estos aspectos se tienen que tener en cuenta.

2.3.4. Obtención de semilla sana y tratamientos de semillas

2.3.4.1. Introducción general

En términos generales, entre las estrategias de producción de semillas de alta calidad se encuentran: la ubicación geográfica de los lotes de producción de semillas, el manejo del cultivo, la cosecha y poscosecha y el manejo genético. Estas deben cubrir en forma integral los riesgos de deterioro, debido principalmente a factores climáticos (Casini, 2006). En primer lugar es importante determina qué épocas de siembra (ambiente) y qué cultivares (hábito de crecimiento, grupo de maduración, resistencia a enfermedades) permitan en cada región obtener semilla de buena calidad (Mitidieri, 1982). En segundo lugar es necesario establecer qué pautas de manejo se pueden aplicar para mejorar la calidad de la semilla, tales como la realización de rotaciones, la adecuada nutrición, el monitoreo y control de plagas y la aplicación de fungicidas foliares (Luque y Scandiani, 2009).

Puesto que la semilla es la estructura inicial de una plantación, es necesario observar algunos cuidados como los indicados en la Guía Técnica de Semilleros y Viveros Frutales, Ministerio de Agricultura y Ganadería, Programa Nacional de Frutas de El Salvador, 2005:

- Selección de las plantas donadoras de semillas: se debe conocer el origen de la planta, su historial productivo, deben ser sanas, tienen que presentar un sistema radicular resistente y vigoroso.
- Cosecha de frutos completamente maduros: las semillas se deben obtener de frutos completamente maduros, para garantizar que el embrión este totalmente desarrollado y apto para dar origen a la nueva planta.

- Selección de frutos grandes: los frutos de donde se obtendrán las semillas deben ser los grandes, generalmente el fruto grande proporciona semillas grandes, estas a su vez darán plántulas más vigorosas.
- Procesado de la semilla: Esto se refiere a las acciones que se deben realizar para obtener una semilla lista para sembrar.
- Preparación de la semilla antes de la siembra: es necesario conocer si la semilla necesita alguna preparación antes de ponerla a germinar, almacenamiento, escarificado entre otros.

Con respecto a la implementación de las rotaciones es importante conocer que su nivel de inóculo dependerá en gran parte de las sucesiones de cultivo y de la sanidad de los mismos. Un estudio realizado en 2007 mostró que los rastrojos de soja de un lote con plantas con cancro del tallo de la soja (CTS) (*Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*) presentaban una incidencia de 63% de *Diaporthe* y 33% de *Fusarium* con dos especies: *F. equiseti* y *F. acuminatum* en la sucesión soja-soja, y de 23% *Diaporthe* y 73% de *Fusarium* con una diversidad mayor de especies: *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum* y *F. equiseti*, en la rotación sorgo-soja (Luque y Scandiani, 2007).

2.3.4.2. Tratamiento de semillas

Algunos de los primeros antecedentes escritos sobre tratamiento de semillas se encuentran con el uso de la savia de cebollas (*Allium* spp.) y extracto de ciprés en los periodos egipcios y romanos. El uso de agua salada en tratamientos de semillas ha sido utilizado desde mediados de los años 1600, los productos cúpricos fueron introducidos junto con el arsénico entre los años 1740 y 1808, y la introducción del mercurio, utilizado desde 1915 hasta 1982. Hasta los años sesenta los tratamientos de semillas habían sido solo desinfectantes de superficies y protectores. El primer fungicida sistémico se lanzó en 1968 que no sólo tenía una acción sobre la superficie sino que también se movilizaba dentro de la planta en las jóvenes plántulas protegiéndolas de patógenos existentes en el ambiente. Desde los años noventa la industria de la protección de cultivos y de semillas ha desarrollado y adoptado nuevas clases de fungicidas, insecticidas y nematicidas, expandiendo el control de plagas y reduciendo el impacto tanto en el usuario como al medio ambiente (ISF, 2007).

El tratamiento de semillas es la aplicación de técnicas y agentes biológicos, físicos y químicos que proveen a la semilla y a la planta protección frente al ataque de insectos y enfermedades transmitidas por semillas así como frente a aquellas que atacan en etapas

tempranas del cultivo y que provocan consecuencias devastadoras en la producción de los cultivos cuando no son controlados. Tienen como objetivos, por una parte, impedir el desarrollo de gérmenes patógenos que se hallan en la semilla o en el embrión, y por otra, prevenir la enfermedad en las plántulas causadas por patógenos que estén en el suelo. En definitiva, un buen tratamiento debe de considerar los siguientes aspectos según la FIS (Federación Internacional de Semillas) (IFS, 2007):

- Seguridad.
- Amplio espectro.
- Eficacia.
- Económico.

En la actualidad la semilla debe estar lo más libre de plagas y enfermedades tanto como sea posible y el tratamiento debe proveer protección contra plagas y enfermedades durante los procesos de germinación, emergencia y crecimiento de la planta.

- ***Tratamientos físicos***

Pertenecen a este grupo de los tratamientos donde la destrucción de organismos patógenos se hace mediante la acción de un agente físico como calor o radiaciones (Gingery, 1993).

Una de las primeras medidas físicas de control de fitopatógenos la constituyen los procesos comerciales de limpieza de semillas, que se han desarrollado para dejarlas libres de restos vegetales, de semillas de malezas, de semillas que no germinaran o semillas vanas, pudiendo reducir totalmente la contaminación por algunos patógenos, pero que pueden contribuir a distribuir otros, uniformemente, sobre el resto de las semillas (COSAVE. 1994).

La temperatura es un factor que se puede utilizar para eliminar estructuras de patógenos e insectos en las semillas cuando las características de las semillas lo permitan (Arboleda, 1997). Los tratamientos térmicos de semillas han sido prácticamente ampliados en diferentes formas. Una forma simple es la solarización, donde las semillas han sido calentadas por los rayos del sol (Luthra y Sattar, 1934; Luthra, 1953), que a veces se aplicaba en los

países cálidos, pero el método ha sido considerado de poco interés en la agricultura industrial debido a las dificultades en la ampliación a gran escala. Sin embargo en la actualidad, se reconsidera especialmente en los países donde la radiaciones solares, pues supone un ahorro de energía y reduce gastos.

En 1885, Jensen fue el primero en aplicar el calor en forma de agua caliente para eliminar *Phytophthora infestans* en tubérculos de papa. En 1888, el método fue adoptado para eliminar carbones producidos por *Ustilago nuda* en avena y cebada por inmersión de la semilla en agua a 54,8°C por minutos. Los tratamientos de agua caliente han sido el principal método para eliminar bacterias transmitidas por semillas, como el caso de la *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* desde especies de *Brassica*. También es este género, el agua caliente reduce la infección de la *Alternaria brassicicola*, pero no ha sido satisfactorio para erradicar *Phoma lingam* (De Tempe y Binnerts, 1961).

El vapor que se ha usado durante muchos años para esterilizar suelos, también es usado para el tratamiento de semillas, con la modificación al procedimiento realizada por Baker, agregando aire al vapor. El humedecimiento que produce el vapor se reduce al introducir aire, lo que también modifica la temperatura. La eficacia del método aumenta, si el contenido de humedad de la semilla se eleva para facilitar la penetración del calor (De Tempe y Binnerts, 1961).

Según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Dirección general de investigación y capacitación agrarias. (Ortega, 1991), el calor seco tiene una amplia y satisfactoria aplicación práctica en algún caso concreto, como en la transmisión del virus del Mosaico del Tomate (ToMV) por la semilla de tomate, que se previene manteniendo las semillas durante 24 horas en estufa a 80°C. Este tratamiento inactiva el virus provocando un retraso en la germinación de solo 1 a 3 días y, si las semillas son de buena calidad, la reducción en el poder germinativo no sobrepasa el 10%.

Muy recientemente, el calor seco fue probado sobre las semillas de alfalfa para controlar *Salmonella* y *E.coli* O157:H7, por el departamento de las ciencias animales y alimentarias de la Universidad de Delaware, EEUU por Neetoo y Chen (2010). Se habían usado semillas inoculadas y otras no inoculadas. Las semillas se sometieron a temperaturas de 55, 60 y 65 °C durante un máximo de 10 días, y a 70 °C durante 24 h como máximo. Después del tratamiento, las semillas tratadas a temperaturas de 50 y 65°C, se dejaron equilibrar su temperatura a la temperatura ambiente (22-23°C) durante 1h antes de realizar el análisis

microbiológico (semillas inoculadas) y del ensayo de viabilidad de semillas (semillas no inoculadas). Las semillas que se habían sometido a temperatura de 65 y 70°C, se habían dejado refrigerar toda la noche a 4°C antes del análisis microbiológico (semillas inoculadas) y del test de viabilidad de las semillas (semillas no inoculadas). Los resultados de este estudio indican que el tratamiento con calor seco a temperaturas moderadas (55 y 60°C) representa una intervención efectiva en la descontaminación de las semillas de alfalfa de *Salmonella*. Sin embargo, la exposición de las semillas a temperatura un poco mayores de 65°C, fue capaz de eliminar simultáneamente *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 pero afectando un poco la germinación de las semillas.

En la inmersión de la semilla en agua caliente también ha sido recomendada para erradicar diversas enfermedades transmitidas por las semillas de hortalizas, según resume Ortega (1991) en el cuadro 2.3.4.2.

Cuadro 2.3.4.2. Tratamientos de semillas de hortalizas con agua caliente (Ortega, 1991).

Familia, género o especie	Temperaturas (°C)	Tiempo (min.)	Enfermedades controladas
Apio	48-50	30-25	<i>Septoria apiicola</i>
Brassicas (coles, etc.) ...	50	25-20	Bacteriosis (<i>Xanthomonas campestris</i>) y Alternariosis
Cebolla	49-57	30-15	Alternariosis
Solanáceas (tomate, pimiento y berenjena)	50	25	Bacteriosis, Antracnosis y <i>Rhizoctonia</i> sp.

En este método, sin embargo, presenta algunos inconvenientes de tipo práctico. Como todas las semillas deben alcanzar la misma temperatura durante el mismo periodo de tiempo, no se pueden tratar lotes grandes (máximo 2,5 kg) y no suele ser efectivo sobre las semillas de tamaño grande (guisante, judía, cucurbitáceas, etc.).



Figura 2.3.4.2 a. Baño María con control de temperatura para el tratamiento de semillas con agua caliente según Ortega (1991).

En 1948 Lier y Jørstad encontraron que el tratamiento con agua caliente sufre una serie de problemas:

1. Primero al estar sumergidas las semillas durante un cierto tiempo en agua calientes seguido por un enfriamiento en agua fría, es necesario un extenso post-tratamiento de secado de las semillas, un proceso caro debido a la energía que se consume y especialmente las instalaciones de secado requeridas.
2. El manejo de las semillas durante el proceso es a menudo poco práctico ya que las semillas húmedas se unen y se vuelven más sensibles a la tensión mecánica.
3. Para el control de alta precisión de la temperatura del medio de calentamiento, el medio debe ser transportado a alta velocidad teniendo en cuenta el material expuesto. Actualmente el tratamiento con agua caliente casi siempre produce una disminución en la germinación.

Sin embargo, los problemas del agua caliente se podrían resolver usando aire caliente y húmedo como medio de calentamiento. Aplicaciones comerciales utilizando el aire caliente y húmedo fueron desarrolladas para tratar la infección de *Alternaria* en las semillas de lobelia (Hall y Taylor, 1983).

De todas formas, a partir de los 1990, se han desarrollado técnicas para uso comercial a gran escala para uso en granos de cereales, con la colaboración de la Universidad Sueca de las Ciencias de la Agricultura (*Swedish University of Agriculture Sciences* ó SLU) y Acanova AB, la compañía que desarrolló la tecnología de la termoterapia de las semillas “*The ThermoSeed™ technology* (Bergman, 1993; Bergman y Forsberg, 2000; Forsberg, 2003; Lagerholm, 2003).

En 1998 la Acanova AB desarrolló un dispositivo para una alta precisión en los tratamientos térmicos, con lo cual, el proceso del tratamiento está regulado por sensores y tecnología de control computadora por ordenador, combinado con la documentación de todos los parámetros del tratamiento en tiempo real. Esta idea iba a ser evaluada con varias pruebas extensivas dentro de un proyecto financiado por la UE “Demostración de un método de tratamiento de semillas de alta precisión biológicamente sostenible y respetuoso con el medio ambiente”, llamado DEST (Bergman y Forsberg, 2000; Hartl y Girch, 2000; DEST, 2001). Básicamente el tratamiento térmico consiste de dos fases: la fase de calentamiento, en la cual las semillas se calientan durante un cierto tiempo con aire caliente con humedad relativa

calculada para una buena desinfección, seguido de un enfriamiento que interrumpe el proceso antes de que las semillas se lesionen. El control se lleva a cabo mediante el PID (sistema de control proporcional, integrado y derivado (Glad y Ljung, 1989). Los dispositivos fueron contruidos para:

1. Permitir el control de los parámetros importantes (temperatura, humedad del aire, tiempo de tratamiento, flujo de aire, el tratamiento y la duración de la refrigeración).
2. Encontrar tiempo de tratamiento corto.
3. Igualar la exposición al calor de todas las semillas.
4. Calentar con grandes volúmenes de aire por kg y por unidad de tiempo.

En el tratamiento se habían usado tres tipos de tratamientos diferentes usando: tratamiento por lotes en capa fina, lecho fluido y tratamientos continuos de lecho fluido sobre semillas de cereales. Algunas de las conclusiones sacadas fueron las siguientes:

- Para lotes de semillas sometidos a tratamiento con aire caliente y húmedo, una duración del tratamiento se puede encontrar para dar una desinfección óptima de patógenos manteniendo la germinación.
- Un rápido calentamiento con aire húmedo durante un tiempo corto seguido por un enfriamiento permite un calentamiento selectivo para las partes externas de la semilla, donde se encuentran la mayoría de los importantes patógenos de las semillas.
- En cuanto a las semillas de cereales, el tratamiento controla con éxito las enfermedades transmitidas por las semillas cuando están situadas cerca de la superficie de la semilla.
- Al tomar estos aspectos del proceso de calentamiento en cuenta, el error en la predicción de la germinación que se puede calcular utilizando la ecuación de Ellis y Roberts (Ellis y Roberts, 1980a, b) de viabilidad para semillas tratadas con un rápido calentamiento usando aire caliente y húmedo se puede reducir considerablemente.
- Al tomar estos aspectos del proceso de calentamiento en cuenta, la ecuación de Ellis y Robert de viabilidad también se puede usar para la predicción de la viabilidad post-tratamiento de patógenos de semillas tratadas con un calentamiento rápido con aire caliente y húmedo con un error bajo.
- La tolerancia a las altas temperaturas varía entre las especies y lotes de las semillas dependiendo de los factores genéticos, del historial de la producción y del almacenamiento de las semillas.

- La tolerancia a las altas temperaturas varía dentro de los lotes de semillas, y los pre-tests de muestras representativas de un lote de semillas pueden ser utilizadas para el análisis de la variación en la tolerancia al calor dentro del mismo lote de semillas.
- La temperatura óptima para un tratamiento térmico de un lote de semillas se puede lograr mediante los procedimientos de los pre-tests.
- Para un efecto óptimo para su almacenamiento a temperatura ambiente, la duración del almacenamiento debe ser preferiblemente limitada en un año antes y otro año después del tratamiento.
- El tratamiento con aire caliente y húmedo es capaz de controlar enfermedades transmitidas por semillas en otros cultivos que los cereales.

Cuadro 2.3.4.2b. Tratamientos físicos de semillas de diferentes cultivos de hortalizas. (Langlois, 2008).

TRATAMIENTO	CULTIVO	ENFERMEDADES	AUTORES
Agua caliente, aire caliente, electrones	Zanahoria	Bacteriosis (<i>Xanthomonas</i> spp.)	Robertes et al., 2006
Agua caliente, aire caliente, electrones	Zanahoria, col, apio, perejil, lechuga	Alternariosis (<i>Alternaria</i> spp), <i>Phoma</i> , bacteriosis (<i>Pseudomonas syringae</i> spp), verticiliosis (<i>Verticillium</i> ssp), septoriosis (<i>Septoria</i> spp).	Jahn et al., 2006
Agua caliente (40-55 °C; 10- 30 min)	Zanahoria, col, apio, perejil, lechuga	Alternariosis (<i>Alternaria</i> spp), <i>Phoma</i> , bacteriosis (<i>Ps. syringae</i> spp), mildiu (<i>Peronospora valerianella</i>), septoriosis (<i>Septoria</i> spp).	Nega et al., 2003
La luz (rojo-rojo lejano)	Hortalizas, cultivos ornamentales.	Aumenta y acelera la germinación.	(*) Vasilenko et Carrier, 2004
Agua caliente, aire caliente, electrones (+ aceite de tomillo y el efecto sobre la germinación)	Perejil	Septoriosis (<i>Septoria petroselini</i>)	Amein et al., 2006
Agua caliente, electrones, vapor con vacío	Perejil, comino, cilantro, hinojo	Alternariosis (<i>Alternaria radicina</i>), Bacteriosis (<i>Pseudomonas syringae</i> spp), Cercospora (<i>Mycocentrospora</i> , <i>Mycosphaerella</i> spp), Verticiliosis (<i>Verticillium</i> ssp.)	Blum et al., 2006

Un ejemplo de la necesidad de la adaptación del tratamiento a las características de cada especie de semillas, podría ser la desinfección de las semillas de albahaca. Una prueba hecha por Heller y Zoller (2010) (en la *Station de Recherche Agroscope Changins-Wädenswil*, en Suiza). Por la particularidad de la semilla de absorber rápidamente el agua en grandes cantidades en una capa mucilaginosa. Las semillas se hinchan y se pegan unas con las otras, lo que impide la desecación después del tratamiento con agua caliente. Con el fin de evitar este problema, las semillas se habían puesto en una sola fila sobre una malla de nylon, que permite al agua condensada filtrarse. Las semillas se secan en la malla y así se pueden separar. Los resultados muestran que el aumento del tiempo de exposición de las semillas al vapor aireado “aire caliente y húmedo” (30s; 65°C, 60s; 65°C, 90s; 65°C), permite reducir fuertemente la contaminación en las semillas hasta llegar a eliminarla totalmente sin alterar su poder germinativo ni su capacidad de crecer siempre y cuando se respetan los parámetros del tratamiento.

Uno de los esfuerzos en busca de alternativas a los tratamientos térmicos de semillas para el control de hongos, es el uso de radiación microonda. El uso de este tipo de tratamiento fue usado para calentar varios productos (e.g. Seaman y Wallen 1967, Diprose *et al.* 1984, Grochowicz *et al.* 1999, Warchalewski *et al.* 2007). Los tratamientos de microondas han sido efectivos contra los microorganismos transmitidos por semillas (Hankin y Sand 1976, Lozano *et al.* 1986, James *et al.* 1988, Cavalcante y Muchovej 1993, Bhaskara Reddy *et al.* 1998, Gralik *et al.* 1999, Reddy *et al.* 2000). En otros ensayos con microondas dieron resultados totalmente diferentes, tales como los hechos por Lozano *et al.* (1986), James *et al.* (1988) y Bhaskara Reddy *et al.* (1998) que afirmaron que el tratamiento con microondas disminuía y radica la presencia de *Fusarium* spp. en otras especies vegetales.

Uno de los últimos trabajos con las radiaciones microondas fue elaborado por Tylkowska *et al.* (2010), en cual se ha estudiado el efecto de las radiaciones microonda sobre la sanidad, la germinación y el vigor de las semillas de judía (*P. vulgaris*. L.). Las semillas fueron expuestas a dichas radiaciones microondas durante 15, 30, 45, 60, 90 y 120 s. Para controlar la temperatura dentro del microondas se colocó un vaso de 500 ml con 200 ml de agua destilada, pero además de facilitar la medida de las temperaturas, el agua servía como disipador de energía con el fin de evitar daños en las semillas (Reddy *et al.*, 2000). Para la comparación final, se hizo uso de semillas control o bien sin tratar o bien tratadas con 2 g/kg del fungicida T 65 DS (carbendazim+ tiram). Se han hecho 5 repeticiones para cada tiempo de exposición). La conclusión que fue sacada del ensayo era que el método, en estas

determinadas condiciones, es recomendable para tratar *Penicillium* spp. Sin embargo los resultados no fueron positivos en cuanto a *A. alternata* y *Fusarium* spp., que al contrario su ocurrencia aumento después del tratamiento, algo que podría ser relacionado con la morfología de las especies (esporas unicelulares o multicelulares, esporas oscuras con paredes gruesas así como micelios oscuros...), a las diferencias en las aplicaciones técnicas del microondas, a la localización de inóculo (en la superficie o dentro de los tejidos de la semillas) y al porcentaje de contaminación.

Otras ventajas adicionales al uso del tratamiento microondas han sido el incremento en la germinación y el vigor, reducción de porcentaje de semillas duras.

Relacionado con el tratamiento físicos menos habituales, el tratamiento con haz de electrones se han desarrollado (Burth *et al.* 1991) y se han comercializado en Alemania para el tratamiento de las semillas de cereales orgánicas (Forsberg, 2003). Las irradiaciones radioactivas también en algunos casos se ha informado que han sido un éxito (Cuero *et al.*, 1986; Bagegni *et al.* 1990), pero no ha sido ampliamente utilizado debido a que la exposición para el control de los patógenos a menudo también mata a las semillas. Incluso el tratamiento con laser se ha mostrado eficaz (Bel'skii y Mazulenko, 1984), aunque es un poco práctico debido a que los rayos laser son muy estrechos y se necesita exponer toda la superficie de la semilla para tener buenos resultados.

En la India, se habían puesto a prueba los haces de electrones y las radiaciones Gamma para la contaminación de las semillas de loto (Rajeev Bhat *et al.*, 2010). Las semillas se habían puesto en bolsas de polietileno y posteriormente se habían expuesto a las radiaciones Gamma (2.5, 5.0, 7.5, 10, 15 y 30 KGy) a temperatura ambiente $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Sala Gamma GC- 500, tasa de dosis 6.5 KGy/h, disponible en ISOMED, Centro de Investigación Atómica de Bhabha, Trombay, Mumbai, India). Otro conjunto de muestras de semillas empaquetadas en bolsas de polietileno, se habían expuesto a las irradiaciones de haces de electrones (2.5, 5.0, 7.5, 10, 15 y 30 KGy) a temperatura ambiente $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Centro Microtron, Universidad de Mangalore, diseñado por el Centro de las Tecnologías Avanzadas, India).

- **Tratamientos químicos**

Los productos químicos deben de ser en primer lugar seguros para los operarios y para las semillas, deben controlar los patógenos de importancia epidemiológica, es decir que deben de controlar los patógenos que reducen la viabilidad de la semilla y también aquellas enfermedades causadas por patógenos que habitan el suelo. No deberían afectar a las bacterias fijadoras de nitrógeno, *Bradyrhizobium*, bacterias solubilizadoras como *Azospirillum*, ni a algunas de la microflora antagónica o benéfica como *Bacillus*, *Streptomyces*, *Trichoderma*, etc (Luque y Scandiani, 2009), una cosa que es difícil de cumplir en el caso de uso de productos químicos.

Existen productos químicos para el tratamiento en forma líquida y en polvo. Según cómo se use se distingue entre (FAO, 1985):

- Tratamiento seco: el polvo utilizado para este tratamiento tiene que aplicarse a la semilla en la dosis exactamente requerida. El tratamiento será eficiente cuando se cubra en forma total a la semilla con el polvo.
- Tratamiento líquido: la aplicación, solamente puede hacerse mediante equipo especial. Posteriormente la semilla debe ser secada.
- Tratamiento con pasta acuosa: antes de la aplicación, el producto químico en polvo se mezcla en una determinada cantidad de agua, posteriormente esta suspensión es aplicada a la semilla, la cual queda adherida como revestimiento.

En el año 1999, Prohens y colaboradores, evaluaron los efectos del hipoclorito sódico (NaOCl) sobre la germinación de tres especies de semillas de pepino dulce *Solanum muricatum* (96-5, B-2 y OV8), *S. tabanoense* (EC- 26) y *S. caripense* (EC- 40). Antes del tratamiento, el porcentaje de la germinación en *S. muricatum* fue de 41,4-66,3% , 13,4-30,2% y 7,1-11,6 % respectivamente. Las curvas de germinación muestran que en general la germinación fue mayor con el NaOCl. La gran diferencia fue entre las especies siendo los valores finales de germinación los siguientes: 70,2-79,2 % para *S. caripense* y de 86,3 – 86,6 % para *S. tabanoense*.

González estudió en el año 2003 los efectos de los tratamientos químicos (antifúngicos y antibacterianos) sobre la germinación y el control de las enfermedades transmitidas por

hongos en semillas de judía tipo granja asturiana. Los antifúngicos ensayados fueron: desinfectantes de uso corriente (lejía, agua oxigenada), fungicidas inorgánicos (permanganato potásico), y fungicidas frecuentes en el tratamiento de semillas como captan, tiram, etc. Además de la mezcla de quintoceno y etridiazol, y también el acetato de guazatina, aunque ninguno de los dos está registrado, a petición de sanidad vegetal (Consejería de medio rural y pesca. Principado de Asturias). Con las semillas seleccionadas visualmente, cinco tratamientos antifúngicos, tiram, benomilo, captan, quintoceno y la mezcla de quintoceno y estidiazol, redujeron el porcentaje de infección hasta eliminar los hongos fitopatógenos de los que había constatado su presencia en el testigo, *Botrytis cinerea* y *Fusarium*. Pero los resultados obtenidos no eran estáticamente significativos dado el bajo porcentaje de infección del testigo. Con las semillas de destrío, se pudo apreciar mejor el efecto de los tratamientos desinfectantes. Se encontraron diferencias significativas entre las semillas tratadas y el testigo respecto a la presencia de *Colletotrichum lindemuthianum* en los tratamientos realizados con tiram, benomilo, captan, PCNB y lejía. El efecto de los distintos tratamientos sobre la germinación, solo se podía apreciar diferencias significativas con PCNB+estridiazol sobre semillas seleccionadas visualmente, que resultó muy tóxico a las dosis ensayadas dando un porcentaje de germinación de 38%. En cuanto a los ensayos de desinfección con antibacterianos, los productos ensayados fueron: Kasugamicina, Copac, Estreptomicina. La reducción de la presencia de bacterias fue significativa con en el caso de la Kasugamicina con cobre y de la estreptomicina, siendo la estreptomicina la que dio los mejores resultados, seguida por la kasugamicina y por último está el Copa que apenas parecía tener efectividad. En cuanto a la nascencia, se podía observar que la nascencia media fue mayor en el testigo sin tratar.

En el año 2007, en el departamento de Ciencias de plantas y protección de cultivos de la Universidad de Nairobi, se estudiaron los efectos del oxiclورو de cobre como fungicida (entre otros tratamientos) sobre la emergencia en semillas de las siguientes leguminosas; judía (*P. vulgaris* L. variedad GLP 2), frijol mungo (*Vigna radiata* L. variedad M66) y el lab lab (*Lablab purpureus* L.). Los resultados mostraron que la aplicación del fungicida incrementó de forma significativa la emergencia en las semillas afectadas por *Rhizotocnia* y *Sclerotinia*, los resultados fueron mejores en judía que en las demás leguminosas. Además que el fungicida mostro buenos resultados en la reducción de la mortalidad de las plántulas procedentes de las mismas semillas hasta el 51%, pero por otro lado tuvo poco efecto sobre *Fusarium* y *Macrophomina* en judía.

Otro ensayo con productos químicos para controlar infecciones fúngicas transmitidas por las semillas fue realizado en Bangladesh en el año 2008 con semillas de sorgo con dos muestras de diferentes localidades (Serphur y Mymensingh), el producto ensayado fue el Vitavax-200, un fungicida sistémico y de contacto presentado en forma acuosa. Los resultados fueron buenísimos, dado que dio los mejores resultados en el control de las infecciones transmitidas por semillas en las dos muestras, eliminó completamente las infecciones provocadas por *A. tenuis*, *B. cinerea*, *C. graminicola* en las muestras de Mymensingh y también un control total de las infecciones por *A. tenuis*, *B. cinerea* y *C. lunata* en las muestras de Serphur de además de un alto control hasta el 98,2% de la infección por *B. sorghicola* en las muestras de serphur y un control de más de 90% en las infecciones por *F. moniliforme* en ambas muestras. También el Vitavax-200 dio excelentes resultados en el control de patógenos transmitidos por semillas en cereales, especialmente en el trigo en todo el mundo (Nene y Saxena, 1971; Sharma y Joshi, 1972; Guldhe *et al.*, 1985; Moronova, 1991; Dey *et al.*, 1992; Hyder-Ali y Fakir, 1993). En cuanto al porcentaje de la germinación, el del Vitavas-200 fue aproximadamente del 34,1% aproximadamente en ambas muestras. Las semillas que tienen buena calidad, muestran menor respuesta (PG>90%), muestran menor respuesta al tratamiento con fungicidas.

En general los Bencimidazoles tienen alto porcentaje de control de *Phomopsis*, *Fusarium*, *C.kikuchii* y *Colletotricum*. Este grupo químico presenta un alto riesgo de generar resistencia ya que con su uso reiterado, transcurrido un tiempo se pueden desarrollar cepas resistentes, por ello se recomienda su utilización en combinación con otros principios activos como tiram, captan y mancozeb. En Argentina, la mezcla más usada al nivel comercial en semillas de soja es el carbendazim+tiram. También con ampliar el espectro de acción, se encuentra en el comercio otras alternativas como el metiltiofanato+tiram, y la “modernización” a través de la mezcla con moléculas de última generación como el pyraclostrobin (estrobilurina)+ metiltiofanato.

Como se puede observar, existen diferencias entre los tratamientos de semilla en el control de patógenos. Los tratamientos químicos son directamente afectados por el tipo de tratamiento, el producto usado y su dosificación. Su mecanismo está determinado por la forma física del agente y el proceso de la mezcla en el tratamiento. La efectividad del tratamiento también está relacionada con la buena adhesión del producto en la semilla y método de aplicación. Para tener la máxima efectividad, el método usado debe permitir la aplicación uniforme del producto sobre la superficie de la semilla y que este forme una cubierta bien

adherida a la misma para evitar que el material se desprenda antes de la siembra y la semilla quede menos protegida, disminuyendo la eficacia del mismo. Por último, el tratamiento debe efectuarse conociendo, previamente los patógenos involucrados y su localización en la semilla, sin olvidar tener en cuenta los daños que el producto puede producir en la semilla. (Arriagada, 2000).

Un punto muy importante que hay que tener también en cuenta a la hora de manejar los productos químicos en el tratamiento de semillas, es la compatibilidad de los fúngicos con bacterias fijadoras de nitrógeno *Bradyrhizobium* y con los antagonistas naturales, cuyo beneficio es conocido (BASF, 2006), ya que los productos fungicidas colocados sobre la semilla, pueden producir diversos efectos sobre los microorganismos favorables al cultivo como, por ejemplo, causar la muerte o disminuir la viabilidad.

En primer lugar, en algunos casos no son los principios activos los que producen la muerte de las bacterias sino los demás componentes que contienen los productos. En segundo lugar, en el suelo hay una diversidad de microorganismos como los hongos (*Trichoderma* spp., *Tolypocladium* spp, *Clonostachys* spp., *Talaromyces* spp.) y las micorrizas vesículo-arbuscular (*Glomus*), bacterias (*Bacillus*) y actinomicetos (*Streptomyces* spp.) que presentan un control actual y potencial de los fitopatógenos que habitan el suelo. Si ellos son destruidos por los fungicidas curasemillas, los patógenos habitantes del suelo, sin competencia alguna, encontrarán mayores posibilidades de colonizar la rizosfera e infectar al hospedante cumpliendo con sus objetivos fisiológicos (Luna *et al.*, 2006).

En estudios de compatibilidad entre carboxin+tiram, carbenzim+tiram y fludioxonil+metalaxil-M, con *Streptomyces* spp. se halló que la cepa C202 de *Streptomyces* fue compatible con fludioxonil+ metalaxil-M y carboxin+tiram, y que el carbenzim+tiram fue altamente tóxico sobre este actinomiceto (Fulgueira *et al.*, 2005). Distintas cepas de *Streptomyces* han demostrado su control sobre diversos patógenos como *Sclerotinia sclerotirum*, *M. phaseolina*, *R. solani*, hongos de semillas, *Fusarium virguliforme* uno de los agentes etiológicos del síndrome de la muerte repentina en soja (Scandiani *et al.*, 2005).

- **Tratamientos biológicos**

La base del control biológico, es la acción sobre los factores que intervienen en la interrelación hospedador-patógeno-ambiente. De esta manera se trata reducir la enfermedad afectando los siguientes puntos (Baker y Cook, 1974; Cook y Baker 1983):

- Viabilidad de los propágulos y eliminación de las estructuras de supervivencia.
- Infección del hospedador por el patógeno.
- Gravedad del ataque por el patógeno.

En general, los tratamientos biológicos se requieren pequeñas cantidades de agentes de control biológico, lo que los hace más rentables que otros métodos.

En la interacción hospedador-patógeno-ambiente, triángulo de la enfermedad, dentro del control biológico se puede añadir un cuarto factor: los organismos antagonistas. Por lo que el control biológico emplea estrategias y métodos para controlar la enfermedad a través de organismos vivos distintos del hombre (Melgarejo y De Cal, 2006). Un antagonista puede definirse como agentes biológicos con potencial para interferir en cualquiera de los procesos vitales de los patógenos vegetales (Campbell, 1989). Estos pueden ser hongos, bacterias, nematodos, protozoos, virus, viroides y plantas. El antagonismo, por otro lado, puede definirse como toda acción directa o indirecta ejercida por microorganismos que da como resultado la reducción de la expresión de la enfermedad (Melgarejo y De Cal, 2006).

Estos microorganismos emplean un cierto número de modos de acción que conducen a la protección de las semillas y las plantas. Estos modos de acción pueden ser clasificados de modo muy general en las categorías antagonismo, antibiosis, competición y microparasitismo (Mukhopadhyay, 1994).

El principal objetivo del tratamiento de semillas con agentes biológicos es proteger las semillas sanas contra los agentes patógenos existentes en el suelo. La aplicación práctica de los controles biológicos en lotes de semillas ya infectadas con patógenos es mucho más difícil, especialmente en los casos en que el patógeno está localizado internamente en las semillas.

El control biológico de patógenos transmitidos por semillas se realiza a través de tres mecanismos, la inducción de resistencia, la competencia o eliminación del patógenos y la producción de antibióticos (Arriagada, 2000).

La búsqueda de alternativas a los productos químicos y un interés creciente en métodos “orgánicos” (en español se suele usar el término “ecológico” si bien parece más correcto orgánico) de producción han estimulado en los últimos años el creciente desarrollo científico de agentes biológicos de control (ABC ó ACB), es decir de lucha antiparasitaria. En

este periodo se han logrado progresos gracias a un mayor conocimiento de los mecanismos de lucha de estos agentes, especialmente en el suelo (McGee, 1996).

Varios estudios demostraron que los tratamientos biológicos de semillas han sido efectivos contra el marchitamiento fúngico en varias legumbres, como es la soja (Osburn *et al.*, 1995), garbanzo (Trapero-Casas *et al.*, 1990), guisante (Harman *et al.*, 1989) y la habichuela (Harman *et al.*, 1989).

De los ACB patentados hasta principios de 1999, 84% eran bacterias y 16% hongos. Las bacterias incluían especies de *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter*. La mayoría de estos productos pertenecían a las especies *Pseudomonas* y *Bacillus*. Los productos a base de hongos consistían en varias especies de *Phomopsis*, *Ectomycorrhizae*, *Trichoderma*, *Cladosporium* y *Gliocladium* (Duvert, 1999).

Podemos concluir que el impacto sobre el control de patógenos en semillas y sobre el crecimiento de las plantas depende de la naturaleza del patógeno y del agente de control utilizado.

- ***Tratamientos combinados***

En el caso que se opte por una combinación de tratamientos (físicos, químicos y biológicos) por una razón o por otra, siempre hay que tener muy presente todas las posibles interacciones que puedan haber entre los tratamientos combinados.

En un estudio para evaluar los efectos de la combinación entre la alta presión, la temperatura y productos antimicrobiaos sobre la germinación y sobre la calidad microbiana de las plántulas, se llegó a la conclusión de que la presurización a 250 MPa sobre semillas de frijol mango tratadas con 18.000 ppm de hipoclorito o con 1500 ppm de carvacol, dio lugar a una inactivación significativa de todas las poblaciones microbianas naturales en las plántulas.

Aunque la combinación de los agentes desinfectantes (hipoclorito + carvacol) con la alta presión que tuvo como resultado a la mayor inactivación microbiana, produjo una disminución en la germinación , mientras para los tratamientos del hipoclorito + alta presión y carvacol+alta presión tuvieron porcentajes de germinación más altos, 80% y 60% respectivamente (Peñas *et al.* 2010).

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

- Ensayo 1. Para el análisis de la microbiota fúngica de las semillas de judía (*Phaseolus vulgaris* L.), se utilizaron 9 muestras (que denominaremos entradas) procedentes de la colección base del CRF-INIA (Centro de Recursos Fitogenéticos de Alcalá de Henares), almacenadas a -18°C durante 10 años en botes herméticamente cerrados y elegidas entre las que tenían una germinación baja, de diferentes localidades de España (cuadro 3.1). De estas mismas muestras, una parte fue utilizada para su análisis bacteriológico realizado paralelamente en el SERIDA de Asturias.

Cuadro 3.1. Entradas de judía del banco de germoplasma (BG) del CRF-INIA, procedencia y otras características.

Código de entrada del CRF	Código de UAL	Provincia	Comunidad Autónoma	Peso 100 semillas (g)	Germinación antes de 10 años (%)	Germinación después de 10 años (%)
BG025740(b)	PV10	Asturias	Asturias	22,34	92	22,5
BG025745	PV11	Asturias	Asturias	50,64	86	75,5
BG025747: lote a, lote b	PV12	Asturias	Asturias	71,22	86	39 (a) 86 (b)
BG026154	PV13	Orense	Galicia	57,18	88	95
BG026196	PV14	Pontevedra	Galicia	61,32	94	95
BG026201	PV 8	Pontevedra	Galicia	48,46	96	84,5
BG026232	PV15	-	Galicia	55,18	94	80
BG039975	PV16	Granada	Andalucía	29,84	-	80,5
BG039977	PV17	Granada	Andalucía	40,76	-	28

-Ensayo 2. Para ensayar tratamientos de termoterapia que se puedan elegir para su posterior uso en las muestras de las semillas de judía del banco de germoplasma sin producir daños en la semilla y en su germinación, se utilizaron tres variedades comerciales de distintos tipos que recojan la diversidad de la especie y de las que se podían disponer en cantidades grandes:

- Alubia riñón, Vegas Bañezanas, La Bañeza que denominaremos **JG**, color blanco y peso de 100 semillas (P100) =47,70 gramos.

- Alubia arrocina Rincón de Gredos, Gredos Alimentaria SL, El Barco de Ávila que denominaremos **JP**, color blanco y P100 =21,62 gramos.
- Frijol negro, El Barco de Ávila que denominaremos **JN**, color negro y P100=19,1 gramos.

-Ensayo 3. Finalmente se utilizaron tres entradas de semillas de la colección del CRF-INIA: BG026196 (PV14), BG026201 (PV8), BG39975 (PV16), para aplicarles dos tratamientos de termoterapia escogidos a partir de los resultados de los ensayos anteriores (con las muestras de las semillas comerciales).

3.2. Preparación de medios de cultivo microbiológicos

Para los análisis de detección de microbiota fúngica se utilizaron diversos medios que se describen a continuación:

-Agar de patata glucosado (PDA) (Tello *et al.*, 1991): Este medio de cultivo es especialmente indicado para el análisis microbiológico puesto que es bastante rico, lo cual permite la expresión de la microbiota fúngica.

➤ Compuesto de:

- 200 g de patatas.
- 20 g de glucosa.
- 17 g de agar.
- 1000 mL de agua destilada.

➤ Preparación: se pelan las patatas, se trocean y se ponen a cocer en 600 ó 700 mL de agua destilada y se mantienen en ebullición durante unos 10 minutos, después se filtra el caldo a través de una muselina. Al filtrado se le añaden el agar y la glucosa y se enrasa hasta llegar a los 1000 mL con agua destilada en una botella de vidrio de un litro. Se esteriliza en autoclave durante unos 25 minutos a 120°C. Se distribuye posteriormente en placas de Petri de 9 cm de diámetro de razón de 17 mL.

-Agar-Agua (AA) (Tello *et al.*,1991): Es un medio de gran utilidad debido a que es muy pobre en nutrientes para los hongos que permite un crecimiento espaciado de las hifas dentro de la placa de petri y ayuda a que la observación de las estructuras sea más clara. Se utilizo mayormente para repicar colonias y posteriormente proceder a su identificación, ya que resultaba difícil sobre las semillas.

- Composición:
 - 20 g de agar.
 - 1000 mL de agua destilada.
- Preparación: se añade el agar a los 1000 mL de agua, se esteriliza a 120°C durante unos 25 minutos en autoclave y se distribuye en placa de Petri.

-Cloruro potásico con hojas de clavel (Tello *et al.*, 1991): se utiliza para identificar especies de *Fusarium* y otras.

- Composición:
 - 5 g de cloruro potásico.
 - 15 g de agar.
 - 1000 mL de agua destilada.
- Preparación: se añade el agar y el cloruro potásico a los 1000 mL de agua, se esteriliza a 120°C durante unos 25 minutos en autoclave. Se reparte luego en placas de petri a razón de 15 mL con unos dos o tres trozos de clavel esterilizados por placa.

3.3. Ensayo 1. Análisis de la microbiota fúngica de las entradas de semillas de judía de la colección del banco de germoplasma del CRF

Para el análisis de las nueve entradas de judía (cuadro 3.1), con el fin de estudiar la microbiota de las semillas, se utilizaron dos métodos:

- Método entre papel de filtro (*International Seed Testing Association* ó ISTA): Se dispusieron las semillas en forma de cinco filas por seis o diez columnas espaciadas para cada entrada sobre dos papeles de filtro humedecidos con agua destilada. Una vez colocadas las semillas se cubrieron con papel de filtro también humedecido, se enrollaron cuidadosamente y se guardaron en bolsas de plástico. El total de las semillas analizadas fue de 60 semillas (dos repeticiones de 30) para cada entrada (Foto 3.3 a y b) y en el caso de la entrada BG026201 se utilizaron 200 (4 repeticiones de 50) realizado en 2008.
 - Método placa de petri con papel de filtro o *blotter test* (Mathur y Kongsdal 2003): En cada placa de Petri de 9 cm de diámetro con dos a tres papeles de filtro Whatman n°1 humedecidos con agua destilada, se colocaron 5 semillas espaciadas por cada entrada en 4 placas, así suman un total de 20 semillas por entrada

(Foto 3.3.1.c). Cada placa se marcó con el código correspondiente, se numeró cada repetición y cada una de las semillas para facilitar la lectura de la microbiota.

Las semillas en ambos métodos fueron sumergidas previamente en una solución de hipoclorito sódico (NaOCl) al 1% durante 10 min y aclaradas con agua destilada (Método 7-006 ISTA 2008 descrito para judía) con el fin de reducir saprofitos externos.

La colocación de las semillas se hizo con pinzas desinfectadas mediante flameado. Las placas se cerraron con tiras de parafilm para evitar su desecación.



Foto 3.3. Método de análisis de la microbiota:

a y b) entre papel de filtro

c) en placa de Petri con papel de filtro.

Las muestras se incubaron a temperatura ambiente (20-22°C). La observación del crecimiento de los hongos se realizó a partir del segundo día de forma individualizada para cada semilla durante 14 días como mínimo. La identificación de las especies fúngicas se hizo mediante la observación de las colonias fúngicas a la lupa, al microscopio óptico, con preparaciones en portaobjetos y mediante la utilización de libros de identificación de hongos (Barnett y Hunter, 1972; Malone y Muskett, 1964; Samson *et al.* 1995). En algunos casos fue

necesario aislar y cultivar los hongos en medios microbiológicos para su identificación (agar de patata glucosado, agar agua y cloruro potásico con hojas de clavel).

3.4. Ensayo 2. Análisis de la microbiota fúngica de semillas de judía comerciales después de tratamientos físicos

Se utilizaron las tres variedades de semillas comerciales JG, JP, JN (apartado 3.1), con el fin de ensayar varios tratamientos de termoterapia. De este modo se evaluaría la eficacia de cada uno de ellos en la eliminación de la microbiota de semillas y su efecto sobre la viabilidad y la germinación de las semillas con el fin de seleccionar posteriormente los más adecuados y que pudieran ser utilizados en tratar semillas de judía en las colecciones de bancos de germoplasma.

Los tratamientos físicos aplicados a las semillas fueron: Calor seco (CS), calor húmedo (CH) y saturación (S), y una gama de temperatura entre 40°C y 70°C con duraciones desde 8h a 7 días según se indica en el cuadro 3.4 y se llevaron a cabo en el CRF (cuadro 3.4). En este Centro también se realizaron tratamientos de calor a 60°C durante 3 días y calor seco a 70°C durante 8h para comprobar la germinación pero no se analizó su microbiota.

Cuadro 3.4. Tratamientos de termoterapia aplicados a semillas de tres variedades comerciales de judía (apartado 3.1).

Tratamiento	CS				CH			S			
	CS- 50°C- 4D	CS- 50°C- 7D	CS- 60°C- 4D	CS- 70°C- 1D	CH- 50°C- 2D	CH- 50°C- 4D	CH- 60°C- 2D	S- 40°C -24h	S- 40°C -48h	S- 45°C -8h	S- 45°C -24h
Código de variedad	JG JP JN	JG JP	JG JP	JG JP	JG JP						

CS= Calor seco; CH= Calor húmedo; S=Saturación; D= Días; h= horas.

El tratamiento de calor seco consistió en introducir las muestras en sobres de aluminio herméticos y se llevaron a baño María con la temperatura deseada. El tratamiento de calor húmedo consistió en colocar las muestras sobre bandejas de papel y se introdujeron en una cámara Binder a una humedad del 70%. Finalmente el tratamiento saturación consistió en colocar las muestras sobre rejillas y se introdujeron en bandejas de plástico; por debajo de la

rejilla se colocó un volumen de agua que en ningún momento entró en contacto directo con las muestras. Después se taparon con un cristal para conseguir un ambiente saturado de humedad y se introdujeron en una cámara Binder, programada a 40% de humedad.

Para el análisis de la microbiota, las semillas tratadas se colocaron en placas de Petri de 9 cm con medio PDA (Mathur y Kongsdal, 2003), a razón de 5 semillas espaciadas por placa para cada variedad y tratamiento repeticiones en 4 placas, incluyendo las semillas utilizadas como control sin tratar, con repeticiones en el tiempo hasta llegar a 100 semillas por tratamiento, siguiendo el procedimiento de colocación explicado en el apartado 3.3.

Posteriormente las semillas se incubaron a temperatura del laboratorio (20-24°C) y las lecturas se hicieron cada dos días. La identificación de los hongos se realizó como se ha explicado en el apartado anterior.

3.5. Ensayo 3. Análisis de la microbiota fúngica de tres entradas de semillas de judía de CRF después de los tratamientos físicos escogidos

Tras analizar la microbiota de la colección del banco de germoplasma y conocer su carga fúngica y bacteriológica, se escogieron tres entradas de las cuales se disponía de una cantidad suficiente de semillas (BG026196, BG026201, BG39975) para poder realizar ensayos de termoterapia.

Dos tratamientos de termoterapia fueron seleccionados: Calor seco a 60°C durante 3 días (CS 60-3D), calor seco a 70°C durante 8h (CS 70-8h), en base a los resultados previos, con el fin de evaluar su eficacia en la eliminación de microorganismos en las semillas y su efecto sobre la viabilidad y germinación de las mismas.

Los análisis se realizaron con dos métodos en placas de Petri de 9 cm de diámetro (Mathur y Kongsdal, 2003):

- Con papel de filtro en cada placa (Whatman n°1) humedecidos con agua destilada.
- Con medio de cultivo general PDA (foto 3.5)

Foto 3.5. Método de análisis de la micobiota de semillas de judía sobre medio agarizado (PDA).



La utilización de placas permitiría un seguimiento continuo a diario del desarrollo de las colonias fúngicas procedentes de las semillas.

En ambos métodos de cada entrada y tratamiento se sembraron 5 semillas espaciadas repetidas en 4 placas. Se analizó un total de 80 semillas por entrada tratada más los controles sin tratar. La disposición de semillas, incubación, lecturas e identificación de hongos se realizaron del modo anteriormente descrito (apartado 3.3).

El estudio estadístico de los resultados se ha hecho mediante el análisis de la varianza. Las comparaciones entre las medias se han realizado por el método de la menor diferencia significativa (LSD), para un nivel de confianza del 95%. Se ha utilizado el programa Statistix 9.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Ensayo 1. Análisis de la microbiota fúngica de las entradas de semillas de judía de la colección del banco de germoplasma del CRF

En los resultados de los análisis después de incubación en placas con papel de filtro (P.placa) y entre papel de filtro enrollado (P.filtro), de forma general, se puede apreciar la presencia de cinco géneros de hongos mayoritarios: *Penicillium* (*Pen*), *Fusarium* (*Fus*), *Rhizopus* (*Rhi*), *Alternaria* (*Alt*) y *Aspergillus* (*Asp*) tal y como se muestra en el cuadro 4.1. En general, el porcentaje de hongos aislados en cada entrada fue mayor por el método P.placa que por el método P.filtro. También se detectaron bacterias.

El hecho de que no se detectaran algunas especies fúngicas citadas por otros autores como González *et al.* (2004) (véase *Rhizoctonia*) puede que se deba a que en el banco de germoplasma se realizó en su día una limpieza (visual) de las muestras o entradas previa a su almacenamiento y conservación; las judías afectadas por *Rhizoctonia* suelen presentar rugosidades.

Palmero e Iglesias (2007) analizaron muestras de semillas de judía en papel de filtro y en PDA, en dicho análisis de la microbiota fúngica detectaron un total de 10 géneros, cinco de ellos coinciden con los obtenidos en nuestro análisis fúngico en los dos métodos utilizados. También según el análisis de la microbiota fúngica de las semillas de judía del CRF-INIA realizado por Blanco *et al.* (2010), la mayoría de hongos coinciden con los del presente estudio aunque los análisis solo los hicieron entre papel de filtro enrollado. Algunos de los hongos mencionados por estos autores fueron también detectados en nuestro análisis pero con un porcentaje muy bajo (*Trichoderma*, *Trichotecium*, *Chaetomium*)

Las entradas con germinación baja después de 10 años de conservación (BG025740 lote b, BG025747 lote a y BG39977), (cuadro 4.1) con porcentajes inferiores al 40% (entre 22,5% y 39,5%), tienen una biota fúngica variable 3,3% y 40% en P.filtro y 20% y 70% en P.placa. En dichas entradas, la presencia de *Fusarium* que puede tener especies patógenas (Melgarejo *et al.*, 2008), junto a *Penicillium* que se considera hongo de almacenamiento y la elevada carga bacteriológica (30,5; 83; 10,7 x10³ ufc/ml respectivamente, comunicación personal Dra. A. González), podrían explicar el descenso de la germinación después de su almacenamiento como ya se mencionó durante 10 años a -18°C.

Cuadro 4.1. Porcentaje de hongos detectados y de número de semillas afectadas para el conjunto de las nueve muestras analizadas. (Alt=*Alternaria alternata*; Asp=*Aspergillus*; Fus=*Fusarium*; Pe=*Penicillium*; Rhi=*Rhizopus*; Otros=en muy pequeños porcentajes o no identificados, P= Papel, GA/GA10=Porcentaje previo de germinación de semillas (GA) y tras 10 años de conservación (GA10).

VARIEDAD	Método de análisis	Géneros/especies fúngicas mayoritarias (%)							GA/G10 (%)
		Alt	Asp	Fus	Pe	Rhi	Otros	Total hongos (%)	
BG025740 (b)	P.filtro	1,6	5	3,3	5	0	0	15	92/22,5
	P.placa	0	0	42,5	2,5	0	0	45	
BG025745	P.filtro	0	0	0	5	0	0	5	86/75,5
	P.placa	0	0	0	32,5	0	0	32,5	
BG025747 (a) y (b)	P.filtro	0	0	1,6	0	0	1,6	3,3	86/39,5(a)
	P.placa	0	0	10	2,5	0	7,5	20	86/85,5(b)
BG026201	P.filtro	0,5	0,5	0,5	1	0,5	1	5	96/84,5
	P.placa	-	-	-	-	-	-	-	
BG026154	P.filtro	-	-	-	-	-	-	-	88/95
	P.placa	5	0	10	25	0	0	40	
BG026196	P.filtro	1,6	0	0	3,3	3,3	0	8,3	94/95
	P.placa	2,5	0	5	0	0	5	12,5	
BG026232	P.filtro	0	0	1,6	18,3	0	0	19,9	94/80
	P.placa	0	0	2,5	25	0	0	27,5	
BG39975	P.filtro	1,7	0	0	15	1,6	0	18,3	-/80,5
	P.placa	0	0	2,5	0	0	0	2,5	
BG39977	P.filtro	0	0	8,3	31,6	0	0	39,9	-/28
	P.placa	7,5	2,5	0	20	40	0	70	

(-)= Sin datos.

A continuación representamos individualmente los resultados de cada entrada respecto al porcentaje de microbiota fúngica y el porcentaje de semillas infectadas comparando la microbiota detectada en los dos métodos de análisis mediante papel.

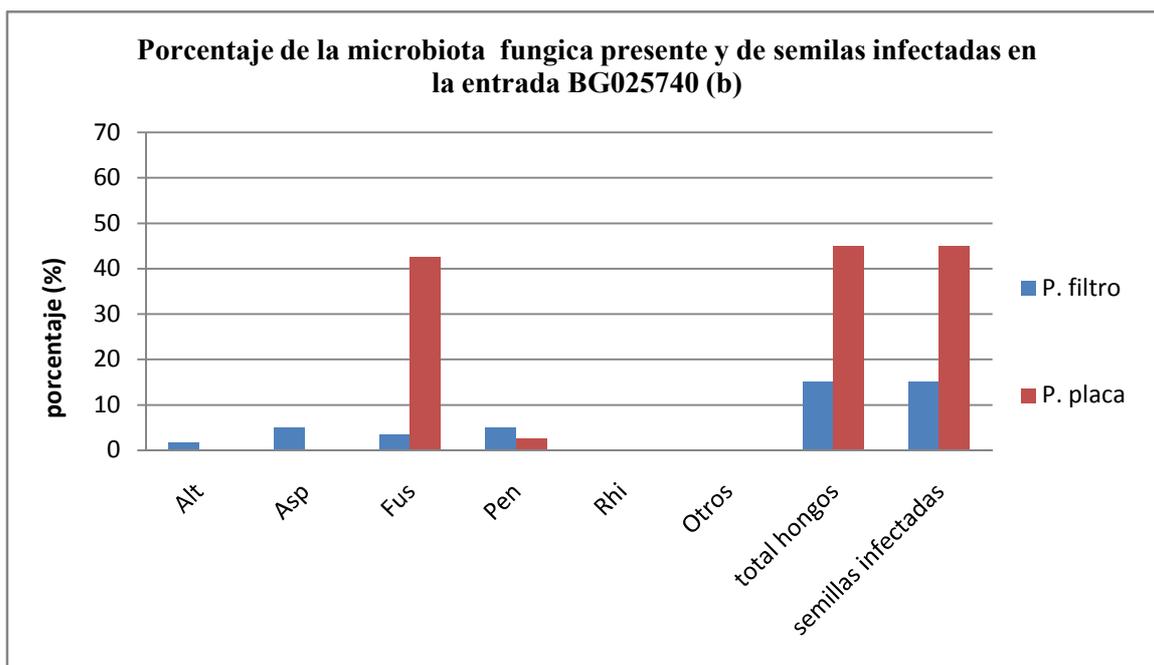


Figura 4.1.1. Porcentaje de la microbiota fúngica presente en la entrada BG025740 (b) y de semillas afectadas.

En los resultados analíticos de la entrada BG025740 (b) se puede observar claramente que *Fusarium* fue el hongo con mayor presencia con un porcentaje de 3,3 % en P.filtro y 42,5% en P.placa (figura 4.1.1). El porcentaje de semillas infectadas también fue notable, del 45% en placas.

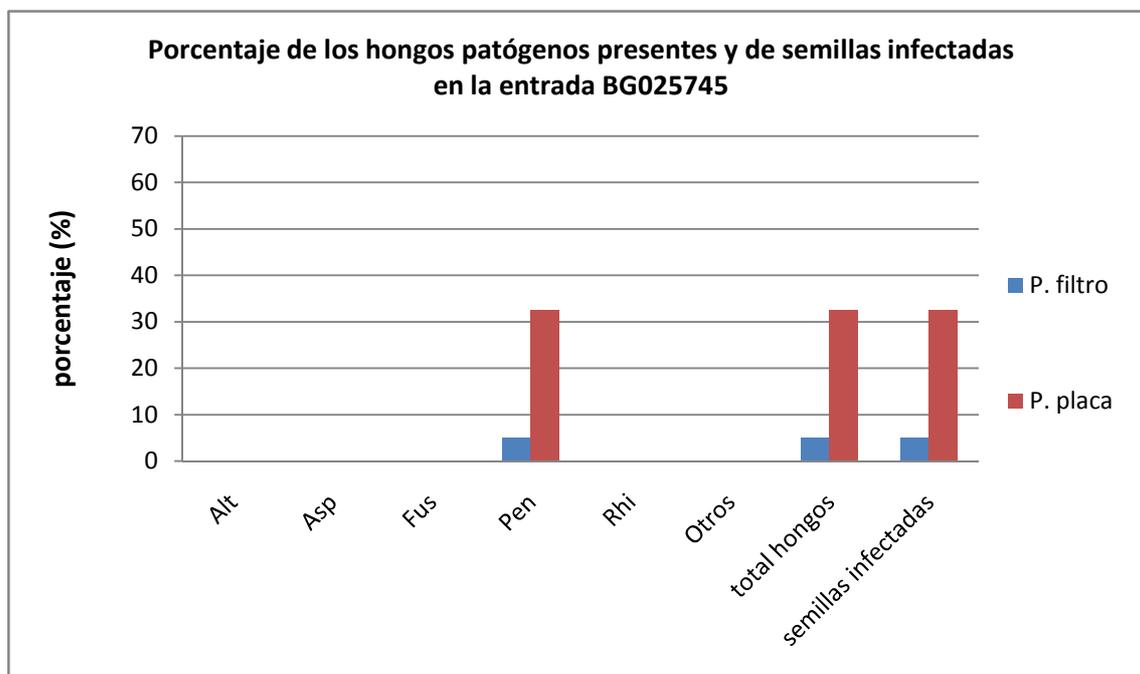


Figura 4.1.2. Porcentaje de la microbiota fúngica presente en la entrada BG025745 y de semillas afectadas

El único hongo detectado en la entrada BG025745 fue *Penicillium* y al igual que el caso anterior se observó en mayor porcentaje en placas (figura 4.1.2), 5% en P.filtro y 32,5% en P.placa. El porcentaje de semillas afectadas también fue del 32,5%.

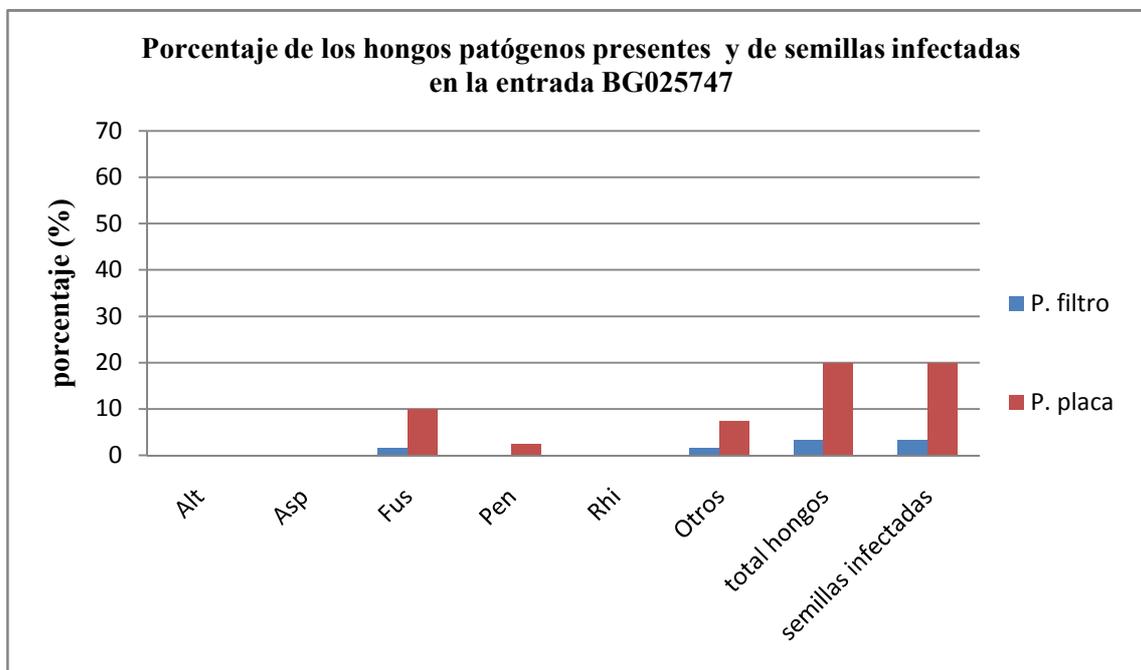


Figura 4.1.3. Porcentaje de la microbiota fúngica presente en la entrada BG025747 y de semillas afectadas.

En la entrada BG025747 (figura 4.1.3) se habían detectado *Fusarium* (P. filtro 1,7%; P.placa 10%) y *Penicillium* (P.filtro 0%; P.placa 2,5%) además de otros no identificados con porcentajes muy pequeños. El porcentaje de semillas afectadas también fue bajo (20%).

En la entrada BG026196 se aisló un porcentaje total de microbiota fúngica muy bajo, menos del 15% (figura 4.1.4), así como el menor porcentaje de semillas afectadas. Los porcentajes de presencia de *Fusarium* (P.filtro 0%; P.placa 5%), *Penicillium* (P.filtro 3,3%; P.placa 0%) y los hongos no identificados fueron bajos (P.filtro 0%; P.placa 5%).

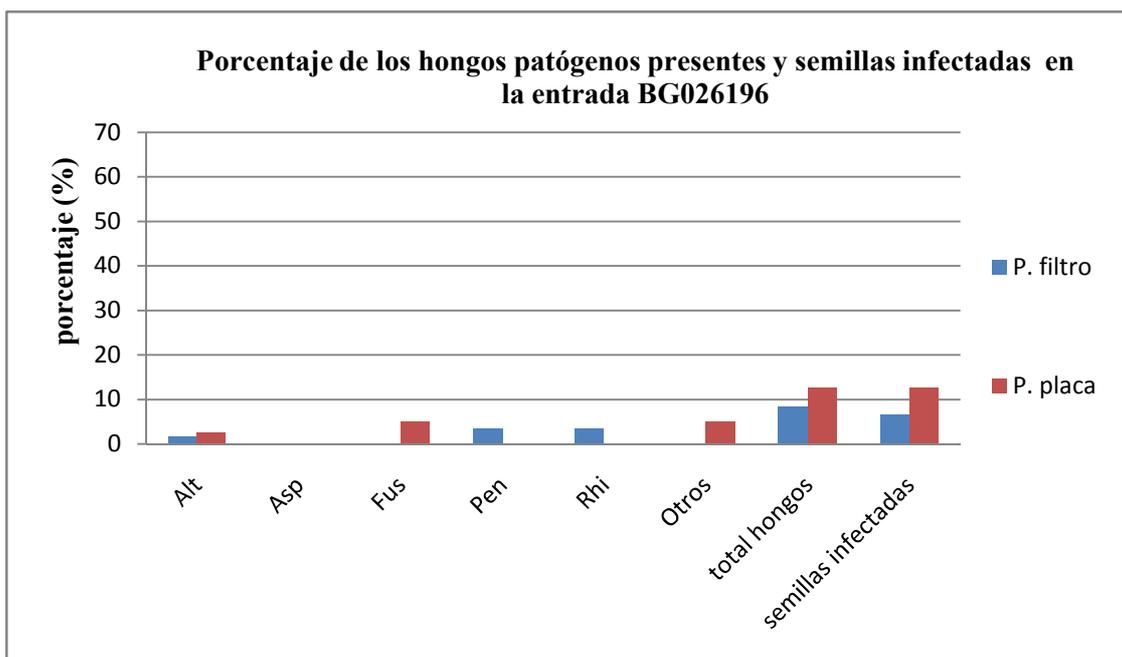


Figura 4.1.4. Porcentaje de la microbiota fúngica presente en la entrada BG026196 y de semillas afectadas.

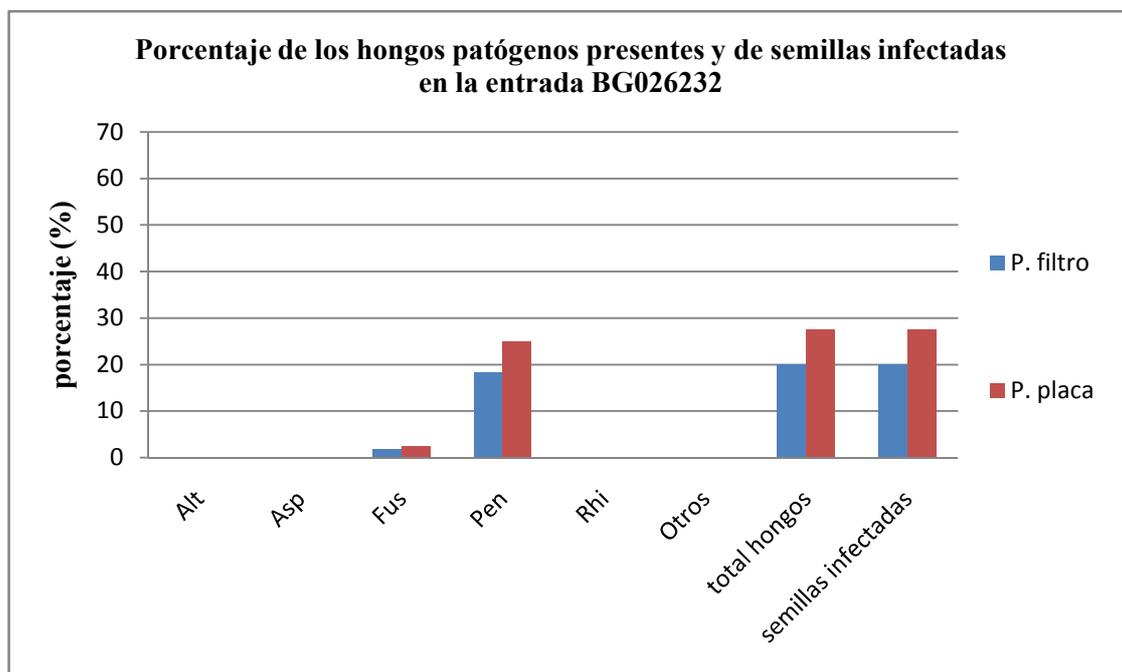


Figura 4.1.5. Porcentaje de la microbiota fúngica presente en la entrada BG026232 y de semillas afectadas.

En la entrada BG026232, el porcentaje total de hongos aislados fue en torno al 27% en P.placa (figura 4.1.5). En este caso, *Penicillium* sigue siendo uno de los más detectados con un porcentaje de afección que llegó hasta el 25% en placas.

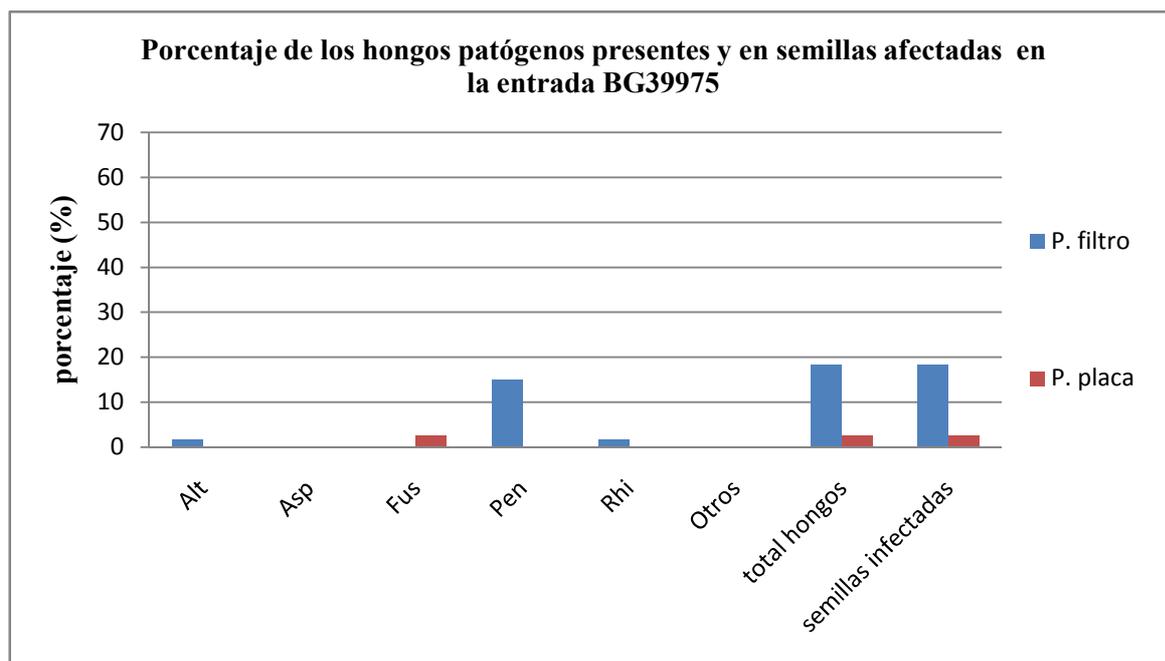


Figura 4.1.6. Porcentaje de la microbiota fúngica presente en la entrada BG39975 y de semillas afectadas.

Los porcentajes de microbiota total de la entrada BG39975 (figura 4.1.6) no fueron superiores al 20%: *Penicillium* (P.filtro 15%; P.placa 0%); *Fusarium* (P.filtro 0%; P.placa 2,5%); *Alternaria* (P.filtro 1,6%; P.placa 0%); *Rhizopus* (P.filtro 1,6%; P.placa 0%). En esta entrada el porcentaje total de hongos aislados y de semillas infectadas fue mayor entre papel de filtro que en placas.

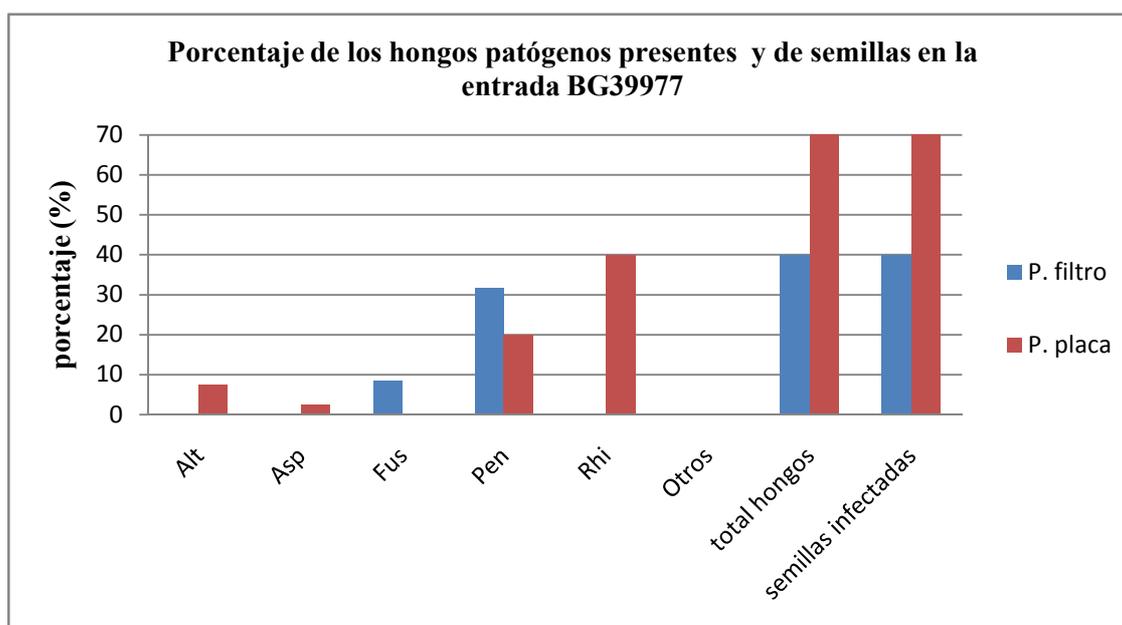


Figura 4.1.7. Porcentaje de la microbiota fúngica presente en la entrada BG39977 y de semillas afectadas.

La muestra BG39977 (figura 4.1.7) fue la más afectada por los hongos: *Penicillium* (P.filtro: 31,6%, P.placa: 20%); *Fusarium* (P.filtro: 8,3%, P.placa: 0%) y *Rhizopus* (P.placa: 40%). El porcentaje de semillas afectadas también fue elevado no teniendo un buen aspecto

Recordemos que el análisis de la microbiota fue realizado a las semillas de judía del CRF almacenadas durante diez años que tuvieron una germinación más baja de la esperada.

De acuerdo con los resultados ya mostrados se puede observar de forma general que el método más adecuado para el análisis de la microbiota fúngica fue el método de las placas con papel en comparación con el método de papel de filtro enrollado, porque permitió mejor desarrollo en cantidad y calidad de las estructuras de los hongos que ayudan a su posterior identificación. En cambio según los resultados de análisis fúngico obtenidos por Palmero e Iglesias (2007) sobre las semillas de judía, el método en el cual encontraron mayor cantidad de hongos desarrollados fue el del papel de filtro en comparación con el PDA, si bien podría depender de la variedad analizada.

4.2. Ensayo 2. Análisis de la microbiota fúngica de semillas de judía comerciales después de los tratamientos físicos

Los resultados del análisis de la microbiota después de los tratamientos de termoterapia aplicados a las semillas de judía, Alubia riñón (JG), Alubia arrocina (JP), Frijol negro (JN) se muestran en las figuras 4.2.1, 4.2.2 y 4.2.3.

En las semillas JG, además de los cinco géneros fúngicos representados en la figura 4.2.1 (*Penicillium*, Pen; *Fusarium*, Fus; *Rhizopus*, Rhi; *Alternaria*, Alt; *Aspergillus*, Asp), se detectaron varias especies de las cuales alguna se identificó como *Cladosporium* y otras no fueron identificadas por no desarrollar estructuras que ayudaran a su identificación.

El porcentaje de hongos totales en los tratamientos de calor seco (CS) y calor húmedo (CH) fueron menores que en el control. En el calor seco, todos los tratamientos han podido disminuir la presencia de *Alternaria* y *Rhizopus* llegando incluso a eliminar éste último. Mientras que en el tratamiento CS-50-4D no tuvo efecto suficiente para reducir al menos al 5% el porcentaje del hongo.; los tratamientos de calor seco a 50°C aplicados, ya sea durante 4 ó 7 días han permitido detectar *Aspergillus*, mientras que en el control no se había detectado. En el caso del tratamiento CS-50-7D pudo disminuir la presencia de *Penicillium* en comparación con el control (figura 4.2.1).

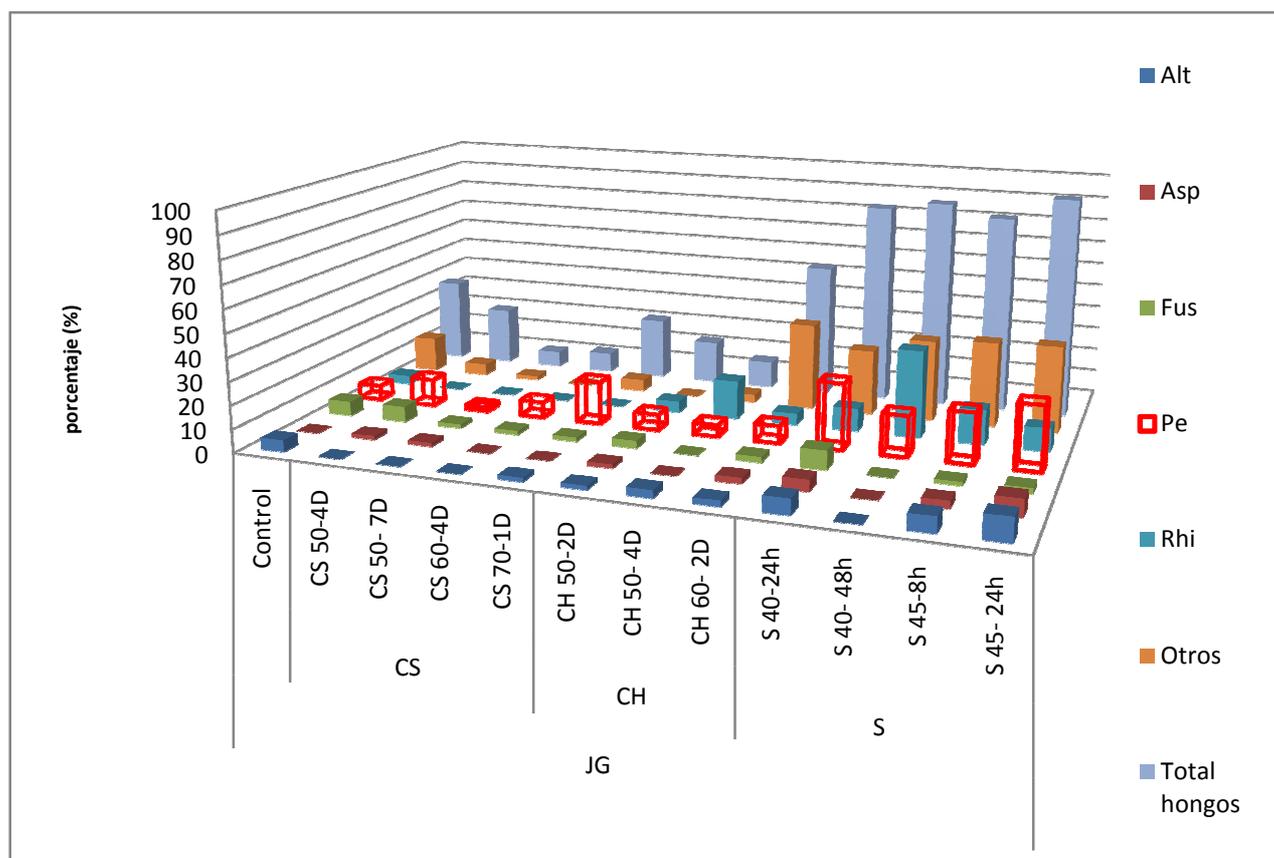


Figura 4.2.1. Porcentaje de la micobiota fúngica detectada en la muestra JG después de tratamientos de termoterapia de 40 a 70°C. CS=Calor seco; CH=Calor húmedo; S=Saturación; D=días; h=horas.

En el calor húmedo, todos los tratamientos fueron eficaces para tratar *Alternaria* y *Fusarium*. En el caso de *Aspergillus* y *Penicillium* el CH-50-4D pudo eliminar la afección por el primero y bajar la del segundo por debajo de la del control. *Rhizopus* resistió a todos los tratamientos incluso aumentó su porcentaje.

En el caso del tratamiento de saturación, en todos ellos destaca un elevado porcentaje total de hongos respecto al control. Se desarrollaron especialmente *Penicillium* y *Rhizopus*, el crecimiento del este último enmascara la identificación de otros hongos, sí bien las colonias de *Penicillium* destacan por su color azul, destacan entre la maraña de hifas de *Rhizopus*. En general los datos deben tomarse con cautela, ya que el desarrollo de *Rhizopus* no permite la detección de todos los hongos (figura 4.2.1).

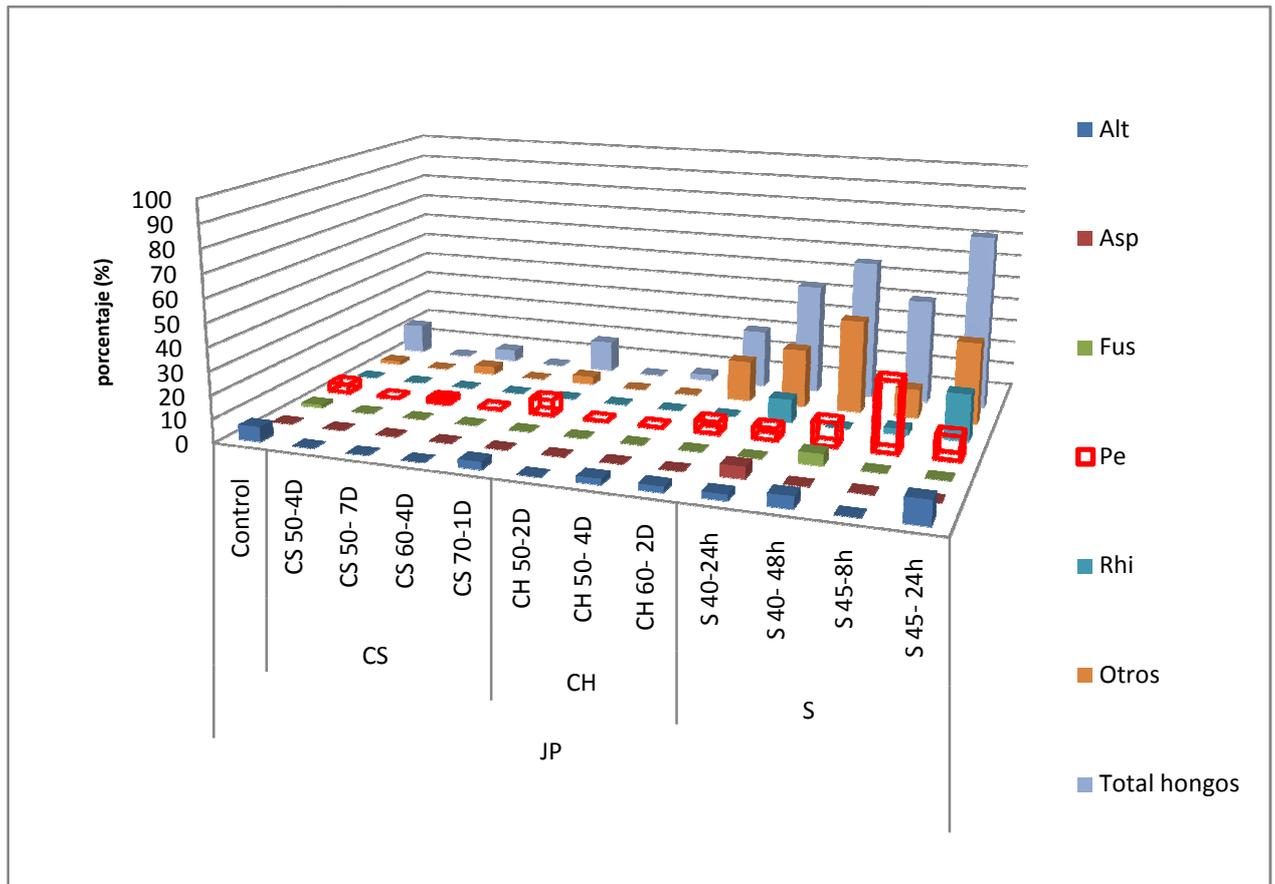


Figura 4.2.2. Porcentaje de la microbiota fúngica en la muestra JP y de semillas afectadas.

En las semillas de JP el porcentaje de microbiota fue bajo (figura 4.2.2). Para el calor seco, se puede observar que todos los tratamientos lograron eliminar por completo la presencia de *Fusarium* y *Rhizopus*, con *Penicillium*, solo los CS-50-4D y CS-60-4D lograron eliminar su presencia en comparación con el control.

En el calor húmedo, el CH-50-2D eliminó todos los hongos, el CH-50-4D, eliminó la presencia de *Fusarium* y *Penicillium* e hizo disminuir la presencia de *Alternaria*, el CH-60-2D, eliminó *Fusarium* e hizo disminuir la presencia de *Alternaria* pero en el caso de *Penicillium* hizo aumentar el hongo (figura 4.2.2.).

Para la saturación, el porcentaje total de hongos fue mayor que en el control. El S-40-24h no se detectó *Fusarium*. El S-40-48h y el S-45-8h no tuvieron efecto positivo sobre la afección por hongos. El tratamiento S-45-24h logró eliminar *Fusarium* y para los demás su efecto fue negativo y al incrementar los porcentajes de afección al respecto al control. La aparición de *Rhizopus* probablemente enmascaró su detección pero no la de *Penicillium*.

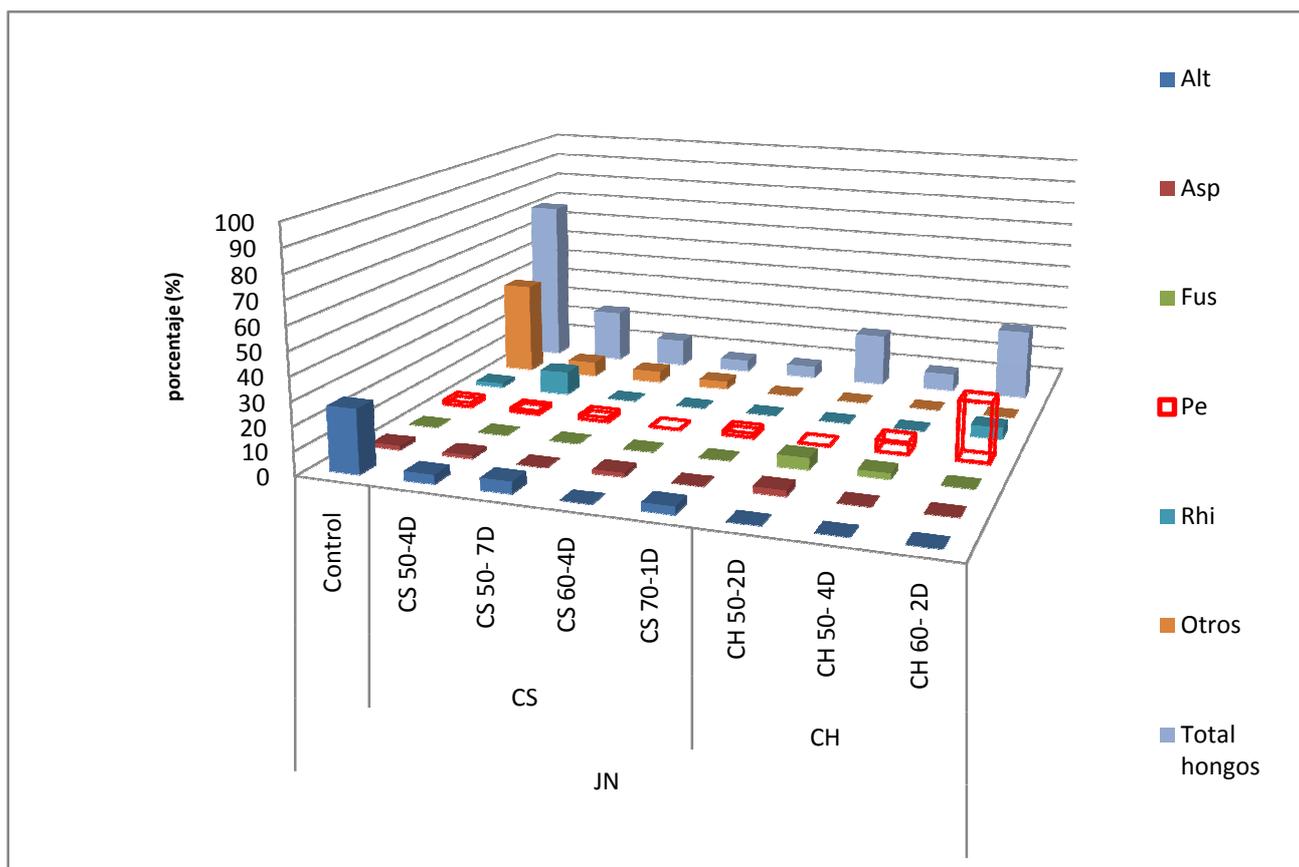


Figura 4.2.3. Porcentaje de la micobiota fúngica detectada en las muestras de judía negra (JN) y de semillas afectadas.

En el caso de la JN, solo se hicieron tratamientos con calor seco y calor húmedo a la vista de resultados anteriores de no eliminación de biota fúngica sino de aumentarla

El porcentaje total de hongos del control fue elevado debido a la presencia de *Alternaria* y otros. En el calor seco, el CS-50-4D no se eliminó *Rhizopus* por lo que el descenso de los porcentajes del resto de hongos puede atribuirse al enmascaramiento sin embargo el resto de tratamientos eliminó *Rhizopus* y *Alternaria* disminuyó a menos del 5% (de mayor duración o mayor temperatura)

El calor húmedo parece reducir *Rhizopus* pero fue detectado en el tratamiento CH-60-2D donde también se pudo observar abundante *Penicillium* (figura 4.2.3).

De forma general, para los tres tipos de judía comerciales el tratamiento más efectivo fue el del calor seco puesto que redujo el porcentaje de la presencia de los microorganismos en comparación con las muestras control (muestras no tratadas). En el caso de la variedad JG dentro del tratamiento con calor seco, el más efectivo fue el CS-50-7D, en el caso de la variedad JP los más eficientes fueron los CS-60-4D y CS-50-4D y en

la variedad JN, el más efectivo fue el CS-60-4D por la razón anteriormente citada. Mientras que los tratamientos menos efectivos fueron para las dos primeras variedades el calor saturado (especialmente el S-45-24h), para la última variedad JN el menos efectivo fue el calor húmedo (especialmente el CH-60-2D) porque no se ensayó el tratamiento de saturación. En este sentido, Jahn *et al* (2006) para el tratamiento de diferentes hortalizas y para cada cepa de *Alternaria* utilizaron un tratamiento específico distinto. Para las especies *Alternaria dauci* y *Alternaria radicini* utilizaron calor seco pero para *Alternaria brassicae* usaron calor húmedo.

En cuanto a la germinación, los tratamientos tuvieron efectos variables en función de la variedad de la semilla y de la temperatura, humedad y tiempo de aplicación. En el caso de JG, los tratamientos que no tuvieron efectos negativos sobre la germinación de las semillas fueron calor seco a 50°C durante 4 y 7 días, calor húmedo a 50°C durante 2 días y todo el tratamiento de saturación. En el caso de la variedad JP, el único tratamiento que no tuvo efecto negativo fue el calor húmedo a 50°C durante 4 días. Mientras que para la variedad JN, entre los tratamientos que se aplicaron solamente el calor húmedo a 60°C durante 2 días tuvo efecto negativo sobre la germinación de las semillas (Datos no presentados, comunicación personal de I. Martín).

Hall y Taylor (1983), también observaron que los tratamientos con calor seco a temperaturas moderadas (55°C y 60°C) pudieron eliminar *Salmonella* sin afectar al porcentaje de germinación de las semillas de alfalfa mientras que a temperatura más alta (65°C) se logró eliminar tanto *Salmonella* como *E. coli* pero afectó a la germinación de las semillas.

Resumiendo, podemos ver que el tratamiento con calor seco fue el más eficaz para reducir o incluso eliminar algunos de los hongos detectados pero fue el que mayor efecto negativo tuvo sobre la germinación de las semillas mientras que con el tratamiento de saturación fue todo lo contrario, es decir, fue el que tuvo menos efecto negativo sobre la germinación pero fue el peor a la hora de reducir la carga fúngica (Datos no presentados, comunicación personal de I. Martín).

4.3. Ensayo 3. Análisis de la microbiota fúngica de tres entradas de semillas de judía del banco de germoplasma después de los tratamientos físicos escogidos

En la totalidad de los lotes (BG 026196, BG 026201, BG 039975) analizados se detectó la presencia de hongos a partir del cuarto día desde el inicio del análisis. Después de 14 días, tras la última lectura de los resultados, se habían detectado cinco hongos mayoritarios: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Rhizopus*, además de otros que no se habían identificado o bien se presentaban en un porcentaje muy bajo y diferente para cada entrada. Los tratamientos realizados fueron calor seco a 60°C durante 3 días (CS-60-3D) y calor seco a 70°C durante 8 horas (CS-70-8h).

Los resultados del porcentaje de hongos detectados además del porcentaje de semillas afectadas por hongos, por entrada y para cada uno de los dos tratamientos físicos además del control sin tratar y el control desinfectado con NaOCl al 1% se representan en las figuras 4.3.1, 4.3.2, 4.3.3).

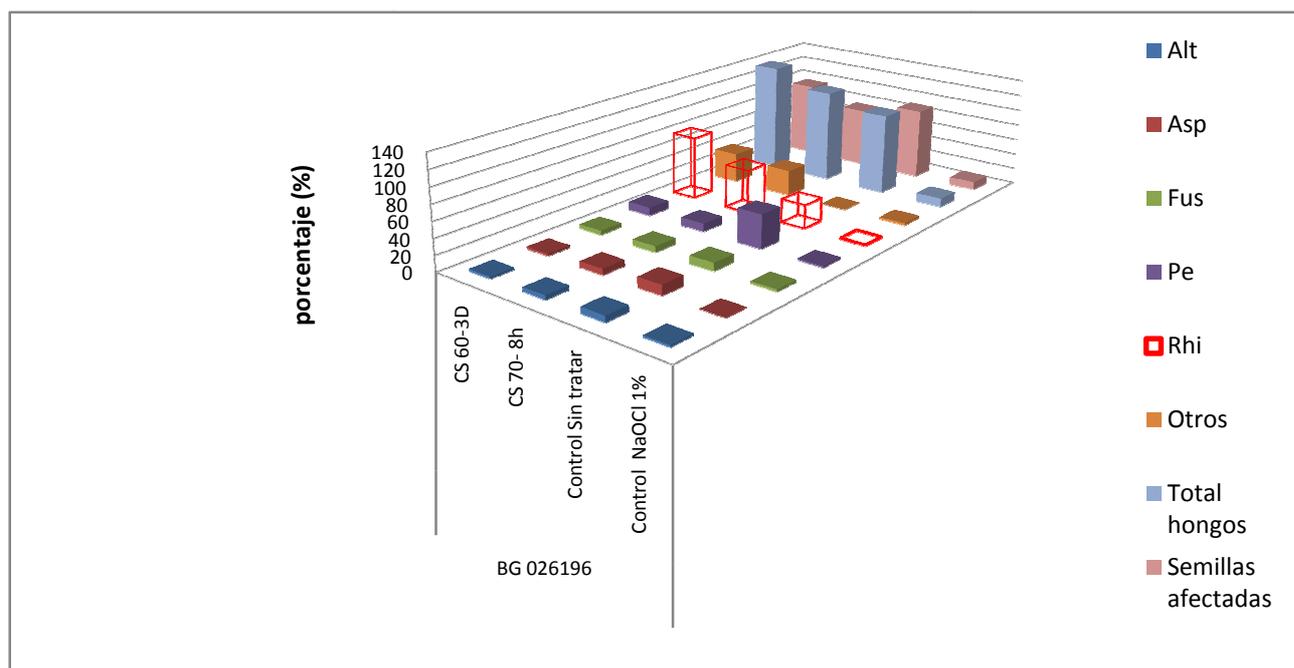


Figura 4.3.1. Porcentaje de hongos detectados y semillas afectadas en la entrada BG 026196. (Alt=*Alternaria*; Asp=*Aspergillus*; Fus=*Fusarium*; Pe=*Penicillium*; Rhi=*Rhizopus*; Otros=No identificados o en pequeño porcentaje.)

En los de la entrada BG 026196, observamos que para *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, el tratamiento con CS-60-3D tuvo mejores resultados que el tratamiento con CS-70-8h comparados con el control sin tratar, aunque ambos han logrado disminuir el porcentaje de semillas afectadas por estos hongos (figura 4.3.1). En cambio en el

caso de *Rhizopus* fue todo lo contrario, el porcentaje de afección por el hongo incrementó con los dos tratamientos desde 30% en el control sin tratar hasta llegar al 55% con CS-70-8h y 80% con CS-60-3D. En todos los casos el pretratamiento con NaOCl parece ser más eficaz que los tratamiento puesto que no se detectó *Aspergillus*, además de disminuir el porcentaje de los demás hongos hasta unos niveles muy bajos en comparación con el control sin tratar.

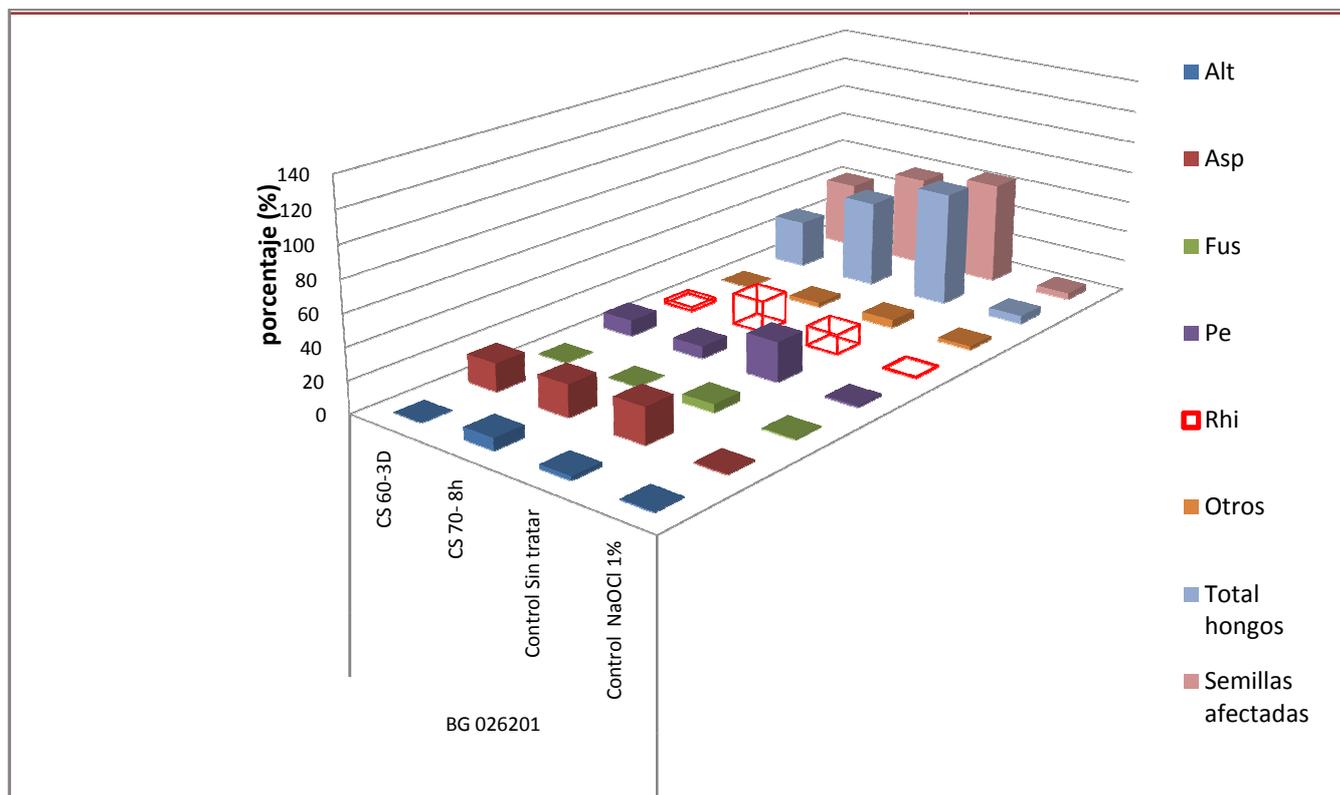


Figura 4.3.2. Porcentaje de hongos detectados y semillas afectadas en la entrada BG 026201.

En la figura 4.3.2 correspondiente a la entrada BG 026201, los dos tratamientos de termoterapia fueron eficaces y lograron eliminar por completo la presencia de *Fusarium*. El que la incidencia de *Fusarium* en el control de esta entrada sea menor que en la entrada anterior puede explicar la mayor eficacia de los tratamientos sobre dicho hongo en la misma (entrada BG 026201). Para *Alternaria* y *Penicillium* el tratamiento con CS-60-3D también fue eficaz y capaz de eliminar *Alternaria* y bajar la afección por *Penicillium* hasta más de la mitad, mientras que el tratamiento CS-70-8h tuvo un efecto contrario e incrementó la presencia del hongo en comparación con el control sin tratar. Para *Aspergillus* y *Penicillium* los dos tratamientos físicos tuvieron mejores resultados en el caso de *Penicillium* que en *Aspergillus*. El crecimiento por *Rhizopus* se incrementó hasta casi el doble con el tratamiento

CS-70-8h y disminuyó hasta casi cero con el CS-60-3D. La desinfección con NaOCl sigue dando muy buenos resultados y casi eliminó todos los hongos respecto al control sin tratar.

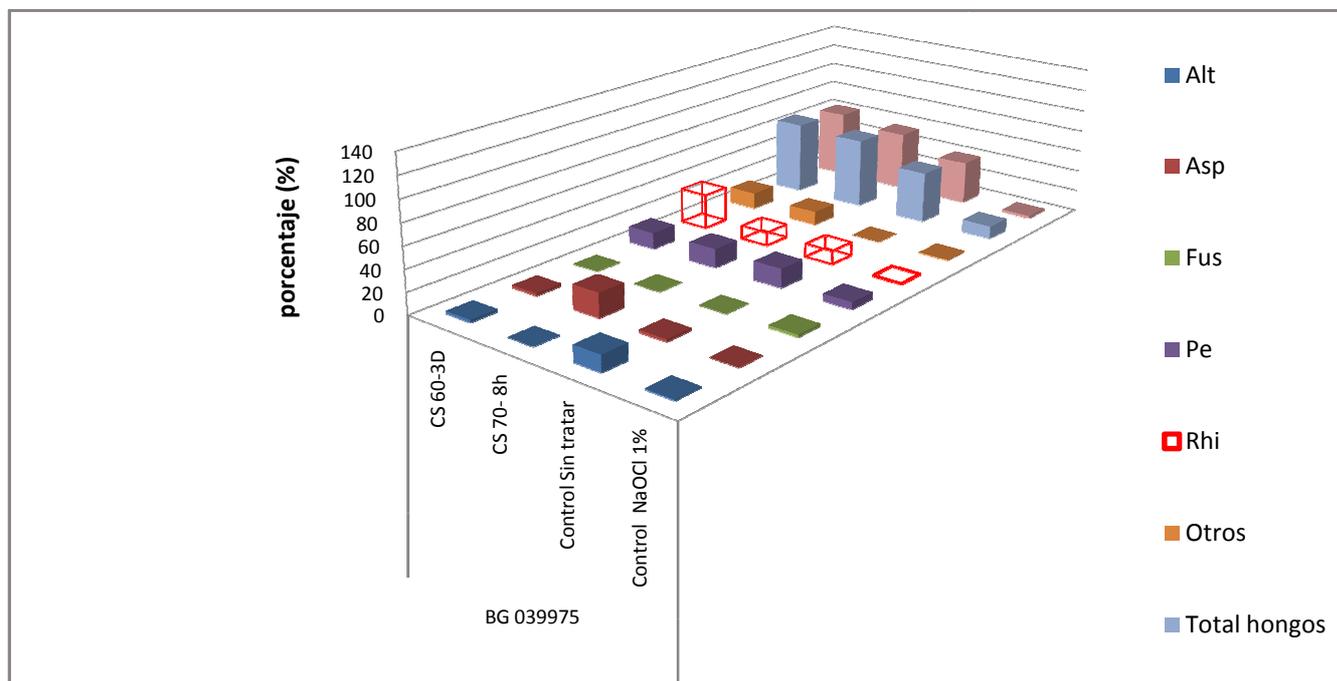


Figura 4.3.3. Porcentaje de hongos detectados y semillas afectadas en la entrada BG 039975.

En los resultados de la entrada BG 039975, (figura 4.3.3) se observó que para *Alternaria*, el tratamiento con CS-70-8h eliminó el hongo y el tratamiento CS-60-3D tuvo muy buenos resultados comparados con el control sin tratar. Para *Aspergillus* el tratamiento CS-60-3D no tuvo ningún efecto, mientras que el tratamiento CS-70-8h incrementó hasta 9 veces el porcentaje de afección. Algo similar ocurrió con *Rhizopus* pero el incremento fue con CS-60-3D y el efecto neutro fue con CS-70-8h. En el caso de *Penicillium* y *Fusarium*, los dos tratamientos no tuvieron efectos significativos.

La desinfección con NaOCl parece ser eficaz puesto que no se detectó *Aspergillus* mientras que sí se detectó en los demás tratamientos y en el control, además disminuyó el porcentaje de los demás hongos hasta niveles muy bajos en comparación con el control sin tratar.

Se puede apreciar también a partir de las gráficas que el porcentaje de las semillas afectadas suele coincidir con el porcentaje del total de hongos (figuras 4.3.1, 4.3.2, 4.3.3),

porque es difícil que podamos observar más de un hongo por semilla dado que compiten entre ellos (datos no presentados).

En definitiva, en algunos casos los resultados fueron satisfactorios hasta poder eliminar algunas especies por completo como es el caso de *Alternaria* con el CS-60-3D en la entrada BG026201 y con el tratamiento CS-70-8h en la entrada BG039975, también en otros casos se logró disminuir el porcentaje de algunos hongos presentes como por ejemplo *Penicillium* en la entrada BG026201 tratada con el CS-60-3D.

En otros casos, estos mismos tratamientos tuvieron un efecto negativo puesto que en vez de bajar el porcentaje de los hongos presentes en las semillas, lo aumentaron como en el caso de *Rhizopus*: de un porcentaje de 30% en control hasta unos porcentajes de 55% con el tratamiento CS-70-8h y de 80 % con el tratamiento CS-60-3D respectivamente en la entrada BG026196). Lo mismo ocurrió con *Penicillium* y *Rhizopus* en la entrada BG026201.

Debido a la escasa información sobre los tratamientos con calor sobre semillas de judía, no nos queda más remedio que intentar comparar con tratamientos similares pero aplicados sobre otros tipos de semillas. En estos casos, las comparaciones han de ser escrupulosas, puesto que es preciso considerar las diferentes características fisiológicas de cada tipo de semilla.

Clear *et al* (2002), intentaron los tratamientos con calor seco sobre dos variedades de trigo (B1) y (B2) y los resultados fueron más o menos parecidos a los nuestros: dependiendo de la variedad de la especie vegetal y del género de hongo, los resultados fueron también diferentes. *Fusarium graminearum* fue eliminado a 60°C, 70°C y 80°C en las dos variedades pero con diferencias en los tiempos que se necesitaban para la total eliminación del mismo, tanto entre las dos variedades como dentro de la misma variedad según la temperatura aplicada. También en algunos casos las temperaturas aumentaron la presencia algunos hongos como *Cochliobolus sativus* en una variedad (B2) mientras que en la otra (B1) disminuyó.

En las tres entradas tratadas en el presente estudio siguieron apareciendo especies fúngicas potencialmente patógenas como por ejemplo del género *Fusarium* tal y como se puede observar en el cuadro 4.3. A su vez el género fúngico *Rhizopus* no desapareció en ninguna de estas muestras tratadas y dado su rápido crecimiento pudo enmascarar la presencia de *Fusarium* en las semillas. Por tanto podemos decir que la no detección de algunos géneros no significa que no estén en las semillas.

Cuadro 4.3. Porcentaje de hongos detectados en las tres entradas del banco de germoplasma tras ser tratadas. Abreviaturas:PP= Placas con papel, PDA= placas con medio PDA, *Alt*=*Alternaria alternata*, *Asp*=*Aspergillus*, *Fus*=*Fusarium* spp. (*F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. roseum*, y otras, *Pe*=*Penicillium*, *Rhi*=*Rhizopus*. Para cada NUMBAN, letras distintas dentro de cada columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos y métodos de análisis según el test de la mínima diferencia significativa.

NUMBAN	Tratamiento	Método de análisis	Géneros/especies fúngicas mayoritarias (%)							Semillas infectadas: n ° (%)
			Alt	Asp	Fus	Pe	Rhi	Otros	Total hongos (%)	
BGE 026196	CS 60-3D	PP	5	0 a	0 b	20 ab	70 a	5	100	20(100)
		PDA	0	5 a	10 ab	0 b	90 a	70	175	18(90)
	CS 70-8h	PP	10	15	10 ab	20 ab	35 ab	5	95	14(70)
		PDA	0	0 a	5 ab	0 b	75 a	60	140	16(80)
	Control Sin tratar	PP	10	15	0 b	30 ab	60 a	0	115	20(100)
		PDA	5	10	20 a	55 a	0 b	0	90	16(80)
	Control NaOCI 1%	P.filtro 1	3	0,5	1	1,5	1,5	4,5	11,5	4(13,3)
		P.filtro 2	1,7	0	0	3,3	3,3	0	8,3	0
		P.placa	2,5	0	5	0	0	5	12,5	6(15)
	BGE 026201	CS 60-3D	PP	0	20 a	0 a	20 ab	5 a	0	45
PDA			0	15 a	0 a	0 b	0 a	0	15	5(25)
CS 70-8h		PP	15	25 a	0 a	5 b	25 a	5	75	15(75)
		PDA	0	15 a	0 a	10 ab	15 a	0	40	8(40)
Control sin tratar		PP	5	25 a	0 a	10 ab	25 a	0	65	13(65)
		PDA	0	20 a	10 a	40 a	0 a	10	80	13(65)
Control NaOCI 1%		P.filtro 1	0,5	0,5	0,5	1	0,5	2	5	
		P.filtro 2	-	-	-	-	-	-	-	
		P.placa	-	-	-	-	-	-	-	
BGE 039975		CS 60-3D	PP	5	0 b	0 a	30 a	15 a	30	80
	PDA		0	5 ab	0 a	0 a	50 a	0	55	10(10)
	CS 70-8h	PP	0	10 ab	0 a	20 a	0 a	25	55	11(55)
		PDA	0	35 a	0 a	15 a	25 a	0	75	11(55)
	Control Sin tratar	PP	0	5 ab	0 a	25 a	25 a	0	55	8(40)
		PDA	30	0 b	0 a	10 a	0 a	0	40	8(40)
	Control NaOCI 1%	P.filtro 1	1,5	0	4,5	4,5	1,5	2	14	9(0,3)
		P.filtro 2	1,7	0	0	15	1,7	0	18,3	1(3,3)
		P.placa	0	0	2,5	0	0	0	2,5	1(2,5)

El análisis de la varianza según el test de la mínima diferencia, no reveló diferencias significativas en la mayoría de los casos entre los tratamientos de las entradas y controles respecto a los hongos más abundantes.

Una llamada de atención respecto a determinada microbiota de las semillas (*Trichoderma*, *Chaetomium*) cuyo papel puede ser positivo, por citar un ejemplo, *Chaetomium* un género generalmente saprofítico habitante del suelo se encuentra frecuentemente en muchos tipos de semillas, ya en 1955 Tveit y Wood, obtuvieron un control de *Fusarium* en avena con *C. cochlioides*.

En cuanto a la germinación, los tratamientos no tuvieron ningún efecto sobre la germinación de las semillas, por ello las semillas que tenían un porcentaje alto de germinación siguieron teniéndolo y viceversa.

Como ya se ha mencionado, según diferentes autores (Trigo *et al.*, 1998; Clear *et al.*, 2002; Lager y Johnsson, 2002; Whitaker *et al.*, 2004) la principal limitación de la termoterapia en semillas destinadas a ser conservadas durante el mayor tiempo posible es, indudablemente, el efecto negativo que las altas temperaturas pueden tener sobre la viabilidad y el vigor. Sin embargo, en diversos casos, se han podido aplicar tratamientos efectivos de termoterapia sobre semillas sin afectar a su germinación.

Dado que en los bancos de germoplasma se dispone de pequeñas cantidades de semillas en la mayoría de las entradas, investigadores como Méndez y Ferreira (1992), propusieron la utilización del método de papel de filtro humedecido aprovechando las pruebas de germinación para conocer su estado sanitario y con lo cual estamos de acuerdo (ya que los métodos de análisis sanitarios de semillas son destructivos).

Recordemos que hay que prevenir la introducción de posibles patógenos en regiones en las que no existen o en zonas protegidas, ya que se pueden transmitir mediante semillas; especialmente en la actualidad que hay un auge en la utilización de semillas de variedades antiguas o procedentes de una zona determinada y que se consiguen solicitando a los bancos de semillas o mediante intercambio entre agricultores o particulares. El tratamiento con calor seco de semillas antes de la siembra podría evitar la introducción de una parte de los patógenos. Sin embargo, harían falta más estudios con mayor cantidad y diversidad de semillas sobre si el método de calor seco sería adecuado antes o después del almacenamiento a largo plazo en la colección base a -18°C , o en la colección activa.

El manejo de la multiplicación de entradas, inspección y recolección de semilla sana es necesario hasta que se encuentren tratamientos de semillas más eficaces a los existentes en la actualidad. La obtención de semillas sanas no será suficiente sin un manejo adecuado en el

campo ya sea durante la regeneración de las entradas o en su uso final por el agricultor, investigador, etc.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES.

1. En las entrada de judía del banco de germoplasma se detectaron cinco géneros de hongos mayoritarios: *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Alternaria* y *Aspergillus*. Su presencia podría explicar en parte el descenso de la germinación después de su almacenamiento durante 10 años a -18°C y en especial la presencia de hongos potencialmente patógenos como *Fusarium*.

2. Los tratamientos de calor seco (CS) dieron mejores resultados en cuanto a la reducción de la microbiota fúngica en variedades comerciales de semillas de judía, aunque no eliminaron todos los organismos potencialmente patógenos.

3. Los tratamientos de calor seco aplicados a las tres entradas elegidas del CRF-INIA redujeron la micobiota pero siguieron apareciendo hongos como *Fusarium*. Por ello, otras estrategias serán necesarias como la detección previa de patógenos mediante inspección de los campos y análisis de los lotes de semilla por ejemplo, durante las pruebas de germinación dado que la cantidad de las semillas suele ser escasa.

4. En vista de los resultados y de la información previa respecto de la limpieza y salud de las colecciones en un banco de semillas se recomienda:

- Vigilar los campos de regeneración de entradas y recolectar las semillas sanas.
- Revisión periódica del estado de contaminación de las cámaras, máquinas y material de trabajo (mesas, bandejas, etc.), limpieza y desinfección si fuera necesario.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Amein T., Wikström M., Schmitt A., Koch E., Van Der Wolf J., Groot S., Forsberg G., Werner S., Krauthausen H.J., Kromphardt C., Jahn M. y Wright S.A.I. 2003, 2006, 2010. Stove: Seed treatments for organic vegetable production.
- Amoros M., Amoros J. 1980. Horticultura. Ed. Dialogo. Lérida.
- Arboleda O. 1997. Plagas de semillas forestales en América central y el Caribe. Ed. Bib. Orton IICA / CATIE.
- Arrigada V. 2000. Semillas: Inspección, análisis, tratamiento y legislación. pp. 6-76.
- Asociación Europea de para la investigación en leguminosas grano (AEP) 2002. Instituto de investigación agronómica (INRA). Folleto: Legumbres Alimentos Sanos.
- Bagegni A M., Slepser D A., Kerr H D. Morris J S. 1990. Viability of *Acremonium coenophialum* in tall fescue seed after ionising radiation treatments. *Crop Science* 30:1272-1275.
- Baker K F. 1972. Seed pathology. pp: 317-416. In: Kozlowski T. Seed biology, 2. Academic Press, Nueva York. 477pp.
- Baker K F. 1979. Pathology of flower seed. *Seed Sci. Technol.* 8: 575-589.
- Baker K F., Cook R J. 1974. Biological Control of Plant Pathogens. In: The Biology of Plant Pathogens. Ed. Freeman. San Francisco. 433 pp.
- Baker K F., Cook R J. 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. Third Printing Ed. APS Pres, St. Paul, Minnesota.
- Barnet, H L, Hunter, B H. 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Ed. Burgess Publishing Company Minnesota EE.UU.
- Barros E 2008. The omics approach to understanding the effect of fungal contamination on maize seed. Kruger National Park, South Africa. 14 al 18 de abril de 2008. 27p.
- BASF Minilabs. Informes campana agrícola 2006-2007.
- BASF. 2006. The chemical company. 2006. Soluciones al tratamiento de semillas. 39 p.
- Baudet L., Villela F. 2009. MODULO 9 - Almacenamiento de semillas Universidad Federal de Pelotas (UFPEL) Brasil. Asociación Nacional de Productores de Semillas (ANAPROSE) Uruguay.
- Belda J. 2000. Submarino o minador de hojas. Junta de andalucia. Ed. Servicio de protección de vegetales. Almería.
- Bel'skii A I., Mazulenko N.N. 1984. Effects of presowing treatment of barley seeds on the incidence of fungal diseases on the plants. *Mikologiya Fitopatologiya* 18: 312-316.
- Bergman S. 1993. Värmebehandling som saneringsmetod mot utsädesburna svampsjukdomar i stråsåd. *34th Swedish Crop Protection Conference, Uppsala.*: 297-300.
- Bergman S., Forsberg G. 2000. Värmebehandling Av Utsäde – en ny effektiv, billig och miljövänlig metod. Slu Fakta Jordbruk 7.
- Besnier Romero F. 1989. Semillas, biología y tecnología. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- Bhaskara Reddy M.V., Raghavan G.S.V., Kushalappa A.C., Paulitz T.C. 1998. Effect of microwave treatment on quality of wheat seeds infected with *Fusarium graminearum*. *J. Agric. Eng. Res.* 71: 113–117.
- Bioversity International. History of Bioversity: How IBPGR became IPGRI became Bioversity. [http://www.bioversityinternational.org/about_us/history_of_bioversity.html?tx_wecdiscussion\[deleteMsg\]=&tx_wecdiscussion\[edit_msg\]=](http://www.bioversityinternational.org/about_us/history_of_bioversity.html?tx_wecdiscussion[deleteMsg]=&tx_wecdiscussion[edit_msg]=). Fecha de conexión: 1/06/2011.
- Blanco R., González A., Guerreo M., Martín I. 2010. Microbiota populations associated with vean sedes preserved in the CRF-INIA genebank: Relationship with seed viability. Comunicación Panel. Seed symposium Abstract 29th International Seed Testing Association (ISTA) Congress, Colonia (Alemania), 16-22 junio 2010. pp 55-56.

- BOE Núm. 178. Jueves 27 Julio 2006. 2816p
<http://www.Boe.Es/Boe/Dias/2006/07/27/Pdfs/A28165-28178.Pdf>. Fecha De Conexión: 26/03/2011.
- BOE-A-2009-1312. Publicación: BOE núm. 23 de 27/01/2009.
http://www.boe.es/aeboe/consultas/bases_datos/act.php?id=BOE-A-2009-1312. Fecha de conexión: 27/03/2011.
- Bolton A T., Donaldson A.G. 1972. Viability in *Fusarium solani* f. sp. *pisi*.
- Burkholder W H., Muller A.S. 1926. Hereditary abnormalities resembling certain infectious diseases in beans. *Phytopathology*. 16: 731-737.
- Burth U., Gaber K., Jahn M. Lindner K., Motte G., Panzer S., Pflaumbaum J., Scholze F. 1991. Behandlung Von Saatgut Mittels Elektronen – Ein Neues Verfahren Zur Bekämpfung Samenbürtiger Schaderreger An Winterweizen. *Nachrichtenblatt Für Den Pflanzenschutz* 43: 41-45.
- Chaves G., Schwartz H F .1980. Anthracnose. In: Bean production problems: Disease, insect soil and climatic constraints of *Phaseolus vulgaris*. Pp. 39-54.
- Campbell R. 1989. Biological control of microbial plant pathogens. *Cambridge University Press*. Cambridge (Reino Unido). 218 p.
- Carmona M, Sautua F., Gally M., Reis E M. 2009a. Desarrollo de un sistema de decisión para el manejo químico racional de las enfermedades de fin de ciclo (Efc) En Soja. XIII Congreso Brasileiro de Fitopatología. Rio de Janeiro.
- Carmona M A., Scandiani M., Luque A. 2009b. Severe Outbreaks of Soybean Frogeye Leaf Spot in Pampeana Region, Argentina. *Plant Disease* Pd-03-09-0198-Pdn.R1.
- Casini C. 2006. Soja: Producción y calidad de semillas. Congreso Mercosoja 2006. Rosario .pp. 199-202.
- Cavalcante M J B., Muchovej J J. 1993: Microwave Irradiation of Seed and Selected Fungal Spores. *Seed Sci. Technol.* 21: 247–253.
- Clear R M., Patrick T K., Turkington T K., Wallis R. 2002. Effect of dry heat treatment o seed-borne *Fusarium graminearum* and other cereal pathogens. *Can. J. Plant Pathol.* 24: 489-498.
- Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Tratado Internacional sobre los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura. <Ftp://Ftp.Fao.Org/Docrep/Fao/011/I0510s/I0510s.Pdf>. Fecha de conexión: 27/03/2011.
- Comité de tratamiento de semillas y medio ambiente de la federación internacional de semillas (ISF) 2007. Tratamiento de semillas: una herramienta para una agricultura sustentable.
- COSAVE. 1994. Estándares fitosanitarios regionales. Comité de sanidad vegetal del cono sur. Informe técnico: 34. *Brasilia*, Brasil.
- Crowley N C. 1957. Studies in the seed transmission of plant virus diseases. *Australian J. boil. Sci.* 10: 449-464.
- Cuero R G., Smith J E., Lacey J. 1986. The Influence of Gamma Irradiation and Sodium Hypochlorite Sterilisation on Maize Seed Microflora and Germination. *Food Microbiology* 3: 107-113.
- De Tempe J., Binnerts J. 1961. Introduction di Methods of seed health testing. *Seed Sci Technol.* 7: 601-636.
- DEST. 2001. Fair5 Ct97 3664. EU 4th Fp. Plant Health. Project Report.
- Dey T K., Chowdhury N., Ayub A., Goswami Bk. 1992. Black Point of Wheat Occurrence, Effect of Fungicidal Seed Treatment on Germination and Quality Characters. *Bangladesh J. Bot.* 21(1): 27-32.
- Diprose M F., Benson F A., Willis A J. 1984: The Effect of Externally Applied Electrostatic Fields, Microwave Radiation and Electric Currents on Plants and Other Organisms, with Special Reference to Weed Control. *Bot. Rev.* 50: 171–223.

- Dominguez Garcia-Tejero F. 2004. Plagas y enfermedades de las plantas cultivadas. Mundi Prensas. 341p.
- Drijfhout E. 1978. Genetic interaction between *Phaseolus vulgaris* and Bean common mosaic virus with implications for strain identification and breeding for resistance. Wageningen: Agr. Res. Rept. Center for Agr. Publishing and Documentation. 98 p.
- Drijfhout E., Davis J H C. 1989. Selection of a new set of homogeneously reacting bean (*Phaseolus vulgaris*) differentials to differentiate races of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Plant Pathol.* 38: 391-396.
- Duvert .P. 1999. Global Seed Treatment Working Group.
- Ellis R H., Roberts E H. 1980 a. Improved Equations for the Prediction of Seed Longevity. *Annals of Botany* 45: 13-30.
- Ellis R H., Roberts E H. 1980 b. The Influence of Temperature and Moisture on Seed Viability Period. In Barley (*Hordeum distichum* L.). *Annals of Botany* 45: 31-37.
- Fakir Ga. 1983. Teaching, Research and Training Activities on Seed Pathology in Bangladesh. *Seed Sci. Technol.* 11: 1345-1352.
- FAO 1985. Procesamiento de semillas de cereales y leguminosas de grano. 146p.
- FAO/IPGRI. 1994. Genebank Standards. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, International Plant Genetic Resources Institute, Roma.
- FAO. 1996. Informe sobre el estado de los recursos fitogenéticos en el mundo. 13 pp.
- FAO. 2009. Tratado internacional sobre los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. pp .10-14.
- FAO. 2010. El segundo informe sobre el estado de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura en el mundo. pp .3-6.
- FAOSTAT. 2008. <http://Faostat.Fao.Org>. Fecha de consulta. 03/07/2010.
- FAOSTAT. 2009. <http://Faostat.Fao.Org>. Fecha de consulta. 26/03/2011.
- Fernández-Corral J A., Santos M., Blanco R., Tello J C. 2002. Estado sanitario de las semillas de judía en los cultivos de caniles (Granada). *Phytoma.*, 136: 16-21.
- French. R., Hebert T. 1982. Métodos de investigación fitopatológica. 1ª Ed, 1ª Reimp. San José (Costa Rica).
- Fronés J. 1982. El cultivo de las judías. Ed. Sintés, S.A., Barcelona.
- Forsberg G. 2003. Aerated steam treatment for control of seed-borne diseases in organic seed production. Proceedings From “Den Nasjonale Kongress For Økologisk Landbruk” 2003. Ed. T. Cottis. Högskolen I Hedmark, Rapport. 19, pp. 130-135.
- Forsberg G. 2004. Control of Cereal Seed-borne Diseases by Hot Humid Air Seed Treatment. pp. 10-40. Tesis Doctoral Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala Suecia.
- Fulgueira C., Scandani M.M., Amigot S., Bottai H., Leiva, M., Ruberti D. 2005. Estudio de la compatibilidad entre *Streptomyces* sp. y fungicidas curasemillas utilizados en soja. II Congreso Y 7º Encuentro Bioquímico. Rosario.
- García V. 1995. Introducción a la microbiología. 2ª Ed. EUNED. pp 14-60.
- Garett C E M. 1992. *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. pp. 186-187. En Manual de enfermedades de las plantas.
- Gepts, P. 1988. Phaseolin as an Evolutionary Marker. In: Genetic Resources of *Phaseolus* Beans. (Ed.). Kluwe Academic Publishers, London, pp 215-245.
- Gilchrist-Saavedra L., Fuentes-Dávila G., Martínez- Cano C. López- Atilano R M., Deveiller E., Singh R P., Henry M., García A. 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. 2ª Ed: pp. 3-10.
- Gingery R G. 1993. Fluorescent antibody comparison of the effects of gamma and microwave irradiation of wheat grain on its microfloral contamination test, viruses. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. pp 287-293.

- In: a laboratory manual. R. Hampton, E. Ball, S. De Boer Eds. APS Press. St. Paul, Minnesota EEUU.
- Glad T., Ljung L. 1989. Reglerteknik, Grundläggande Teori. Studentlitteratur. Lund.
- González A J. 1996. Antracnosis de la judía. Ficha 32. En: Fichas de diagnóstico en laboratorio de organismos nocivos de los vegetales 38: 489-493.
- González A J. 2000. Microbiota patógena en semilla de judía tipo granja asturiana. Obtención de semilla saneada. Oviedo. Tesis Doctoral. pp. 11-42.
- González. A J. 2003. Desinfección de semilla de judía (*Phaseolus vulgaris* L.) tipo granja asturiana con antifúngicos y antibacterianos. (S.E.R.I.D.A.). 1- 96. Bol san. Veg. 29pp.
- González A., Mendoza C., Tello J C. 2004. Microorganismos patógenos transmitidos por semilla de judía tipo granja asturiana. Saneamiento de semilla. Serida KRK Oviedo.
- Gralik J., Trojanowska K., Warchalewski J R. 1999: Sci. Pap. Agric. Univ. Pozn. *Food Sci. Technol.* 3: 59–66.
- Grochowicz J., Zawisłak K., Walczyński S., Podgorska H. 1999: zastosowanie energii mikrofalowej w obrobce surowców paszowych. biul. Nauk. Przem. Pasz. 38. 1/4: 7–22.
- Guldhe S., Raut J., Wangikar Pd .1985. Control of Loose Smut Infection in Wheat by Physical and Chemical Methods of Seed Treatment. PKV Res. J. 9(1): 56-58.
- Hagedorn H A J., McCoy. D J .1968. Survival, transmission, and taxonomy of *Pseudomonas syringae* van Hall, the causal organism of bacterial brown spot of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Can J. Microbiol.* 14: 437-441.
- Hall H. 1991. Compendium of Bean Diseases. Ed. APS Press. The American Phytopathological Society. pp 4- 32.
- Hall T J. Taylor G S. 1983. Aerated-Steam Treatment for Control of *Alternaria tenuis* on Lobelia Seed. *Annals of Applied Biology* 103: 219-228.
- Hankin L., Sands D C. 1976. Microwave Treatment of Tobacco Seed to Eliminate Bacteria on the Seed Surface. *Phytopathology* 67: 794–795.
- Harman G E., Taylor A G., Stasz, T E., 1989. Combining Effective Strains of *Trichoderma Harzianum* and Solid Matrix Priming to Improve Biological Seed Treatments. *Plant Dis.* 73, pp. 631–637. Full Text Via Crossref.
- Harrison D E., Freeman H. 1965. Bacterial brown spot (*Pseudomonas syringae*) of French bean. *J. Agric. Victoria Depp. Agric.* 63: 407- 411.
- Hartl W., Girch L. 2000. Perspektiven zur Hitzebehandlung bei Getreidesaatgut. *Arbeitstagung der Vereinigung österreichischer Pflanzzüchter* 51. pp 59-61.
- Heller W., Zoller C. 2010. Désinfection de la semence de basilic: Un vrai défi. Station de Recherche Agroscope Changins-Wädenswil Acw, 8820 Wädenswil.
- Hoitink H A J., Hagedorn D J. 1966. Bacterial brown spot (*Pseudomonas syringae*) of bean and pea. *Phytopathology.* 56: 881.
- Hodge W H., Erlanson W H. 1956. Federal plant introduction –a review. *Economic Botany* 10: 299-334.
- Hubbeling N. 1972. Resistance in beans to strains of bean mosaic virus. *Meded. Fakult. Landbouwwetensch.* 37: 458- 466.
- Hyder A., Fakir G A.1993. Control of Seed Borne Fungi of Wheat with Fungicides. *Bangladesh J. Bot.* 22(2): 135-141.
- Hyland H L. 1977. History of U.S. Plant introduction. *Environmental Review* 4: 26-33.
- IFS (*International Federation of Seeds*). 2000. Tratamientos de semillas con productos biológicos . Comité de Tratamiento de Semillas y del Medio Ambiente (STEC).
- ISTA (*International Seed Testing Association*) 2008. International Rules for Seed Testing. Annexe to chapter 7. Seed Health Testing Methods. www.seedtest.org
- ISTA (*International Seed Testing Association*). 2009 ISTA News Bulletin No. 135 April 2008

- Jaccoud FO. D.S. Reeves J. 1993. Detection and Identification of *Phomosis* Species in Soya Bean Seeds Using Pcr. 1th ISTA-Seed Health Symposium, Ottawa, Canadá.
- Jahn M. Nega E. Kromphardt C. Forsberg G. Werner S. 2006. Optimisation of different physical methods for control of seed-borne pathogens in organic vegetable production. International Conferences: Joint Organic Congress . Theme 6: Plant breeding and seed production. European Union . Organic Inputs.
- James R L., Gilligan C J. Dumroese R K. Wenny D L. 1988: Microwave Treatments to Eradicate Seed-borne Fungi on Douglas-Fir Seed. For. Pest Manag. Rep. 88-7: 1-8.
- Janssen D., Martín G., García M. Cuadrado I.M. 2011 El virus del desorden amarillo de la judía y su repercusión agroeconómica. *Phytoma*, 228: 20-25.
- Kaiser W J. 1987. Testing and Production of Healthy Plant Germplasm. Tech. Bull 2, Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries. Copenhagen, Dinamarca.
- Lagerholm J. 2003. Värmebehandlat Utsäde För Sundare Växtodling. Proceedings from the Conference "Ekologiskt Lantbruk., Vägar, Val, Visioner", Ultuna 18-19 November 2003. P 206. Uppsala, Suecia.
- Leach Ch., Pierpoint M. 1956. Seed transmission of *Rhizoctonia solani* in *Phaseolus vulgaris* and *P. lunatus*. *Pl. Dis. Repr.* 40: 907.
- Leach Ch., Pierpoint M. 1958. *Rhizoctonia solani* may be transmitted with seed of *Agrostis tenuis*. *Pl. Dis. Repr.* 42: 240.
- Lier O., Jørstad I. 1948. Forsøk Med Varmtvannsbehandling Mot Naken Sot På Bygg Og Hvete. Melding Fra Selskapet For Norges Vels Planteavlutvalg Og Statens Plantevern. Grøndahl & Søn's Boktrykkeri Oslo. Norway.
- Llanos Company M. 1998. Cultivo de judías verdes en España. ED. Vida rural, 74:2-5.
- Lozano J.C., Laberry R., Bermudez A. 1986: Microwave Treatment to Eradicate Seed-Borne Pathogens in Cassava True Seed. *J. Phytopathol.* 117: 1-8.
- Luna C., Vargas Gil S., Bressano M., Benitez G., Ducasse D., March G.J. 2006. Glomus Intraradis como protector del daño oxidativo por *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium virguliforme* en soja. Congreso Mercosoja 2006. Rosario. pp. 366-368.
- Luque A G., Scandiani M M. 2009. Identificación de patógenos en semilla de soja. Ed. Rev. Análisis De Semillas.
- Luthra J C., Sattar A. 1934. Some Experiments on the Control of Loose Smut, Ustilago Triticici (Pers.) Jens. of Wheat. *Indian Journal of Agricultural Science* 4: 177-199.
- Luthra J C. 1953. Solar Energy Treatment of Wheat Loose Smut ,Ustilago Triticici (Pers.) Rostr. *Indian Phytopathology* 6: 49-56.
- Machado J C., Langerak C J., Jaccoud-Filho D.S. 2002. Seed-born fungi: A contribution to routine seed health analysis. ISTA. 134 p.
- Machado J C., Da Cruz De Oliveira J A. M., Das G., Alves M. 2003. Controle de germinacao de sementes de soja em testes de sanidade pelo uso da restricao hidrica. *Revista Brasileira de sementes*, V. 25 (2): 77-81.
- Mármol J. R. 2005. Cultivo de la judía en invernadero. pp. 16-21. Ed. MAPA.
- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.1984. Una fuente de proteínas. Alubias, garbanzos y lentejas.
- MAPA, Pagina Del Ministerio De Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid. <http://www.Madrimasd.Org/Informacionidi/Noticias/Noticia.Asp?Id=25046>. Fecha de conexión: 10 /07/2010.
- MARM (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino). Ficha de diagnóstico en el laboratorio de organismos nocivos de los vegetales (Observatorio de Tecnología Probadas. Fichas 32, 129, 232, 266, 278.

- Martín I., De la Cuadra C. 2008 .Seed Germinability After 20 Years of Storage in Spanish Plant Genetic Resources Centre (CRF),. 28 Congreso de la Intenational for Seed Testing Association (ISTA). 5-11 Mayo, Iguassu, Brazil.
- Martín Martínez. I. Conservación de Recursos Fitogenéticos
http://www.esporus.org/recursos/articles/agrobiodiversitat/conservacion_rec_fitog_isaura_martin.pdf. Fecha de conexión: 3/05/2011.
- Masun M M I., Islam S M M., Fakir G A. 2008. Effect of seed tratment practices in controlling of seed-born fungi in sorghum. *Academic Journals*.4: 022-027.
- Mathur S B., Kongsdal O. 2003. Common Laboratory Seed Health Testing Methods for Detecting Fungi, Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries. Copenhagen, Dinamarca. 425p.
- McGee .D C. 1996. Advances in Seed Treatment Technology. Technical Report No. 11 Asian Pacific Seed Association.
- McGee D C. 1997. Plant Pathogens and the Worldwide Movement of Seeds APS Press St. Paul, Minnesota. EE.UU.
- Melgarejo P., De Cal A. 2006. Biofungicidas y control biológico de hongos fitopatógenos: Aplicación a la filosfera. *Phytoma*, 182: 59-63.
- Mendes A S., Ferreira M A V. 1992. Fungos patogénicos detectados em germoplasma vegetal introduzido de 1990 a 1992. (Pathogenic fungi detected in vegetable germoplasm introduced in Brazil 1990 to 1992). *Fitopatol bras*. 19 (3): 449-454.
- Messiaen C M., Blancard F., Rouxel F., Lafon R. 1995. Enfermedades de las hortalizas. Ed. Mundi –Prensa. Madrid.
- Mitidieri, I Z M. De 1982. Efecto de la época de cosecha sobre el ataque de hongos y la calidad de granos. EEA- INTA San Pedro. Informe técnico.51: 14.
- Morales J F., Bos L., 1988. Bean commun mosaic virus. CMI/ AAB description of plant viruses. 337: 6.
- Moronova G V. 1991. The effectiveness of spring wheat seed treatment. *nauchno-tekhnicheskii bull*. 5: 20-24.
- Mukhopadhyay .1994, Biocontrol of soil borne fungal pathogens – current status future prospects and potential limitations. *Indian phytopathology*.
- Muskett A E., Malone J.P. 1941. The Ulster method for the examination of flax seed for the presence of seed borne parasites. *Ann appl. Biol*. 28: 8-13.
- Muthomi J W., Otieno P E., Chemining´Wa G N., Nderitu J H ., Wagacha J.M. 2007. Effect of Legume Root Rot and Pathogens and Fungicide Seed Treatment on Nodulation and Biomass Accumulation. Department of Plant Science and Crop Protection, University of Nairobi, Kenya. *Journal of Biological Sciences* 7.Ed. Asian Network for Scientific Information.
- Napoleón I J. Vela Cruz. A M. 2005. Guía Técnica de semilleros y viveros frutales, Ministerio de Agricultura y Ganadería: Programa nacional de frutas de el salvador. Ed. Iica. Frutal Es. pp: iii, iv, v.
- Neergaard, P. 1988. Seed Pathology. Vols. 1 y 2. Macmillan Press Ltd., London. Reino Unido. 1191p.
- Neetoo H., Chen H. 2010. Individual and Combined Application of Dry Heat With High Hydrostatic Pressure To Inactivate *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on Alfalfa Seeds. Department of Animal and Food Sciences, University of Delaware, Newark, De 19716-2150, USA.
- Nene Y L. Saxena Sc 1971. Present status of research on fungicidal control of wheat rusts and lose smut in Isi India. Second International Symposium, I. A. R. I., New Delhi, India. 10: 83.

- Noble M., Richardson M J. 1968. An annotated list of seed-borne diseases, 2nd ed. Proc. int. Seed Test. Ass. 33: 1-191.
- OEPP/EPPPO 1990. Specific quarantine requirements. *EPPO Technical Documents* No. 1008. Schuster, M.L.; Vidaver, A.K.; Mandel, M. (1968) A purple pigment producing bean wilt bacterium, *Corynebacterium flaccumfaciens* var. *violaceum* n. var. *Canadian Journal of Microbiology* 14: 423-427.
- Ortega. Gil., R. 1991 Transmisión de enfermedades por las semillas de hortalizas. Su prevención. Dirección general de investigación y capacitación agrarias. http://www.marm.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1990_06.pdf. conexión: 16/ 04/ 2011.
- Osburn R M., Milner J L., Oplinger E S., Smith R W., Handelsman J. 1995. Effect of *Bacillus Cereus* Uw85 on the Yield of Soybean at Two Field Sites in Wisconsin. *Plant Dis.* 79:551–556. View Record in Scopus | Cited By in Scopus (40).
- Palmero D., Iglesias C. 2007. Evaluación de la patogenicidad de la microbiota fúngica asociada a cinco variedades autóctonas españolas de judión (*Phaseolus coccineus* L.). *Agroecología* 2:55-64.
- Nárdiz M P., García-Jiménez J., Jordá Gutiérrez C M., González L M^a M., Yebes A. M^a. Duran-Vila N. 2010. Pátogenos de plantas descritos en España. 2: 526.
- Pastor-Corrales M A. 1991. Estandarización de variedades diferenciales y designación de razas de *Colletotrichum lindemuthianum* (abstr.). *Phytopathology* 81: 694.
- Peñas E., Gómez R., Frías J, Vidal-Valverde C. 2010. Effects of Combined Treatments of High Pressure, Temperature and Antimicrobial Products on Germination of Mung Bean Seeds and Microbial Quality of Sprouts. *Food Control* 21: 82–88
- Pioli R N., Morandi E N., Martínez N C., Lucca F., Tozzini A., Bisaro V., Hopp, E. 2003. Morphologic, Molecular, and Pathogenic Characterization of *Diaporthe Phaseolorum* Variability in the Core Soybean-Producing Area of Argentina. *Phytopathology* 93, 2:136-146.
- Plucknett D L., Smith N J H., Williams J T., Murthi Anishttey N. 1983. Crop germplasm conservation and developing countries. *Science* 220:163-169.
- Prohens J., Soler S., Nuez F. 1999. The effect of thermotherapy and sodium hypochlorite treatments on pepino seed germination, A Crucial Step in Breeding. *Programmes Ann. Appl. Biol.* 134: 299-305.
- Puerta Romero J. 1961. Variedades de judías cultivadas en España. Monografía Numero 11. Ministerio de Agricultura, Madrid. 798 p.
- Rajeev Bhat K R., Sridhar A A., Karim. 2010. Microbial quality evaluation and effective decontamination of nutraceutically valued lotus seeds by electron beams and gamma irradiation. Food technology division, school of industrial technology. University Sains Malaysia, Malaysia. Microbiology and Biotechnology, Department of Biosciences, Mangalore University, India.
- Rao, N.K., J. Hanson, M.E. Dulloo, K. Ghosh, D. Novell y M. Larinde. 2007. Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8. Bioersity International, Roma, Italia.
- Real Decreto 2129/2008, de 26 de diciembre, <http://www.boe.es/boe/dias/2009/01/27/pdfs/BOE-A-2009-1312.pdf>. Fecha de conexión: 16/ 04/ 2011.
- Reddick D., Stewart V B. 1919. Trasmision of the virus of bean mosaic in seed and observations on thermal death-point of seed and virus. *Phytopathology*.9: 445-450.
- Reddy P., Mycock D J., Berjak P. 2000: The effect of microwave irradiation on the ultrastructure and internal fungi of soybean seed tissues. *Seed Sci. Technol.* 28: 277- 289.

- Riccioni L., Duvnjak T., Pucci N., Hartman G.L. 2005. PCR-RFLP Identification of *Phomopsis* / *Diaporthe* species on soybean seeds. In: 5th ISTA-SHC Seed Health Symposium, May 10-13, Anger, Francia.
- Richardson M J. 1991. An annotated list of seed-borne diseases. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, Reino Unido. 320 pp.
- Ridao A., Del C. Fabano. Ej. 2006. Prevalencia de la pudrición húmeda del tallo de soja en el sudeste bonaerense y su relación con las lluvias. Congreso Mercosoja 2006. Rosario. pp. 359-361.
- Romero P.J. 1962. Enfermedades y plagas de judía. pp. 11-12.
- Samson R A., Hoekstra E S., Frisvad J C., Filtenborg O. 1995. Introduction to food-borne fungi. CBS. Baarn, Delft.
- Scandiani M M., Fulgueira C., Amigot S., Bottai H., Pioli R. Giorda L., Ruberti D. 2005. Evaluation of biocontrol agents against soybean sudden syndrome *Fusarium* causing isolates. *Biocell* 29 (1): 118.
- Schippers B. 1963. Transmission of bean common mosaic virus by seeds of *Phaseolus vulgaris* L. cultivar beka. *Acta Bot. Neerl.* 12: 433-497.
- Seaman W L., Wallen V R. 1967: Effect of Exposure to Radio-Frequency Electric Fields on Seed-Borne Microorganisms. *Can. J. Plant Sci.* 47: 39-49.
- Selcuk M., Oksuz L., Basaran P. 2008. Decontamination of grains and legumes infected with *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. by cold plasma treatment. *Bioresource Technology* 99: 5104-5109.
- Sharma R., Joshi L. 1972. Controlling the Hill Bunt, *Indian Fmg.* 22: 31-32.
- Silbernagel M J. 1969. Mexican strain of bean common mosaic virus. *Phytopathology* 59: 1809-1812.
- Smith I M., Dunez J., Phillips D M., Lelliott R A., Arche S A. 1992. Manual de enfermedades de las plantas. Mundi-Prensa, Madrid. 671 p.
- Steadman J R. 1975. White mold disease initiation development and control in Nebraska. Rep. Bean Improvement Cooperative and national Dry Bean Res. Ass. Conf, Rochester, N.Y. November 6-8. 1973: 2.
- Stewart V B. Reddick D. 1917. Bean mosaic. *Phytopathology* 7: 61.
- Tello J C., Vares F., Lacasa A. 1991. Análisis de muestras en: Manual de laboratorio. Diagnóstico de hongos, bacterias y nematodos fitopatógenos. M.A.P.A., Madrid.
- Trapero-Casas A., Kaiser W J., Ingram D M. 1990. Control of *Pythium* Seed Rot and Preemergence Damping-Off of Chickpea in the U.S. Pacific Northwest and Spain. *Plant Dis.* 74. pp. 563-568.
- Trigo M F O., Pierobom C R., Nedel J L., Trigo L F N. 1998. Heat treatment on carrot seeds. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 33(3): 357-361.
- Tveit M., Wood R K. 1955. The control of *Fusarium* blight in oat seedling with antagonistic species of *Chaetomium*. *The Annals of Applied Biology*, 43: 538-552.
- Tylkowska. K., Turek. M., Blanco Prieto. R. 2010. Health, germination and vigour of common bean seeds in relation to microwave irradiation. *Phytopathologia* 55: 5-12.
- USDA. 1965. Losses in Agriculture. Agric. Res. Serv. Agric. Handbook N° 291, Washington. 120 p.
- Van Rensburg J. C. J., Lamprecht S. C., Groenewald J Z., Castlebury L A., Crous P.W. 2006. Characterisation of *Phomopsis* spp. Associated with die-back of rooibos (*Aspalathus linearis*) in South Africa *Stud Mycol* V. 55: 65-74.
- Vasilenko V., Carrier J. 2004. Application of light and natural compositions in new technology of seed enhancement. In Proceedings of the First World Conference on Organic Seed, Rome.

- Vergara A., Obrador J., Arancibia F. 1969. Tratamiento de semillas. INIA, Estación Experimental la Platina. Santiago. Chile.
- Walcott R R., Mc Gee D S., Misra M K. 1988. Detection of asymptomatic fungal infections of soybean seeds by ultrasound analysis. *Plant Dis.* 82, 5: 584-589.
- Warchalewski J R., Dolińska R., Błaszczak W. 2007: Analiza mikroskopowa ziarna pszenicy dwu pokoleń wyhodowanych z nasion ogrzanych mikrofalami. *Acta Agrophys.* 10: 727–737.
- Whitaker C., Berjak P., Kolberg H., Pammenter N. 2004. Responses of various manipulations, and storage potential, of seeds of the unique desert gymnosperm, *Welwitschia mirabilis* Hook. Fil. *South African Journal of Botany*, 70(4): 622-630.
- Zaumeyer W J., Thomas H R. 1957. A Monographic Study of Bean Diseases and Methods for their Control. U. S. Dep. *Agric. Tech. Bull.* 868. Revised Ed. 255 pp.

ANEXOS

ANEXO I

- **Ensayo 1. Análisis de la microbiota fúngica de las entradas de semillas de judía de la colección del banco de germoplasma del CRF**



Foto 1. Semillas de las entradas BG026232 infectadas por *Penicillium* entre papel de filtro.



Foto 2. Observación de preparación de *Penicillium* al microscopio óptico.

- **Ensayo 2. Análisis de la microbiota fúngica de semillas de judía comerciales después de tratamientos físicos**



Foto 3. Semillas comerciales JN control en placa con PDA.

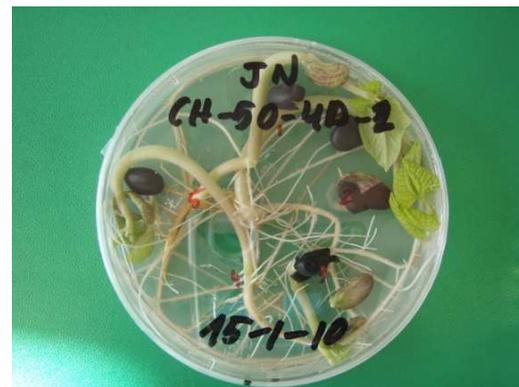


Foto 4. Semillas comerciales JN tratadas en placas PDA con calor húmedo a 50°C durante 4 días.

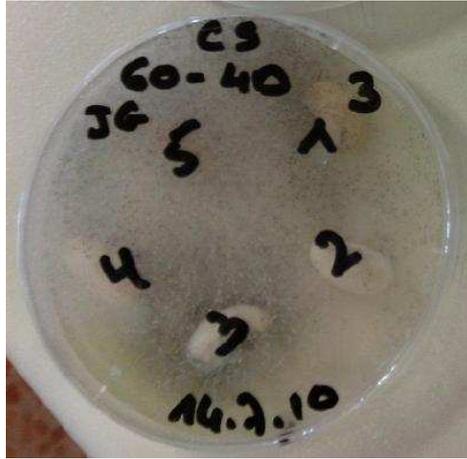


Foto 5. Semillas comerciales JG tratadas con calor seco a 60°C durante 4 días en placas con PDA invadidas por *Rhizopus*.

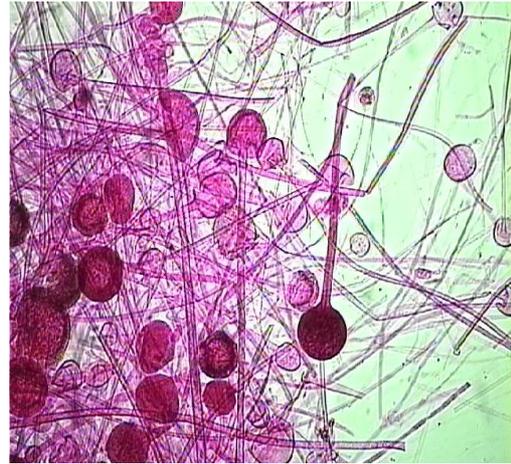


Foto 6. Observación de preparación de *Rhizopus* al microscopio óptico.

- Ensayo 3. Análisis de la microbiota fúngica de tres entradas de semillas de judía de CRF después de los tratamientos físicos escogidos



Foto 7. Semillas control de la entrada BG026201 en placa con papel infecta Por *Aspergillus*.

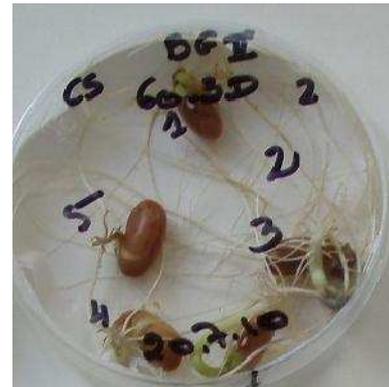


Foto 8. Semillas de la entrada BG026201 tratadas con calor seco a 60°C durante 3 días en placas con papel.



Foto 9. Observación de preparación de *Aspergillus* al microscopio óptico.

ANEXO II (FAO 2006)

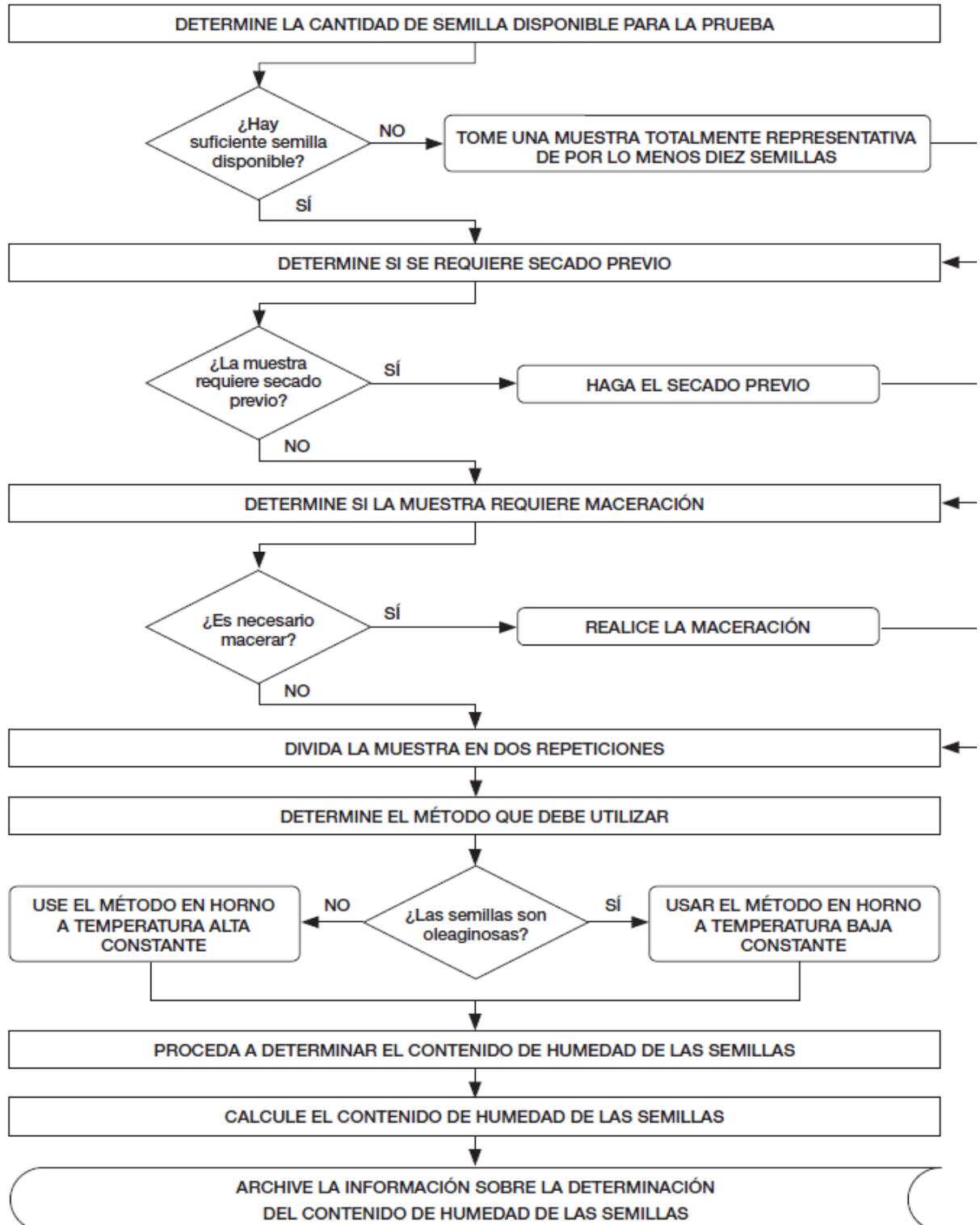
Diagrama de Flujo 1.4. Determinación del contenido de humedad de las semillas

Diagrama de Flujo 1.5. Secado de las semillas

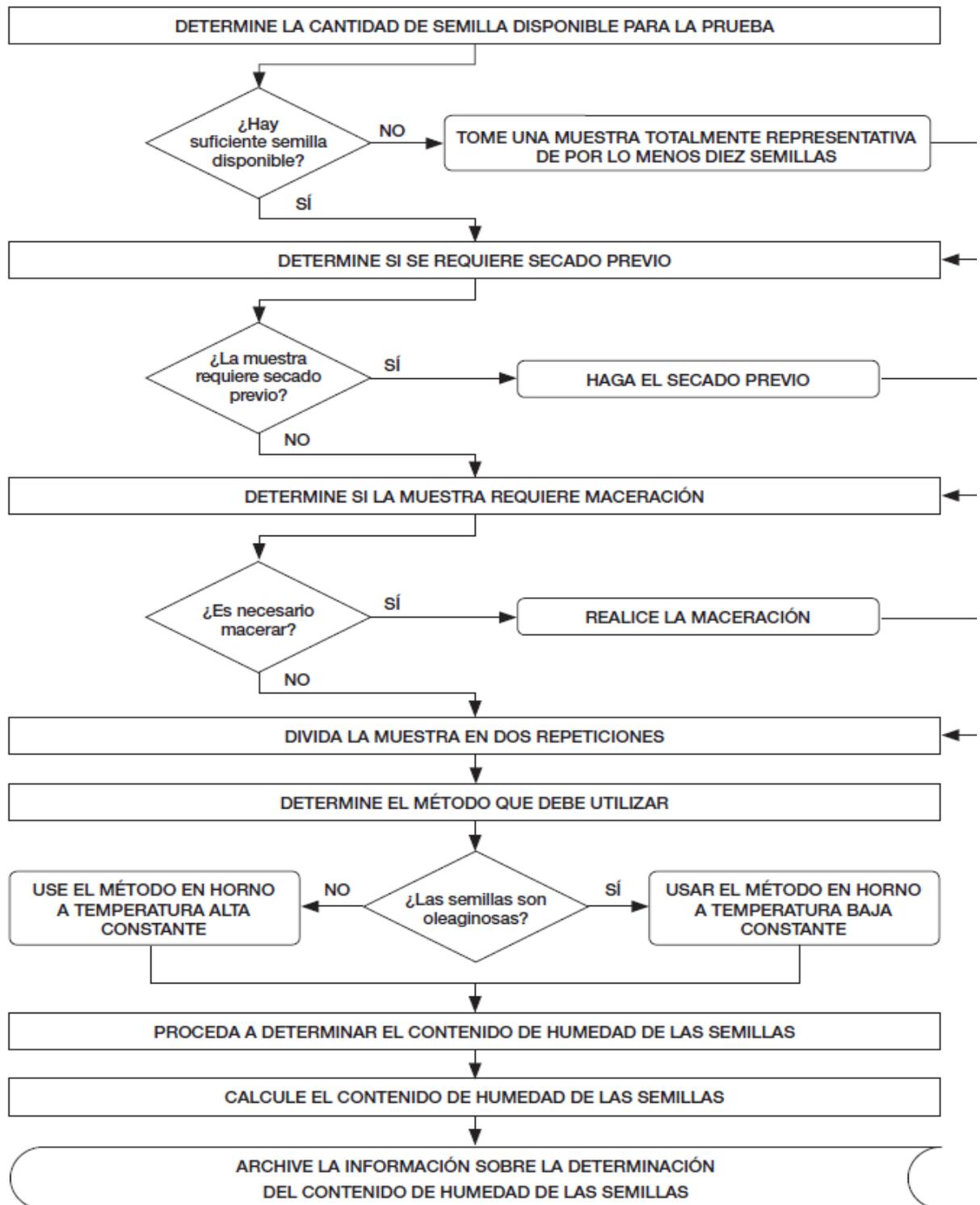


Diagrama de flujo 1.6. Pruebas de germinación

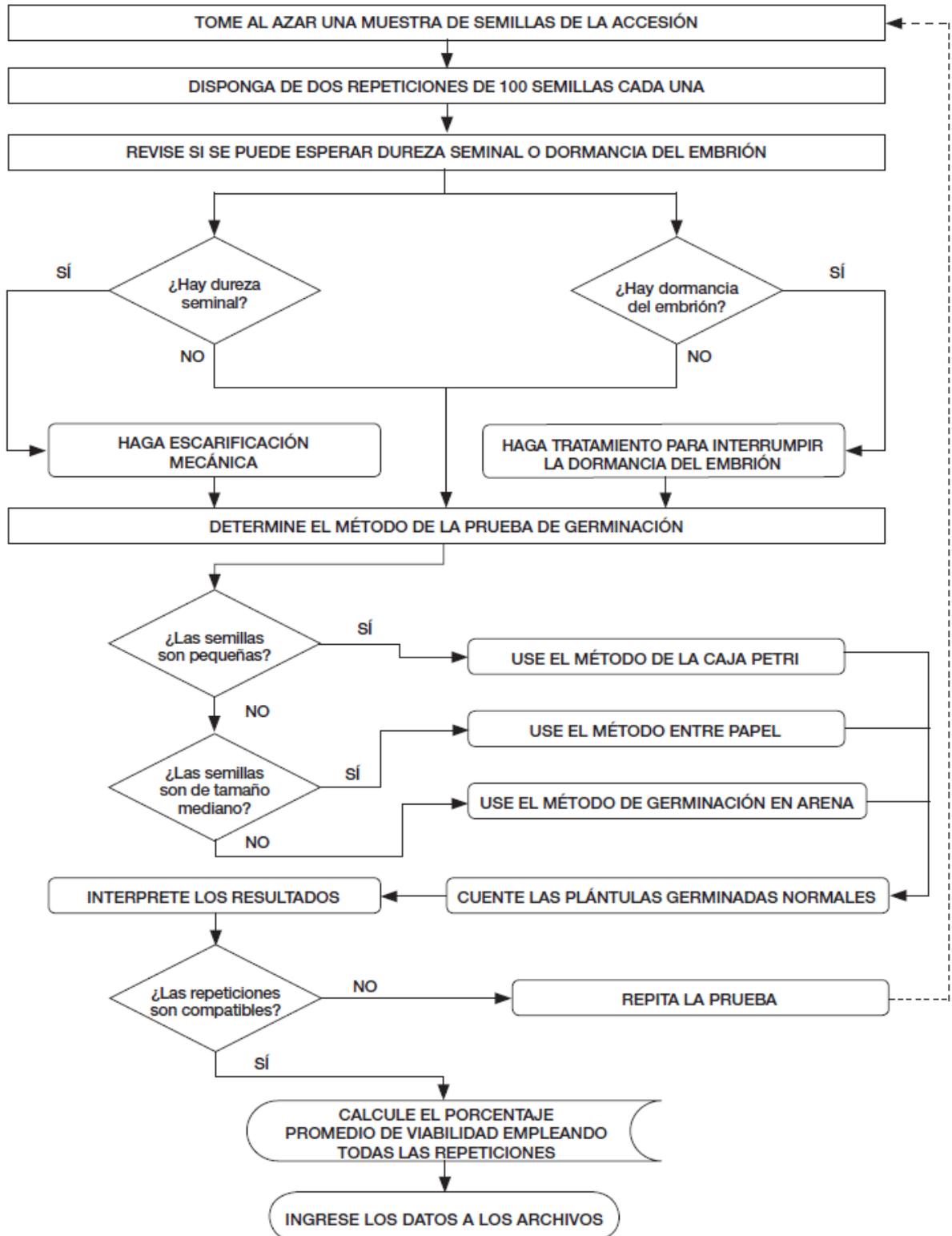


Diagrama de flujo 1.7. Empaque de las semillas

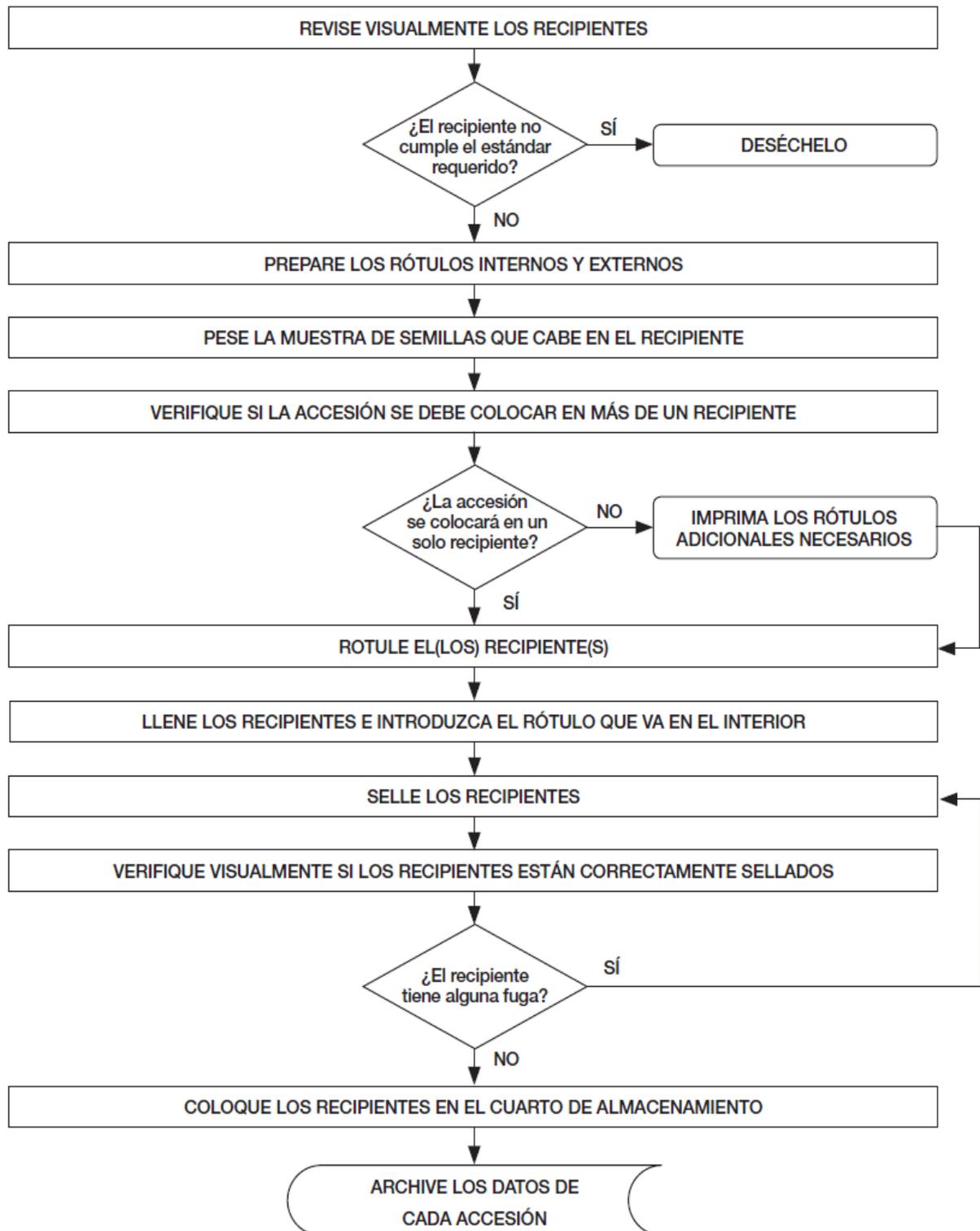


Diagrama 1.8. Distribución del germoplasma

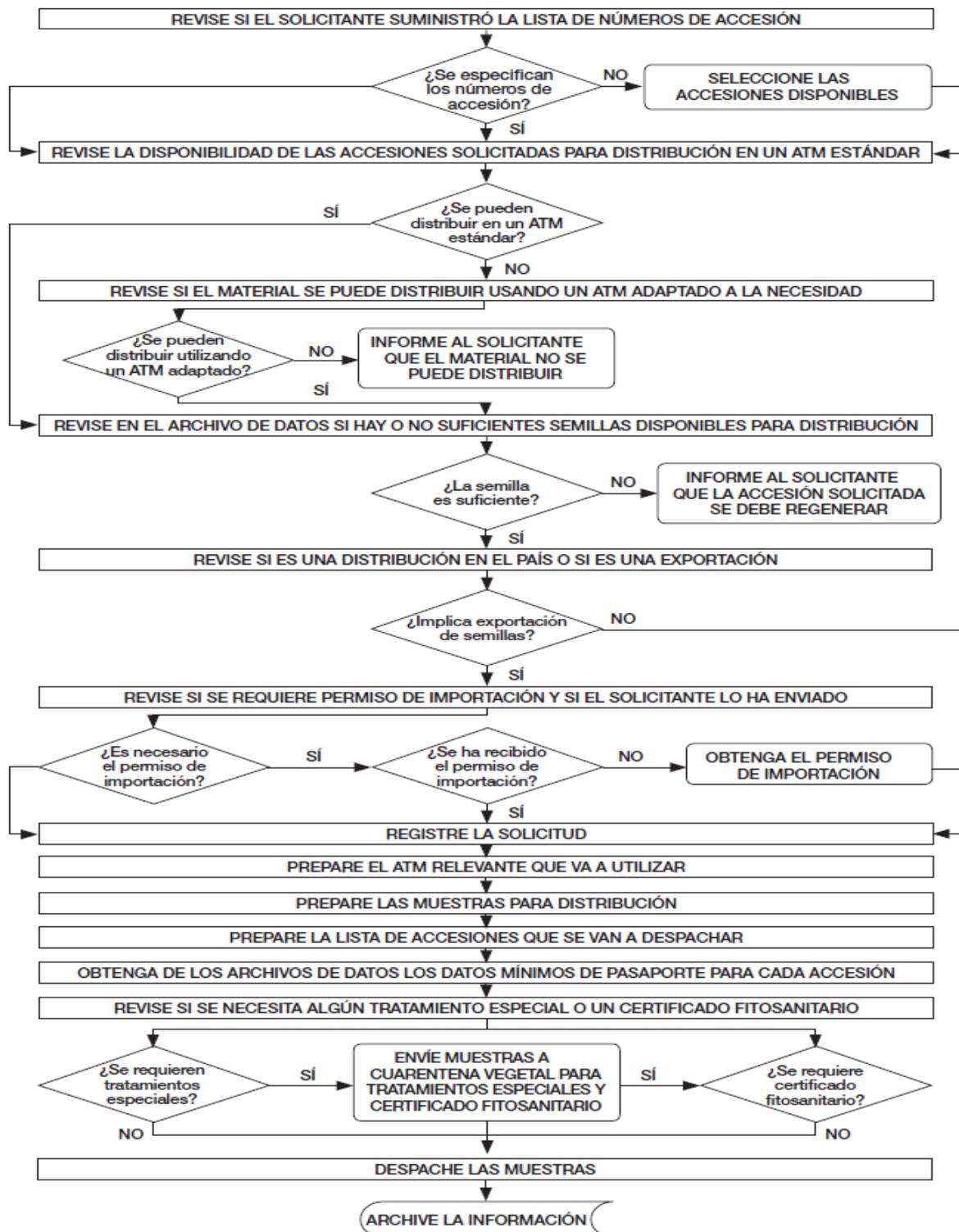


Diagrama de flujo 1.9. Monitoreo de la viabilidad

