

DETECCION DE HONGOS, BACTERIAS Y VIRUS
PRESENTES EN SEMILLA DE CHILE (*Capsicum
annum L.*) Y SU EFECTO EN LA CALIDAD, EN EL
MUNICIPIO DE RAMOS ARIZPE, COAHUILA

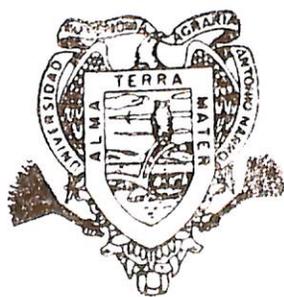
MARIA MAGDALENA RODRIGUEZ VALDES

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
EN PARASITOLOGIA AGRICOLA



BIBLIOTECA
EGIDIO G. REBONATO
BANCO DE TESIS
U.A.A.A.N.



Universidad Autónoma Agraria
Antonio Narro

PROGRAMA DE GRADUADOS

Buenavista, Saltillo, Coah.

JUNIO DE 1938

039903

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

DETECCIÓN DE HONGOS, BACTERIAS Y VIRUS PRESENTES
EN SEMILLA DE CHILE (*Capsicum annum* L.) Y SU
EFECTO EN LA CALIDAD, EN EL MUNICIPIO DE RAMOS
ARIZPE, COAHUILA.

TESIS

POR

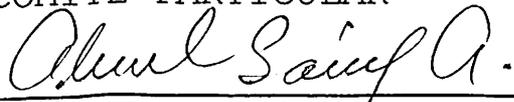
MARÍA MAGDALENA RODRÍGUEZ VALDÉS

Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de
Asesoría y aprobada como requisito parcial para optar al
grado de:

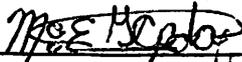
MAESTRO EN CIENCIAS EN
PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

COMITÉ PARTICULAR

Asesor Principal:

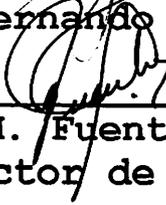

M.C. Abiel Sánchez Arizpe

Asesor:


M.C. Ma. Elizabeth Galindo C.

Asesor:


Dr. J.M. Fernando Narváez Melo


Dr. Jesús M. Fuentes Rodríguez
Subdirector de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila. Junio de 1998.

AGRADECIMIENTOS

A MI ALMA MATER por haberme brindado su apoyo a través del Departamento de Parasitología Agrícola.

Al M. C. Abiel Sánchez Arizpe por su apoyo y colaboración en la realización de este trabajo.

Al M.C. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda por su disposición y estímulo en la revisión de este trabajo.

Al Dr. J. M. Fernando Narváez Melo por sus sugerencias y atención brindada.

A Jorge Luis Salazar González por la ayuda prestada.

A todas aquellas personas que de alguna u otra forma apoyaron en la realización del presente trabajo.

DEDICATORIA

A MI FAMILIA: Por la comprensión, el estímulo y el apoyo.

MI ESPOSO Francisco J. Cueto García.

MIS HIJAS Berenice, Jessica y María Magdalena.

A MIS PADRES Juan Manuel Rodríguez Solís.
 María Delfina Valdés Valencia.

A MIS HERMANOS María Obdulia y Darío Alejandro.

COMPENDIO

DETECCIÓN DE HONGOS, BACTERIAS Y VIRUS PRESENTES EN SEMILLA DE CHILE (*Capsicum annum* L.) Y SU EFECTO EN LA CALIDAD, EN EL MUNICIPIO DE RAMOS ARIZPE, COAHUILA.

POR
MARÍA MAGDALENA RODRÍGUEZ VALDÉS

MAESTRÍA
PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
Buenavista, Saltillo, Coahuila. Junio de 1998.

M.C. Abiel Sánchez Arizpe - Asesor -

Palabras clave: Detección, Identificación y Calidad.

Los objetivos del presente trabajo fueron determinar la calidad fitosanitaria de la semilla de chile, por medio de la detección e identificación de los agentes presentes en la misma.

Los métodos utilizados para aislar a los hongos de la semilla fueron: el papel secante congelado y placas de agar, se purificaron y se procedió a su identificación se encontró a los hongos, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata* y *Aspergillus niger*.

En lo que se refiere a bacterias se utilizaron los medios diferenciales, selectivos, pruebas bioquímicas y finalmente el medio Tween B y se aisló a la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* de varias de las muestras.

En ambos casos se practicaron las pruebas de patogenicidad para confirmar que las identificaciones de hongos y bacterias presentes en la semilla fueran correctas.

Por medio de las pruebas de ELISA se detectó la presencia de los virus del mosaico del tabaco (TMV), virus de la mancha anular del tabaco (TRSV), virus del jaspeado del tabaco (TEV) y virus del mosaico del pepino (CMV).

Al final se realizó una correlación entre los resultados de germinación y vigor con los hongos y bacterias aislados de la semilla para de esta forma reforzar las pruebas realizadas.

ABSTRACT

DETECTION OF FUNGI, BACTERIA AND VIRUSES PRESENTED IN
PEPPER SEEDS (*Capsicum annum* L.) AND ITS EFFECT IN QUALITY,
IN THE MUNICIPIO OF RAMOS ARIZPE COAHUILA

By
MARÍA MAGDALENA RODRÍGUEZ VALDÉS

MASTER OF SCIENCE
AGRICULTURAL PARASITOLOGY
UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
Buena Vista, Saltillo, Coahuila. Junio de 1998.

M.C. Abiel Sánchez Arizpe -Advisor-

Key word: Detection, identification and Quality

The objectives of the present research were to determine the seed health of pepper, by detection and identification of pathogens present in the seed.

The methods used to isolate the fungi of seed-borne were: freezing towel paper and media of agar plaque. The following fungi were identified: *Fusarium solani*, *Alternaria alternata* and *Aspergillus niger*.

Referring to bacterium it's utilized differential and selective media, performer biochemical tests and finally grew it on Tween B media, the bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* was isolate of several seed samples.

Both fungi and bacterium were submitted tests of pathogenicity to confirm their identification.

ELISA test was used to detect the presence of tobacco mosaic virus (TMV), tobacco ring stain virus (TRSV), tobacco etch virus (TEV) and cucumber mosaic virus (CMV).

At the end of the research a correlation between germination and vigor of seed contaminated with fungi and bacterium was performed to reinforce the developed tests.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
Historia e importancia.....	5
Patología de Semillas.....	6
Hongos presentes en semilla.....	8
Daños en la semilla.....	9
Localización.....	10
Transmisión.....	10
Métodos de detección de hongos y bacterias Transmitidas en la semilla	11
Bacterias.....	13
Daños en las semillas por bacterias.....	14
Virus en la semilla.....	15
Presencia de virus en el cultivo del chile.....	21
Sintomatología.....	22
Transmisión de virus en semilla de chile.....	23
Métodos de detección de virus en semilla.....	24
Control de virus en semilla.....	26
Pruebas de germinación.....	27
Sustratos.....	28
Tipos de sustratos.....	28
Pruebas de vigor en semillas.....	28
Objetivo de una prueba de vigor	30
Requisitos para una buena prueba de vigor.....	30
Consideraciones en el ensayo de vigor.....	31
Pruebas de patogenicidad.....	31

MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
Recolección de Material.....	34
Pruebas de sanidad de la semilla para detectar hongos.....	35
Incidencia de hongos por muestra	35
Escala patogénica para hongos.....	36
Identificación de hongos.....	37
Pruebas de detección de bacterias.....	38
Identificación de la bacteria.....	39
Detección de virus en la semilla.....	39
Pruebas de patogenicidad.....	40
Pruebas de germinación.....	42
Pruebas de vigor.....	42
RESULTADOS.....	45
Pruebas de patogenicidad para hongos.....	46
Pruebas de patogenicidad para bacterias	47
Resultados de pruebas de virus.....	47
Correlación entre patógenos, el vigor y germinación.....	48
DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIONES.....	57
RESUMEN.....	58
LITERATURA CITADA.....	61

ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro	Página
2.1 Enfermedades Transmitida por semilla Chile. UAAAN 1997.....	11
2.2 Métodos de Detección de Hongos y Bacterias Transmitidas por semilla. UAAAN 1997.....	12
2.3 Bacterias de Importancia Cuarentenaria con su Rango de Hospedantes y la Parte u Organo Afectado.....	14
2.4 Métodos de Detección de Virus en Semilla. UAAAN 1996.....	25
2.5 Porcentaje de Transmisión por Semilla de los Principales Virus.....	26
3.1 Calidad Sanitaria de la Semilla.....	37
4.1 Escala Patogénica para Hongos Encontrados en Semilla de Chile de Ramos Arizpe, Coah. UAAAN 1997.....	45
4.2 Valor IFI y Categoría de la Semilla de Chile de Ramos Arizpe, Coah. UAAAN 1997.....	46
4.3 Pruebas de ELISA practicadas a Semilla de Chile de Ramos Arizpe, Coah. UAAAN 1997.....	48
4.4 Muestras de Semilla de Chile de Ramos Arizpe, Coah. donde hubo mayor presencia de virus. UAAAN 1997.....	48
4.5 Resultados de la Germinación y Vigor de Semilla de Chile de Ramos Arizpe, Coah. UAAAN 1997.....	49
4.6 Prueba de Kendall practicada a la Semilla de Chile de Ramos Arizpe Coah. UAAAN 1998.....	50

INTRODUCCION

El cultivo de chile (*Capsicum annum* L.) en México se usa como alimento en la dieta diaria desde tiempos precolombinos. Además juega un papel importante, proporcionando vitaminas y minerales, y se ha seleccionado por su aportación para condimentar la dieta alimenticia.

El chile junto con el maíz, frijol y calabaza fueron la base de la alimentación de las culturas de Mesoamérica incluso se le considera a esta región como centro de domesticación del género *Capsicum* y en particular, la especie *annum*.

En el país se cultivan diversos tipos de chile que tienen forma, color y sabor muy diferentes, destacando para el consumo nacional por el área sembrada y volumen de producción el chile serrano con una superficie de 40,000 ha y el chile jalapeño con 25,000 ha respectivamente siguiendo en orden de importancia los chiles anchos y mirasoles. Siendo en total de 130,000 ha sembradas.

El 80 por ciento de la superficie corresponde a la siembra bajo condiciones de humedad y el resto a temporal.

A su vez destaca el chile dulce y morrón con fines de exportación, principalmente a Estados Unidos y Canadá.

En el municipio de Ramos Arizpe, Coah. este cultivo cumple una función socioeconómica importante por los siguientes aspectos: es altamente redituable, es de amplio consumo, y es una fuente de trabajo para la población campesina, ya que se requieren de 200 a 300 jornales por hectárea; beneficiando también a los trabajadores de las empacadoras y transporte.

La superficie sembrada de chile en el Municipio de Ramos Arizpe, Coah. es de alrededor de 350 ha de riego, con una producción promedio de 12-15 ton/ha.

En el sistema agrícola tradicional, los agricultores ahorran una parte del cultivo, en forma de semillas para la siembra del ciclo agrícola siguiente; pero esto no basta si se quiere obtener un aumento en la producción. Para estimular la producción un requisito indispensable es la utilización de semillas de calidad de cultivares mejorados.

Un problema fuerte en esta región es que algunos de los agricultores no usan en su totalidad semilla certificada, y revuelven parte de la semilla certificada con la recolectada por ellos, aunque la mayoría utilizan semilla criolla de la región o de otros lugares; por lo mismo provocan que las condiciones de sanidad no sean las adecuadas, favoreciendo con ésta práctica, que hongos, bacterias y virus que pueden estar presentes en la semilla, causen problemas en la germinación, y en el desarrollo del cultivo en el campo. Con respecto a las enfermedades que se han detectado en el campo, se cree que la mayoría de ellas pueden tener su origen en la semilla; desde la recolección de la misma, siembra del almácigo, hasta el rendimiento del cultivo y por consecuencia en la producción de chile.

El presente trabajo plantea los siguientes objetivos:

Determinar la calidad fitosanitaria de la semilla de chile utilizada en el establecimiento de almácigos en el Municipio de Ramos Arizpe, Coah.

Detectar e identificar los agentes presentes en la semilla, que influyen en la calidad de la misma.

El presente trabajo plantea las siguientes hipótesis:

En el caso de los hongos se espera encontrar *Fusarium*, *Aspergillus* y *Helminthosporium*.

En el caso de las bacterias se espera encontrar *Pseudomonas* y *Xanthomonas*.

En el caso de los virus se espera encontrar el virus del mosaico del tabaco (VMT), virus de la mancha anular del tabaco (TRSV), virus del jaspeado del tabaco (TEV) y virus del mosaico del pepino (CMV).

REVISION DE LITERATURA

Historia e Importancia

El hombre en su afán de obtener productos vegetales diversos que satisfagan sus necesidades de alimentación, vestido, y otras de menor importancia, encuentra factores que disminuyen, y en casos extremos bajan los rendimientos de sus cultivos. Entre estos factores juegan un papel de gran importancia las enfermedades de las plantas (De la Isla, 1994).

Asimismo, en la comercialización, como en el intercambio de recursos genéticos e introducción de nuevos cultivos traslada semilla a los diferentes ambientes; por lo que se ha constituido en el principal vector de patógenos en cada área agrícola abierta al cultivo.

Los microorganismos al evolucionar cubren sus necesidades de sobrevivencia, desarrollando fases de su ciclo de vida resistentes al medio ambiente adverso, o parasitando sistemáticamente en la semilla; lo cual les asegura la perpetuación de la especie y su amplia

distribución geográfica, y completamente al azar en los terrenos de cultivo (Jiménez, 1997).

El 90 por ciento de los cultivos destinados a la alimentación humana y animal, requiere del uso de semillas; de ahí que éstas sean el principal insumo para la producción de alimentos de origen vegetal (Agarwal and Sinclair 1987a).

Siempre se ha considerado que las enfermedades de las plantas cultivadas constituyen una seria amenaza para la producción de alimentos, desde el momento de la siembra hasta el consumo de las cosechas (Moreno, 1996).

En México se ha calculado una disminución del 30 por ciento de los cultivos principales a causa de insectos, malas hierbas, roedores y enfermedades, y seguramente corresponde a estas últimas un alto porcentaje de la cifra total (De la Isla, 1994).

Patología de semilla

Durante el desarrollo de la semilla, ésta puede ser invadida o contaminada por diversos patógenos. Las enfermedades que afectan a las semillas en muchas ocasiones

pasan desapercibidas durante sus etapas iniciales, y cuando uno se percata de su presencia, ya es muy tarde para aplicar algún método de control.

Salazar (1992), menciona que una de las ramas de la Fitopatología que en los últimos años ha ido adquiriendo mayor importancia es la patología de semillas; sin embargo, en México existen pocas investigaciones sobre patógenos transmitidos por semilla.

Aunque las pérdidas causadas por las enfermedades en semillas no han sido bien cuantificadas, Agarwal and Sinclair (1987a) mencionan que las pérdidas globales debido a enfermedades en plantas se estima en un 12 por ciento del potencial de producción.

Se dice que un patógeno es transmitido por semilla cuando aquel es llevado sobre o dentro de la semilla, penetrando sus tejidos, y permanece en la ella en estado de reposo; de modo que al sembrarla, la infección en la planta provendrá de la semilla infectada (Moreno, 1996).

Otros patógenos contaminan la semilla a nivel superficial o están mezclados con ellas, pero esto no implica necesariamente que las semillas las transmitan.

Entre los patógenos asociados a semillas están los hongos, bacterias, virus y nemátodos.

Por otra parte, se tienen evidencias de que las semillas juegan un papel importante en la diseminación de enfermedades de las plantas de un lugar a otro y que algunos patógenos, pueden vivir por años alojados en o sobre la semilla (Kreitlow et al., 1982).

La mayoría de los cultivos alimenticios del mundo son sembrados directamente por semilla; para que sea un buen inicio es necesario que la semilla esté en óptimas condiciones (Agarwal and Sinclair, 1987a).

Hongos presentes en semilla

Los hongos son los patógenos más importantes de las plantas, y también en cuanto a patógenos transportados en las semillas. Las bacterias, nemátodos, virus y viroides asimismo son acarreados en las semillas, pero no los micoplasmas y las rickettsias (Argwal and Sinclair, 1987b).

Aunque la mayoría de las especies de hongos aparentan estar ya diseminados alrededor del mundo, es necesario evitar la posible transferencia de cepas de

algunos de ellos; los cuales pueden contener nuevo material genético, o bien hongos que aparecen restringidos a ciertas condiciones de suelo, como pH y temperatura y que aparentemente no se adaptan a otras condiciones (Moreno, 1996).

Las semillas se consideran la fuente más importante para la perpetuación de patógenos e incluso para algunos son el medio exclusivo de sobrevivencia, como los carbones voladores (*Ustilago nuda*) y carbones cubiertos (*Tilletia caries*). Además, el patógeno permanece más tiempo viable en las semillas que en el suelo o en residuos de cosecha, y su estrecha relación con la semilla favorece las infecciones primarias tempranas (Navarrete, 1995).

Daños en la semilla

El impacto directo de los hongos en las semillas es considerable, muchos afectan el primordio de la semilla o semillas maduras y provocan la reducción de la cosecha a nivel cuantitativo y cualitativo (Moreno, 1996).

Algunos hongos que son parásitos débiles manchan la semilla disminuyendo el valor comercial. Otros provocan el aborto de la semilla o sustituyen órganos florales al

desarrollar fructificaciones u otras estructuras del hongo. En ocasiones la presencia de los hongos causa un pobre desarrollo de la semilla la cual queda enjuta y de menor tamaño (Navarrete,1995).

Localización

Los hongos en las semillas son acarreados en dos formas, como una infección o como una infestación. La primera implica que el patógeno ha invadido los tejidos de las plantas, y se ha establecido en ellos y la segunda que el patógeno va como contaminante, en forma de esporas o de esclerocios, directamente sobre las semillas, pero sin invadir las testas o pericarpios; o bien en residuos de cosechas y en partículas de suelo (Moreno,1996).

Transmisión

La transmisión puede ser sistémica o no sistémica.

La sistémica proviene tanto de infecciones embrionarias como de no embrionarias, es decir que en algunas enfermedades el hongo está dentro de la semilla y en otras se sitúa fuera de ellas.

La transmisión no sistémica implica que el hongo no se desarrolla internamente a través de los tejidos de las plantas, sino que lo hace por fuera, causando lesiones a tallos, hojas, flores, y frutos. La transmisión no sistémica puede provenir de semillas infectadas, contaminadas o infestadas (Moreno,1996). Cuadro 2.1.

Cuadro 2.1. Enfermedades Transmitidas por Semilla de Chile. UAAAN. 1997

PATOGENOS	NOMBRES COMUNES
<i>Alternaria</i> spp.	Podredumbre del fruto
<i>Cercospora capsici</i>	Mancha jaspeada de la hoja Podredumbre apical
<i>Colletotrichum piperatum</i>	Podredumbre de la madurez
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	Podredumbre del fruto
<i>Fusarium solani</i>	Marchitez del Fusarium
<i>Phytophthora capsici</i>	Marchitez de Phytophthora
<i>Rhizoctonia solani</i>	Rhizoctoniasis
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Cáncer del tallo

Jiménez (1997).

Métodos de detección de hongos y bacterias transmitidos en la semilla.

En la mayoría de los casos es inevitable la presencia de hongos en la semilla, los métodos para detección de hongos y bacterias se presentan de la siguiente forma en el Cuadro 2.2.

Cuadro 2.2. Métodos de Detección de Hongos y Bacterias Transmitidos por Semillas. UAAAN 1997.

METODO	APLICACION
Inspección directa.	Detección de esclerocios de hongos agallas de nemátodo, semillas de malezas, partículas de suelo, etc..
Suspensión de lavado.	Detección directa de esporas de hongos.
Observación directa de embriones.	Detección de esporas de hongos que invaden sistemáticamente la semilla.
Siembra de agar.	Detección de hongos en general.
Congelado de semilla.	Específico para ciertos hongos (<i>Phoma</i> , <i>Septoria</i> , <i>Alternaria</i>)
Observación de síntomas en plántulas.	Detección de patógenos, útil en semilla de cereales y forestales.
Observación de síntomas en plántulas creciendo en agar-agua.	Utilizado para muchas clases de semillas.
Inoculación en indicadoras.	Detección de bacterias (<i>X.phaseoli</i> , <i>X.campestris</i>).
Método de bacteriófago	Detección de algunas bacterias (<i>P. phaseolitica</i> , <i>X.phaseoli</i>) (<i>C. michiganense</i> , <i>X. vesicatoria</i>)
Métodos serológicos.	Utilizado para todos los patógenos que producen antisuero específico.

Jiménez (1997)

Debido a la importancia que tienen los hongos como causantes de enfermedades a partir de semillas infectadas se hace necesario realizar análisis para detectar la calidad sanitaria de ellas, dado que la correcta determinación de las causas de la enfermedad será el primer paso para combatirlas.

Bacterias

Las bacterias ocurren sobre especies de casi todas las familias de plantas. Las bacterias en condiciones no favorables pueden vivir en el tejido infectado, en el suelo o en algún insecto vector. Las bacterias que producen tizones y cáncer invaden el cambium; y las que producen marchitamiento colonizan el xilema. La mayoría de las bacterias fitopatógenas se desarrollan primeramente en la planta hospedera como parásitas y parcialmente en el suelo como saprófitas, Cuadro 2.3. El hombre contribuye localmente a la distribución de la bacteria por el manejo de plantas y por sus prácticas culturales, y a largas distancias por transportación de plantas infectadas o parte de plantas a nuevas áreas. En el caso de infección de la semilla, las bacterias pueden ser transportadas dentro de ella de manera sistémica, o bien en la parte externa como contaminante.

Cuadro 2.3. Bacterias de Importancia Cuarentenaria con su Rango de Hospedantes y la parte u Organo Afectado.

PLAGA	PARTE U ORGANO AFECTADO	HOSPEDERO
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Semilla	Tomate
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Semilla,plántula	Tomate Chile
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	Semilla	Tabaco

DGSV, IX Curso Taller de Actualización de Semillas 1997.

Daños en las semillas por bacterias

El efecto patogénico de las bacterias en las semillas puede ser derivado de uno de los siguientes cuatro tipos de daño:

Aborto de la semilla. La semilla puede ser totalmente detenido su desarrollo, o puede disminuir su tamaño.

Pudrición de la semilla. La bacteria puede penetrar a la semilla y causarle una pudrición.

Cuadro 2.3. Bacterias de Importancia Cuarentenaria con su Rango de Hospedantes y la parte u Organo Afectado.

PLAGA	PARTE U ORGANO AFECTADO	HOSPEDERO
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato	Semilla	Tomate
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. vesicatoria	Semilla,plántula	Tomate Chile
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tabaci	Semilla	Tabaco

DGSV, IX Curso Taller de Actualización de Semillas 1997.

Daños en las semillas por bacterias

El efecto patogénico de las bacterias en las semillas puede ser derivado de uno de los siguientes cuatro tipos de daño:

Aborto de la semilla. La semilla puede ser totalmente detenido su desarrollo, o puede disminuir su tamaño.

Pudrición de la semilla. La bacteria puede penetrar a la semilla y causarle una pudrición.

Decoloración de la semilla. La decoloración de la superficie de la semilla es producida por bacterias patogénicas.

Adelgazamiento de la semilla. Se produce una cantidad excesiva de bacterias en la superficie asemejando una especie de barniz que cubre la semilla.

Todo lo anterior de acuerdo al patógeno y a las diferentes condiciones durante la maduración de la semilla, uno u otro pueden presentarse o una combinación de ambos (Neergaard, 1979).

Virus en la semilla

La transmisión de virus por semilla no era un aspecto importante en la epidemiología de estos patógenos en los inicios del presente siglo veinte. Los primeros reportes al respecto aparecieron en la década de los años 20's en virus que por estudios posteriores se ha confirmado su alta eficiencia de transmisión a través de la semilla, como son los virus del Mosaico común del frijol (BCMV) y el Mosaico del pepino (CMV), los cuales pueden transmitirse en semillas de diferentes especies de plantas hospederas hasta en un 80 y 40 por ciento respectivamente.

A pesar de que actualmente aun se tiene un amplio desconocimiento sobre los mecanismos de infección entre el virus-semilla-planta para la transmisión de virus a través de aquella, Neergaard en (1977) define cuatro conceptos que indican aspectos relacionados con los mecanismos de transmisión como son:

a) Virus transmitidos en semilla. Son aquellos que en plantas infectadas han invadido en forma temprana el meristemo floral antes de su desarrollo y diferenciación, sin que las células germinales sufran algún colapso, de tal manera que el virus puede invadir el embrión y a través de éste pasar en la germinación a la nueva planta. Estos virus pueden transmitirse por este medio hasta en un 100 por ciento.

b) Virus llevados en la semilla. Estos virus son acarreados dentro, sobre o en cualquier lugar de la semilla, y pueden o no ser transmitidos a la plántula que da lugar la semilla que los contiene; se ha mencionado que su transmisibilidad no es mayor del cinco por ciento.

c) Virus que infectan a la semilla. Son aquellos virus que logran penetrar dentro del tejido de la semilla pero que frecuentemente permanecen latentes o inactivos. Estos solo

se transmiten en el caso de que el virus presente una alta eficiencia de transmisión mecánica como el Virus mosaico del tabaco (TMV).

d) Virus que contaminan semilla. Son aquellos que van adheridos en forma externa a la semilla. Su eficiencia de transmisión es baja y en casos excepcionales se pueden transmitir como el TMV.

En función de lo anterior, no todos los virus presentes en semilla son capaces de transmitirse a la siguiente generación y, mucho menos, no todas las semillas procedentes de plantas infectadas por virus son capaces de transmitirlos. En el caso de ciertos virus llevados en la semilla, pueden transmitirse cuando éstas son inmaduras, sin embargo al madurar las semillas (almacenadas), de alguna manera los virus son inactivados por supuestos compuestos presentes en la semilla o que sintetizan durante la madurez de ésta. En ciertos casos, estos virus aun son capaces de transmitirse a la planta generada.

El chile (*Capsicum annum* L.) es afectado severamente por enfermedades de tipo viral, las que disminuyen su producción hasta el 100 por ciento. En México se han detectado en plantas de chile diversos virus: virus del mosaico del tabaco TMV; virus de la mancha anular del

tabaco TRSV; virus del jaspeado del tabaco TEV; virus del mosaico del pepino CMV; y el virus Y de la papa PYV (Garzón, et al.,1986).De estos el TEV,CMV, y TMV se han encontrado ampliamente distribuidos en las áreas chileras del país. Además se ha consignado la planta atigrada (Garzón y Galindo, 1985) y el geminivirus del rizado amarillo del chile (Acosta,1988).

En México no se ha consignado la transmisión de virus por semilla de chile. Sin embargo, el TMV y CMV se han detectado en otros países. El TRSV, PYV y TEV no se ha encontrado que sean transmitidos por semilla (Vega et al.,1993). La detección de virus en planta y/o semilla puede hacerse a través de plantas diferenciales, inclusiones virales, microscopía electrónica, serología, etc.

En México los informes más recientes de transmisión de virus por semilla fueron descritos por Vega et al. (1993). En estos se consignó por primera ocasión la transmisión del virus jaspeado del tabaco (TEV) en plantas de chile jalapeño, el cual fue detectado en testa y endospermo de semillas procedentes de plantas infectadas y cuya transmisión posteriormente se confirmó en plantas desarrolladas a partir de estas semillas enfermas

identificándose el mencionado virus, por estudios inmunoserológicos y por microscopía de luz y electrónica.

No existen en México datos precisos sobre la incidencia y porcentaje de daño del Virus del Mosaico del Tabaco TMV en plantaciones de chile; por lo general siempre que se habla de éste, se le menciona asociado a otros virus (Garzón,1987).

El TMV se transmite mecánicamente y por semilla, el PYV y el CMV se transmiten mecánicamente y a través de afidos, de manera no persistente , aunque este último se ha detectado en semilla de melón y pepino (Vega, et al.,1993).

El conocimiento de la transmisión de virus por semilla es muy importante desde el punto de vista epidemiológico, pues la infección puede ocurrir desde las primeras etapas de desarrollo de la planta e introducirse fácilmente la enfermedad a nuevas áreas (Sutula, et al.,1986); además permite la latencia del virus en las plantas anuales que en general es diseminado por el vector durante la estación de crecimiento.

Aun no se sabe con certeza que es lo que determina que un virus sea o no transmitido por semilla; puede ser la

capacidad de crecer en determinados tejidos y la insensibilidad de los productos del hospedante presentes en la semilla (Vega, et al.,1993).

Los virus pueden encontrarse en la testa, embrión o endospermo de la semilla (Garzón,1995). La transmisión por semilla es específica para el virus y hospedante; en plantas de chile el TMV se encontró en 45 por ciento y el CMV en uno por ciento, aunque este último se detectó en semillas de pepino en un 30 por ciento (Vega, et al.,1993).

El TMV se transmite de una generación a otra en la semilla de chile pimiento y se asocia con la testa y raramente con el endospermo o embrión (Vega,et al.,1993).

La mayoría de los virus transmitidos por semilla provienen del óvulo de las plantas infectadas o del polen que fertilizó la flor (Agrios,1986).

Garzón (1995) ha mencionado que los virus pueden permanecer en la semilla por algunos meses o por muchos años, aunque existen otros factores importantes que afectan la transmisión de virus por semilla, entre estos se considera que los más importantes son: temperatura, hospedante, variante de virus y tiempo de infección.

En lo que concierne al impacto epidemiológico de la transmisión por semilla, esta ha tenido repercusiones determinantes en la introducción de un nuevo virus a una región, o como fuente de inóculo primario, lo cual da lugar a que la incidencia del virus en cada ciclo de producción de una determinada especie esté asegurada, y principalmente esté relacionada con daños al cultivo (Garzón, 1995).

Presencia de virus en el cultivo de chile.

En el cultivo del chile, la literatura universal ha consignado más de 35 enfermedades de tipo viroso; no obstante muchas de éstas son variantes de virus ya descritos y otros no se han caracterizado plenamente

También se han mencionado tres virus que infectan chile, y son: el Jaspeado del tabaco, el Mosaico del Pepino, y el Mosaico del Tabaco (Garzón, 1987).

Sin embargo, existe otra enfermedad cuya etiología aun se desconoce, denominada "planta atigrada de chile". Es importante señalar que existen otros síndromes con características que indican la presencia de virus cuya etiología aún se desconoce (Garzón, 1985).

Sintomatología.

Los síntomas de la enfermedad de la "planta atigrada de Chile", se caracterizan por un mosaico amarillo o dorado con achaparramiento de la planta y deformación del fruto. Estos se inician con un amarillamiento de las nervaduras en la base de la hoja, seguido por abolsamientos de color verde normal que alternan con áreas amarillas. El desarrollo de la planta, así como el número de flores y tamaño del fruto fueron menores y los frutos eran deformes (Garzón y Galindo, 1985).

Martínez, et al. (1985), indicaron que existen algunos síntomas macro y microscópicos que pueden ser relacionados con el TEV; estos son: curvaturas de la nervadura central, bandeado de las venas y, como síntoma microscópico, la presencia de inclusiones intranucleares.

Vega et al. (1993), presentó una amplia descripción del síndrome del virus TEV en Chile del tipo ancho que consistió en plantas con desarrollo reducido que destacan a la vista por el color verde amarillento que contrasta con el verde normal de las plantas sanas. Si la infección fue tardía, los brotes nuevos que crecieron posteriormente son

de menor tamaño y amarillentos y se diferencian del resto por que conservan su apariencia y tamaño normal.

Los síntomas consignados en la planta de chile de Virus mosaico del pepino CMV que se inician en la base de la hoja, además de una distorsión de la misma (Martínez *et al.*, 1985).

Garzón, (1987) consigna en CMV una defoliación y necrosis en puntos de crecimiento de plantas jóvenes (chamusquina) y aborto de flor.

Transmisión de virus en semilla de chile.

- Las enfermedades virosas del chile causadas por CYV, TEV y CMV se diseminan por semilla en México.
- La forma de transmisión TEV por semilla es una novedad mundial.
- La concentración de los tres virus es mayor en testas y endospermos que en semilla completa.
- Se observaron partículas de varilla flexible en extractos de semilla y testas por medio del microscopio electrónico.
- Se detectó mayor concentración de los tres virus en plantas de 12 a 16 hojas.

- Se observó mayor concentración de microcristales cuadrados en plantas de 12 a 14 hojas, inclusiones de TEV y TMV.
- Se detectó mayor incidencia de los tres virus en follaje de plantas a 20°C y en raíces de plantas a 30°C.
- Los tratamientos a la semilla con calor seco eliminaron a TMV y CMV en la testa, y los tratamientos con Na₃ PO₄ no fueron efectivos (Vega et al.,1993).

Métodos de detección de virus en semilla.

Es necesario contar con métodos de detección confiables rápidos y económicos que permitan detectar los virus presentes en la semilla. En el Cuadro 2.4. se pueden observar algunos métodos de detección de virus en semilla y en el Cuadro 2.5. se puede observar el porcentaje de transmisión por semilla de los principales virus.

Cuadro 2.4. Métodos de Detección de Virus en Semilla.

UAAAN 1996.

METODO	APLICACIÓN
Revisión visual de la semilla.	Detección de sintomatología externa en la semilla.
Pruebas de crecimiento de plántulas.	Las plántulas de semilla se examinan para la presencia de virus.
Pruebas de infectividad.	Uso de plantas indicadoras que reaccionan con ciertos virus.
Pruebas serológicas.	El uso de serología tradicional ELISA y sus variantes para la detección de la mayoría de los virus de manera rápida y confiable.
Microscopio.	El microscopio electrónico puede ser utilizado para detectar la presencia de partículas vírales en partes de la semilla.

Jiménez, (1996)

Cuadro 2.5. Porcentaje de Transmisión por Semilla de los Principales Virus. UAAAN 1996.

VIRUS	PLANTA	PORCENTAJE
Mosaico de la alfalfa	alfalfa, chile	6
Mosaico arábigo	remolacha	13
	lechuga	60-100
	tomate	2
Mosaico del tabaco	tomate	2
	vid	20
Anillo negro	soya	83
	tomate	19

Jiménez, (1996)

Control de virus en semilla

En lo que se refiere al control de estos patógenos en semillas, esto es posible realizarlo con cierto éxito solo en virus que contaminan semillas, como el caso del virus mosaico del tabaco, o el virus moteado del pepino (CGMV) (Vega et al., 1993) por medio de termoterapia, que consiste en someter a la semilla a 70°C por 24 horas y por quimioterapia con tratamientos de ácido clorhídrico al 20

por ciento con imersiones de la semilla por 30 min o fosfato trisódico 10 por ciento por 10 min (Garzón,1995).

Vega et al.(1993) reportó que efectivamente los tratamientos con calor seco a 40°C por cinco horas solo eliminaron al TMV y CMV cuando estos se encontraban en la testa pero no en el endospermo de la semilla. Para el caso de los virus que se localizan en el embrión o endospermo de la semilla, solo la resistencia genética ha logrado reducir o evitar la transmisión por semilla.

Pruebas de germinación.

El objetivo de las pruebas de germinación es obtener información con respecto a la capacidad de las semillas para producir plantas normales, además permiten establecer comparaciones del poder germinativo entre diferentes lotes de semillas de la misma especie. Los métodos de laboratorio han sido desarrollados de tal manera que sea posible controlar la mayoría de las condiciones externas. Esto permite obtener resultados uniformes y rápidos sobre la germinación de muestras de semillas de una determinada especie, para lo cual se han estandarizado las condiciones controladas de las pruebas de germinación (Moreno,1995).

Copeland and McDonald (1985) califican a estas plántulas en las pruebas de germinación en plántulas normales, plántulas anormales (ausencia de radícula, ausencia de epicotilo, ausencia de cotiledones, o plántulas deformes), semillas en dormancia y semillas muertas.

Sustratos

En la prueba de germinación el sustrato tiene la función de proveer humedad adecuada y soporte de las semillas durante su germinación.

Tipos de sustratos

Papel secante, papel filtro, toallas de papel, algodón, tierra, arena.

Pruebas de vigor en semillas.

Las semillas que son capaces de desarrollar la raíz durante la germinación, pueden no tener el vigor para establecer una plántula bajo condiciones de campo. Siendo el vigor un indicador de la calidad de la semilla, y denota la completa habilidad de las semillas para funcionar bien bajo condiciones de campo.

Es un concepto relativamente nuevo comparado con germinación y surgió de la observación de diferencias en establecimiento de plántulas entre lotes de semillas, esto es discrepancias entre los resultados de la prueba de germinación y la emergencia en el campo.

Se considera la prueba de germinación insuficiente para predecir la emergencia y detectar diferencias de calidad (vigor) entre lotes de semillas, y trae como resultado la necesidad de una prueba adicional de calidad capaz de predecir la emergencia de plántulas bajo condiciones, ambas adversas y favorables de campo (Bustamante, 1995).

Bustamante (1995) reporta que la germinación en el laboratorio es 34 por ciento más alta que la emergencia en el campo.

Las definiciones más aceptadas para describir el concepto de vigor de la semilla son aquellas propuestas por ISTA, (1987) o AOSA, (1984) que definen que el vigor de la semilla es la suma total de aquellas propiedades de la semilla para determinar el nivel de actividad y capacidad de la semilla o lote de semillas durante la germinación y emergencia de plántula. Las semillas con buen comportamiento se denominan de alto vigor, mientras que las

de pobre comportamiento son consideradas de bajo vigor (Bustamante, 1995).

Objetivo de una prueba de vigor.

La evaluación del vigor de las semillas es importante debido a que hace posible evitar desuniformidad y establecimientos pobres, evitar replantaciones, lo que ocasiona aumento en el costo de producción; evita el aclaréo al utilizar exceso de densidad de siembra, por el desconocimiento del potencial de emergencia, además permite conocer la capacidad de almacenamiento de la semilla para tomar decisiones respecto a su utilización inmediata.

Requisitos para una buena prueba de vigor.

- De bajo costo.
- Rápida.
- Fácil y simple.
- Objetiva.
- Reproducibile.
- Buena correlación con emergencia en campo.

Consideraciones en el ensayo de vigor.

Ninguna prueba sola podrá satisfacer todos los requerimientos para ser utilizada, por lo que es conveniente se seleccione una combinación de métodos que se adecuen al cultivo y a las condiciones en las que se espera sembrar la semilla.

Es importante tomar en cuenta la necesidad de información del vigor, el propósito por el cual se desea evaluar, conveniencia de la prueba, nivel de precisión posible, experiencia, expertos en la prueba seleccionada y criterio de interpretación (Moreno,1995).

Pruebas de patogenicidad

Consisten en hacer los aislamientos de los patógenos sospechados de la prueba del papel secante o de las placas de agar, sembrando éstos en agar para la identificación (esporas, crecimiento vegetativo, etc.) inoculando a plantas sanas (normalmente plántulas) para la observación de síntomas de patogenicidad, y posteriormente reaislarlo y sembrar el patógeno sobre un sustrato. Este procedimiento sigue los postulados de Koch y es un método de identificación positiva de varios patógenos. La inoculación puede ser por inyección u otros métodos, por

ejemplo: aspersion o espolvoreación seguido de una abrasión mecánica (Copeland and MacDonald,1985).

Randhawa (1995) menciona que la bacteria que se sospecha que fue aislada de la semilla puede ser virulenta de las diferentes especies de patógenos; para que la prueba no sea un falso positivo, una prueba de patogenicidad debe ser corrida, la patogenicidad es determinada por varias técnicas disponibles para patógenos específicos. Este mismo autor menciona una técnica de patogenicidad para *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, mediante la cual se inocula atomizando o inyectando a plántulas de chile de tres semanas de edad.

Los síntomas de manchas en las hojas pueden aparecer dentro de 7-14 días.

Liang (1993) cita que para las pruebas de patogenicidad de *Acremonium strictum*, *Ascochita capsici*, *Chaesticta* sp., *Microdiplodia capsici*, *Mirothecium verrucaria*, y especies de *Phoma* respectivamente fueron asperjados en hojas de un mes de edad en los semilleros, y las inoculadas fueron mantenidas en cámara húmeda por 48 hr después de la inoculación. La suspensión de esporas fue preparada con cultivos de 20 días y fueron ajustados a

50,000 esporas por mililitro en agua destilada. Mientras que las especies de *Fusarium* fueron probadas por inoculación de suelo; el suelo inoculado fue preparado con cultivo de 10 días ajustándose de 20,000-25,000 esporas.

MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se desarrolló en dos fases:

- a) La recolección del material en campo; y
- b) La realización de las pruebas en el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, ubicada en Buenavista, Saltillo Coahuila, México.

Recolección del Material

Se visitó a los productores de planta de chile del municipio de Ramos Arizpe, Coah. y se llevó a cabo la recolección de la semilla que ellos utilizan en la preparación de los almácigos; en su mayoría chile serrano variedad tampiqueño 74, una de chile ancho y una de pimiento morrón. Nueve de las muestras es semilla de la que ellos seleccionan y tres muestras de semilla comercial (5,6 y 7); para detectar los microorganismos y virus presentes en la semilla así como la realización de las pruebas de germinación y vigor de las mismas.

Pruebas de sanidad de la semilla para detectar hongos

Se utilizó la prueba con papel secante y congelamiento (Neergaard,1979) para detectar hongos.

De cada muestra se seleccionaron 100 semillas al azar con dos repeticiones, se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al tres por ciento por tres minutos antes de colocarlas en las cajas Petri con papel filtro humedecido con agua destilada estéril. Se colocaron 20 semillas en cada caja bien distribuidas y equidistantes para evitar el contacto de una con otra; después se sellaron e incubaron a una temperatura de 25°C por 24 hr seguido de un período de congelamiento de 24 hr a una temperatura de -20°C. Esto con el fin de inhibir la germinación y así permitir un desarrollo fungoso más abundante. Después de las 24 hr de congelamiento se colocaron las cajas en la cámara de incubación de cinco a siete días a 25°C tiempo suficiente para que los hongos se desarrollen y formen estructuras reproductivas que faciliten su identificación.

Incidencia de hongos por muestra

La presencia de hongos patogénicos que nos pueden causar una infección en un mismo lote de semillas o muestra

probada están directamente ligados con la sanidad y calidad de la semilla, por este motivo se establece el índice de infección fungosa de la siguiente manera:

IFI= Σ (Escala patogénica X porcentaje de infección).

Escala patogénica para hongos

Esta se establece en base al efecto de los hongos presentes en la semilla. El efecto de los hongos en la semilla fue dividido en una escala de 0-3 dependiendo de la disminución en la germinación causada por hongos.

Así tenemos que:

0 Bajo. No influye en la germinación.

1 Moderado a severo. Influye en la diseminación de 50-80 por ciento.

3 Severa en la germinación. Influye de 80-100 por ciento.

El efecto de los hongos en las plantas puede ser dividido en una escala de 0-5.

Así tenemos que:

0 Bajo. No hay potencial patogénico p/p.

1 Bajo potencial de patogenicidad.

2 Bajo - moderado.

3 Moderado.

4 Moderado a significativa.

5 Significante.

La escala se multiplica con el por ciento de los hongos que mostraron mayor incidencia. En base a lo anterior podemos obtener la categoría sanitaria de la semilla.

Identificación de Hongos.

Después de la aparición de los hongos se realizaron montas permanentes en lactofenol para identificarlas en el microscopio compuesto y con la ayuda de las claves de Barnett y Hunter (1987). La identificación de especies se realizó con la ayuda de micrómetro midiendo las estructuras reproductivas de los hongos para su identificación y claves específicas para cada género detectado. A continuación se muestra la calidad sanitaria de la semilla en el cuadro 3.1.

Cuadro 3.1. Calidad Sanitaria de la Semilla.

Categoría	IFI	Calidad
A	0	Semilla certificada
B	0-40	Sana
C	41-80	Moderadamente sana
D	81-120	Sin sanidad
E	+ 120	Totalmente infestada

(Liang, 1993).

Pruebas de detección de bacterias

Las pruebas se realizaron utilizando primeramente agar nutritivo, para el aislamiento de las bacterias presentes en semilla. Se pesaron 7 gramos de semilla de cada una de las muestras previamente lavadas durante 30 min con agua corriente, con la finalidad de eliminar el tratamiento de las semillas con fungicidas; inmediatamente después se agregó 3. mililitros de Buffer fosfato 0.05M (1000 mililitros de agua destilada estéril, 7 gramos de K_2HPO_4 , 1.3 gramos de KH_2PO_4 , 1 mililitro de Tween 20, y se ajusta el pH a 7.2), por gramo de semilla y se incubó durante 12 hr a $4^\circ C$. En seguida se obtuvo el filtrado (separación de la semilla y el buffer), y se realizaron las diluciones seriadas a partir de la solución madre, 10^{-1} y 10^{-2} colocando 0.1 mililitros de cada una de las diluciones con dos repeticiones en cada una de las cajas Petri que contenían el agar nutritivo y se incubó a $27^\circ C$ en un lapso de tiempo de cuatro a siete días, realizando inspecciones diarias hasta observar las unidades formadoras de colonia (UFC), desarrolladas con las características propias de esta bacteria.

Identificación de la bacteria.

Una vez que se desarrollaron las (UFC), se aislaron cepas con características de esta bacteria (colonias amarillas mucoides), se purificaron en agar nutritivo (AN), en seguida se les practicó la tinción de Gram y se corroboró la identificación por medios diferenciales, medios selectivos, pruebas bioquímicas, medio Tween B (Mc Guire et al.,1986) y pruebas de patogenicidad,(se colocaron en medio YDC a 35°C , licuefacción de la gelatina, digestión de la proteína, producción del ácido a partir de glucosa, arabinosa y manosa (Rodríguez, 1991), degradación del pectato CVP, crecimiento en KB, SX agar (Schaad,1994), D-1, D-3 y D-4 (Kado y Heskett 1970), y catalasa (Gitiatis et al.,1987).

Detección de virus en la semilla

La prueba para detectar la presencia de virus se basó en el método de ELISA, se realizaron para el virus del mosaico del tabaco (TMV), virus de la mancha anular del tabaco (TRSV), virus del mosaico del pepino (CMV); y virus jaspeado del tabaco (TEV). Siguiendo el protocolo para virus.

Pruebas de patogenicidad

Una vez que se aislaron y se tuvieron puras las colonias de hongos y bacterias se hicieron separadamente las pruebas de patogenicidad en plántulas.

Estas pruebas consistieron en hacer los aislamientos de los patógenos sospechados de la prueba de papel secante o de las placas de agar; sembrados éstos en agar para la identificación (esporas, crecimiento vegetativo etc.), inoculando a plantas sanas (usualmente plántulas), para la observación de síntomas de patogenicidad; y posteriormente reaislarlo y sembrar el patógeno sobre un sustrato.

Este procedimiento sigue los postulados de Koch y es un método de identificación positiva de varios patógenos. Las pruebas de patogenicidad para hongos se efectuaron de la siguiente forma:

Para la producción de planta se realizó la siembra en charolas germinadoras de poliuretano, utilizando sustrato orgánico proveniente de musgo (Peat Moss) esterilizado.

Las inoculaciones se realizaron en plántulas de cuatro semanas asperjadas a follaje, con una suspensión de esporas con cultivos de 10 días y fueron ajustadas a 50,000 esporas por mililitro en agua destilada estéril y fueron mantenidas en cámara húmeda las 40 hr posteriores a la inoculación, en el caso de *Alternaria alternata* y en el caso de *Fusarium solani* fue aplicado al suelo, ajustándose de 20,000 a 25,000 esporas por mililitro en agua destilada estéril.

Las pruebas de patogenicidad para bacterias se realizaron por medio de inyecciones a las hojas y tallos de acuerdo a la técnica de Stall et al., (1972). Para la producción de planta fue de la forma anteriormente descrita. Las inoculaciones se realizaron en plántulas de cuatro semanas, utilizándose cultivos de bacterias de 48 hr de edad, crecidas en AN, utilizando una suspensión bacteriana de 1×10^6 UFC/ml (Schaad, 1994), y a los testigos únicamente se les inyectó agua destilada estéril. Una vez que aparecieron los síntomas en las plántulas la bacteria fue reaislada en agar nutritivo e identificada mediante el procedimiento descrito con anterioridad.

079908

BANCO DE TESIS

Pruebas de germinación.

Esta prueba se realizó con el objetivo de conocer el efecto de los hongos y bacterias sobre la germinación y vigor de la semilla. La germinación se llevó a cabo en papel secante y se humedeció con agua estéril, en cada hoja de papel secante se colocaron 100 semillas en forma equidistante, se le cubrió con otra hoja de papel encima para después envolverla en forma de taco, los cuales previamente etiquetados se acomodaron en bolsas de polietileno para llevarlas a la cámara germinadora a una temperatura de 25°C y períodos de 12 hr de luz. Para la evaluación se realizaron dos conteos, uno a los siete días y el otro a los 14 días , evaluando semillas germinadas y no germinadas. De cada una de las muestras se hicieron dos repeticiones de 100 semillas cada una tomadas al azar.

Pruebas de vigor

La prueba de vigor se realizó por el método de Deterioro Controlado, en la cual se somete a la semilla a una alta temperatura y humedad relativa, incorporando la diferencia de un control uniforme de contenido de humedad de la semilla antes del período de estrés, ya que las muestras de semilla absorben humedad a distintas fases de

la atmósfera húmeda, por lo que las diferencias de respuesta al envejecimiento pueden depender del contenido de humedad inicial y la velocidad con la que se alcanza la humedad final.

Para esta prueba se seleccionaron 200 semillas al azar de cada muestra, a las cuales se les hizo previamente el análisis de contenido de humedad, para conocer la humedad de las muestras y determinar así la cantidad de agua que se agregara a cada muestra.

El contenido de humedad se ajusta de la siguiente forma:

$$\text{Cantidad de agua que agregar (ml)} = \frac{100 - \text{CH inicial}}{100 - \text{CH requerido en gramos}} \times \text{peso de la muestra}$$

Una vez que se determinó lo anterior las muestras se colocaron en bolsas de polietileno calibre 500, se les agregó el agua que falta y se selló la bolsa, se homogenizó la muestra, y se dejaron las bolsas a 10°C por 15 hr. Después de esto las bolsas selladas se colocaron en baño de agua a 45°C por 24 hr o en cámara de envejecimiento a la misma temperatura y humedad relativa mayor del 90 por ciento. Después de este deterioro provocado, se colocaron

las semillas en papel secante húmedo a 20°C de acuerdo a la germinación previamente descrita, se hace el conteo de plántulas obtenidas y el resultado se expresa en por ciento de germinación ISTA, (1987).

RESULTADOS

Los resultados aquí expresados se presentan de la siguiente forma (Cuadro 4.1), primeramente los hongos encontrados en las muestras de semilla evaluadas seguido de la escala patogénica.

Cuadro 4.1. Escala Patogénica para Hongos Encontrados en Semilla de Chile de Ramos Arizpe, Coah. UAAAN 1997.

Hongos	Efecto en planta	Efecto en semilla	Escala
<i>Alternaria alternata</i>	2	0	2
<i>Aspergillus niger</i>	0	1	1
<i>Fusarium solani</i>	2	2	4

El valor del Índice de Infección Fungosa (IFI) para cada una de las muestras colectadas de acuerdo a la fórmula: $IFI = \sum (\text{Escala patogénica} \times \text{porcentaje de infección})$, se encuentra en el Cuadro 4.2.

Cuadro 4.2. Valor IFI y Categoría de la Semilla de Chile de Ramos Arizpe, Coah. UAAAN 1997.

Muestra	IFI	Categoría de la semilla	
1 serrano	36	B	sana
2 serrano	25	B	sana
3 serrano	10	B	sana
4 ancho	25	B	sana
5 pimiento	16	B	sana
6 serrano	15	B	sana
7 serrano	19	B	sana
8 serrano	17	B	sana
9 serrano	21	B	sana
10 serrano	36	B	sana
11 serrano	66	C	moderadamente sana
12 serrano	73	C	moderadamente sana

Pruebas de patogenicidad para hongos

Se realizaron con los hongos que se conoce que no son propios de almacén para ello nos apoyamos en los postulados de Koch. Los hongos que se pobaron fueron *Fusarium solani* que fue aplicado en el suelo, cerca de la base de la planta; mientras que *Alternaria alternata*, se asperjó al follaje de las plantas de un mes de edad después del trasplante. El hongo que más efecto mostró hacia las plántulas fue *Fusarium solani* presentándose una marchitez muy marcada, seguida de la muerte de las plántulas; en el caso de *Alternaria alternata*, mostró síntomas leves.

En lo que se refiere a bacterias encontradas en la semilla, se encontró en las muestras número 3,4,7,9 y 12, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* reportada como una de las más dañinas para este cultivo.

Pruebas de patogenicidad para bacterias

En relación a las pruebas de patogenicidad los síntomas característicos de la mancha bacteriana aparecieron de 10 a 15 días después de las inoculaciones, reaislándose la bacteria de las plantas a los 30 y 45 días después de que las plantas fueron inoculadas, las bacterias reaisladas dieron los mismos resultados que los medios diferenciales, medios selectivos y pruebas bioquímicas de la bacteria inoculada.

Resultados de pruebas de virus

Con respecto a virus se realizaron las pruebas de ELISA, para el virus del mosaico del tabaco(TMV), virus de la mancha anular del tabaco(TRSV), virus del mosaico del pepino(CMV), y virus del jaspeado del tabaco(TEV), en semilla y los resultados fueron como se muestra en el Cuadro 4.3. para pruebas de ELISA y el Cuadro 4.4. donde hubo mayor presencia de virus.

Cuadro 4.3. Pruebas de ELISA Practicadas a Semillas de Chile de Ramos Arizpe, Coah. UAAAN 1997.

	CMV	TEV	TRSV	TMV
Muestra No 1				X
Muestra No 4	P		X	
Muestra No 5	X-P	X	X	
Muestra No 6	X-P	X		
Muestra No 7	X-P			X
Muestra No 8	X			
Muestra No 9	X			

P para planta
X para semilla

Cuadro 4.4. Muestras de Semilla de Chile de Ramos Arizpe, Coah. Donde Hubo Mayor Presencia de Virus. UAAAN 1997.

Muestra	Presencia de virus		
	CMV	TEV	TRSV
4	CMV		TRSV
5	CMV	TEV	TRSV
6	CMV	TEV	

La germinación y el vigor para las muestras se encuentra en el Cuadro 4.5.

Cuadro 4.5. Resultados de la Germinación y Vigor de Semilla de Chile de Ramos Arizpe. UAAAN 1997.

Muestra	Germinación	Vigor
1	77	72
2	66	62
3	78	67
4	75	71
5	3	0
6	82	76
7	51	34
8	99	99
9	98	83
10	97	73
11	81	97
12	76	74

Correlación entre Patógenos el Vigor y Germinación

Así tenemos que la correlación entre los diferentes patógenos encontrados en la semilla con la germinación y el vigor; nos arrojaron los siguientes resultados de acuerdo a las pruebas estadísticas.

De acuerdo a la prueba de Kendall para medir el grado de asociación entre variables de estudio la correlación se muestra en el Cuadro 4.6.

Cuadro 4.6. Prueba de Kendall Practicada a la Semilla de Chile de Ramos Arizpe, Coah. UAAAN 1998.

	IFI	Germinación	Vigor
IFI	1.000	0.0308	0.2462
Germinación	0.0308	1.000	0.7293
Vigor	0.2462	0.7273	1.000

Tenemos que las variables de vigor y germinación son las que mostraron una alta significancia ($P < 0.01$). No así el vigor y la germinación en relación con el IFI.

En el caso de bacterias y virus los efectos aleatorios no son fijos, por lo que solo se hace la detección e identificación de los patógenos.

DISCUSION

Sin lugar a dudas una de las preocupaciones de los productores de chile de la región de Ramos Arizpe, Coah. es la aparición de enfermedades, que ocurre desde la emergencia de la plántula en el almácigo hasta el establecimiento de éstas en el campo.

Con respecto a lo anterior es posible que una de las causas que más pueden favorecer el establecimiento y la diseminación de diferentes patógenos es la semilla; ya que puede ser portadora de hongos, bacterias y virus.

El presente trabajo bajo este concepto trata de identificar que tipo de patógenos se encuentran presentes en la semilla de chile del municipio de Ramos Arizpe, Coah. para poder sugerir a los productores medidas sanitarias que al final de cuenta los beneficiara en el desarrollo y producción de este cultivo.

De acuerdo a lo esperado se aisló de las muestras de semilla a los hongos, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* y *Fusarium solani*.

Los hongos *A. niger* y *F. solani* tuvieron efecto en semilla.

Por su parte *A. alternata* y *F. solani* tuvieron efecto en planta.

Las muestras 11 y 12 de chile serrano fueron las que presentaron el índice de infección fungosa (IFI) más alto, que las muestras 1 a la 10, donde se incluyen una de chile ancho y una de pimiento morrón; el(IFI) de estas muestras fue más bajo, las fluctuaciones para chile serrano fueron de 15 hasta 36, la de chile ancho de 25, y la de chile pimiento morrón de 16; lo cual nos indica que a pesar de la presencia de los diferentes hongos, las 10 primeras muestras se encuentran en la categoría B considerada como sana, que tal vez fue seleccionada de plantas sanas. La 11 y la 12 se encuentran en la categoría C que se considera moderadamente sana, es decir que la presencia de hongos es mayor que en las muestras anteriores, y pudo ser que la semilla fuera más vieja, y que se hubiera colectado de plantas aparentemente sanas.

Lo anterior se confirma de acuerdo a Christensen (1972) que menciona que los hongos pueden ser divididos en

dos grupos; que son los hongos de campo, y los hongos de almacén.

Por su parte Copeland y MacDonald (1985) citan que los hongos asociados con semilla pueden incluir hongos saprófitos y hongos de almacén, más el manejo del productor de su semilla, que son situaciones que pueden tener un impacto directo en la calidad de la semilla.

Con respecto a las bacterias se aisló a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* la cual está reportada como una de las bacterias más patogénicas presentes en solanáceas.

De acuerdo a Salazar (1997) se utilizó el medio Tween B para aislar a la bacteria, por ser el más eficiente para la detección de esta bacteria.

Sinclair and Shurtleff (1975) indican que la presencia de bacterias en semillas pueden disminuir su calidad, reduciendo significativamente la germinación y la emergencia.

Por lo que se refiere a los virus se realizaron las pruebas de ELISA para el virus del mosaico del tabaco (VMT), virus de la mancha anular del tabaco (TRSV), virus

del jaspeado del tabaco (TEV) y virus del mosaico del pepino (CMV).

Se encontró mayor presencia del (CMV), en cinco de las muestras; y los demás virus se presentaron en menor proporción en el resto de las muestras.

Agarwal and Sinclair (1987a) mencionan que cerca del 20 por ciento de los virus conocidos son transmitidos por semilla, y que las pérdidas globales debido a enfermedades en las plantas, se estima en un 12 por ciento del potencial de producción.

Desde luego que las pruebas de patogenicidad nos dan una seguridad acerca de los daños que pueden causar los hongos y bacterias aislados, pero debemos recordar que el comportamiento de ellos, puede ser diferente en el campo.

Asimismo al apoyarnos en las pruebas de germinación y vigor, confirmamos que la presencia de hongos y bacterias, tienen un impacto a la baja en la germinación y vigor de la semilla. Como lo demuestra la prueba de Kendall donde se encuentra alta significancia con respecto a vigor y germinación.

En el caso de las muestra 4 de chile ancho, se comporta de forma similar que las muestras de chile serrano.

En la muestra número 5 hay tres semillas germinadas sin vigor, pero no se puede decir que los hongos y las bacterias sean los responsables; ya que en el caso de los hongos presentan lo mismo que las demás muestras, y en el caso de las bacterias a esta muestra no se le detectó la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

En el caso de los virus esta muestra fue una de las que presentaron tres de los virus para los que se hicieron las pruebas (CMV, TEV, y TRSV).

De cualquier forma se puede decir que los virus son los causantes de la baja germinación; pero la opinión de los investigadores es que se debe a problemas fisiológicos de la semilla, ya que la muestra de pimiento morrón presenta problemas a este respecto.

De acuerdo a los antecedentes aquí expresados acerca del manejo que los productores dan a la semilla que utilizan para la siembra de sus almácigos que los hongos bacterias y virus pueden permanecer por largos períodos, y

afectan tanto la emergencia como la germinación de la semilla y posteriormente la diseminación de los mismos.

Deberán tener cuidado en la selección de las fuentes de semillas, su certificación, y de ser posible la utilización de variedades mejoradas para asegurar la sanidad de sus cultivos.

CONCLUSIONES

De acuerdo a las diferentes metodologías se obtuvieron las siguientes conclusiones:

Se determinó que la calidad fitosanitaria de la semilla de chile no es apropiada para siembra de almácigos.

Los patógenos detectados e identificados en la semilla de chile de Ramos Arizpe, Coah. influyen directamente en la calidad de la misma.

RESUMEN

Con la realización del presente trabajo se pretende establecer que los problemas que tienen los productores de chile de Ramos Arizpe, Coah. con enfermedades, desde el establecimiento de los almácigos, hasta su desarrollo en el campo, el origen de estas puede ser la semilla.

Después de coleccionar muestras de chile entre los productores del municipio de Ramos Arizpe, Coah., posteriormente en el Laboratorio de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro se procedió a realizar por medio de las diferentes metodologías específicas para cada uno de los agentes previstos (hongos, bacterias y virus), se les logró detectar lo siguiente:

En el caso de los hongos por medio del papel secante y congelamiento y placas de agar *Fusarium solani*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*. Los últimos dos hongos es bien sabido que se encuentran presentes en el campo y como

hongos de almacén y *Fusarium solani* se sabe que puede dañar la semilla desde el almácigo hasta el campo.

En el caso de bacterias, se tuvo especial atención en la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causante de la mancha bacteriana en solanáceas y que en este caso se aisló de cinco de las muestras, utilizando el medio Tween B (Mc Guire et al., 1986).

Se realizaron también las pruebas de patogenicidad para hongos y bacterias para confirmar la identificación y patogenicidad de hongos y bacterias presentes en semillas.

La presencia de virus solo se detectó por medio de las pruebas de ELISA a los virus del mosaico del tabaco (TMV), virus de la mancha anular del tabaco (TRSV), virus del jaspeado del tabaco (TEV) y el virus del mosaico del pepino (CMV). Algunos de los cuales estuvieron presentes con mayor frecuencia en las muestras 4, 5, y 6.

En el caso de la germinación y el vigor se corrieron las pruebas de germinación en papel húmedo (tacos) y las de vigor para su observación en el laboratorio.

La correlación que hay entre hongos y bacterias aislados, con respecto a la calidad de la semilla, se realizó por medio de la prueba

LITERATURA CITADA

- Acosta, L.R. 1988. Avances en la Caracterización de una Enfermedad Viral Transmisible por Mosquita Blanca en Chile y Tomate en la Planicie Huasteca Memorias XV Congreso Nacional de Fitopatología Xalapa, Ver. p 91.
- Agarwal, V.K. and Sinclair, J.B. 1987 a. Principles of Seed Pathology. Vol. I. C.R.C., U.S.A. 168 p.
- _____ . 1987 b. Principles of Seed Pathology. Vol. II. C.R.C. U.S.A., 176 p.
- Agrios, G.N. 1986. Fitopatología. Editorial Limusa. 2ª Ed México, D.F. 756 p.
- Association of Official Seed Analysts (AOSA) 1984. Rules for Testing Seed. Journal of Seed Technology. Published by the Association. Lansing, Michigan.
- Barnett, H.L. and Hunter B.B. 1987. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth edition Mc Millan Publishing Company U.S.A. 217 p.
- Bustamante, G.L.A. 1995. Prueba de Germinación, VIII Curso de Actualización en Tecnología de Semillas. UAAAN Buenavista, Saltillo, Coah. Méx.
- Christensen, C.M. 1972. Microflora on Seed Deterioration In viability of Seeds. Siracuse University Prees Great Britain. 59-93
- Copeland, L.O. and MacDonald M.B. 1985. Principles of Seed Science y Technology. Second edition Mc Millan publishing Company U.S.A. 321 p.
- Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) 1997. IX Curso Taller de Semillas. Memorias. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coah.

- Garzón, T.J.A. y Galindo, A.J. 1985. La Planta Atigrada del Chile (*Capsicum annum* L.) en la Región de Valsequillo Puebla. Revista Mexicana de Fitopatología. 3(1): 10-17.
- Garzón, T.J.A. 1987. Presencia de Virus en los Cultivos de Chile (*Capsicum annum* L.) Tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.) en México. Temas en Virología II. Chapingo, Mex. Soc. Mex. de Fitopatología 156-181 p.
- Garzón, T.J.A., Mora, P.C., Rodríguez, M.R., Delgado, S.S. 1986. Determinación del Insecto Vector de la Enfermedad de Tipo Viral "Permanente del Tomate" (*Lycopersicum esculentum* Mill.) en la Región de El Bajío. Memorias XIII Congreso Nacional de Fitopatología en Chiapas México.
- Garzón, T.J.A. 1995. Transmisión de Virus a Semillas de Cultivos Hortícolas. I Curso Taller Internacional para la Detección de Patógenos en Semillas. Memorias. UAAAN. Buenavista, Saltillo Coahuila.
- Gitiatis, R.D., Sasser, M.J., Beaver, R.W., McInnes, T.B. and Stall, R.E. 1987. Pectolytic *Xanthomonas* in Mixed Infections with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* *P. syringae* pv. *tomato*, and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Tomato and Pepper Transplants. *Phytopathology* 77:611. United States of America.
- Isla, L. de la 1994. Fitopatología. 2ª Ed Editorial Limusa. México. 9 p.
- International the Rules for Seed Testing (ISTA) 1987. Seed Science and Technology. 3(2). The Netherland.
- Jiménez, D.F. 1996. Aspectos Sanitarios en Relación al Movimiento Internacional de Semillas. VIII Taller de Semillas. Memorias. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila México. 30 p.
- Jiménez, D.F. 1997. IX Curso Taller de Semillas Memorias. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila Mex.
- Kado, C.I. and Heskett, M.G. 1970. Selective Media for Isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas* *Phytopathology* 60:969-976. United States of America.

- Kreitlow, K.W., Letebvre, C.L., Presley, J.T. and Zaumeyer, W.J. 1982. Enfermedades que pueden Propagarse por Semilla en: Semillas Anuario de Agricultura de los E.U.A. Editorial CECSA 484-497 p.
- Liang, L.Z. 1993 A Method for Comprehensive Evaluation of Capsicum Seed with Especial Reference to Seed Borne Fungi S. Sci. and Technology 21 (3)495-504 p. Beijing, China.
- Lockard, B.E.L. and Fischer, H.U. 1974. Chronic Infection by Seed-Born Bean Common Mosaic Virus in Morocco. Pl. Dis. Reprtr. U.S.A. 58:307-308
- Martínez, S.J.P., Galindo, A.J., Cárdenas, S.E. 1985. Los Síntomas como Herramientas en el Diagnóstico de Tres Virus del Chile Serrano. Resúmenes. XII Congreso Nacional de Fitopatología. Guanajuato, Gto. México.
- Mc Guire, R.G., Jones, J.B. and Sasser, M. 1986. Tween Media for the Semiselective Isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from Soil and Plant Material. Plant Disease 70:887-891. United States of America.
- Mora, P.C. 1977. Estudio de la Virosis del Chile Serrano (*Capsicum annum* L.) como Base para Estructurar un Programa de Obtención de Variedades Resistentes. Tesis. CP., Chapingo México. 73- 85 p.
- Moreno, M.E. 1995. Los Hongos de Almacén y las Micotoxinas I Curso-Taller Internacional Sobre Métodos para la Detección de Patógenos en Semillas. Memorias UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila México.
- _____. 1996. Análisis Físico y Biológico de las Semillas Agrícolas. Instituto de Biología UNAM México. 281-289 p.
- Navarrete, M.R. 1995. Patología de Semillas. I Curso Taller Internacional para la Detección de Patógenos en Semilla. Memorias. UAAAN. Buenavista Saltillo, Coahuila. México. 152 p.
- Neergaard, P. 1977. Seed-Borne Virus. Chapter 3 in Seed Pathology. Vol. I Mc Millan Press, London y Madras 839 p.

_____. 1979. Seed Pathology. Vol. I Editorial. Mc Millan Press Ltd. London.

- Rhandawa, 1995. Theory and Principles Seedborne Bacteria and their Detection. I Curso Taller Internacional Sobre Métodos para la Detección de Patógenos en Semillas. Memorias. UAAAN. Buenavista, Saltillo Coah. Méx.
- Rodríguez, M.M.L. 1991. Manual de Identificación de Bacterias Fitopatógenas U. A. Ch. 91 p. México.
- Salazar, G.J.L. 1997. Métodos para la Detección de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en Semilla de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Tesis Maestría. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coah.
- Salazar, H.F.J. 1992. Microflora de Semilla de Trigo en el Noreste de México XIX Congreso Nacional de Fitopatología. Memorias. UAAAN. Buenavista Saltillo, Coah. México. 152 p.
- Schad, N.W. 1994. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Aps. Press. St. Paul Minnesota U.S.A. 4-98.
- Sinclair, J.B. and M.C. Shurtleff 1975. Compendium of Soybean Diseases University of Illinois 69 p.
- Stall, R.E., Hall, C.B. and Cook, A.A. 1972. Relationship of Ammonia to Necrosis of Pepper Leaf Tissue During Colonization by *Xanthomonas vesicatoria*. Phytopathology 62:882-886 United States of America.
- Sutula, L.Ch., Gillett, M.J., Morrissey, M.S. and Ramsdel, C.D. 1986. Interpreting ELISA Data Establishing the Positive-Negative Threshold Plant Disease. Vol. 70 No 8. U.S.A.
- Vega, P.A., Téliz, O.D., Rodríguez, M.R., Delgadillo, S.F. y Garzón, T.J.A. 1993. Transmisión de Virus en Semilla de Chile. Agrociencia, Montecillo, México. Vol. 4 No(1) 81-92.