

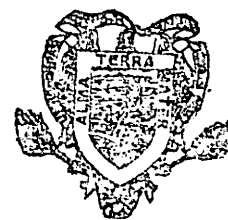
HONGOS PORTADOS INTERNAMENTE Y LA
CALIDAD DE LA SEMILLA DE FRIJOL
(Phaseolus vulgaris L.) PRODUCIDA EN
EL NORTE DE ZACATECAS

LUIS ROMAN CASTAÑEDA VIESCA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE ^{Universidad Autónoma Agraria}
MAESTRO EN CIENCIAS ^{ANTONIO NARRO}
EN TECNOLOGIA DE SEMILLAS



BIBLIOTECA



Universidad Autónoma Agraria
Antonio Narro

PROGRAMA DE GRADUADOS
Buenavista, Saltillo, Coah.
JUNIO DE 1996

Tesis elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada como requisito parcial, para optar al grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
EN TECNOLOGIA DE SEMILLAS

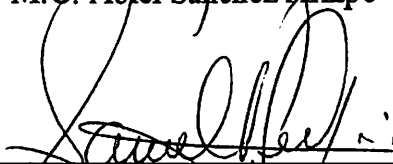
COMITE PARTICULAR

Asesor Principal:



M.C. Abel Sánchez Arizpe

Asesor:

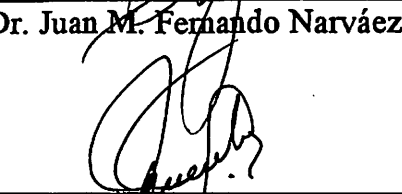


M.C. Víctor Samuel Peña Olvera

Asesor:



Dr. Juan M. Fernando Narváez Melo



Dr. Jesús Fuentes Rodríguez
Subdirector de Postgrado

Universidad Autónoma Agraria
"ANTONIO NARRO"



Buenavista, Saltillo, Coahuila. Junio de 1996

BIBLIOTECA

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor principal M.C. Abiel Sánchez Arizpe por todo su apoyo.

A mis asesores M.C. Víctor Samuel Peña Olvera y Dr. Juan M. Fernando Narváez Melo por sus valiosas aportaciones.

A la Familia Adame Pérez por sus atenciones.

Al Sr. Isidoro Alvarez, por la ayuda proporcionada.

A Leticia, Alicia, Ciria Alicia, Eduardo y José de Jesús, por su amistad.

DEDICATORIA

A Lilzy, René, Leopoldo, Francisco y César por nuestra verdad.

**Caminante
Son tus huellas el camino
y nada más
Caminante, no hay camino
se hace camino al andar**

Antonio Machado

COMPENDIO

Hongos portados internamente y la calidad de la semilla de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)
producida en el norte de Zacatecas.

Por:

LUIS ROMAN CASTAÑEDA VIESCA

MAESTRIA EN

TECNOLOGIA DE SEMILLAS

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. JUNIO DE 1996

M.C. Abiel Sánchez Arizpe -Asesor-

Palabras clave: Hongos portados internamente, frijol, calidad de la semilla,
Phaseolus vulgaris.

Esta investigación se realizó con el propósito de evaluar la calidad de la semilla de frijol en variedades criollas y mejoradas con coloración contrastante de testa, ante el problema de la transmisión interna de hongos patógenos, comparando las propiedades físicas, biológicas y sanitarias de las mismas, antes y después de un ciclo agrícola en la zona temporalera de Río Grande, Zac.

Se cuantificaron y determinaron los hongos portados internamente por la semilla de frijol, tanto certificada como criolla, observándose que no existe una relación directa entre el número y tipo de hongos y la calidad fisiológica de la semilla ensayada. Tampoco se observó ningún efecto de la coloración de la testa de la semilla sobre el vigor y la resistencia a los hongos transmitidos internamente.

ABSTRACT

Seed borne fungi and the quality of bean seed (*Phaseolus vulgaris* L.) harvested in northern Zacatecas.

By

LUIS ROMAN CASTAÑEDA VIESCA

MASTER OF SCIENCE

SEED TECHNOLOGY

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAH. JUNE 1996

M.C. Abiel Sánchez Arizpe -Advisor-

Key words: Seed borne fungi, bean, seed quality, *Phaseolus vulgaris*.

The purpose of this research was to evaluate the quality of bean seed of native and improved origin with emphasis on coat coloration. The main objective was to compare physical, biological and sanitary properties of light and dark colored seeds before and after an agricultural cycle in the region of Río Grande, Zac. to test for internal transmission of pathogenic fungi.

Seed borne fungi were determined and quantified in native and improved seeds. There was not a direct relation between the number and type of fungi and the physiological quality of the test seeds. No apparent effect was observed of the seed coating coloration on the vigour and seed borne fungi resistance.

INDICE DE CONTENIDO

	Página
INDICE DE CUADROS	viii
INDICE DE FIGURAS	ix
INTRODUCCION	1
REVISION DE LITERATURA	4
Generalidades	4
Infección de la Semilla	10
Almacenamiento de la Semilla y Supervivencia de los Patógenos	13
Hongos Transmitidos por Semilla	15
Prueba de Sanidad	21
El Lote de Semillas	21
Intensidad de Muestreo	22
Muestras de Envío	23
Análisis de Semillas	26
Métodos para Detección de Patógenos	27
MATERIALES Y METODOS	32
Trabajo de Campo	32
Trabajo de Laboratorio	34
RESULTADOS	38
DISCUSION	43
CONCLUSIONES	49
RESUMEN	50
LITERATURA CITADA	52

INDICE DE CUADROS

Cuadro No.		Página
4.1	Análisis de la semilla certificada de frijol bayo	38
4.2	Análisis de la semilla certificada de frijol negro zacatecas	39
4.3	Análisis de la semilla criolla de frijol bayo baranda	40
4.4	Análisis de la semilla de frijol negro bola	41
4.5	Géneros de hongos portados internamente por la semilla de frijol	42
5.1	Contenido de humedad de la semilla de frijol	43
5.2	Peso volumétrico (Kg/Hl) de la semilla de frijol	44
5.3	Pureza (%) de la semilla de frijol	45
5.4	Germinación (%) de la semilla de frijol	46
5.5	Vigor (%) de la semilla de frijol	46

INDICE DE FIGURAS

Figura No.		Página
3.1	Precipitaciones totales y temperaturas medias mensuales registradas por la estación meteorológica de Río Grande, Zac. durante 1988	35
5.1	Precipitaciones totales y temperaturas medias mensuales registradas por la estación meteorológica de Río Grande, Zac. de 1975 a 1995	48

INTRODUCCION

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) una de las principales fuentes de alimento en nuestro país, no se propaga vegetativamente y por consiguiente depende de la producción de semilla para perpetuar el cultivo.

En el Estado de Zacatecas, anualmente se siembran más de 500,000 hectáreas con frijol, situándolo como el principal productor de esta leguminosa en México. El 92 por ciento de la superficie se siembra bajo condiciones de temporal y aporta el 76.78 por ciento de la producción total, con un rendimiento medio de 460 kilogramos por hectárea.

Las principales zonas productoras de frijol en el Estado de Zacatecas, se localizan en los municipios de Fresnillo, Sombrerete y Río Grande.

Los agricultores de estas y otras zonas temporaleras siembran en general, semilla de su cosecha anterior y en ocasiones los bajos rendimientos obtenidos en sus siembras son efecto de las condiciones climáticas adversas durante su almacenamiento, cultivo y utilización de variedades criollas, por lo que el uso de variedades mejoradas con una mayor resistencia a plagas y enfermedades debido a sus características genéticas, debe traducirse en mejores producciones de grano.

Se considera que las variedades tolerantes a un patógeno en particular, permiten un desarrollo limitado del patógeno y entonces la transmisión de éste dentro de la semilla, se transforma en un problema potencial.

Las semillas constituyen una vía para transmitir los organismos fitopatógenos entre diferentes localidades. Diversos reportes consideran que más del cincuenta por ciento de las principales enfermedades del frijol son transmitidas por la semilla.

El efecto sobre la germinación de los organismos transmitidos por la semilla, todavía no está bien determinado, pero los hongos alojados en el interior de la misma, están asociados con una disminución de la germinación de la semilla y de la emergencia de las plántulas en el campo. Por tanto, para una evaluación más eficiente de la calidad de las semillas, es necesario determinar su estado de sanidad debido a que la presencia de microorganismos influye en su vigor.

En cuanto a la estructura de la semilla, se reporta que existen diferencias anatómicas en testas que contrastan en color. Las semillas de color negro, a diferencia de las de color claro, tienen la testa fuertemente adherida a los cotiledones, más gruesa y presenta poca afinidad a la humedad, lo cual hace que su capacidad de absorción de agua sea menor. Estas características confieren a las plántulas provenientes de semillas negras, un porcentaje de germinación alto así como un marcado vigor y resistencia a los patógenos y a las condiciones ambientales adversas.

En referencia a lo anterior, actualmente en la región norte del Estado de Zacatecas, los agricultores han dejado de sembrar para fines de producción los frijoles bayos o de testa clara, debido a que han comprobado con su experiencia que son variedades más susceptibles a plagas y enfermedades y en su lugar producen frijol negro, el cual no consumen, por lo que intercambian parte de su producción por granos de color claro.

Por todo lo anterior, es objetivo de este estudio, el evaluar en base a las normas oficiales de calidad, la semilla de frijol en variedades criollas y mejoradas con coloración contrastante de testa ante el problema de la transmisión interna de hongos patógenos, comparando las propiedades físicas, biológicas y sanitarias de las mismas, antes y después de un ciclo agrícola en la zona temporalera de Río Grande, Zac.

Las hipótesis de trabajo son:

- Los hongos transmitidos por semilla están presentes en las semillas de frijol.
- La semilla certificada es de mejor calidad que la criolla.
- El color de la testa influye en la calidad de la semilla.

REVISION DE LITERATURA

Generalidades

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los principales cultivos en México debido a que la producción de sus granos representa una de las principales fuentes alimenticias populares. De acuerdo a pruebas recientes de proteína cruda en diferentes variedades, su contenido se encontró en un rango de 21.9 a 26.9 por ciento, lo cual indica que el frijol tiene un valor protéico relativamente bueno comparado con otras fuentes de proteína vegetal (Yañez et al, 1995).

Según Neergaard (1979) los cultivos de leguminosas, entre ellos el frijol, constituyen las más importantes fuentes de proteína vegetal en la dieta humana. En algunos lugares donde la población no tiene acceso a fuentes de proteína animal, depende de estas plantas para su alimentación, de ahí la importancia económica del estudio de las enfermedades de las leguminosas.

Kozlowski (1972) señala que el frijol tiene un alto contenido de proteínas (15-31 por ciento), con un promedio del 24 por ciento. (La mayoría de sus enfermedades son causadas por patógenos transmitidos por semilla. Del 20 por ciento aproximado de las pérdidas en este cultivo, el 16 al 17 por ciento son causadas por enfermedades

transmitidas por semilla,) principalmente la pudrición radicular por *Fusarium solani* var. *phaseoli* y la antracnosis por *Colletotrichum lindemuthianum*.

(En 1994 se sembraron en el país 2,000,000 de hectáreas de este cultivo, siendo el Estado de Zacatecas el principal productor donde de 720,800 hectáreas se obtuvo una producción total de 455,543 toneladas con un valor de 708 millones de pesos, considerando a 155,000 pesos la tonelada. Su siembra ocupa el 63.6 por ciento de la superficie agrícola cosechada en el Estado y su producción el 39.6 por ciento (INEGI, 1995).)

La sanidad del cultivo es uno de los principales factores que deben cuidarse para la obtención de altas producciones, sin embargo, según datos del INEGI (1995) sólo el 45.22 por ciento de los agricultores en el Estado de Zacatecas reciben asistencia técnica y sólo el 6.72 por ciento cuentan con servicios de sanidad vegetal.

Las principales enfermedades que atacan al frijol bajo temporal son provocadas por hongos y bacterias, las cuales producen daño en hojas, tallos y vainas que generalmente frenan el desarrollo normal del cultivo y ocasionan pérdidas considerables en rendimiento. En Zacatecas, las enfermedades más comunes son la antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*), el chauixtle (*Uromyces phaseoli*), el tizón de halo (*Pseudomonas phaseolicola*) y el tizón común (*Xanthomonas phaseoli*).

Debido a las características climáticas de las regiones productoras, donde la humedad y la temperatura son relativamente bajas, las enfermedades causadas por bacterias revisten menor importancia (SARH, 1995).

Las altas temperaturas durante el cultivo, pueden ocasionar una baja producción de vainas y de semillas como consecuencia de una baja polinización por inmadurez del polen y daño en la formación del gametofito femenino (Gross y Kigel, 1994).

White y Montes (1994) citan que el frijol crece en un amplio rango de ambientes, incluidas regiones con altas y bajas temperaturas del suelo. En pruebas hechas con 20 genotipos, evaluaron la respuesta de la germinación de la semilla a la temperatura, encontrando que ésta responde desde los 8 °C, con un óptimo de 29-34 °C, teniendo las especies mesoamericanas ligeramente más tolerancia a las altas temperaturas en comparación con el germoplasma andino.

Las semillas constituyen un método para transmitir los organismos patogénicos de la planta entre diferentes localidades. Más del 50 por ciento de las principales enfermedades del frijol son transmitidas por la semilla. Los hongos alojados en el interior de la semilla se asocian con una disminución en la germinación de la misma y por una baja emergencia de las plantas en el campo.

Cuando un agricultor siembra semilla infectada, también está sembrando el potencial de futuros problemas causados por enfermedades. En general, la semilla de

frijol que los pequeños agricultores siembran, son granos provenientes de su cosecha anterior, cuya calidad es normalmente baja, lo que se traduce en pobres rendimientos (Ellis y Gálvez, 1980).

En el Estado de Zacatecas, sólo el 9.72 por ciento de los agricultores utilizan semillas mejoradas (INEGI, 1995).

(La semilla ha sido descrita por Sinclair (1974) como un microcosmos de microbios, con potencial de llevar una amplia variedad de hongos, bacterias, virus y en ocasiones nemátodos, muchos de los cuales causan enfermedades a las plántulas o plantas. Algunos viven sobre la semilla sin causarles un daño aparente y se vuelven dañinos sólo cuando las condiciones del medio ambiente se tornan favorables para su crecimiento y reproducción. Tales condiciones pueden presentarse en las cámaras de germinación, causando problemas de viabilidad en las pruebas. Otros microorganismos permanecen en los tejidos que cubren las semillas tales como brácteas, pericarpio o cubiertas seminales y atacan a las plántulas cuando las condiciones les son favorables. Otros son llevados dentro de las semillas, en el endospermo y/o el embrión. Y aun cuando ellos no matan a la semilla, pueden afectar su germinación.)

(Neergaard (1979) menciona que alrededor del 90 por ciento de los cultivos en el mundo se propagan por semilla. Nueve de ellos, entre los que se encuentra el frijol, representan la mayor parte de la producción de alimento en el mundo.) Todos estos cultivos son atacados por patógenos transmitidos por semilla.

La información disponible sobre las pérdidas en cultivos, varía considerablemente de acuerdo a la fuente de información. La mayoría está basada en pérdidas “estimadas” y sólo hasta años recientes se tienen métodos estándar mas precisos para su determinación.

Kozlowski (1972) cita que los estudios sobre patología de semillas generalmente han sido emprendidos debido a causas económicas más que a investigaciones científicas. Estas observaciones han sido hechas en alguna de las siguientes situaciones:

- Estudios de la producción de semillas en el campo.
- Estudios en pruebas de semillas en laboratorio.
- Estudios de producción de cultivos en el campo.
- Estudios de producción de semillas y cultivos en laboratorio y campo.

La transmisión de fitopatógenos por cualquier propágulo vegetal es de gran importancia agrícola debido a que es una vía eficiente de transferirlos en espacio (diseminación de un lugar a otro) y tiempo (llevar de una estación a otra). Sin embargo, desgraciadamente la transmisión por semilla no es comunmente apreciada como un rasgo único y significativo que tiene implicaciones biológicas e involucra adaptaciones tales como:

- Prolongada transmisibilidad

Al ser la semilla viable por mucho tiempo.

-Infección máxima

Debido a la íntima asociación hospedero-parásito.

-Diseminación a grandes distancias

Consecuencia de su comercialización.

-Selectividad de patógenos

Llegando a establecerse incluso en variedades.

-Focos aleatorios de infección en campo

Al efectuarse la siembra con semillas contaminadas.

-Sobrevivencia del patógeno debida a la transmisión por semilla.

Cuando sólo dependen de este medio para su transmisión.

-Incremento de la transmisión por semilla sobre las plantas producidas

Las plantas originadas de semillas contaminadas dan un más alto porcentaje de transmisión de la enfermedad.

-Invasión uniforme del patógeno

Debido a que además puede ser asintomática.

-Inducción de la enfermedad por dos patógenos transmitidos por semilla

Interacción de una bacteria y un nemátodo por ejemplo.

-Importancia potencial de la transmisión por semillas de diferentes patógenos.

La transmisión por semilla de todos los patógenos no es igualmente importante y peligrosa para los diferentes cultivos.

Infección de la semilla

Según Neergaard (1979) la predisposición de una semilla a la infección por un patógeno dado, cambia con el tiempo. Desde el comienzo de la floración hasta la maduración de la semilla, ocurren una serie de cambios en el desarrollo de su estructura.

Las condiciones de humedad, son decisivas para la extensión de la diseminación y el proceso de inoculación donde la semilla es susceptible.

El grado de infección de la semilla está relacionado con el estado de crecimiento del hospedero.

El primordio seminal o la semilla pueden ser infectados directamente de la planta madre o desde afuera. La infección directa por la planta madre se efectúa a través de la flor, de las estructuras del fruto (pedicelo, pedúnculo, etc.), de la semilla (funículo) o directamente de la superficie de la semilla (tegumentos). La infección exterior se efectúa a través del estigma, la pared del ovario o pericarpio y las estructuras de la flor o fruto y posteriormente a través de la cubierta de la semilla.. Un solo patógeno puede penetrar por varias de esas partes.

Davis en 1987 estudió la infección y control de *Colletotrichum gleosporoides* en dos especies de *Stylosanthes* y encontró que la infección de las vainas es la fuente de inóculo primario para la infección de las semillas.

De acuerdo a Kozlowski (1972), debido a la íntima interrelación de la ontogenia de la semilla y su estructura con la infección y transmisión de los fitopatógenos, la patología de semillas está íntimamente relacionada con la anatomía de las mismas.

Existe una gran variación en la estructura anatómica de las diferentes semillas. Generalmente las semillas con cubiertas gruesas u originadas en frutos secos donde no existan tejidos húmedos o espacio entre ellas, son menos susceptibles a la penetración de los patógenos externos.

Wojtaszek y Bolwell (1995) a través de un estudio de ultraestructura hecho en semillas de frijol, demostraron por primera vez la presencia de glicoproteínas específicas en la pared celular secundaria, diferentes a las proteínas hasta hoy conocidas.

La investigación hecha por Ortega (1995) acerca de las enzimas degradadoras que son producidas por el hongo *Colletotrichum gleosporoides* indican que éstas son endoglucanasa y xilanasas, mientras que Malolepsza y Urbanek (1995) al cultivar células en suspensión de frijol infectadas con *Botrytis cinerea* encontraron un incremento en la actividad de la peroxidasa intra y extracelular.

Valadez (1986) encontró una correlación positiva entre el color oscuro de la testa de semillas de frijol y la resistencia a la infección por dos tipos de bacterias fitopatógenas.

Mohamed-Yasseen, *et al* (1994) mencionan que la cubierta de la semilla es la defensa primaria contra el medio ambiente adverso, protegiéndola no sólo de la tensión mecánica sino también de la invasión de microorganismos y de cambios en temperatura y humedad durante el almacenaje y que los fenoles en la cubierta contribuyen a su dureza y a la inhibición de crecimiento de microorganismos.

Vandeynze y Pauls (1994) al trabajar con semillas de nabo de diferente coloración para su respuesta al almacenamiento, encontraron que las de color oscuro, fueron dominantes sobre las de color claro.

Yang *et al* (1995) al analizar los complejos protéico-pigmenticios en la testa del frijol mungo, proponen que dicho complejo son los componentes residuales del desarrollo de la testa y protegen al embrión de la incidencia luminosa.

Vetter (1995) a su vez analizando la composición química de las semillas de *Vicia faba*, encontró que la testa está constituida por una muy alta concentración de fibras y es una significativa fuente de calcio (1.86g/Kg).

Con respecto al daño interno de las semillas, en el caso del almidón, Singh y Agarwal (1987) encontraron que las semillas de sorgo infectadas con *Curvularia lunata*, *Fusarium moniliforme* y *Phoma sorghina* causaron una significativa reducción en el tamaño de los gránulos de almidón, comparándolos con los de semillas sanas. *F. moniliforme* también causó daños a la superficie de los gránulos.

Paul y Mishra (1994) estudiaron el efecto de la infestación de semillas de maíz por hongos y encontraron como resultado una reducción en el peso seco, incremento en la acidez grasa y depreciación del almidón, siendo esta última baja en las primeras fases de la incubación , volviéndose pronunciada después de 30 días.

Almacenamiento de la Semilla y Supervivencia de los Patógenos

Las condiciones de almacenamiento de semillas constituyen un factor muy importante para la supervivencia de la semilla de buena calidad durante períodos prolongados y para el grado de pérdidas por almacenamiento ocasionadas por diversos contaminadores y patógenos transmitidos por semilla (Ellis y Gálvez, 1980).

Para el caso de la producción de semilla de frijol en el Estado de Zacatecas, el almacenamiento de la semilla no es un factor de riesgo, ya que las condiciones climáticas de baja humedad y temperatura y el corto tiempo de almacenamiento (de noviembre a junio), impiden el desarrollo de los patógenos externos e internos a la semilla (SARH, 1995).

Sin embargo la supervivencia del hongo sobre los residuos de las plantas en el suelo representa la fuente más importante de inóculo para el siguiente ciclo de cultivo. Dillard y Cobb (1994) determinaron que la supervivencia *Colletotrichum lindemuthianum* fue de hasta 4 meses a profundidades de 0, 10 y 20 cm sobre residuos vegetales. Señalan también que la severidad de la enfermedad se incrementó con la

densidad del inóculo y a los 22 meses ya no fue posible detectarlo a ninguna profundidad.

Lima, Carvalho y Carvalho también en 1988 trabajando con el hongo *Colletotrichum gossypii* en semilla de algodón, encontraron que éste sobrevivió hasta 14 meses sobre la semilla con contenido de humedad del 12 al 13 por ciento y a una temperatura ambiente de 16.6 a 33 °C. Los muestreos se realizaron a intervalos de dos meses.

Laciakova et al (1995) midiendo el tiempo requerido para la desvitalización de cuatro especies de hongos bajo condiciones de laboratorio a diferentes temperaturas encontraron que a 22 °C no hubo ningún efecto; a 37 °C lo hubo entre los 14 y 35 días y a 60 °C la desvitalización ocurrió en todos en un término de cinco horas. *Fusarium moniliforme* y *Mucor fragillis* fueron el más y el menos susceptible, respectivamente. *Penicillium glabrum* y *Aspergillus niger* fueron intermedios.

También la ultraestructura de las esporas puede servir de indicador acerca de la edad y sobrevivencia de los hongos, como el estudio hecho por Mims et al (1995) en conidiosporas de *Colletotrichum graminicola*, encontrando diferencias marcadas en la estructura de esporas jóvenes (5-7 días) y viejas (30-35 días).

Tripathi, Singh y Chaube en 1988 trabajando con *Ascochyta rabisi* en semilla de garbanzo, encontraron que éste sobrevivió de 14 a 15 meses en semillas almacenadas

de 5 a 10 °C y de 10 a 12 meses en semillas almacenadas de 20 a 30 °C. La viabilidad del hongo en semillas almacenadas a temperatura ambiente decreció de una forma constante al parecer sin influencia de las altas temperaturas (37-40 °C) del verano.

Asimismo, Naumova y Obetemperanskaya, en el mismo año, reportan que para el caso del cultivo de soya, el hongo infeccioso *Peronospora manshurica* puede sobrevivir hasta 5 años en forma de zoosporas sobre las semillas y vainas, pudiendo también sobrevivir en los residuos del cultivo, en el suelo sobre la superficie y a profundidades de hasta 10 cm. Consideran dichos autores que las semillas infectadas representan la fuente primaria de infección en el campo.

Hongos transmitidos por semilla

Samson y Frisvad (1994) señalan que los conceptos taxonómicos de la mayoría de los hongos filamentosos transmitidos por semillas están bien definidos y una identificación real de los taxa es posible con la ayuda de claves y descripciones publicadas en diferentes libros. Sin embargo, la taxonomía no deja de ser un problema.

Existen listas para diversos cultivos de los hongos transmitidos por semillas, para el caso del frijol:

Neergaard (1979) cita a *Fusarium solani* var. *phaseolicola*, causante de la pudrición radicular; *Colletotrichum lindemuthianum*, productor de la antracnosis y a *Sclerotinia sclerotiorum*, el moho blanco.

Richardson (1979) en su clásico listado de enfermedades transmitidas por semilla, cita para el frijol 23 géneros con 30 especies como sigue:

<i>Alternaria brassicicola</i>	<i>Elsinoë phaseoli</i>
<i>Ascochyta boltshauseri</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> var. <i>phaseoli</i>
<i>A. phaseolorum</i>	<i>Fusarium solani</i>
<i>Ascochyta spp</i>	<i>Fusarium spp</i>
<i>Aspergillus sp</i>	<i>Giberella fujikuori</i>
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Macrophomina phaseolina</i>
<i>Cercospora sp</i>	<i>Nematospora spp</i>
<i>Chaetoseptoria wellmanii</i>	<i>Phaeoisariopsis griseola</i>
<i>Cladosporium herbarum</i>	<i>Phyllosticta phaseolina</i>
<i>Cochliobolus heterostrophus</i>	<i>Phytophthora phaseoli</i>
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	<i>Pleospora herbarum</i>
<i>Colletotrichum phaseolorum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
<i>Colletotrichum truncatum</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	<i>Sclerotium rolfsii</i>
<i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>sojae</i>	<i>Uromyces apendiculatus</i>

(Ellis y Gálvez (1980) proporcionan una lista más completa que incluye a 44 especies, producto de una revisión bibliográfica:

Hongo	Enfermedad
<i>Acrostalagmus sp</i>	-

<i>Alternaria sp</i>	-
<i>Ascochyta sp</i>	-
<i>Aspergillus candidus</i>	Pudrición en almacén
<i>Aspergillus glaucus</i>	Pudrición en almacén
<i>Aspergillus niger</i>	Pudrición en almacén
<i>Aspergillus repens</i>	Pudrición en almacén
<i>Aspergillus restrictus</i>	Pudrición en almacén
<i>Botryodiplodia theobromas</i>	Semilla cariada
<i>Botrytis cinerea</i>	Moho gris
<i>Cercospora cruenta</i>	Mancha de la hoja
<i>Chaetoseptoria wellmanii</i>	Mancha angular
<i>Cladosporium herbarum</i>	Mancha cladosporium
<i>Colletotrichum dematium</i>	-
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Antracnosis
<i>Curvularia sp.</i>	-
<i>Dendrophoma sp</i>	-
<i>Daiaporthe phasiolorum</i>	Añublo de la vaina y tallo
<i>Diplodia natalensis</i>	Contaminación de la semilla
<i>Erysiphe polygoni</i>	Cenicilla polvosa
<i>Fusarium equiseti</i>	Muerte de las plántulas
<i>Fusarium moniliforme</i>	-
<i>Fusarium oxysporum</i> var. <i>phaseoli</i>	Fusarium amarillos (sic)
<i>Fusarium roseum</i>	-

<i>Fusarium semitectum</i>	Cariamiento de la vaina
<i>Fusarium solani</i>	Pudrición radicular
<i>Fusarium sulphureum</i>	-
<i>Isariopsis griseola</i>	Mancha angular de la hoja
<i>Macrophomina phaseolina</i>	Añublo ceniciento del tallo
<i>Monilia sp</i>	-
<i>Mucor sp</i>	-
<i>Nematospora coryli</i>	Mancha de levadura
<i>Nigrospora sp</i>	-
<i>Penicillium sp</i>	Pudrición en almacén
<i>Pestalotopsis sp</i>	-
<i>Peyrenollea sp</i>	-
<i>Phomopsis phaseolina</i>	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	Pudrición radicular
<i>Rhizopus sp</i>	Pudrición leve
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Moho blanco
<i>Sclerotinia rolfsi</i>	Añublo sureño
<i>Sporoltrichum sp</i>	-
<i>Stemphylium sp</i>	-
<i>Thanatephorus cucumeris</i>	Añublo Web

Copeland y Mc Donald (1985) señalan a *Phaseolaropsis griseola*, que produce la mancha angular de la hoja y a *C. lindemuthianum*, causante de la antracnosis.

Colletotrichum lindemuthianum es el principal patógeno del frijol, exhibiendo una diversidad de razas fisiológicas, las cuales han sido determinadas por diferentes autores basándose en pruebas de patogenicidad como las realizadas en 1995 por Fabre y colaboradores y Hugouvieux y colaboradores, con marcadores moleculares; en el mismo año por Annamalai y colaboradores y por Freeman y Rodríguez mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); en 1994 por Singh y Singh en base a valores binarios y de infección; y por Defiguerado y colaboradores (1994) mediante una metodología de extracción y análisis de isoenzimas de aislamientos monoconidiales.

Para el caso de otras leguminosas, existen diversas investigaciones:

Jindal y Thind (1988) investigando la microflora de las semillas de *Vigna radiata*, encontraron 7 especies de bacterias y 13 de hongos, siendo de estos últimos los más comunes *Aspergillus flavus*, *Fusarium semitectum*, *F. equiseti*, *Rhizopus oryzae* y *Trichothecium roseum*, quienes redujeron significativamente la germinación de las semillas inoculadas posteriormente con ellos. Señalan también que la población de bacterias fue significativamente mayor que la de hongos y que las semillas rugosas y decoloradas presentaron más microorganismos, la mayoría aislados de los tejidos internos que de la superficie externa.

Prasad y Prasad en 1987 trabajando con semillas de *Dolichos lablab*, aislaron 35 hongos transmitidos por semilla recién cosechada. El 17 por ciento de las semillas

contenían hongos, de los cuales la mayoría eran deuteromicetos dematiáceos y algunas especies de *Fusarium*. Las semillas almacenadas no mostraron diferencia significativa entre los hongos aislados y las tres variedades estudiadas. La germinación de la semilla fue afectada por *Aspergillus niger*, mientras que *A. chavalieri*, *A. flavus*, *A. candidus*, *A. niveus* y *Alternaria alternata* causaron manchas y necrosis en un 23 a 37 por ciento de los cotiledones y malformaciones en un 19 a 27 por ciento. La actividad de las enzimas celulolíticas y pectolíticas en las semillas infectadas fue alta debida a la presencia de los hongos. Las plántulas cortas y deformadas, mostraron altos niveles de actividad de la oxidasa del ácido indolacético.

Quiniones y Dayan (1985), aislaron 30 hongos de semillas de *Leucaena leucocephala*, colectadas en diferentes provincias de Filipinas. Los géneros *Aspergillus*, *Botryodiplodia*, *Cephalosporium*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Phoma* y *Penicillium* fueron los encontrados.

Dwivedi y Dwivedi (1994) en la determinación de los hongos asociados a la semilla de *Cyamopsis tetragonoloba*, encontraron que los deuteromicetos fueron los que estuvieron mayormente presentes en todas las estaciones de muestreo, seguidos por los zigomicetos y ascomicetos. Los dominantes fueron *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *Trichoderma viride* y *Aspergillus terreus*. La detección se hizo en los medios de cultivo de agar y papel filtro en cajas Petri.

Prueba de sanidad

Practicar cualquier prueba de sanidad a un lote de semilla, está basado en el examen de una muestra que usualmente es una porción extremadamente pequeña del lote de semillas. El procedimiento aplicado en la obtención de una muestra representativa y la división de ésta en muestras de trabajo para su análisis es por lo tanto fundamental para obtener resultados uniformes, verídicos y reproducibles. La experiencia acumulada de prácticas e investigaciones ha sido establecido en las Normas para el Análisis de Semillas (ISTA, 1976). En la obtención de muestras para pruebas de sanidad de semillas, estas normas deben seguirse estrictamente.

El Lote de Semillas

Para cualquier prueba obtenida en concordancia con las Normas Internacionales para el Análisis de Semillas, el tamaño máximo de un lote para semillas agrícolas y hortícolas es de 20,000 kg para semillas del tamaño del trigo o más grandes y de 10,000 kg para semillas mas pequeñas que el trigo.

Un lote de semillas debe ser homogéneo, pero este ideal puede no ser obtenido nunca. A pesar de una cuidadosa mezcla y estibado, es imposible en la práctica obtener un lote de semillas completamente homogéneo. La uniformidad de un lote de semillas se refiere a cualquier atributo que pueda ser medido, por ejemplo: pureza, número de semillas de malezas, germinación, etc.

Intensidad de Muestreo

Para lotes de semillas en sacos o envases de tamaño similar, la siguiente intensidad de muestreo debe ser observado como requerimiento mínimo:

De uno a cinco envases: muestrear cada envase y siempre tomar al menos cinco muestras primarias.

De seis a treinta envases: muestrear al menos uno de cada tres envases, pero nunca menos de cinco.

De treinta y uno envases o más: muestrear al menos uno de cada cinco envases, pero nunca menos de diez.

Uno debe elegir los sacos o envases por muestrear y tomar las muestras de la parte superior, media e inferior de cada envase. Para envases grandes, uno debe tomar muestras primarias grandes.

Las semillas a granel deben muestrearse en sitios al azar y las muestras deben ser obtenidas a varias profundidades. La intensidad de muestreo debe ser como para los lotes de semillas en sacos, por ejemplo: arriba de 500 kg al menos cinco muestras primarias (excepto para lotes muy pequeños); mayor de 3,000 kg, una muestra primaria por cada 300 kg, pero no menos de cinco muestras; y mayor de 20,000 kg, una muestra primaria por cada 500 kg, pero no menos de 10 muestras primarias.

Muestras de Envío

Las normas internacionales establecen las prescripciones para los pesos mínimos de las muestras de envío y proporcionan una lista para semillas agrícolas, hortícolas y forestales con las indicaciones de pesos mínimos de las muestras, como por ejemplo:

1,000 g - La mayoría de los cereales, cacahuate, soya, algodón, girasol, frijol, pino, chícharo, etc.

Moreno (1984), señala que el objetivo del muestreo es el de obtener una muestra de tamaño adecuado que sea representativa del lote de semillas del cual se desea conocer la calidad. Define los diferentes tipos de muestras de acuerdo a la Asociación Internacional de Analistas de Semillas (ISTA) y la Asociación Oficial de Analistas de Semillas de Estados Unidos (AOSA), dando las recomendaciones para la toma de muestras primarias en lotes a granel y en costales. Presenta una tabla con los pesos máximos de los lotes de semillas y los pesos mínimos de las muestras de envío y trabajo, que para el caso del frijol es como sigue:

Peso máximo del lote: 20,000 Kg

Muestra de envío: 1,000 g

Muestra para análisis de pureza: 700 g

Muestra para cuantía de semillas extrañas: 1,000 g

Número de semillas por gramo: 4

También Russell (1988), discute algunos aspectos sobre el muestreo, el uso de tablas binomiales para el análisis de datos cualitativos, el establecimiento de tamaños apropiados de muestras y el manejo de datos cuantitativos en las pruebas de sanidad de las semillas en un documento presentado en la LXXVI Reunión Anual de la Sociedad Americana de Fitopatología en la Universidad de Guelph, Canadá. El resume que no se puede predecir un conteo de cero patógenos mediante los resultados de una prueba tomada de una muestra. Se pueden utilizar tablas binomiales para predecir apropiadamente el tamaño de muestra cuando las pruebas producen datos cualitativos.

También se pueden usar tablas binomiales para evaluar resultados cualitativos, pero no para analizar resultados cuantitativos. Sin embargo, se pueden predecir posibles niveles de infección con datos masivos cuando se requiere un conteo de cero patógenos.

Ya desde la sesión anual 1984 de la Sociedad Americana de Fitopatología se señala la importancia de establecer los umbrales para los niveles de inóculo de las patógenos transmitidos por semilla (Kuan, T.L., 1988).

Para el caso de los hongos, Gabrielson (1988) señala que un grano de polen puede fertilizar un óvulo y que una espora fúngica puede causar una enfermedad vegetal, pero generalmente se necesita de miles de esporas para establecer una interrelación parasítica que provoque una enfermedad. Esta interrelación es similar en sus umbrales de nivel para las enfermedades transmitidas por semilla y pone como

ejemplo que en pruebas de campo, no se presenta la enfermedad cuando las semillas de crucíferas tienen 0.6 por ciento o menos de infección con *Phoma lingam*.

Los umbrales de inóculo de los patógenos transmitidos por semilla son los niveles de infección sobre o en la semilla que tendrán un efecto significativo al desarrollar una enfermedad, dando como resultado pérdidas económicas. El umbral del nivel puede ser cero para una enfermedad que no se encuentra en una área protegida por una cuarentena. Los métodos empleados rutinariamente para las pruebas de sanidad, no predicen acertadamente un nivel cero y no son recomendables para propósitos cuarentenarios.

Para establecer un umbral de nivel, debe determinarse la cantidad de semilla infectada. El Comité de Enfermedades de Plantas (PDC) de la Asociación Internacional de Analistas de Semillas (ISTA) ha desarrollado y evaluado pruebas específicas hospedero-patógeno para tal fin.

Finalmente, para el caso de la tolerancia para patógenos transmitidos por semilla de frijol, se señala únicamente como patógeno a *Colletotrichum lindemuthianum*, con un 0.600 por ciento de tolerancia para semilla básica.

Se tiene referencia (Shivanna y Shetty, 1988) de que la antracnosis producida por *Colletotrichum dematium* es transmitida por semilla en un tipo de frijol (*Cyamopsis tetragonoloba*), siendo detectada de un 0.5 a un 23.5 por ciento de las semillas

procedentes de muestras de diez variedades. La muestra con más alta incidencia mostró un 10 por ciento de mortalidad en pre y post-emergencia en agar-agua y un 3 por ciento en preemergencia y un 15 por ciento en post-emergencia en arena. Las muestras en invernadero, mostraron síntomas de antracnosis durante todas las etapas de crecimiento. El 70 por ciento de las semillas colectadas de esas plantas mostraron infección más por *C. dematium*. En las pruebas de campo, las plantas mostraron los síntomas de la infección tardíamente. Las semillas de la primera cosecha mostraron un 43 por ciento de infección, mientras que las semillas colectadas de 15 a 20 días después mostraron 80 por ciento de infección. El patógeno fue localizado en las capas internas de la cubierta seminal.

McDonald (1995) señala los progresos que se han hecho a la fecha en tecnología de semillas acerca de la correlación existente entre la viabilidad y el vigor con la emergencia en el campo.

Análisis de Semillas

Moreno (1984), basado en las normas de ISTA, y AOSA presenta una tabla en la que señala los métodos para las pruebas de germinación de semillas, siendo para el frijol:

Substrato: entre papel y arena.

Temperatura: 20 °C, 25 °C, 20-30 °C.

Conteos: a los cinco y nueve días

Tratamientos para semillas frescas y latentes: luz difusa.

La Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (1994) a través de las Normas para la Certificación de Semillas, marca las tolerancias de laboratorio para la semilla certificada de frijol como sigue:

Factor	Tolerancia
Semilla pura (mín.)	98.0 %
Materia inerte (máx.)	2.0 %
Semilla de otras variedades (mín.)	10 por Kg.
Semilla manchada (máx.)	25 por Kg.
Semillas de hierbas nocivas	Ninguna
Germinación (mín.)	80.0 %
Humedad (máx.)	13.0 %

Métodos para Detección de Patógenos

Copeland y McDonald (1985) señalan como métodos para la detección de patógenos a las siguientes pruebas:

Prueba de agar.

Utilizando agar-agar o agar más un extracto de plantas, al que se agrega un antibiótico (sulfato de estreptomicina). La semilla antes de sembrarse ser tratada con una solución de hipoclorito de sodio al 1 por ciento durante un minuto a fin de desinfectarla externamente. Se vacía el medio en cajas Petri y una vez efectuada la siembra, las cajas se colocan en una incubadora a 20-25 °C durante 5-8 días.

Prueba en papel húmedo.

Es una prueba semejante a la anterior, sólo que el agar se sustituye por capas de papel humedecido con agua destilada. A fin de evitar el rápido crecimiento de las plántulas, se agrega al medio la sal 2,4-D. También se puede inhibir el crecimiento mediante la técnica de congelamiento después de 24 horas de la siembra a -15°C por 24 horas.

Prueba de virulencia.

Es recomendada para la identificación de algunos patógenos siguiendo los postulados de Koch.

Pruebas sin cultivo.

Se realizan mediante inspección visual de los esclerocios o esporas de algunos hongos.

Neergaard (1979) clasifica a las pruebas de incubación para la identificación de patógenos como:

Prueba en papel húmedo.

Prueba en agar.

Método de congelamiento.

Pruebas de síntomas en plántulas:

a. Método Hiltner

b. Método en arena

c. Método en suelo

Los tres primeros son esencialmente iguales a los señalados por Copeland y McDonald (1985).

Las pruebas en plántulas se apoyan en claves de evaluación para enfermedades elaboradas para tal fin en diferentes cultivos.

Señala el mismo autor que los factores que afectan los resultados de estas pruebas son:

Selección del tipo de prueba.

Condición de la semilla.

Cantidad de inóculo por semilla.

Respuesta del patógeno a las condiciones de la prueba.

Factores debidos a la muestra de semillas (muestreo, almacenamiento, tratamiento, condiciones de incubación, etc.).

Manandhar, *et al* (1994) determinaron un medio de cultivo selectivo (CGPIM) para el cultivo de *Colletotrichum gleosporoides* en semillas de chile. El medio contenía papa dextrosa agar más fenarimol, vinclozolin, cloranfenicol, eritromicina, iprodiona, sulfato de neomicina e hidrocloreuro de tetraciclina.

Alzaemey, *et al* (1995) durante sus estudios *in vitro* de las condiciones

medioambientales que afectan el cultivo de *Colletotrichum musae*, causante de la antracnosis del platanero, determinaron como óptimos un pH entre 4 y 5; una temperatura de 30 °C; actividad del agua de 0.995 a(w) y una concentración de CO₂ menor al 15 por ciento.

Los métodos de laboratorio para la detección de los hongos transmitidos por semilla han sido investigados para diferentes cultivos como son el arroz por Shetty y Shetty en 1988 quienes evaluaron seis diferentes medios (estándar, 2,4-D, congelación, papa dextrosa agar, guayacol agar y extracto de arroz agar), encontrando que todos los métodos respondieron igual en la detección de *Alternaria*, pero prefiriéndose el de extracto de arroz por permitir la identificación de las especies; y aunque las especies de *Asergillus* y *Penicillium* crecieron bien en los medios de papa - dextrosa y de guayacol, crecieron más abundantemente en el primero. No se encontraron diferencias significativas entre los seis medios para la determinación de los hongos *Drechslera oryzae*, *Fusarium moniliforme* y *Rhynchosporium oryzae*.

Irwin (1987) menciona que las pruebas de incubación en agar y en papel representan una alternativa simple y barata para la detección de hongos transmitidos por semillas, siendo utilizados ampliamente en el mundo.

Egley (1995) determinó a partir de su estudio, que los substratos influyen sobre la germinación de las conidiosporas de *Colletotrichum truncatum*, siendo ésta mayor en los medios sólidos que en los líquidos o semisólidos.

Wu y Mathur (1987) evaluaron cinco diferentes métodos para la detección de *Fusarium moniliforme* en semillas de sorgo. Encontraron que la identificación del hongo fue difícil en los medios en papel, estándar y con enfriamiento, debido a la presencia de otros hongos. El medio de Nash y Snyder (NSM) permitió la presencia de características colonias blancas polvosas de *F. moniliforme* y muy pocas de otros hongos. El porcentaje de infección registrado por NSM estuvo negativamente correlacionado con la emergencia de la plántulas en el invernadero, pero no con la emergencia en campo.

Rajendra y Chaudhary (1987) trabajando con semillas de lenteja, encontraron que el medio estándar de cajas con papel es mejor que el método de placa de agar para el aislamiento de un gran número y variedad de hongos.

Por último, Megan (1994) señala que han sido desarrollado métodos a fin de detectar la actividad de los hongos antes de su presencia visual. Estos han sido divididos en aquellos que cuantifican el total de masa fúngica y aquellos que son capaces de diferenciar especies individuales. Estos métodos involucran el análisis de marcadores bioquímicos característicos, incluyendo quitina, erosterol y ATP; la cuantificación de enzimas indicativas de la invasión fúngica; presencia de odorantes y métodos electroquímicos. Además de métodos que involucran el uso de pruebas de DNA y el desarrollo de anticuerpos monoclonales de productos fúngicos específicos.

MATERIALES Y METODOS

El trabajo experimental se desarrolló tanto en campo como en laboratorio .

Las parcelas experimentales se establecieron en el municipio de Río Grande, Zac. en la pequeña propiedad “Santa Teresa”, localizada a los 103° 02’ de longitud oeste y 23° 50’ de latitud norte y altitud de 1,860 msnm.

Según el INEGI, el área pertenece a la Provincia IX Mesa del Centro y a la Subprovincia 41 Sierras y Llanuras del Norte, con clima Bsh (seco semicálido) con temperatura y precipitación promedio anuales de 18.3 °C y 397.1 mm, respectivamente. Los análisis de laboratorio se efectuaron en las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en su sede de Buenavista, Saltillo, Coah.

Trabajo de Campo

A inicios del mes de junio de 1988, se hizo una visita al área de Río Grande, Zac., a fin de localizar a algún agricultor que aceptase cooperar en la siembra de los materiales experimentales. Ello se logró con el Sr. Isidoro Alvarez, vecino del lugar quien se dedica de toda su vida al cultivo del frijol.

Dicha persona siembra regularmente bajo temporal, varias parcelas en el Distrito de Desarrollo Rural de Río Grande, utilizando las variedades criollas negro bola y bayo baranda, sin tratamiento.

Para fines del experimento, se le proporcionó semilla certificada comprada en la Productora Nacional de Semillas, quien recomienda para la zona las variedades negro zacatecas y bayo blanco, las cuales estaban tratadas con Captán Methoxicloro, 65-10 por ciento/ton. y Malathion 1000-E, 50 ml/ton.

Se establecieron cuatro parcelas experimentales de 100 m de ancho (160 surcos) por 250 m de largo para cada una de las cuatro variedades señaladas.

Para la siembra se realizaron las preparaciones comunes del terreno consistentes en barbecho a una profundidad de 20-30 cm y rastreo mediante dos pasos para una buena cama de siembra. La siembra se efectuó el día 25 de junio de 1988 con sembradora mecánica a una profundidad de 8-10 cm y distancia entre surcos de 70 cm para una separación entre plantas de 10-12 cm.

La cantidad de semilla por hectárea fue variable dependiendo del tamaño de la semilla. Para las semillas chicas (negro zacatecas) 25 kg/ha; para semillas medianas (bayos baranda y blanco) 40 kg/ha y para semillas grandes (negro bola) 60 kg/ha. Con estas cantidades se tuvo una población de 80,000 a 130,000 plantas por hectárea.

La fertilización se realizó con las fórmulas 46-00-00 y 18-46-00 a razón de 50 kg/ha en cada caso para las cuatro parcelas.

La emergencia de las plántulas ocurrió el día 2 de julio siguiente.

Las plantas fueron cortadas el 20 de octubre procediéndose a hacer los “borregos” o amontonamiento de plantas, de acuerdo a los métodos convencionales, a fin de que la semilla pierda humedad. El “parveado” de las plantas para la extracción de la semilla de las vainas se realizó el 27 de noviembre de 1988.

El envasado de la semilla se realizó en el campo en costales de yute, los que posteriormente fueron almacenados en un cobertizo de paredes de madera y techo de lámina en el domicilio del Sr. Alvarez en la ciudad de Río Grande, Zac.

Un vez estibados los costales, se procedió a realizar un muestreo a fin de formar para cada una de las variedades, una muestra de trabajo para su análisis en laboratorio.

Las condiciones del medio ambiente durante el tiempo que duró el experimento se presentan en la Figura 3.1.

Trabajo de laboratorio

Antes de la siembra, las semillas de las cuatro variedades fueron analizadas en el

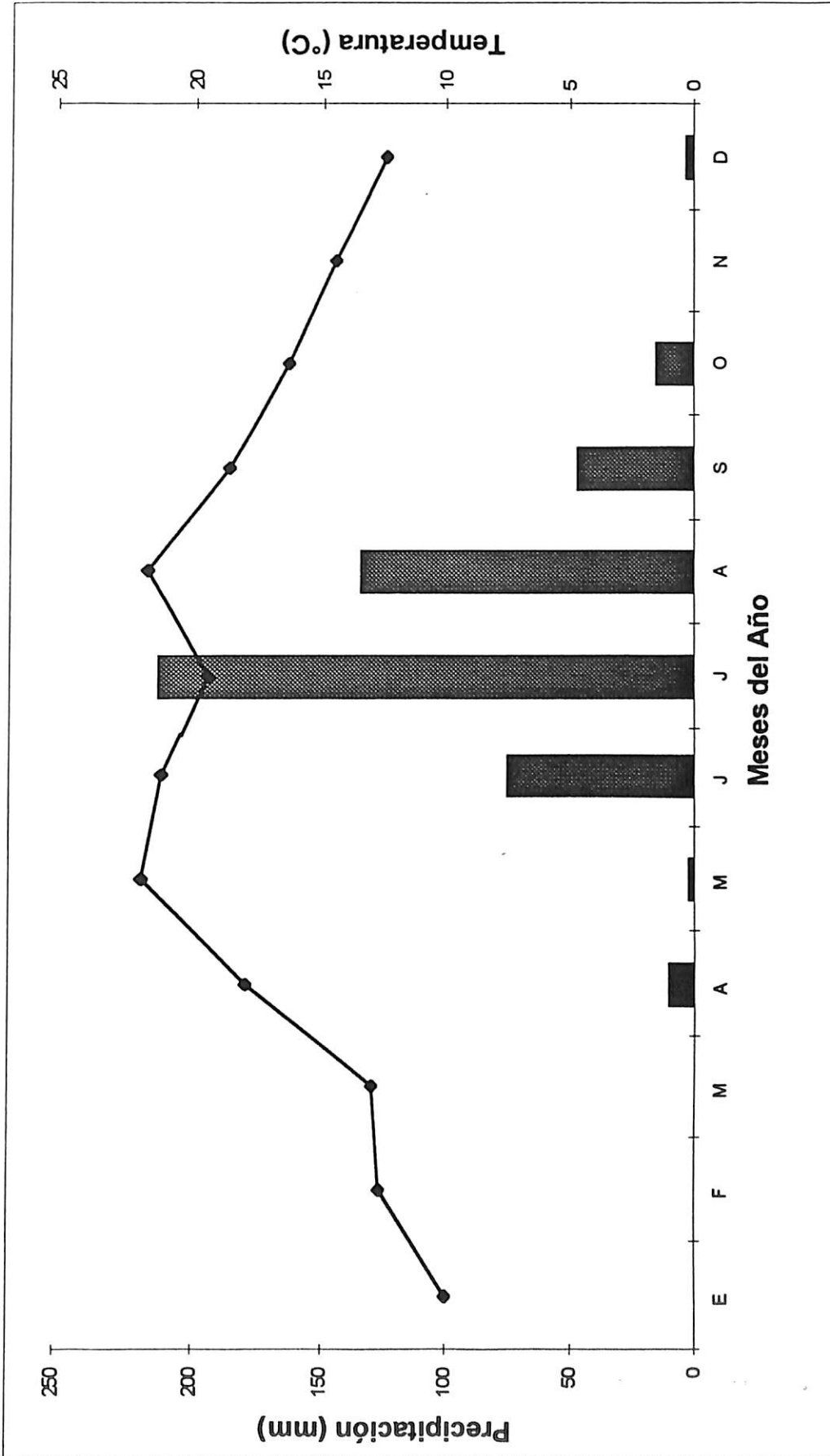


Figura 3.1 Precipitaciones totales y temperaturas medias mensuales registradas por la estación meteorológica de Río Grande, Zac. durante 1988 (CONAGUA, 1996).

Laboratorio de Control de Calidad de la UAAAN para determinar sus características físicas, biológicas y sanitarias consistentes en la determinación de:

Humedad.

Mediante el determinador de humedad eléctrico marca "Steinlite".

Peso volumétrico.

Determinado en kg/hl mediante la balanza de laboratorio.

Pureza física.

A fin de determinar los porcentajes de semilla pura, semilla de otros cultivos, semilla de malas hierbas y materia inerte de acuerdo a las normas de la ISTA (Moreno, 1984).

Germinación estándar.

En toallas enrolladas de papel de acuerdo a las especificaciones de ISTA, (Moreno, 1984). Cuatro repeticiones de 100 semillas cada una.

Vigor.

Mediante la prueba de envejecimiento acelerado por 72 hrs a 43 °C (Neergaard, 1979). Diez repeticiones de 10 semillas cada una.

Sanidad (hongos portados internamente).

Mediante incubación en pruebas sobre papel filtro con congelamiento (Copeland y McDonald, 1985). Se trabajó con una muestra de 100 semillas, sembrándose 10 semillas por caja.

Una vez obtenidos los hongos, se hicieron resiembras a cajas Petri con agar de papa y dextrosa para la obtención de cultivos puros y proceder a su identificación mediante las claves de Barnett y Hunter, (1972) y la Etimología e Iconografía de Ulloa y Herrera, (1994).

Posteriormente, las mismas pruebas fueron efectuadas en la semilla cosechada para relacionar estos resultados con los obtenidos previamente en la semilla de siembra.

Con la finalidad de determinar el mejor método de trabajo para realizar el análisis de sanidad, se efectuaron pruebas preliminares de vigor con 400 semillas en las que se compararon tres métodos de siembra de las semillas en agar-agua, papel filtro sin enfriamiento y papel filtro con enfriamiento.

RESULTADOS

En los cuadros 4.1 al 4.5 que se presentan a continuación, se registran los datos obtenidos de los análisis aplicados a las semillas de frijol en sus diferentes categorías y coloraciones.

Cuadro 4.1. Análisis de la semilla certificada de frijol bayo blanco.

	Semilla sembrada	Semilla. cosechada
Análisis físico		
Humedad (%)	13.4	8.6
Peso volumétrico (kg/hl)	72.4	75.7
Pureza física (%): Semilla pura	96.7	97.1
Semilla de otros cultivos	0.0	0.0
Semilla de malas hierbas	0.0	0.0
Materia inerte	3.3	2.9
Análisis biológico		
Germinación estándar (%): Normales	92	90
Anormales	5	7
Duras	0	0
Muertas	3	3
Vigor (%): Normales	72	90
Anormales	12	4
Duras	0	0
Muertas	16	6
Análisis de sanidad		
Hongos portados internamente	6	5
(Número de colonias)		

Cuadro 4.2 Análisis de la semilla certificada de frijol negro zacatecas.

	Semilla sembrada	Semilla cosechada
Análisis físico		
Humedad (%)	13.8	8.7
Peso volumétrico (kg/hl)	75.7	78.7
Pureza física (%):		
Semilla pura	98.7	94.3
Semilla de otros cultivos	0.0	0.0
Semilla de malas hierbas	0.0	0.0
Materia inerte	1.3	5.7
Análisis biológico		
Germinación estándar (%):		
Normales	92	88
Anormales	7	10
Duras	0	1
Muertas	1	1
Vigor (%):		
Normales	43	90
Anormales	29	6
Duras	0	0
Muertas	28	4
Análisis de sanidad		
Hongos portados internamente (Número de colonias)	8	6

Cuadro 4.3 Análisis de la semilla criolla de frijol bayo baranda.

	Semilla sembrada	Semilla cosechada
Análisis físico		
Humedad (%)	12.9	9.0
Peso volumétrico (kg/hl)	73.6	75.7
Pureza física (%):		
Semilla pura	98.7	95.7
Semilla de otros cultivos	0.0	0.0
Semilla de malas hierbas	0.0	0.0
Materia inerte	1.3	4.3
Análisis biológico		
Germinación estándar (%):		
Normales	92	96
Anormales	6	2
Duras	0	1
Muertas	2	1
Vigor (%):		
Normales	55	93
Anormales	10	4
Duras	0	0
Muertas	35	3
Análisis de sanidad		
Hongos portados internamente (Número de colonias)	10	6

Cuadro 4.5 Géneros de hongos portados internamente por la semilla de frijol. *

	Semilla sembrada	Semilla cosechada
Certificada Bayo Blanco	<i>Aspergillus niger</i> - 4 <i>Colletotrichum</i> <i>lindemuthianum</i> - 2	<i>Aspergillus niger</i> - 5
Certificada Negro Zacatecas	<i>Aspergillus candidus</i> - 2 <i>Aspergillus niger</i> - 4 <i>Fusarium oxysporum</i> - 2	<i>Aspergillus niger</i> - 3 <i>Fusarium oxysporum</i> - 3
Criolla Bayo Baranda	<i>Alternaria</i> sp - 2 <i>Aspergillus niger</i> - 6 <i>Colletotrichum</i> <i>lindemuthianum</i> - 2	<i>Aspergillus niger</i> - 4 <i>Colletotrichum</i> <i>lindemuthianum</i> - 2
Criolla Negro Bola	<i>Aspergillus niger</i> - 4 <i>Fusarium oxysporum</i> - 2	<i>Aspergillus niger</i> - 3

* Expresados en géneros de hongos y número de colonias de los mismos determinados en muestras de 100 semillas para cada variedad.

DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos se relacionan las dos categorías de semillas, certificada y criolla, discutiéndose en los siguientes cuadros los diferentes aspectos de análisis involucrados para al final relacionar la calidad fisiológica de la semilla con el color de la testa y los hongos portados internamente.

Contenido de Humedad

Para este concepto es importante señalar que es precisamente la semilla producida y vendida como certificada, la que ligeramente se encuentra fuera de normas (Cuadro 5.1), las que marcan un contenido de humedad máximo del 13.0 %.

Cuadro 5.1 Contenido de humedad de la semilla de frijol.

	Semilla sembrada	Semilla cosechada
Certificada Bayo Blanco	13.4 % *	8.6 %
Certificada Negro Zacatecas	13.8 % *	8.7 %
Criolla Bayo Baranda	12.9 %	9.0 %
Criolla Negro Bola	13.0 %	8.8 %

* Semilla fuera de normas de certificación (SARH, 1994).

Peso Volumétrico

En el caso del peso volumétrico las semillas fuera de normas son las de frijol bayo para siembra en ambas categorías (Cuadro 5.2), lo que puede atribuirse a una propiedad de la variedad, más que de la categoría. Sin embargo, la semilla cosechada está dentro de normas, aunque en el límite de la tolerancia.

Cuadro 5.2 Peso volumétrico (kg/hl) de la semilla de frijol.

	Semilla sembrada	Semilla cosechada
Certificada Bayo Blanco	72.4 *	75.7
Certificada Negro Zacatecas	75.7	78.7
Criolla Bayo Baranda	73.6 *	75.7
Criolla Negro Bola	75.6	78.6

* Semilla fuera de las normas de certificación (SARH, 1994).

Pureza Física

Como se puede notar, toda la semilla cosechada se encontró fuera de normas en cuanto a pureza (Cuadro 5.3). Sin embargo, de acuerdo a los resultados, fueron impurezas y no semillas extrañas las que marcaron estos datos, por lo que debe considerarse a la semilla apta para siembra con la debida observación de este análisis.

Asimismo, el hecho de que una de las semillas certificadas para siembra estuvo fuera de normas, hace importante reconocer la falla de la compañía comercial en este aspecto.

La semilla criolla sembrada siempre estuvo dentro de normas.

Cuadro 5.3 Pureza (%) de la semilla de frijol.

	Semilla sembrada	Semilla cosechada
Certificada Bayo Blanco	96.7 *	97.1 *
Certificada Negro Zacatecas	98.7	94.3 *
Criolla Bayo Baranda	98.7	95.7 *
Criolla Negro Bola	98.9	92.8 *

* Semillas fuera de normas de certificación (SARH, 1994).

Germinación Estándar

En este aspecto, todas las semillas estuvieron dentro de normas (80 por ciento min.) que marca la SARH, 1994 (Cuadro 5.4).

Sin embargo, la semilla criolla negra utilizada en la siembra, estuvo en el límite.

Cuadro 5.4 Germinación (%) de la semilla de frijol. *

	Semilla sembrada	Semilla cosechada
Certificada Bayo Blanco	92-5-0-3	90-7-0-3
Certificada Negro Zacatecas	92-7-0-1	88-10-1-1
Criolla Bayo Baranda	92-6-0-2	96-2-1-1
Criolla Negro Bola	81-8-0-11	89-10-0-1

* Expresada como plántulas normales, plántulas anormales, semillas duras y semillas muertas, respectivamente.

Vigor

Esta prueba es muy significativa, ya que es de hacerse notar que las semillas criollas, debido posiblemente al factor condiciones de almacenamiento, se deterioran más que al menos una de las certificadas (Cuadro 5.5), ya que la semilla certificada variedad negro zacatecas se determinó por debajo de las criollas.

Cuadro 5.5 Vigor (%) de la semilla de frijol. *

	Semilla sembrada	Semilla cosechada
Certificada Bayo Blanco	92-5-0-3	90-7-0-3

Cuadro 5.5.Continuación.

Certificada Negro Zacatecas	43-29-0-28	90-6-0-4
Criolla Bayo Baranda	55-10-0-35	93-4-0-3
Criolla Negro Bola	50-8-0-42	91-6-0-3

* Expresado a través de envejecimiento acelerado en germinación de plántulas normales, plántulas anormales, semillas duras y semillas muertas, respectivamente.

De acuerdo a la Figura 3.1, 1988 fue un año ideal, en cuanto a condiciones ambientales se refiere, para el cultivo del frijol en la región de Río Grande, Zac. La precipitación pluvial fue abundante, adecuada para la presiembra y el cultivo. A la cosecha, la precipitación cesa, lo que permitió mayor eficiencia en el manejo de la misma y mayor seguridad en el almacenamiento de la semilla por su bajo contenido de humedad (Cuadro 5.1). Las temperaturas medias también fueron adecuadas. Para contrastar, se presentan en la Figura 5.1 las precipitaciones pluviales y temperaturas promedio para veinte años, de 1975 a 1995 en la misma región.

Lo anterior repercutió directamente en la buena calidad de la semilla cosechada en sus diferentes aspectos fisiológicos, no encontrándose diferencia entre la semilla certificada y la criolla, ni en aquellas de color contrastante de testa,

El número y tipo de hongos determinados fue mínimo y debido a las excelentes condiciones ambientales durante el cultivo, éstos no influyeron en la calidad de la semilla cosechada. Los géneros y especies encontrados están enlistados para el cultivo del frijol por los autores de la literatura citada.

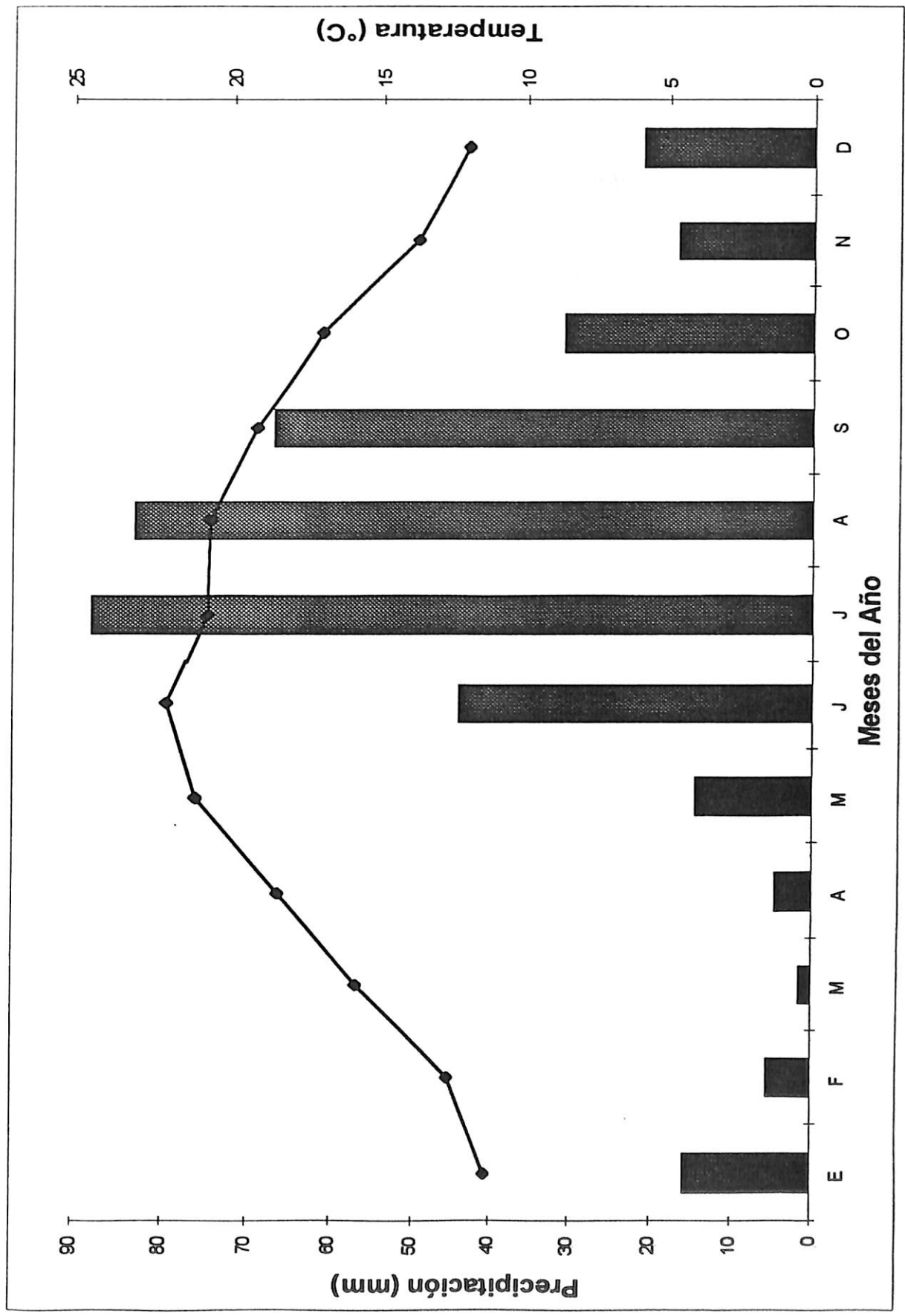


Figura 5.1 Precipitaciones totales y temperaturas medias mensuales registradas por la estación meteorológica de Río Grande, Zac. de 1975 a 1995 (CONAGUA, 1996).

CONCLUSIONES

Se logró a través de este trabajo, determinar y cuantificar los hongos portados internamente por la semilla de frijol, tanto certificada como criolla, que se siembra bajo temporal en el norte de Zacatecas.

Se concluye que bajo las condiciones en que se realizó el experimento, no existe una relación directa entre el número y tipo de hongos encontrados y la calidad fisiológica de la semilla ensayada.

Tampoco se observó ningún efecto de la categoría y color de la testa de la semilla, sobre el vigor y la resistencia a los hongos portados internamente.

RESUMEN

El objetivo de la investigación fué el evaluar la calidad de la semilla de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en variedades criollas y mejoradas con coloración contrastante de testa ante el problema de la transmisión interna de hongos patógenos comparando las propiedades físicas, biológicas y sanitarias de las mismas, antes y después de un ciclo agrícola en la zona temporalera de Río Grande, Zac.

Se utilizaron semillas certificadas bayo blanco y negro zacatecas compradas en la Productora Nacional de Semillas, las cuales fueron comparadas con semillas criollas bayo baranda y negro bola, utilizadas por los agricultores de la región.

Las propiedades físicas determinadas fueron: por ciento de humedad, peso volumétrico y por ciento de semilla pura. En el caso de las propiedades biológicas, se realizaron mediante germinación estándar en toallas de papel enrolladas y vigor mediante la prueba de envejecimiento acelerado. Las pruebas sanitarias se efectuaron sobre papel con enfriamiento e incubación de las colonias en agar de papa y dextrosa. Todas las pruebas se realizaron de acuerdo a las normas establecidas por la Asociación Internacional de Analistas de Semillas (ISTA).

Se logró determinar y cuantificar los hongos portados internamente por la semilla de frijol, tanto certificada como criolla, concluyéndose que bajo las condiciones en que se desarrolló el experimento, no existe una relación directa entre el tipo y número de hongos encontrados y la calidad fisiológica de la semilla ensayada.

Tampoco se observó ningún efecto de la categoría y color de la testa de la semilla sobre el vigor y la resistencia a los hongos portados internamente.

LITERATURA CITADA

- Alzaemey, A.B., N. Magan and A.K. Thomson. 1995. In vitro studies of the effect of environmental conditions on the anthracnose pathogen of bananas, *Colletotrichum musae*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 33 : 4, 369-381.
- Annamalai, P., H. Ishii, D. Lalithakumari and R. Revathi. 1995. Polymerase chain reaction and its applications yn fungal disease diagnosis. *Journal of Plant Disease and Production*. 102 : 1, 91.104.
- Barnett, H.L. and B.B. Hunter. 1972. *Illustrated genera of Imperfect Fungi*. Third Edition. Burgess Publishing Company. Minneapolis, MI., U.S.A. 240 p.
- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). 1996. *Registros de la Estación Meteorológica de Río Grande, Zac.*
- Copeland, L.O. and M.B. McDonald. 1985. *Principles of Seed Science and Technology*. Burgess Publishing Company, Minneapolis, MI., U.S.A. 321 p.
- Davis, R.D. 1987. *Colletotrichum gleosporioides* infection and fungicidal control in *Sylosanthes spp.* *Seed Science and Technology*. 15 : 3, 785-792.
- Defiguereado, G., A.C. Alfenas, S.H. Brommonschenkel and J.C. Defaria. 1994. Isoenzimatic variability of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates with

different virulence level. *Arquivos de Biología e Tecnología*. 36 : 4, 793-808.

Dillard, H.R. and A.C. Cobb. 1994. Survival of *Colletotrichum lindemuthianum* in bean debris in New York State. *Plant Disease*. 77 : 12, 1233-1238.

Dwivedi, S.K. and S.K. Dwivedi. 1994. Post-harvest association of fungi with clusterbean seeds - *Micology*. *National Academy Science Letters - India*. 17 : 1-2, 9-12.

Egley, G.H. 1995. Substrate surface influences upon germination of *Colletotrichum truncatum* conidia. *Canadian Journal of Botany*. 71 : 12, 1758-1765.

Ellis, M.A. y G. E. Gálvez. 1980. Patología de la Semilla de Frijol. Problemas en la producción del frijol. C.I.A.T. Cali, Colombia. 301-315.

Fabre, J.V., J. Julien, D. Parisot and M. Dron. 1995. Analysis diverse isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* infecting common bean using molecular markers. *Mycological research*. 99 : 4, 429-435.

Freeman, S. and R. J. Rodríguez. 1995. Differentiation of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose of strawberry by arbitrarily primed PCR. *Mycological Research*. 99 : 4, 501-504.

Gabrielson, R.L. 1988. Inoculum thresholds of seedborne pathogens. *Fungi*. *Phytopathology*. 78 : 6, 868-872.

- Gross, Y. and J. Kigel. 1994. Differential sensitivity to high temperature of stages in the reproductive development of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Research*. 36 : 3, 201-212.
- Hugouviex, V., S. Centis, C. Lafitte and M.T. Esquerretugaye. 1995. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* endopolygalacturonase with molecular probes. 318 : 1, 113-120.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 1995. Anuario Estadístico del Estado de Zacatecas. Aguascalientes, Ags., México. 362 p.
- International Seed Testing Asociation (ISTA). 1976. International Roules for Seed Testing, Rules 1976. *Seed Science and Technology*. 1.4 - 1, 1-177.
- Irwin, J.A.G. 1987. Recent advances in the detection of seedborne pathogens. *Seed Science and Technology*. 15 : 3, 755-763.
- Jindal, K.K. and Thind, B.S. 1988. Seedborne micoflora of green gram. *Plant Disease Research*. 3 : 1, 5-10.
- Kozlowski, T.T. 1972. *Seed Biology*. Vol. III. Academic Press. New York, N.Y., U.S.A. 422 p.
- Kuan, T.L. 1988. Inoculum thresholds of seedborne pathogens. Overview. *Phytopathology*. 78 : 6. 867-868.

- Laciakova, A., A. Kocisova and D. Kukucka. 1995. Survival of microscopic filamentous fungi: under various conditions of temperature. *Veterinary Medicine*. 40 : 7. 233-235.
- Lima, E.F., J.M.F.C. Carvalho y L.P. Carvalho. 1988. Sobrevivencia de *Colletotrichum lindemuthianum* var. *cephalosporoides* em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* var. *latifolium*). *Fitopatologia Brasileira*. 13 : 3, 247-248.
- Malolepsza, U. and H. Urbanek. 1995. Changes in peroxidase activity in bean suspension cultures after *B. cinerea* and elicitor treatment. *Journal of Phytopathology*. 14 : 3, 314-322.
- Manandhar, J.B., G.L. Hartman and T.C. Wang. 1994. Semiselective medium for *Colletotrichum gleosporoides* and occurrence of three *Colletotrichum* spp on pepper plants. *Plant Disease*. 79 : 4, 376-379.
- McDonald, M.B. 1995. Seed lot potential : Viability, vigour and field performance. *Seed Science and Technology*, 22 : 3, 421-425.
- Megan, N. 1994. Early detection of fungi in stored grain. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 32 : 1-3, 145-160.
- Mims, C.W., E.A. Richardson, R.P. Clay and R.L. Nicholson. 1995. Ultrastructure of conidia and the conidium aging process in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum graminicola*. *International Journal of Plant Sciences*. 156 : 1, 9-18.

- Mohamed-Yasseen, Y., S.A. Barringer, W.E. Splittstoesser and S. Costanza. 1994. The Role of Seed Coats in Seed Viability. *Botanical Review*. 60 : 4, 426-439.
- Moreno, E. 1984. *Análisis Físico y Biológico de Semillas Agrícolas*. Instituto de Biología, U.N.A.M. México. 383 p.
- Naumova, E.S. and M.S. Obtempnaskaya. 1988. Modes of survival of the casual agent of *Peronospora manshurica* (Naum.) Syd., in the intervegetative period. *Mykologiya y Fitopatologiya*. 22 : 6, 500-502.
- Neergaard, P. 1979. *Seed Biology*. Vol. 1. The Macmillan Press LTD. London, G.B. 519 p.
- Ortega, J. (1995). Cell wall degrading enzymes produced by the phytopathogenic fungus *Colletotrichum gleosporoides*. *Texas Journal of Sciences*. 46 : 4, 329-335.
- Paul, M.C. and R.R. Mishra. 1994. Effect of fungal infestation on the starch, lipids and dry weight of maize seeds. *J. Food Sci. and Technology*. 31: 1, 52-54.
- Prasad, A. and Prasad, B.K. 1987. Seedborne fungi of stored lablab and their significance. *Indian Journal of Mycology and Plant Physiology*. 17 : 3, 262-266.
- Quiniones, S.S. and Dayan, M.P. 1985. Fungi associated with ipil-ipil (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit) seeds. *Sylvatrop*. 10 : 3, 143-161.

- Rajendra, P. and Chaudhary, K.C.B. 1987. Seed-borne mycoflora of lentil. *Lens Newsletter*. 14 1-2, 20-22.
- Richardson, M..J. 1979. *An Annotated List of Seed-Borne Diseases. Third Edition.* Commonwealth Agricultural Bureaux. London, U.K. 320 p.
- Russell, T.S. 1988. Inoculum thresholds of seedborne pathogens. Some aspects of sampling and statics in seed health testing and the establishment of threshold levels. *Phytopathology*. 78 : 6, 880-881.
- Samson, R.A. and J.C. Frisvad. 1994. New taxonomic approaches for identification of food-borne fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 32 : 1-3, 99-116.
- Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). 1994. *Normas para la Certificación de Semillas.* Dirección General de Agricultura. México. 91 p.
- Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). 1995. *El frijol bajo temporal en Zacatecas.* INIFAP, CIANOC, CAEZ. Folleto para productores No. 14.
- Shetty, S.A. and Shetty, H.S. 1988. Development and evaluation of methods for the detection of seed-borne fungi in rice. *Seed Science and Technology*. 16 : 3, 693-698.
- Singh, D.P. and Agarwal, V.K. 1987. Effect of grain mold infection on starch granules of sorghum. *Indian Journal of Plant Pathology*. 5 : 1, 26-28.

- Singh, N. and V. Singh. 1994. *Colletotrichum falcatum* race designation - A methodology. *Current Science*. 66 : 10, 777-779.
- Shivanna, M. B., and Shetty, H.S. 1988. Seed-borne nature and transmission of *Colletotrichum dematium* in cluster bean. *Seed Research*. 16 : 1, 102-104.
- Sinclair, J.B. 1974. The role of the seed coat in disease control of soybean. *Proc. 9th. Ann. Illinois Soybean Conference* 22. Illinois Crop Improvement Assn. Urbana, Ill., U.S.A.
- Tripathi, H.S., R.S. Singh and H.S. Chaube. 1988. Survival of *Ascochyta rabiei* in infected chickpea seed stored at different temperature. *Indian Journal of Micology and Plant Pathology*. 17 : 1, 98-99.
- Ulloa, M. y T. Herrera. 1994. *Etimología e Iconografía de Géneros de Hongos*. Cuadernos del Instituto de Biología No. 21. Primera Edición, U.N.A.M. 300 p.
- Valadez, E. 1986. Influencia de los pigmentos de la testa de las semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en la resistencia a *Pseudomonas syringae* var. *phaseolicola* y *Xanthomonas campestris* var. *phaseoli*. Tesis de Maestría Colegio de Postgraduados. Montecillos, México. 141 p.
- Vandeyze, A. and K. P. Pauls. 1994. The inheritance of seed colour and vernalization requirement in *Brassica napus* using double haploid populations. *Euphytica*. 74 : 1-2, 77-83.

- Vetter, J. 1995. Chemical composition of seeds and of testa of *Vicia faba* L. *Zeitschrift Fur Lebensmittel Forschung.* 200 : 3, 229-132.
- White, J.W. and C. Montes. 1994. The influence of temperature on seed germination in cultivars of common bean. *Journal of Experimental Botany.* 44 : 269, 1795-1800.
- Wojtaszek, P. and G.P. Bolwell. 1995. Secondary cell-wall-specific glycoprotein (s) from French bean hypocotyls. *Plant Physiology.* 108 : 3, 1001-1012.
- Wu, W.S. and Mathur, S.B. 1987. Evaluation of methods for detecting *Fusarium moniliforme* in sorghum seeds. *Seed Science and Technology.* 15 : 3, 821-829.
- Yang, C.M., J.C. Hsu and Y.R. Chen. (1995). Analysis of pigment-protein complexes in mungbean testa. *Plant Physiology and Biochemistry.* 33 : 2, 135-140.
- Yañez, E., I. Zacarías, M. Aguayo, M. Vásquez and E. Guzmán. 1995. , Nutritive value evaluated on rats of new cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris*) released in Chile. *Plant Foods for Human Nutrition.* 47 : 4, 301-307.