

MICROFLORA Y EFECTO DE METODOS DE
INOCULACION DEL COMPLEJO *Dicaporthe* SOBRE LA
GERMINACION DE VARIETADES DE SEMILLA
DE SOYA (*Glycine max.* L. Merrill.)

VIRGILIO MOJICA MARIN

T E S I S

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.

JULIO DE 1998

10116

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

SUBDIRECCION DE POSTGRADO

MICROFLORA Y EFECTO DE METODOS DE INOCULACIÓN DEL COMPLEJO
Diaporthe SOBRE LA GERMINACIÓN DE VARIEDADES DE SEMILLA DE SOYA
(*Glycine max.* L. Merrill.)

TESIS

POR

VIRGILIO MOJICA MARÍN

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

MAESTRO EN CIENCIAS EN
PARASITOLOGIA AGRICOLA

COMITE PARTICULAR

Asesor Principal: Abiel Sánchez Arizpe
M.C. Abiel Sánchez Arizpe

Asesor: Leticia Bustamante García
M.Sc. Leticia Bustamante García

Asesor: Emilio Padrón Corral
M.C. Emilio Padrón Corral

Asesor: Alberto Flores Olivas
M.C. Alberto Flores Olivas

Asesor: M. Elizabeth Galindo Cepeda
M.C. M. Elizabeth Galindo Cepeda

Asesor: Fernando Narváez Melo
Ph D. J.M. Fernando Narváez Melo

Dr. Jesús Manuel Fuentes Rodríguez
Subdirector de Postgrado

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme su apoyo en una de mis metas de superación profesional.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro que a través de su Departamento de Parasitología Agrícola recibí una sólida formación profesional y personal.

Al M.C. Abiel Sánchez Arizpe, uno de mis mejores maestros, quien me iniciara en la tarea de la investigación, además de la aportación de valiosos conocimientos científicos y por la confianza que depositó en mi para la realización del presente trabajo.

A la M.Sc. Leticia Bustamante García por sus invaluable aportaciones y acertadas sugerencias para el enriquecimiento de este trabajo.

A la M.C. Elizabeth Galindo Cepeda por su participación en el desarrollo y revisión de este trabajo, así mismo, por su disposición permanente en bien en mi superación profesional.

Al M.C. Alberto Flores Olivas por sus valiosas sugerencias, apoyo incondicional y motivación para seguir adelante.

Al M.C. Emilio Padrón Corral, por su participación en lo estadístico, y sus consejos para la realización del presente.

Al Ph. D. J.M. Fernando Narváez Melo por su valiosa colaboración en el presente, así como por su amistad brindada.

A mis maestros, compañeros y personal de los Departamentos de Parasitología Agrícola y Tecnología de Semillas con quienes conviví durante mis estudios de Postgrado.

A todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron en la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A DIOS Nuestro Señor

Por haberme guiado por el buen camino de la vida y permitirme gozar plenamente el más natural y arraigado anhelo del corazón humano, el cual es “ vivir ”

A mi Hijo, Alan Con amor , como ejemplo para que sea hombre de bien.

A mi esposa, Nancy Con amor, por el apoyo y comprensión que siempre me ha brindado, alentándome a superar con bien esta etapa de mi vida.

A la memoria de mi padre Sr. Virgilio Mojica Vera (†) Por haberme dado el mayor tesoro en este mundo “ La vida”

A mi madre Sra. María de Lourdes Marín Martínez, Por el gran amor que me has brindado durante todo este tiempo, por que aunque lejos, siempre has estado conmigo en todo momento y por ser un motivo y aliento para seguir superándome.

A mis hermanos Zulma, Lourdes, Gabriel, Adriana, Luis Manuel y Noé Por el valor que representa su presencia en mi vida.

A la Familia González Aguilar, Con amor y respeto de quienes siempre he recibido apoyo y considerarme un miembro más de la familia. Muchas Gracias.

COMPENDIO

MICROFLORA Y EFECTO DE METODOS DE INOCULACION DEL COMPLEJO
Diaporthe SOBRE LA GERMINACIÓN DE VARIEDADES DE SEMILLA DE SOYA
(*Glycine max.* L. Merrill).

POR

VIRGILIO MOJICA MARIN

MAESTRIA EN
PARASITOLOGIA AGRICOLA

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
Buenavista, Saltillo, Coahuila, Junio de 1998.

M.C. Abiel Sánchez Arizpe -Asesor-

Palabras Clave: *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*, Germinación, Incubación,
Inoculación, Infección, Microflora, Semillas, Soya.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la microflora presente en diferentes variedades de semilla de soya, así como determinar el efecto del complejo *Diaporthe / Phomopsis* bajo diferentes métodos de inoculación sobre la germinación de semilla. Esta investigación se realizó en laboratorios e invernadero de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, las variedades evaluadas fueron la

Huastecas-100, Huastecas-200, Júpiter, Santa Rosa, Tapachula-86 y UFV-1. Para este trabajo se utilizaron pruebas de sanidad teniendo como sustrato papa dextrosa agar y papel secante con Paraquat, y para germinación, emergencia e infección pruebas de laboratorio e invernadero. En la prueba de germinación estándar se encontró diferencia altamente significativa ($P < 0.01$) entre variedades, siendo las de mayor germinación la Huastecas-100, Tapachula-86 y la Júpiter. Al evaluar la germinación en los métodos de incubación se encontró diferencia altamente significativa ($P < 0.01$) entre los métodos de incubación, no encontrándose entre variedades, al igual que en la interacción métodos de incubación por variedades obteniendo la mayor germinación en los métodos normal e intervalos de luz. En lo referente a la microflora presente en semilla de soya, para hongos no se encontró diferencia significativa entre los métodos de incubación, variedades, ni en la interacción métodos de incubación por variedades. En bacterias se encontró alta diferencia significativa ($P < 0.01$) entre los métodos de incubación, no encontrándose en variedades, así como en la interacción métodos de incubación por variedades, siendo el método normal y el intervalos de luz donde se presentó la mayor incidencia de bacterias. Para el caso de actinomicetos se encontró diferencia altamente significativa ($P < 0.01$) entre métodos de incubación no encontrándose diferencia entre variedades ni en la interacción métodos de incubación por variedades, encontrándose en el método de incubación normal la mayor incidencia de actinomicetos. Los microorganismos obtenidos e identificados fueron, *Alternaria* sp; *Aspergillus flavus*; *Cercospora kikuchii*; *Chaetomium* sp; *Cladosporium* sp; *Fusarium* sp; *Macrophomina phaseolina*; *Nematospora coryli*; *Penicillium* sp; *Phomopsis sojae*; *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* y *Pseudomonas syringae*. Semilla de soya inoculada artificialmente con micelio y conidias

del complejo *Diaporthe*, el organismo causal del tizón de la vaina y tallo, se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre cantidades de semilla y altamente significativa ($P < 0.01$) en la interacción métodos de inoculación / cantidad de semilla, así como entre los métodos de inoculación. En los resultados de semilla infectada con *Diaporthe* se encontró diferencia altamente significativa ($P < 0.01$) entre cantidades de semilla, métodos de inoculación y en la interacción de estos.

ABSTRACT

MICROFLORA AND EFFECT OF INOCULATION METHODS OF *Diaporthe* COMPLEX ON THE SEED GERMINATION OF SOYBEAN VARIETIES. (*Glycine max.* L. Merrill).

By

VIRGILIO MOJICA MARIN

MASTER OF SCIENCE
AGRICULTURAL PARASITOLOGY

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

M.C. Abiel Sánchez Arizpe -Advisor-

Key words: *Diaporthe phaseolorum* , Germination, Incubation, Inoculation, Infection, Microflora, Soybean seeds.

The objective of this work was to determine the existing microflora in different varieties of soybean seeds, as well as determine the effect of *Diaporthe/Phomopsis* under different soybean seed germination inoculation methods. This research was carried out in laboratories and greenhouse of "Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro", the assemmed varieties were Huastecas-100, Huastecas-200, Júpiter, Santa Rosa,

Tapachula-86, and UFV-1. The health tests used for this work were incubation in dextrose agar potato and blotter paper with Paraquat, and for germination, laboratory and greenhouse tests as emergency and infection percentage. On the standar germination tests a highly significant difference was found ($P < 0.01$) among the varieties, Huastecas- 100, Tapachula-86 and Júpiter were those with higher germination. When the germination was assemmed in the incubation methods, a highly significant difference was found ($P < 0.01$) among the incubation methods, not found among the varieties, the same as in the incubation methods interaction by varieties obtaining the highest germination in normal methods and light intervals. In relation to the existing microflora in soybean seed no significant difference was found for fungi infection among incubating methods, varieties, nor in the interaction of incubating methods by varieties. In bacteria, a high significant difference was found among the incubating methods, not found in varieties, as well as the interaction of incubation methods by varieties, bacteria incidence was found in normal method and in light intervals. For the actinomycetes, a higly significant difference was found ($P < 0.01$) among incubation methods, and no difference among varieties nor in the interaction of incubation methods by varieties, higher incidence of actinimycetes was found in normal incubation method. The identified microorganisms were: *Alternaria* sp; *Aspergillus flavus*; *Cercospora kikucii*; *Chaetomium* sp; *Cladosporium* sp; *Fusarium* sp; *Macrophomina phaseolina*; *Nematospora coryli*; *Penicillium* sp. *Phomopsis sojae*; *Diaporthe phaseolorum* and *Pseudomonas glycinea*. Artificially inoculated soybean seed with mycelium and spores from *Diaporthe* complex was the organism which caused pod and stem blight, significant differences were found ($P < 0.05$) among seed quantities and

highly significant ($P < 0.01$) in the interaction of inoculation methods / seed quantity, as well as among the inoculation methods. In the *Diaporthe* infected seed, a highly significant difference was found ($P < 0.01$) among seed quantities, inoculation methods and the interaction.

INDICE DE CONTENIDO

	Página
INDICE DE CUADROS	xiii
INTRODUCCION.....	1
REVISION DE LITERATURA.....	3
Germinación como Atributo de Calidad.....	3
Concepto de Germinación.....	4
Requerimientos para la Germinación.....	5
Ensayo de Germinación.....	6
Enfermedades Portadas y/o Transmitidas en Semillas.....	8
Enfermedades Portadas y/o Transmitidas en Semilla de Soya.....	10
Enfermedades Fungosas Transmitidas por Semilla de Soya.....	12
Hongos Reportados en Semilla de Soya.....	14
Hongos de Almacén en Semilla de Soya.....	18
Enfermedades Bacterianas Transmitidas por Semilla de Soya.....	19
Bacterias Reportadas en Semilla de Soya.....	20
Importancia de las Pruebas de Sanidad.....	20
Objetivos de las Pruebas de Sanidad.....	21
Cuarentenas.....	22
Certificación.....	22
Evaluación de la Siembra de Muestras de Semilla.....	23
Recomendaciones para el Tratamiento de Semillas.....	23
Calidad de granos de Consumo Humano y Animal.....	23
<i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>sojae</i> el Tizón de la Vaina y Tallo.....	24
Síntomatología.....	24
Etiología.....	26
Ciclo de la Enfermedad y Epidemiología.....	28
Problemas en Germinación Potencial por <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>sojae</i>	30
MATERIALES Y METODOS.....	34
Localización del Sitio Experimental.....	34
Material Experimental.....	34
Ensayo de Semillas.....	35
Germinación Estándar.....	35
Detección de Microflora.....	36
Método de la Placa de Agar (Intervalos de Luz).....	36
Método de la Placa de Agar (Normal).....	37
Método del Papel Secante (Paraquat).....	37

Pruebas de Inoculación.....	38
Obtención del Inoculo.....	38
Método de Inoculación Aspersión (M.I.A.).....	38
Método de Inoculación Aspersión Alta Humedad Relativa (M.I.A.A.H.R.).....	39
Método de Inoculación Crecimiento Activo (M.I.C.A.).....	39
Método de Inoculación Testigo (M.I.T.).....	40
Diseño Experimental.....	40
RESULTADOS.....	44
Microflora.....	44
Inoculación con <i>Dps</i>	55
Infección de la Semilla con <i>Dps</i>	59
DISCUSION.....	63
CONCLUSIONES.....	67
RESUMEN.....	68
LITERATURA CITADA.....	71

INDICE DE CUADROS

Cuadro No.		Página
4.1	Análisis de Varianza de la Variable Capacidad de Germinación de Semilla de Diferentes Variedades de Soya. UAAAN, 1998	45
4.2	Comparación de Medias de la Variable Capacidad de Germinación de Semilla de Diferentes Variedades de Soya. UAAAN, 1998.....	45
4.3	Análisis de Varianza de la Variable Capacidad de Germinación de Semilla de Diferentes Variedades de Soya en Tres Métodos de Incubación. UAAAN, 1998.....	46
4.4	Comparación de Medias de la Variable Porcentaje de Germinación de Semilla de Soya en Diferentes Métodos de Incubación. UAAAN,1998.....	47
4.5	Comparación de Medias de la Variable Porcentaje de Germinación de diferentes Variedades de Semilla de Soya en Tres Métodos de Incubación. UAAAN, 1998.....	47
4.6	Análisis de Varianza de la Variable Porcentaje de Hongos en Semilla de Soya de Seis Variedades en Tres Métodos de Incubación. UAAAN, 1998.....	48
4.7	Comparación de Medias de la Variable Porcentaje de Hongos en Semilla de Soya en Diferentes Métodos de Incubación, UAAAN, 1998.....	48
4.8	Comparación de Medias de la Variable Porcentaje de Hongos de Diferentes Variedades de Semilla de Soya en Tres Métodos de Incubación. UAAAN, 1998.....	49
4.9	Resultados del Porcentaje de Infección e Identificación de la Microflora Total Presente en Semilla de Seis Variedades de Soya en Tres Métodos de Incubación, UAAAN, 1998.....	51
4.10	Análisis de Varianza de la Variable Porcentaje de Bacterias en Semilla de Soya de Seis Variedades en Tres Métodos de Incubación. UAAAN, 1998.....	52

4.11	Comparación de Medias de la Variable Porcentaje de Bacterias en Semilla de Soya en Diferentes Métodos de Incubación. UAAAN, 1998.....	52
4.12	Comparación de Medias de la Variable Porcentaje de Bacterias de Diferentes Variedades de Semilla de Soya en Tres Métodos de Incubación. UAAAN, 1998.....	53
4.13	Análisis de Varianza para el Porcentaje de Actinomicetos en Semilla de Soya de Seis Variedades en Tres Métodos de Incubación. UAAAN, 1998.....	54
4.14	Comparación de Medias de la Variable Porcentaje de Actinomicetos en Semilla de Soya en Diferentes Métodos de Incubación. UAAAN, 1998.....	54
4.15	Comparación de Medias de la Variable Porcentaje de Actinomicetos de Diferentes Variedades de Semilla de Soya en Tres Métodos de Incubación. UAAAN, 1998.....	55
4.16	Análisis de Varianza de el Porcentaje de Germinación de Siete Cantidades de Semilla de Soya en Cuatro Métodos de Inoculación con <i>D.p.s.</i> UAAAN, 1998.....	56
4.17	Comparación de Medias de la Variable Capacidad de Germinación de Diferentes Cantidades de Semilla de Soya en Cuatro Métodos de Inoculación. UAAAN, 1998.....	57
4.18	Comparación de Medias de la Variable Capacidad de Germinación en Semilla de Soya en Diferentes Métodos de Inoculación. UAAAN, 1998.....	57
4.19	Comparación de Medias de la Variable Capacidad de Germinación de Cantidades de Semilla / Métodos de Inoculación. UAAAN, 1998.....	58
4.20	Análisis de Varianza para el Porcentaje de Infección de Siete Cantidades de Semilla de Soya en Cuatro Métodos de Inoculación con <i>D.p.s.</i> UAAAN, 1998.....	59

4.21	Comparación de Medias de la Variable Porcentaje de Infección en Diferentes Cantidades de Semilla de Soya en Cuatro Métodos de Inoculación. UAAAN, 1998.....	60
4.22	Comparación de Medias de la Variable Porcentaje de Germinación de Semilla de Soya en Diferentes Métodos de Inoculación. UAAAN, 1998.....	61
4.23	Comparación de Medias de la Variable Porcentaje de Infección de Cantidades de Semilla / Métodos de Inoculación. UAAAN, 1998..	62

INTRODUCCION

La producción de semillas oleaginosas ocupa un importante lugar en la economía de varios países como Estados Unidos, Brasil, China, Argentina y Paraguay. Gracias a éstas se pueden elaborar una amplia gama de subproductos destinados a la alimentación humana y animal, además se pueden obtener materias primas para la industria como jabones, pinturas, lubricantes, esmaltes y otros más. Sin embargo, entre las oleaginosas existen algunas que tienen mayor ponderación en el total mundial, un ejemplo claro de este tipo de semillas es la soya, la que ocupa el primer lugar en producción mundial y en algunos países representa una importante fuente de ingresos para venta al exterior. La semilla de frijol soya, es la oleaginosa más importante en nuestro país. En el año de 1994 se cosechó una superficie promedio de 294 mil hectáreas con un rendimiento promedio de 582 mil toneladas (ASERCA 1997). Vinculada a una larga serie de cadenas de la industria alimentaria, sin embargo, la producción de esta semilla en los años noventa ha mostrado niveles de decremento significativos. Varios han sido los aspectos que han influido: falta de rentabilidad, ausencia de agua en algunas zonas productoras y problemas fitosanitarios que han provocado no sólo la reducción de volúmenes producidos, sino también un crecimiento de las importaciones en abastecimiento de la demanda interna. Las enfermedades de la soya y el efecto que tienen en la semilla deben ser controladas debido a que los microorganismos reducen el grado de comercialización de grano. El desarrollo de la infección de la semilla es importante, por que puede causar pérdidas directas,

expresadas en términos de producción y reducción de la calidad, y además reducen la germinación, tal es el caso de varios microorganismos y en especial *Diaporthe spp.*, el cual tiene un efecto perjudicial en germinación y emergencia. Al ser entonces los microorganismos patógenos un factor de gran importancia para el uso de semillas para siembra, ya sea que las semillas importadas tengan una sanidad dudosa o las producidas en el país en las regiones de producción de semilla de esta especie, resulten con niveles de infección por diferentes microorganismos, se hace necesario conocer los niveles de sanidad de lotes de semilla en el mercado, detectando la presencia de patógenos de importancia en este cultivo. Aunado a esto, actualmente no existen estudios que den a conocer el impacto de microorganismos a nivel nacional y a esto se le agrega la presión que está ejerciendo la asociación de semilleros para la introducción de semillas libres de patógenos del extranjero. En base a lo anterior se estableció un estudio detallado de laboratorio e invernadero para determinar la influencia de *Diaporthe phaseolorum var. sojae* sobre la germinación (emergencia) de semilla de soya, así como la detección de otros microorganismos presentes en la semilla, para ello los objetivos del presente trabajo son:

- Determinar la microflora presente en diferentes variedades de semilla de soya.
- Determinar el efecto del complejo *Diaporthe / Phomopsis* sobre la germinación de semilla de soya bajo diferentes métodos de inoculación.

REVISION DE LITERATURA

Germinación Como Atributo de Calidad.

La calidad de semillas no tiene una definición simple, y se le considera como la suma de todos aquellos atributos los cuales contribuyen al comportamiento de la semilla. Garay (1985) la define como un concepto múltiple, que comprende varios aspectos que se refieren a la utilidad de la semilla para siembra y que puede también expresarse como un nivel o grado de excelencia, el cual es alcanzado por la semilla solo cuando se compara con un nivel de calidad aceptable.

Así mismo se define la calidad de semillas como un conjunto de atributos deseables que posee una semilla o un lote de semillas, aumentando el número de estos en base al conocimiento y la tecnología disponible para determinarlos, como consecuencia, nuestro concepto de calidad de semilla seguirá evolucionando. No obstante, esta calidad involucra un número de factores diferentes que están incluidos en componentes de tipo genéticos, fisiológicos, sanitarios y características físicas. Bajo este concepto, la calidad de semillas y su potencial será cuando en la semilla estén contenidos todos y cada uno de los componentes a su máximo nivel (Sayers, 1982, Garay, 1985).

La semilla es un paquete de energía y de información, siendo el estado mínimo de entropía en el ciclo de las angiospermas y gimnospermas, y por el papel que juegan como unidad de reproducción, forma de supervivencia de las especies vegetales y por ser esenciales en el establecimiento de cultivos, es fundamental atender el proceso de germinación de las semillas para obtener la producción máxima de los cultivos, especialmente ahora que existe un gran desbalance entre la producción de alimentos y el crecimiento demográfico (Copeland y McDonald, 1985). De ahí que el factor de germinación o atributo más antiguo, sigue siendo el principal criterio de calidad de lotes de semilla.

Scott y Aldrich (1975), indican que la elevada calidad de las semillas de soya es un factor tan importante para la obtención de ganancias como lo es en los demás cultivos. Muchos estudios de germinación han demostrado que entre el 25 y el 50 por ciento de las semillas de soya sembradas es deficiente en uno o más factores de calidad, esto por ser la semilla de soya una especie de longevidad baja o muy susceptible al deterioro.

Concepto de Germinación

Varias definiciones sobre germinación de semillas han sido propuestas, siendo de gran importancia entender sus distinciones, los Botánicos la definen como la emergencia de la radícula a través de la cubierta de la semilla (Bidwel, 1979); también Berlyn (1972) la define como una serie secuencial de eventos morfogenéticos, que resultan de la transformación del embrión en plántula; en donde se involucra división y expansión

celular y la formación de órganos como hojas, tallos y raíces. El proceso de germinación presenta en secuencia las etapas de imbibición, hidratación de enzimas hidrolíticas y sintéticas, división y alargamiento celular, presión de la radícula o la plúmula sobre el tegumento y su emergencia a través de éste (Sivori *et al.* 1980).

Sin embargo en tecnología de semillas la Asociación de Analistas Oficiales de Semillas (AOSA, 1973) define la germinación como la emergencia y desarrollo a partir del embrión de aquellas estructuras esenciales, que por clase de semilla son indicadoras de la habilidad para producir una planta normal bajo condiciones favorables.

Así mismo la Asociación Internacional para el Ensayo de Semillas (ISTA) define la germinación en el laboratorio como la emergencia y desarrollo de las estructuras esenciales del embrión a un nivel tal que manifiesta la habilidad de la semilla para desarrollarse a una planta normal en condiciones favorables (ISTA, 1985).

Requerimientos para la Germinación.

Knapp (1988) cita algunos factores que afectan la germinación de la semilla y el desarrollo de la plántula tales como: especie, variedad, madurez de la semilla y el medio ambiente. Asimismo Sivori *et al.* (1980) enumeran todos aquellos factores tanto intrínsecos como extrínsecos que regulan la germinación los cuales son: temperatura, luz, relaciones hídricas, características de los tegumentos, composición de la fase gaseosa, factores químicos exógenos y endógenos así como la viabilidad.

Para que una semilla germine debe colocarse bajo condiciones ambientales favorables para este proceso, así Berlyn (1972) menciona que las condiciones requeridas son: un adecuado suplemento de agua, temperatura y composición gaseosa de la atmósfera, así como luz para ciertas especies; también menciona que los requerimientos de estas condiciones varían de acuerdo a las especies y variedad.

Ensayo de Germinación

El objetivo del ensayo de germinación, es obtener información con respecto al valor de las semillas para su siembra en campo y producción de plántulas normales, asimismo proporciona información que permite comparar el poder germinativo de diferentes lotes de semillas (ISTA, 1985).

Esta prueba se ha aceptado y se utiliza universalmente para determinar la calidad fisiológica de un lote de semillas; por lo que este ensayo se diseñó para medir el máximo potencial de viabilidad de las semillas (Sayers, 1982).

Cuando se prueba la germinación bajo condiciones de campo, normalmente los resultados no son satisfactorios al no obtenerse la confiabilidad y repetibilidad entre éstos; razón por la cual los métodos de laboratorio intentan controlar todas las condiciones externas que permitan lograr una regular, rápida y completa germinación de una determinada muestra de semillas (ISTA, 1985).

Para medir la viabilidad de las semillas la prueba de germinación estándar es sin duda la más comúnmente usada, esto ha sido aceptado universalmente y es realizado como una prueba de rutina en la mayoría de las empresas productoras de semillas y utilizado como un estimador universal de calidad de semillas. Sin embargo, esta prueba tiene ciertas limitaciones ya reconocidas. Una de estas limitaciones es el tiempo relativamente largo que se requiere para conocer los resultados.

Delouche *et al.*, (1971) menciona que el tiempo que una semilla requiere para germinar es de considerable importancia y que algunas semillas requieren mínimo cinco días para completar la prueba, mientras que otras como especies de zacate requieren 42 días para completar el ensayo. La reducción del tiempo requerido para las pruebas sería deseable a través del uso de pruebas químicas, aceleración de la germinación y otro medio que nos reporte resultados rápidos y confiables.

Un sistema de producción de semilla, una rápida obtención de la viabilidad de semillas es de fundamental importancia en la cosecha, recepción y en otras etapas de la producción y beneficio de semillas.

Las asociaciones de análisis de semillas han dedicado mucho tiempo y esfuerzo para identificar la temperatura, luz, humedad y métodos de laboratorio que puedan proporcionar la máxima germinación de un gran número de semillas. También se han establecido criterios para evaluar las plántulas al final de un período y así determinar si poseen las estructuras necesarias para producir plántulas normales.

Enfermedades Portadas y/o Transmitidas en Semillas

La contaminación por patógenos, por lo general, no alcanza un porcentaje muy elevado en la semilla verdadera, pero aun que esto varía mucho según el cultivo y la enfermedad; un porcentaje muy bajo de semilla infectada puede significar una fuente de inóculo primario suficiente para servir de base para una epifitias severa, ya que los propágulos del patógeno van directamente asociados con el hospedante susceptible y se favorecen con las mismas condiciones que influyen en la viabilidad de las semillas. (González 1989).

Una lista de enfermedades transmitidas por semilla tiene registrados alrededor de 1500 microorganismos de semillas en cerca de 600 géneros en cultivos agrícolas. Desde el punto de vista de plantas cuarentenadas, las estadísticas no exageran la magnitud de los problemas envueltos en controlar el movimiento de microorganismos transmitidos por semilla en las áreas donde previamente no han estado presentes. Las cifras pueden ser engañosas, no obstante la extensa estimación de microorganismos transmitidos por semilla como problemas cuando la semilla es producida por el establecimiento de áreas de producción de cultivos donde los microorganismos han estado presentes (McGee, 1981).

Muchos hongos, bacterias, y virus patógenos se transmiten en o con las semillas usadas por los agricultores para la siembra; estos patógenos pueden sobrevivir por largos períodos de tiempo y pueden infectar y destruir la germinación de las plántulas o sobrevivir como epifitias en el desarrollo de la planta, esperando condiciones ambientales

favorables para la infección durante la fenología del cultivo. Estos patógenos pueden ~~infectar en almacén, emergencia y vigor de las semillas~~ y plantas en el campo (Schwartz *et. al.*, 1978).

Comercialmente, los microorganismos de semillas reducen la calidad del grano en almacén causando reducción de tamaño, distorsiones, semillas encogidas, decoloradas y manchadas. Estos signos y síntomas patogénicos son muy comunes en las semillas, las cuales son definidas en términos fitopatológicos por Sinclair en 1979, como un microcosmos de microbios, con el potencial para llevar una amplia variedad de hongos, bacterias, virus y nemátodos, los cuales pueden causar enfermedades en semillas o plántulas (Sinclair y Dhingra ,1979).

Para tener una perspectiva de los aspectos de enfermedades de las semillas, los microorganismos de estas pueden considerarse bajo cuatro clases: Uno consiste en patógenos para los cuales la semilla es el principal punto de inóculo; otra clase consiste de patógenos importantes que están en ellas, pero en los cuales la fase de enfermedad en la semilla es de menor significancia como punto de inóculo; el tercero y más grande grupo de organismos de semillas son los que nunca muestran causa de la enfermedad como resultado de su presencia en las semillas; finalmente se encuentra un grupo de microorganismos que pueden infectar semillas en campo o almacén causando reducción de la calidad en campo y almacenamiento de semillas (McGee, 1981).

Enfermedades portadas y/o transmitidas en semilla de soya.

Todas las partes de la planta de soya son susceptibles a numerosos patógenos, los cuales reducen la calidad y/o cantidad de semilla cosechada. Short *et al.* (1981), cita que las pérdidas en la calidad y producción de semillas puede ser causada por microorganismos que afectan a las semillas de soya.

Cerca de 100 patógenos conocidos afectan este cultivo, de los cuales alrededor de 35 son de importancia económica. Generalmente una o más enfermedades pueden ser encontradas en cualquier área donde se cultiva esta especie. (Sinclair y Shurtleff, 1975)

La pérdida de producción estimada en soya debido a enfermedades son consideradas comúnmente, en lo siguiente: 9.8 por ciento hongos; 0.1 por ciento bacterias, 0.2 por ciento por virus y 4.8 por ciento por nématodos dando un total de pérdidas de 14.9 por ciento (Ploper, 1982)

Las semillas de soya antes de la cosecha pueden ser invadidas por varios microorganismos que pueden reducir la calidad y la viabilidad de las semillas. Algunos microorganismos causan serias pérdidas durante la estación de crecimiento. La infección de la semilla también puede actuar como medio de sobrevivencia de microorganismos, algunos patógenos pueden permanecer viables largamente en las semillas durante el almacenamiento. La infección de la semilla puede resultar en grandes rangos de deseminación del patógeno resultado en introducción de inóculo primario dentro

de áreas donde el patógeno previamente estaba ausente. Las semillas pueden ser infectadas en un tiempo durante otros desarrollos dependiendo de el patógeno involucrado (Jordan *et al.*, 1992).

Todas las poblaciones de semilla de soya potencialmente transportan una gran variedad de microorganismos, este potencial microcósmico incluye hongos y bacterias, algunos de los cuales pueden causar enfermedades en plantas y semillas, poblaciones de semillas y semillas individuales dentro de una población pueden variar con el tiempo, en el tipo y número de microorganismos que sean transportados (Sinclair, 1993).

Las enfermedades que atacan a la soya, incluyen hongos, bacterias y virus, que estos pueden bajar la calidad de semillas, causando diversos síntomas, tales como absorción, semillas arrugadas, semillas podridas, esclerotización, necrosis, decoloración (Sinclair, 1993), reducción o eliminación de la capacidad de germinación y otras alteraciones (Neergaard, 1979).

Sinclair (1993) cita una lista con mas de 40 bacterias, hongos y virus, que causan decoloración y que pueden afectar las semillas de soya, 15 son de mayor importancia economica.

Las enfermedades de la soya pueden clasificarse como infecciosas y no infecciosas. Infecciosas son causadas por agentes capaces de transmitir de una planta infectada a una planta sana y causando una enfermedad bajo condiciones favorables.

Enfermedades infecciosas son causadas por hongos, bacterias, virus y nemátodos. Las enfermedades no infecciosas son causadas por una variedad de condiciones ambientales no favorables, nutricionales y otras condiciones (McGee, 1981).

Enfermedades Fungosas Transmitidas por Semillas de Soya

Los hongos invaden la cubierta de las semillas. La penetración y colonización de semillas de soya puede variar o estar influenciada por factores, como fechas de siembra (Kilpatrick, 1955), fechas de cosecha, localización geográfica (Tenne *et al.*, 1974), condiciones climáticas (Roy y abney, 1976, 1977), y susceptibilidad del cultivo al patógeno. En general, el hongo se presenta más frecuentemente en semillas de maduración precoz en cultivares cuando las temperaturas son favorables para la infección (Sinclair, 1982).

Muchas clases de semillas hospedan una gran variedad de microflora, especialmente hongos, los cuales forman el mayor grupo de patógenos que pueden estar o ser transmitidos por semillas (Agarwal y Sinclair, 1987).

Existen alrededor de 100,000 especies de hongos descritos, de los cuales más de 8,000 son patógenos de plantas (Agarwal y Sinclair, 1987).

Mas de 30 hongos citados como transmitidos en semilla de soya, rango de patógenos mayores de la semilla no patógenos. Varios hongos patógenos de la soya,

aunque asociados a la semilla, algunas veces no pueden actuar como tales si las condiciones ambientales no son favorables (Sinclair, 1991).

No menos de 19 hongos patógenos causan infección latente en la semilla de soya (Sinclair, 1991). Estudios recientes de nueve géneros de hongos presentes en la semilla de soya reportan solamente a *Phomopsis* y *Fusarium* spp. Como asociados con la reducción de la viabilidad de las semillas de esta especie. Un buen número de hongos tienen efectos perjudiciales en semillas, algunos organismos de esta clase pueden tener factores benéficos, como interacciones entre hongos en semillas de soya, puede ser posible manipular el control de los hongos patógenos (McGee et al., 1980).

Los hongos de semillas pueden ser divididos convenientemente en dos grupos que son los hongos de campo y almacén. Las semillas de soya son normalmente almacenadas aproximadamente seis meses antes de ser llevadas al campo, el inóculo de hongos de almacén están universalmente presentes, ellos producen esporas en gran número y su apariencia en semilla almacenada es un signo de deterioro en la calidad de la misma (Kennedy, 1964, Chistensen y Kufman, 1965, Williams y McDonald, 1983).

La presencia de hongos no patógenos en los lotes de semillas pueden causar una considerable confusión en el seguimiento de la prueba de germinación. Las condiciones ambientales durante la prueba usualmente incluyen alta humedad y alta temperatura, permitiendo un rápido crecimiento de hongos como *Rhizopus* y *Aspergillus* en la semilla

que tienden a una exageración de la cantidad de contaminación en los lotes de semillas (McGee, 1981).

Hongos Reportados en semilla de Soya

Diaporthe phaseolorum var. *sojae* (*P. sojae*). Es uno de los hongos más importantes que contribuyen a la baja calidad de la semilla, las semillas infectadas pueden no mostrar síntomas o tienen poco daño, arrugadas, y de poco peso, algunas semillas generalmente no germinan. Si la germinación ocurre, las plántulas no son vigorosas y sirven como fuente de inóculo para el desarrollo de la enfermedad más adelante en el ciclo. La infección de la semilla se incrementa cuando la cosecha se retarda por factores ambientales de humedad. Esto es una correlación inversa entre la ocurrencia de *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* en las semillas y germinación (Sinclair, 1982).

Cercospora kikuchii reduce la calidad de la semilla por impartir una decoloración rosa a púrpura intenso en la cubierta de la semilla y reduce la germinación. Algunas semillas se encuentran comúnmente sin brillo y la cubierta de la semilla es agrietada. La germinación de la semilla puede ser altamente reducida, después semillas infectadas germinan, los hongos invaden y colonizan los cotiledones, esporulando y la infección se esparce a las hojas, tallos y vainas. Esto es una evidencia de que la penetración directa en semilla produce drásticamente la reducción en la germinación (Roy y Abney, 1977).

Peronospora manchurica. Forman poderosas incrustaciones de micelio y oosporas en semillas, que imparten una apariencia blanco lechosa. El micelio se encuentra en varias capas de células de la cubierta de la semilla. Semillas infectadas pueden reducir la germinación o producir algunas infecciones sistémicas en las plántulas de soya (Riggle y Dunleary, 1974).

Colletotrichum dematium var. *truncata* (*C. truncatum*). La semilla infectada puede no mostrar síntomas o es expresada como pequeñas, áreas grises irregulares o pudiendo ser rugosas. Las semillas infectadas pueden no completar la germinación o si germinan, producen plántulas infectadas. La fase de antracnosis puede desarrollarse en un estado de crecimiento de la planta, pero es más serio en la formación de vainas (Kunwar et al., 1985).

Macrophomina phaseolina (Syn. *M. phaseoli*, *Rhizoctonia batycola*) produce síntomas similares a los de *C. dematium* var. *truncata*. La germinación de semillas es reducida en suelo a temperaturas arriba de 30°C. La emergencia de plántulas pueden no mostrar síntomas de plántulas atizonadas, pudrición de collar o pudrición de raíz sola o en combinación (Sinclair, 1982).

Myrothecium roridum causa pudrición de la semilla y tizón de las plántulas emergidas. Las plántulas pueden marchitarse si las condiciones son favorables para el desarrollo de la enfermedad. El hongo es considerado como una amenaza potencial en la India y este fue introducido en semillas importadas (Sinclair, 1982).

Aspergillus flavus causa el deterioro en semillas de soya con alta humedad en almacén. *Aspergillus flavus* produce aflatoxinas en algunas semillas, pero estas no parecen ser un problema en soya. Los hongos pueden reducirse colocándolos en suelos con altas temperaturas (Sinclair, 1982).

Aspergillus melleus reportado de semillas cultivadas en Luisiana. Reduce la germinación y emergencia de plántulas, desarrolla síntomas de tizón, *Penicillium* ha dado muestras que causa enfermedades cuando han inoculado plántulas de soya (Harris y Ellett, 1945)

Fusarium especies incluyendo *F. equiseti*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. semitectum*, y *F. solani* han sido reportados como hongos de semilla transportados internamente en semilla de soya. Las semillas infectadas generalmente no germinan o las plántulas presentan pudrición de raíz y muestran síntomas de marchitamiento. Altas incidencias de infección por spp. *Fusarium* se han encontrado en ciertos lotes de semillas del suroeste de los Estados Unidos (French y Kennedy, 1963).

Rhizoctonia solani es transmitido por semilla a una extensión muy limitada. Las semillas infectadas pueden no germinar, o si emergen, estas plántulas se secan o se pudre la raíz (Tachibana *et al.*, 1971).

Sinclair (1982) menciona otras enfermedades causadas por hongos que son transmitidos en semilla de soya y pueden reducir la germinación entre estos se incluyen :

Alternaria longissima

A. tenuis

Cercospora sojina

Chaetomium brassiliense

C. erectum

Chaetophoma sp.

Cladosporium sp.

Curvularia lunata

Drechslera tetramera

Epicoccum purpurascens

Helminthosporium sp.

Monilia sp.

Nigrospora oryzae

Penicillium sp.

Pestalotiota sp.

Philophora gregata

Phoma sp.

Pillostica sp.

Rhizopus nigricans

Sclerotium rolfsii

ñ *Stemphylium* sp.

Thielaviopsis basicola

Verticillium cinnabarinum

Verticillium sp.

Hongos de Almacén en Semilla de Soya

No es conveniente almacenar la semilla de soya con un alto contenido de humedad o con altas temperaturas y humedad relativa, ya que hay una pérdida de viabilidad por la invasión de hongos de almacén y calor espontáneo de las semillas. El contenido de humedad de soya almacenada a un contenido de humedad del 11 por ciento o superior bajo alta humedad relativa (60 por ciento o más) es incrementada. Las semillas son invadidas por hongos de almacén (Tekrony *et al.*, 1983).

La soya con un contenido de humedad original de 6 a 7 por ciento, y al almacenarse a una humedad relativa del 93 por ciento puede alcanzar un nivel de humedad de 17 por ciento en 74 días y 22 por ciento en 150 días. Si el aire húmedo circula alrededor de las semillas, la humedad puede llegar 20 por ciento dentro de 49 días. Los altos niveles de humedad, calor espontáneo y temperaturas circundantes pueden llegar de 50 a 55° C. Alta humedad (arriba de 18 por ciento) y niveles de temperaturas, casi todas las semillas pueden infectarse con hongos de almacén (Tekrony *et al.*, 1983).

Además Sinclair y Shurtleff (1975) reportan que los siguientes géneros son más frecuentemente asociados con pérdidas en la viabilidad de las semillas: *Alternaria*,

Aspergillus, *Penicillium*, y *Rhizopus*. Semillas que germinan producen plántulas atrofiadas, con cotiledones deteriorados y plúmulas con gran reducción en crecimiento. Pérdidas en almacén pueden ser prevenidos por niveles de humedad de la semilla manteniéndolos entre 10 a 13 por ciento, bajas temperaturas de almacén (5°C) y baja humedad relativa (abajo del 40 por ciento)

Enfermedades Bacterianas Transmitidas por Semilla de Soya

En la naturaleza existe un gran número de bacterias, con cerca de 200 especies conocidas como causantes de enfermedades de plantas. De estos cinco géneros de bacterias, son transmitidas por semillas de soya (Agarwal y Sinclair 1987); (Nicholson y Sinclair, 1971)

Las bacterias en las semillas de soya pueden disminuir la calidad reduciendo la germinación y emergencia, como *Bacillus* sp. Esta puede reducir la germinación particularmente en suelos a temperaturas de 30°C a superiores. Pérdidas de sitios completos han sido reportados en algunos países tropicales cuando las temperaturas del suelo exceden 25°C en el tiempo de siembra, tal es el caso de *Pseudomonas glycinea* el agente causal del tizón bacteriano, puede reducir la germinación y emergencia. Transmitiéndose por semilla puede ser una fuente de inóculo primario de tizón en el campo y en este sentido han sido reportadas como algunos de los causantes de estos problemas (Sinclair y Shurtleff, 1975).

Nicholson *et al.*, (1973), demuestran que *Pseudomonas glycine* provocaron reducción de germinación *in vitro* de semillas de soya cosechadas en cinco estados del sur de E.U.A.

Bacterias Reportadas en Semilla de Soya

Dentro de algunas otras bacterias que se han reportado como portadas en semillas de soya se encuentran las siguientes: *P. tabaci*, *P. solanacearum*, *P. siringae*, *Xanthomonas phaseoli* var. *sojensis*, *X. campestris* pv. *glycine*, *Corynebacterium flaccumfaciens*, Sinclair y Shurtleff (1975); Copeland y McDonald (1985); Agarwal y Sinclair (1987); Nicholson y Sinclair *et al.*, (1973).

Importancia de las Pruebas de Sanidad

En muchas partes del mundo, las pruebas de sanidad para enfermedades de semillas forman parte integral de la inspección de rutina para la calidad de semillas. Sin embargo, en Norte América, las pruebas patológicas no son tan importantes como las pruebas de pureza y germinación (Copeland y McDonald, 1985).

La importancia de los patógenos de las semillas radica en la calidad de las semillas certificadas para la siembra por muchos ensayos dedicados a esto en los procedimientos de la Asociación Internacional de Pruebas de Semillas (Cristensen, 1965).

Más de un método puede estar disponible para la detección de un patógeno de semillas en particular. La selección de un método depende de el propósito de las pruebas que pueden ser la certificación, tratamiento químico o cuarentena etc. En general el método debe ser simple y rápido y los resultados deben de ser reproducibles. En suma, los resultados deben ser confiables con respecto a la función en campo. Las características de infección de un patógeno deben ser reconocidas con facilidad y certeza (Agarwal y Sinclair, 1987)

Los métodos para detección de microorganismos y virus va desde la simple observación visual hasta sofisticadas técnicas tales como microscopia electrónica y serología y Métodos moleculares.

Dentro de las pruebas de sanidad y que son específicas para la detección de hongos en semilla de soya se tienen las siguientes:

Observación de semillas secas; Observación de semillas remojadas; Método de semillas lavadas; Métodos de incubación como papel secante y placa de agar; Prueba de síntomas en plántulas; Pruebas histopatológicas etc.

Así mismo bacterias puede citarse las siguientes:

Examen visual de semillas secas; Aislamiento en medio agar; Prueba de sintomatología de plántulas; Pruebas de infectividad; Pruebas de serología; Método del bacteriófago etc.

Los objetivos de las pruebas de sanidad para todo tipo de microorganismos son las siguientes, Neegaard (1979), Agarwal y Sinclair (1987) :

Cuarentenas

Las semillas para colección de germoplasmas traídas de diversas zonas agroclimáticas, que se intercambian entre países para mejorar el material genético local. Con este intercambio es probable que se introduzcan nuevos patógenos o nuevas razas de patógenos nativos, los cuales pueden infectar cultivos locales. Las pruebas de semillas las hacen las Oficinas Internacionales de Cuarentenas de Plantas para Peligro y Riesgo de Patógenos. Estas pruebas pueden ser complejas por que las semillas frecuentemente se tratan en los países exportadores antes de exportar. Es difícil la detección de infección por métodos convencionales en semillas tratadas.

Certificación

La certificación de muestras de semillas, relativamente libres de patógenos es una garantía tan importante como un criterio para alta calidad de semillas. En el presente, la detección de solo unos pocos patógenos es parte de los programas de certificación de semillas en muchos países. Esto es debido, en parte, a la falta de una correcta documentación de las reglas de infección de semillas en el desarrollo de enfermedades o disponibilidad de métodos de pruebas rutinarios.

Evaluación del valor de la siembra de muestras de semillas

Un número de patógenos de plantas se transmite por semillas. Detectando la presencia o ausencia de microorganismos y virus, pueden ayudar en la predicción de la función en campo de las muestras de semillas relativo a la emergencia y subsecuente desarrollo de enfermedades. Las muestras de semillas excesivamente infectadas o infestadas pueden ser rechazadas para la plantación después de que las pruebas de sanidad de semillas se completan.

Recomendaciones para el tratamiento de semillas

Los resultados de una prueba presenta tres posibilidades: (uno) la semilla es conveniente para sembrar sin tratamiento; (dos) las semillas pueden ser usadas después de acuerdo al tratamiento prescrito; (tres) las semillas sean inapropiadas para sembrar.

Calidad de granos para consumo humano y animal

La invasión por hongos de almacén, pueden llevar a una producción de toxinas asociadas con semillas de ciertos cultivos. Las pruebas de sanidad de semillas detectan la presencia o ausencia de hongos productores de toxinas en semillas, las cuales podrían reducir el riesgo al usar lotes de semillas contaminadas como alimento para ganado y humano.

***Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* el Tizón de la Vaina y Tallo**

Diaporthe phaseolorum (Cke Ell.) var.*sojae* Wehm. Es una de las varias enfermedades ubicuas de la soya causadas por miembros del complejo *Diaporthe / Phomopsis*. Aunque todos los miembros del complejo son transmitidos por semilla de soya, la causa de la pudrición de la semilla por *phomopsis* es *P. longicolla* W. Hobbs. Este complejo probablemente ha sido estudiado más enteramente que muchas otras enfermedades de semillas de leguminosas causadas por hongos de campo (Hobbs *et al.*, 1985)

Sintomatología

Las infecciones ocurren en los tallos, pecíolos, vainas y semillas, y frecuentemente en hojas, la enfermedad aparece usualmente primero en los pecíolos de las hojas bajas y en ramas bajas quebradas durante los períodos de lluvia y días lluviosos en el estado de formación de vainas más tarde. Gran número de picnidios del hongo se desarrollan mejor en la porción baja del tallo principal ramas y vainas hasta completar la madurez. Los tallos pueden ser totalmente cubiertos con puntitos de diferente tamaño, picnidios usualmente en un arreglo linear, o pueden ser limitados a pequeños lunares, generalmente en los nudos (Kulik, 1984)

Bajo condiciones de campo, no es definitivo la producción de lesiones en los tallos. En las estaciones lluviosas , aparecen simultáneamente en toda la planta, en

contraste cuando no hay agua, se limita en áreas de los tallos cerca del suelo y son generalmente racimos cerrados en los nudos. Los picnidios también son fuente de dispersión en seco, pobremente desarrollando en vainas. No todas las vainas infectadas producen picnidios (Hepperly y Sinclair, 1978).

Las semillas muy infectadas estarán muy agrietadas, quebradizas y frecuentemente pueden estar cubiertas total o parcialmente con micelio blanco. Aun así las semillas altamente infectadas frecuentemente tienen un tamaño y apariencia normal. Las semillas infectadas generalmente no germinan. Las lesiones en cotiledones de plantas, provienen de semillas infectadas, variando en los colores de las lesiones de rojo brillante a pardo y tamaño de punta de alfiler y algunas veces cubriendo todo el cotiledón. La semilla cubierta en tales cotiledones frecuentemente puede infectar a la semilla en la emergencia, grandes discos de color rojo castaño en línea, menores de 1.5 cm de longitud, se presentan en el hipocotilo o bajo el suelo (Nicholson *et al.*, 1972).

La semilla viable infectada puede ser la más importante, por que semillas infectadas muertas usualmente son visibles, se encogen y son fácilmente removibles por equipo de acondicionamiento, por otro lado la semilla viable infectada raramente muestra síntomas de la enfermedad y es normal en tamaño, para pruebas de sanidad se necesita una prueba sencilla para detectar este patógeno (Garzonio y McGee, 1983).

En las hojas se desarrollan lesiones no discretas, la infección se puede iniciar en una pequeña porción de las hojas, la infección usualmente se inicia en el margen

de las hojas y progresivamente alrededor del pecíolo hasta que las hojas son aniquiladas.

Etiología

Diaporthe phaseolorum (Cke. y Ell) var. *sojae* Wehm. (Syn. *D. sojae* Leh.); estado imperfecto *Phomopsis sojae* Leh. Los picnidios se desarrollan bajo la epidermis del hospedero en grupos compactos de estromas negros, el tamaño y la forma depende del largo de el órgano de la planta cuando ella se desarrolla en el tallo esto es más o menos en una forma general (Sinclair, 1982).

Mientras que en vainas son casi esféricos, y en las hojas isodiamétricas, picnidios generalmente varían en tamaño de 82 a 225 x 82 a 375 μ m en vainas y tallos en hojas de 120 a 180 x 135 a 240 μ m.. Picnidios de 385 x 542 μ m han sido reportados. El mayor número de picnidios son simples con una cavidad por picnidio y ha sido fundamentado cada cavidad con un ostiolo (Ellet y Schmitthenner, 1974).

Las conidias son cortas, delgadas, cónicas y hialinas, conidioforos unicelulares dentro de la cavidad del picnidio. Las conidias se liberan continuamente por el ostiolo durante períodos de alta humedad y acumulándose en masas blanquecinas en el pico del picnidio. Las conidias son unicelulares, hialinas y ensanchadas y rectas, fusiformes-elípticas, comúnmente redondeadas en un en un extremo, y miden de 4.9 a 9.8 x 1.7 a 3.2 μ m. Las conidias son capaces de soportar severas desecaciones formando un exudado masoso lechoso (Sinclair, 1982).

El estado peritecial es formado frecuentemente en mayor o menor grado que el estado picnidial en maduración de los tallos, *D.p.s.* es heterotálico, peritecios maduros son esféricos, ligeramente aplanados en la base y miden 48 a 282 x 185 a 346 μm . El peritecio puede ser alargado, midiendo de 60 a 142 μm de largo y en la base hacia arriba 1,5 μm de longitud y se encuentran en un estroma negro en los tejidos corticales (Welch y Gilman, 1948).

Las cavidades periteciales contienen un gran número de ascosporas, sesiles, elongadas, clavadas y de alta esporulación (35 a 51 x 3.3 a 10 μm). La liberación de las ascosporas sucede cuando el asca se rompe fuera de la pared del peritecio o fuera de las paredes desintegradas. Las esporas son llevadas en fluidos viscosos con escurrimientos fuera del ostiolo (Kulik, 1984).

Las ascosporas son hialinas, uni septadas, elípticas, redondeadas en los extremos ligeramente estrechas en el septo, bicatenuladas en cada célula y miden de 9 a 13 x 2 a 6 μm , pueden germinar por un gran tubo germinativo que generalmente empuja cerca en el extremo de la célula (Hobbs *et al.*, 1985).

Diaporthe phaseolorum var. *sojae* se desarrolla en papa dextrosa agar a un pH de 6 y a una temperatura de 28°C, produciendo densas hifas blancas y septadas, el micelio es inicialmente compacto, y se desarrollan más tarde. Así mismo se desarrollan en el cultivo negros estromas de varios tamaños y formas. Este hongo rara vez produce picnidios y picnidiosporas en tallos y pecíolos de soja incubados. La luz es requerida

Para el desarrollo de picnidios. No se desarrollan peritecios consistentemente igual con pares de cultivos de ascosporas u otras manipulaciones (Jensen, 1983).

Ciclo de la Enfermedad y Epidemiología

El inóculo primario proviene de micelio, picnidios y peritecios en residuos de cosecha en el campo y del hongo hospedado en semillas infectadas *D.p.s.*, fácilmente coloniza plantas hospederas de muchos cultivos incluyendo frijol, frijol lima, garbanzo, cacahuete, okra, cebolla , chile y Tomate. (Sinclair, 1982).

Las semillas enfermas son muy importantes como fuente de inóculo primario por su gran rango de diseminación. Las semillas son invadidas en un tiempo después de la formación de vainas y la infección es incrementada grandemente por retraso de la cosecha de la maduración del grano por lluvias y humedad ambiental (Short et al., 1981).

Diaporthe puede infectar partes vegetativas de la planta en un tiempo durante el tiempo de crecimiento, la infección de la semilla puede ocurrir después de la madurez fisiológica, cuando el contenido de humedad de la semilla disminuye de aproximadamente 55 por ciento y entre 12 y 14 por ciento, y los hongos crecen de carpelos infectados dentro de las semillas. Condiciones ambientales de alta humedad durante este periodo han sido señalados a favor de la infección de la semilla (Rupe, 1986).

La alternancia de humedad y días secos, conduce al deterioro de la vaina. La infección de la semilla es frecuentemente grande en poblaciones de campo por que hay exceso de plantas establecidas. El hongo puede permanecer viable en semillas almacenadas por 2 años bajo condiciones frías y secas (Kulik y Yaklich, 1991).

Las semillas frecuentemente no germinan, pero pueden producir enfermedades en las plantulas, el hongo puede ser sistémico en plantas provenientes de semillas infectadas . La emergencia de plantulas enfermas decrece severamente en suelo a temperaturas de 35°C y menores efectos de 15 a 20°C. La invasión de tejidos del hospedero es miceliar es por ínter e intracelular. La invasión es inicialmente restringida a la delgada pared del cortex y luego el hongo penetra la espesa pared del ducto (Rupe, 1986).

Los arreglos lineares de picnidios son debidos a la tendencia del hongo a crecer en el clorénquima situado entre los tejidos resistentes del esclerenquima de la corteza. El micelio invade el óvulo y se desarrolla en las semillas continuando con el funículo y el hílum . Dentro de la semilla el hongo coloniza todos los tejidos de la cubierta de la semilla, cotiledones y eventualmente la radícula y la plúmula (Illas *et al.*, 1975).

Las semillas de soya y residuos de maíz son reconocidos como fuente de inóculo de sp. de *Phomopsis*. y *D.p.s.* Los organismos causales del tizón de la vaina y tallo, el hongo sobrevive en residuos en cultivos en invierno y subsecuentemente esporula en los tejidos produciendo inóculo primario que puede infectar las plántulas de soya, el tizón de la vaina y tallo en campos previamente cultivados con soya que los cultivados con maíz

(Kmetz *et al.*, 1979).

Problemas en Germinación Potencial por *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*

Problemas en evaluación de viabilidad de semillas infectadas con *Diaporthe* ocurre cuando varios métodos de medidas del ensayo de germinación, son usados, como las toallas de papel enrollado, cámaras húmedas, camas de arena, platos de agar etc. Por ejemplo, la germinación de semilla de soya colocada en toallas de papel húmedo enrolladas fue de 33 por ciento menor que algunos de los lotes de semilla sembradas en arena (Neto y West, 1989).

Wallen y Cuddy (1960) reportan que la germinación de soya en arena en pruebas de laboratorio y suelo en pruebas de invernadero fue afectado adversamente por la infección de *D.p.s.* Kmetz *et al.*, (1978) reporta que semillas inoculadas con *D.p.s.* no germinan y se desintegran rápidamente en el suelo, *D.p.s.* fue capaz de invadir rápidamente y podrir la semilla durante los estados tempranos de germinación.

Wallen y Seaman (1962), encontraron que el tratamiento con fungicida incrementó la emergencia en campo de semillas infectadas con *D.p.s.* esta es la primera indicación en la literatura de que la transmisión por semilla de *D.p.s.* puede reducir la germinación en campo.

En un estudio posterior Wallen y Seaman (1963) encontraron que la relación entre *D.p.s.* y emergencia no era muy cercana. Lotes que contenían entre un 1.2 y 73 por ciento de semillas infectadas mostraron emergencia de campo de 80-66 por ciento respectivamente.

Otros investigadores reportaron una correlación inversa entre *D.p.s.* en semilla y la germinación en pruebas de laboratorio así como en pruebas de arena en invernadero y estudios en cámara de crecimiento (Kmetz *et al.*, 1978).

Los reportes posteriores indicaron que la infección de semillas por *D.p.s.* puede tener un efecto perjudicial en germinación y emergencia, aun así estos estudios fueron limitados en su mayoría a pruebas de laboratorio y de invernadero con relativamente pocas determinaciones de calidad (Kulik, 1981).

La germinación potencial es la máxima germinación de semilla que puede ser obtenida en la ausencia de microorganismos asociados a la semilla o cuando el efecto de germinación es mínima, como por uso de tratamiento de semilla con fungicidas y fue desarrollado usando el complejo *Diaporthe / Phomopsis* (Foor y Sinclair, 1976).

La germinación potencial de semillas de soya es ampliamente definida como el máximo nivel de germinación por una muestra bajo condiciones de estres, la germinación potencial de semillas de soya puede disminuir con la edad o tratamiento fitotóxicos o deterioro por micoflora de la semilla, pero no puede ser incrementada con un tratamiento

(Sinclair, 1993).

Diaporthe puede enmascarar la germinación potencial de las semillas de soya por muerte de los embriones jóvenes o durante la imbibición de agua y germinación, la actividad fungal puede ser limitada por algunos medios aun así la germinación potencial de algunas semillas puede ser moderada, la germinación potencial de semilla de soya colonizadas o infectadas con *Diaporthe* / *Phomopsis* se puede llevar a cabo por la aplicación de fungicidas a las semillas, termoterapia, control de condiciones ambientales durante los procesos de germinación (Ellis *et al.*, 1974).

Por muchos años en Illinois, la germinación de semillas de soya ha sido algunas veces baja inmediatamente después de la cosecha, después de varios meses en almacén, y atribuyen esto, en parte, a la reducción en cantidad de *Diaporthe* / *Phomopsis* asociado con algunos lotes de semillas, asumiendo que el micelio superficial, y esporas del hongo afectan su viabilidad y éstas no pueden sobrevivir bajo condiciones de almacenamiento (Sinclair, 1993).

El agente causal no solo reduce la calidad de semillas usadas para la siembra por afectar la germinación potencial, si no que también reduce la calidad de semillas usadas para el procesamiento. Idealmente la soya es usada para alimentación, comida y producción de aceite es alta en proteínas y aceite, y baja en contenido de ácidos grasos. La infección de semillas por *Diaporthe* / *Phomopsis* pueden reducir la cantidad de harina y aceite e incrementar el contenido de ácidos grasos, cambia la posición de ácidos grasos

libres y afecta otros procesos de calidad (Sinclair, 1991).

MATERIALES Y METODOS

Localización Del Sitio Experimental

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología Agrícola , Laboratorio de Ensayo de Semillas del Centro de Capacitación y Desarrollo de Tecnología de Semillas (CCDTS), e invernaderos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, ubicada en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Material Experimental

Se utilizó semilla de seis variedades de soya *Glycine max.* (L.) Merr. de lotes de producción de semilla del Campo Agrícola Experimental " LAS HUASTECAS" localizado en Estación, Cuauhtémoc, Tamaulipas y cosechadas en el ciclo agrícola primavera - verano 1994.

Las muestras fueron registradas mediante un número de trabajo para su control, de acuerdo a su identificación. En seguida se homogenizaron, y se obtuvieron muestras de trabajo mediante clasificación con cribas, para eliminar impurezas y obtener semilla aprovechable. Durante el período del experimento las muestras de trabajo se

mantuvieron en bolsas de polietileno, en refrigeración a una temperatura de $9^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ esto para evitar el deterioro de la semilla.

Ensayo de Semillas

Germinación Estándar

Siguiendo el método propuesto por la Asociación Internacional de Ensayo de Semillas (ISTA) para evaluar la capacidad germinativa de la semilla se colocaron ocho repeticiones de 50 semillas tratadas con fungicida Arasán, por muestra, en toallas de papel secante para germinación aprobado por Reglas de Análisis de Semillas, humedecidas, las que se cubrieron con otra toalla y se enrollaron en forma de taco e identificaron, y se colocaron en una incubadora en condiciones estándar de aireación, y temperatura de 25°C , con luz durante 8 hrs y 6 hrs de obscuridad, durante 7 días. Al quinto día se realizó el primer conteo de germinación, anotándose el número de plántulas normales, las que se retiraron del ensayo. El segundo conteo a los 8 días, en el cual se tomaron de nuevo plántulas normales, se registraron plantulas anormales y las semillas muertas.

Detección de Microflora

Método de la placa de agar (Intervalos de Luz)

Este método es de los más antiguos y más comunes para la identificación de hongos de semilla, basado en crecimiento y características de colonias en un medio nutritivo.

Una muestra de 100 semillas por cada una de las seis variedades fueron esterilizadas con una solución de NaOCl al 1 por ciento durante un minuto, este tratamiento para matar a los microorganismos que se presentan en la superficie de la semilla y para evitar una complicada identificación de patógenos. Las semillas se lavaron en seguida tres veces con agua destilada estéril y se drenaron. Las muestras (10 semillas por caja) se colocaron en cajas petri de plástico conteniendo el medio de cultivo papa dextrosa agar, y se incubaron a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ bajo intervalos de 12 hrs luz y 12 hrs oscuridad luz. Después de 7 días, la germinación de la semilla y el desarrollo de microorganismos fueron evaluados. Para la germinación se consideró un crecimiento mínimo de 2 cm de largo, y la identificación de los microorganismos se llevó a cabo mediante las características de la colonia, observación de las estructuras de reproducción y uso de claves para su identificación. (Barnett y Hunter, 1987 ; Schaad, 1988).

Método de la placa de agar (Normal).

Igual que en el ensayo anterior se utilizaron 100 semillas para cada una de las seis variedades de soya, las semillas fueron desinfectadas con una solución de NaOCl al 1 por ciento por un minuto, lavadas tres veces con agua destilada estéril y posteriormente drenadas. Las muestras se colocaron en cajas petri de plástico conteniendo el medio de cultivo papa dextrosa agar, 10 semillas por cada caja. Estas fueron incubadas en obscuridad a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Después de 7 días se evaluó el desarrollo de microorganismos y su identificación igual que en el caso anterior.

Método del papel secante (Paraquat)

Una muestra de 100 semillas por cada una de las seis variedades, fueron desinfectadas con una solución de NaOCl al 1 por ciento durante un minuto, lavadas tres veces con agua destilada estéril y drenadas. En seguida 10 repeticiones de 10 semillas por muestra se sembraron en cajas de petri de plástico conteniendo como sustrato papel secante previamente humedecido con una solución del herbicida Paraquat (Sal dicloruro de paraquat (1,1-dimetil-4,4 del ion bipyridilo) al 1.5 por ciento de concentración, esto para retardar o inhibir la germinación, estas fueron incubadas a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Después de 7 días se evaluó el desarrollo de los microorganismos sobre las semillas y se procedió a su identificación al igual que en los ensayos anteriores.

Pruebas de Inoculación

Obtención de Inoculo.

Se colectaron plantas de soya infectadas con *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*, en el Campo Agrícola Experimental Huastecas de Estación Cuauhtémoc Tamaulipas perteneciente al INIFAP. Estas fueron trasladadas al laboratorio de Parasitología Agrícola de la U.A.A.A.N para su procesamiento. Las partes de las plantas infectadas fueron cortadas en trozos pequeños, desinfectándolos con una solución de NaOCl al 1 por ciento durante un minuto y lavándolos tres veces con agua destilada estéril, se drenaron y se sembraron en cajas petri conteniendo medio de cultivo (PDA) e incubando a 25+- 2°C durante cuatro a cinco días e identificando el hongo de acuerdo a sus características morfológicas. En seguida se realizó una purificación por medio de la técnica de punta de hifa e incubando a 25+- 2°C durante tres a cuatro semanas con alternancias de 12 hrs luz y 12 hrs oscuridad que es cuando se presenta la mayor cantidad de peritecios viables.

Método de Inoculación Aspersión (M.I.A)

Semillas de la variedad Santa Rosa fueron divididas en siete muestras de semilla (5, 10, 20, 40, 60, 80, y 100) semillas, para cada método de inoculación. Todas las semillas a utilizar en estas pruebas fueron previamente desinfectadas con una solución de NaOCl al 1.3 por ciento por un minuto y lavadas tres veces con agua destilada estéril.

Las semillas fueron inoculadas rociando una suspensión conidial (1.5×10^8) por ml. de *Dps*, se sembraron en charolas de germinación conteniendo una mezcla de suelo, perlita y peat moss en una relación (1:1:1) manteniendo una temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ durante el día y $16 \pm 2^\circ\text{C}$ durante la noche, la emergencia fue registrada a los ocho días, las semillas que no germinaron fueron removidas y sembradas en placas de agar.

Método de Inoculación Aspersión Alta Humedad Relativa (M.I.A.A.H.R)

Semilla de soya libre de infección de *Dps* fueron inoculadas con un aislamiento de *Dps* rociándolas con una suspensión conidial (1.5×10^8) por ml. incubándolas por dos días a 28°C y una humedad relativa del 70 por ciento y luego drenadas, se sembraron en charolas de germinación conteniendo una mezcla estéril de suelo, perlita y peat moss en una relación (1:1:1) manteniendo una humedad relativa del 60-70 por ciento y una temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ durante el día y $16 \pm 2^\circ\text{C}$ durante la noche. La emergencia fue registrada a los ocho días, las semillas que no germinaron fueron removidas y sembradas en placa de agar.

Método de Inoculación Crecimiento Activo (M.I.C.A)

Semillas de soya fueron colocadas en el perímetro de una colonia de crecimiento de *Dps* a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, las semillas fueron removidas después de 72 hrs y sembradas en charolas de germinación conteniendo una mezcla estéril de suelo, perlita y peat moss en una relación (1:1:1) manteniendo una humedad relativa de 60-70 por

ciento y una temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante el día y $16\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante la noche, la emergencia fue registrada a los 8 días, Las semillas que no germinaron fueron removidas y sembradas en placas de agar.

Método de Inoculación Testigo (M.I.T)

Semillas libres de Infección de *Dps.* fueron sembradas en charolas de germinación conteniendo una mezcla estéril de suelo, perlita y peat moss en una relación (1:1:1) manteniendo una humedad relativa de 60-70 por ciento y una temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante el día y $16\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante la noche. La emergencia fue registrada a los ocho días, semillas que no germinaron fueron removidas y sembradas en placas de agar.

Diseño Experimental

* Ensayo de semillas (Germinación Estandar)

El modelo del diseño Experimental utilizado fue un completamente al azar con seis tratamientos en ocho repeticiones.

$$Y_{ij} = \mu + \delta_i + \epsilon_{ij}$$

con:

$$i = 1, 2, 3, \dots, 6 \quad \text{Variedades}$$

$$j = 1, 2, 3, \dots, 8 \quad \text{Repeticiones}$$

donde:

Y_{ij} = Variable aleatoria observable correspondiente a la i -ésima variedad, y a la j -ésima repetición.

μ = Media General

δ_i = Efecto del i -ésimo tratamiento

ϵ_{ij} = Error Experimental

* Detección de Microflora

El modelo del diseño Experimental utilizado fue un completamente al azar, con arreglo factorial 6 X 3 con 10 repeticiones. Para cada una de las variables individuales (germinación e incidencia de microorganismos).

Antes de realizar el análisis estadístico, las variables expresadas en por ciento fueron transformados mediante la siguiente fórmula $\sqrt{x + 0.5}$ (Stell y Torrie, 1986).

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

con:

$i = 1,2,3,\dots,6$ Variedades

$j = 1,2,3$ Métodos

$k = 1,2,3,4,\dots,10$ Repeticiones

donde:

Y_{ijk} = Variable aleatoria observable correspondiente a la i -ésima variedad, a la j -ésimo método y a la k -ésima repetición.

μ = Media general

α_i = Efecto de la i -ésima variedad

β_j = Efecto del j -ésimo método

$\alpha\beta_{ij}$ = Efecto conjunto de la i -ésima variedad y el j -ésimo método.

ϵ_{ijk} = Error Experimental

* Pruebas de inoculación.

El modelo del diseño Experimental utilizado fue un completamente al azar con arreglo en parcelas divididas 7x4 con 10 repeticiones.

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \delta_{ijk} + \epsilon_{ijk}$$

con:

$i = 1,2,3,\dots,7$ Cantidad de semilla

$j = 1,2,3,4$ Métodos de la inoculación

$k = 1,2,3,4,\dots,10$ Repeticiones

donde:

Y_{ijk} = Variable aleatoria observable correspondiente a la i -ésima variedad, a la j -ésimo

método y a la k-ésima repetición.

μ = Media general

α_i = Efecto de la i-ésima cantidad de semilla

ϵ_{ik} = Error parcela grande

β_j = Efecto del j-ésimo método

$\alpha\beta_{ij}$ = Efecto conjunto de la i-ésima cantidad de semilla y el j-ésimo método.

δ_{ijk} = Error parcela chica

Para la interpretación de la interacción cantidades de semilla por métodos de inoculación en los análisis de varianza combinadas, ésta se descompuso en sus efectos simples, para conocer los efectos entre las cantidades de semilla en cada método de inoculación y los efectos de métodos de inoculación en cada cantidad de semilla, todo esto para las diferentes variables de respuesta.

Para todos los factores, así como en las diferencias que fueron significativas en los análisis de varianza, se compararon sus medias utilizando la prueba de rango múltiple por el método de Tukey.

RESULTADOS

Los resultados de germinación que se presentan en el Cuadro 4.1. muestran diferencias altamente significativa entre variedades al ($P < 0.01$), el coeficiente de variación (CV) se encuentra dentro de los rangos aceptables ya que para este caso fue de 4.07 por ciento. Lo mismo se observa en la prueba de rango múltiple (Tukey al 0.01) donde las diferencias numéricas entre las variedades se observan en el Cuadro 4.2. Estos valores de germinación son aceptables ya que la variedad Santa Rosa la cual tiene el valor más bajo de germinación (89.75 por ciento de germinación normal) está por encima del valor mínimo aceptable (80 por ciento), lo que indica que la semilla, por ser de reciente cosecha y estar almacenada a temperaturas bajas, no tuvo la interferencia con microorganismos de almacén que pudieran bajar drásticamente la germinación, comprobándose así su aptitud y disponibilidad como semilla para siembra. Estos resultados de germinación demuestran que la semilla usada en estos experimentos se usaron con confiabilidad al tener una calidad aceptable de germinación que es el principal criterio para la comercialización de lotes de semilla y con estos valores se espera o asegura un buen funcionamiento.

Cuadro 4.1. Análisis de Varianza de la Variable Capacidad de Germinación de Semilla de Diferentes Variedades de Soya. UAAAN, 1998.

FV	gl	SC	CM	Fc	Probabilidad
Variedades	5	107.601563	21.520313	5.8549	0.001**
Error	42	154.375000	3.675595		
Total	47	261.976563			

Coefficiente de variación = 4.07 Por ciento.

**** Significativo al 1 Por ciento.**

Cuadro 4.2. Comparación de Medias de la Variable Capacidad de Germinación de Semilla de Diferentes Variedades de Soya. UAAAN, 1998.

Variedad	Medias	
Huastecas-100	98	A
Tapachula-86	96.25	A
Júpiter	95.75	A
UFV-1	95.25	AB
Huastecas-200	90.75	BC
Santa Rosa	89.75	C

(Tukey al 0.01)

En lo que respecta al evaluar el porcentaje de germinación de las seis variedades de soya en los métodos de incubación se muestra en el Cuadro 4.3. que existe diferencia altamente significativa entre métodos de incubación, no encontrándose entre variedades al

igual que en la interacción métodos por variedades. El coeficiente de variación (4.25 por ciento) se encuentra dentro de los rangos aceptables para este tipo de pruebas. La prueba de Tukey al 0.01 (Cuadro 4.4.), nos muestra que existe diferencia significativa entre el método de incubación Paraquat y los métodos Intervalos de luz y Normal siendo estos últimos estadísticamente iguales. No se encontró diferencia entre variedades Cuadro 4.5., pero se puede observar que las variedades de mayor germinación fueron la Tapachula-86 con un 65 por ciento y la Huastecas-100 con 64 por ciento en promedio, observándose valores similares para el resto de las variedades, estos valores disminuyeron notablemente ya que el método Paraquat influyó grandemente al inhibir totalmente la germinación, aunque en los otros métodos tuvieron una germinación muy por encima de los valores aceptables.

Cuadro 4.3. Análisis de Varianza de la Variable Capacidad de Germinación de Semilla de Diferentes Variedades de Soya en Tres Métodos de Incubación. UAAAN, 1998.

FV	gl	SC	CM	Fc	Probabilidad
Variedades	5	0.018433	0.003687	0.3711	0.868
Métodos de Incubación	2	242.748047	121.374023	12217.5332	0.000**
Interacción Mét. X Var.	10	0.031616	0.003162	0.3182	0.975
Error	162	1.0609375	0.009934		
Total	179	224.407471			

Coeficiente de Variación = 4.24 Por ciento.

** Significante al 1 Por ciento.

Cuadro 4.4. Comparación de Medias de la Variable Porcentaje de Germinación de semilla de Soya en Diferentes Métodos de Incubación. UAAAN, 1998.

Método de Incubación	Medias	
Método I. de Luz	95.8	A
Método Normal	95.5	A
Método Paraquat	0.00	B

(Tukey al 0.01)

Cuadro 4.5. Comparación de Medias de la Variable Porcentaje de Germinación de Diferentes Variedades de Semilla de Soya en Tres Métodos de Incubación. UAAAN, 1998.

Variedad	Medias	
Tapachula-86	65.00	A
Huastecas-100	64.00	A
Júpiter	63.66	A
Santa Rosa	63.33	A
UFV-1	63.33	A
Huastecas-200	63.33	A

(Tukey al 0.01)

En lo referente a la evaluación de hongos como se observa en el análisis de varianza (Cuadro 4.6.) no se encontró diferencia entre los métodos de incubación, variedades, ni en la interacción métodos de incubación por variedades. El coeficiente de variación (38.80 por ciento) se encuentra entre los rangos aceptables para este tipo de

prueba. Los valores medios de hongos detectados en los métodos de incubación así como de variedades se presentan en los Cuadros 4.7. y 4.8. respectivamente.

Cuadro 4.6. Análisis de Varianza de la Variable Porcentaje de Hongos en Semilla de Soya de Seis Variedades en Tres Métodos de Incubación. UAAAN, 1998.

FV	gl	SC	CM	Fc	Probabilidad
Variedades	5	0.689041	0.137408	1.1338	0.344
Métodos de Incubación	2	0.645401	0.322701	2.6549	0.071
Interacción Mét. X Var.	10	0.792709	0.079271	0.6522	0.768
Error	162	19.69128	0.12155		
Total	179	218.18359			

Coefficiente de Variación = 38.80.

Cuadro 4.7. Comparación de Medias de la Variable Porcentaje de Hongos en Semilla de Soya en Diferentes Métodos de Incubación. UAAAN, 1998.

Método de Incubación	Medias	
Método del Paraquat	6.83	A
Método Normal	4.00	A
Método I. de Luz	2.33	A

Cuadro 4.8. Comparación de Medias de la Variable Porcentaje de Hongos de Diferentes Variedades de Semilla de Soya en Tres Métodos de Incubación. UAAAN, 1998.

Variedad	Medias	
Santa Rosa	7.00	A
Tapachula-86	6.66	A
Huastecas-100	4.33	A
Huastecas-200	3.66	A
UFV-1	2.33	A
Júpiter	2.33	A

El hongo más frecuentemente obtenido fue *Macrophomina phaseolina* en las seis variedades de semilla de soya en los tres métodos de incubación, el porcentaje de semillas para las variedades Tapachula-86 y Santa Rosa infectadas con *Macrophomina phaseolina* fueron altas, un contraste con la infección de semillas de Huastecas-100, Huastecas-200, Júpiter y UFV-1 fueron bajas. El segundo hongo obtenido más frecuentemente fue *Phomopsis*, la incidencia de *Phomopsis* fueron altas para semillas de Huastecas-100 y Tapachula-86 seguidos por semillas de Santa Rosa, incidencias de hongos fueron bajas para semillas de Huastecas-200, HFV-1 y Júpiter. Otros hongos frecuentemente aislados de semilla de soya fue *Alternaria*, las altas incidencias de *Alternaria* fueron para semillas de las variedades Huastecas-100 y Tapachula-86, las bajas incidencias se presentaron en las semillas de las variedades Santa Rosa, UFV-1, Júpiter y Huastecas-200. *Cercospora kikuchii* fue también aislado, las altas incidencias ocurrieron

en semillas de las variedades Huastecas-100 y Huastecas-200 seguidas por las variedades Santa Rosa, UFV-1, Júpiter y por último Tapachula-86. Otros hongos obtenidos en semilla de soya fueron *Diaporthe*, la causa del tizón del tallo y *Nematospora coryli*. Los altos porcentajes de *Diaporthe* se encontraron en las semillas de las variedades Tapachula-86, altos porcentajes de semilla infectada con *N. coryli* se encontraron en las variedades tapachula-86 y UFV-1. La incidencia de saprofitos u hongos débiles fueron esporádicos, la incidencia de *Aspergillus flavus* y *Fusarium* se presentaron en semillas de las variedades Huastecas-100, Santa Rosa y UFV-1 y la incidencia de *Chaetomium*, *Penicillium* y *Cladosporium*, menos del uno por ciento de las semillas examinadas, (Cuadro 4.9.).

Con relación a la presencia de bacterias, en los tres métodos de incubación, como se observa en el análisis de varianza (Cuadro 4.10.), Hubo diferencia altamente significativa, no encontrándose diferencia entre variedades y en la interacción métodos por variedades. El coeficiente de variación (26.25 por ciento) se encuentra dentro del rango aceptable para este tipo de pruebas. Al comparar los valores medios de bacterias detectadas en los métodos de incubación (Tukey al 0.01) por ciento se observan diferencias entre los métodos (cuadro 4.11.), no encontrándose entre variedades como se observa en el cuadro 4.12. Cabe mencionar que si durante el proceso es contaminada por microorganismos saprofitos de rápido crecimiento puede enmascarar la presencia de bacterias, la incidencia de bacterias es posible que se deba a la longevidad de las mismas, debido a las condiciones en que estaban almacenadas las semillas, además la baja incidencia de bacterias en el método Paraquat en papel secante, no da las condiciones

necesarias para el desarrollo de bacterias.

Cuadro 4.9. Resultados del Porcentaje de Infección e Identificación de la Microflora Total Presente en Semilla de Seis Variedades de Soya en Tres Métodos de Incubación. UAAAN, 1998.

Microorganismos	Variedades					
	Huastecas-100	Tapachula-86	Santa Rosa	UFV-1	Júpiter	Huastecas-200
<i>Alternaria sp.</i>	2	2	1	1	1	1
<i>Aspergillus flavus</i>	1	0	1	1	0	0
<i>Cercospora kikuchii</i>	2	0	1	1	1	2
<i>Chaetomium sp.</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Cladosporium sp.</i>	0	1	0	0	0	0
<i>Fusarium sp.</i>	1	0	1	1	0	0
<i>Macrophomina phaseolina</i>	4	10	11	2	4	4
<i>Nematospora coryli</i>	0	1	0	1	0	0
<i>Penicillium sp</i>	0	1	2	0	1	1
<i>Phomopsis sojae</i>	3	3	2	0	0	1
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	0	2	1	0	0	1
<i>Pseudomonas syringae</i>	8	10	9	7	6	4
<i>Actinomicetos</i>	3	2	3	1	5	1

Cuadro 4.10. Análisis de Varianza de la Variable Porcentaje de Bacterias en Semilla de Soya de Seis Variedades en Tres Métodos de Incubación. UAAAN, 1998.

FV	gl	SC	CM	Fc	Probabilidad
Variedades	5	0.177658	0.035532	0.7469	0.592
Métodos de Incubación	2	1.399071	0.699535	14.7075	0.000**
Interacción Mét. X Var.	10	0.428459	0.042846	0.9007	0.535
Error	162	7.706261	0.047570		
Total	179	9.711479			

Coefficiente de Variación = 26.25 Por ciento.

** Significativo al 1 Por ciento.

Cuadro 4.11. Comparación de Medias de la Variable Porcentaje de Bacterias en Semilla de Soya en Diferentes Métodos de Incubación. UAAAN, 1998.

Método de Incubación	Medias	
Método Normal	3.83	A
Método Intervalos de Luz	3.50	A
Método del Paraquat	0.00	B

(Tukey al 0.01)

Cuadro 4.12. Comparación de Medias de la Variable Porcentaje de Bacterias en Diferentes Variedades de Semilla de Soya en Tres Métodos de Incubación. UAAAN, 1998.

Variedad	Medias	
Tapachula-86	3.33	A
Santa Rosa	3.00	A
Huatecas-100	2.66	A
UFV-1	2.33	A
Júpiter	2.00	A
Huastecas-200	1.33	A

Para el caso de actinomicetos se observa en el análisis de varianza (Cuadro 4.13.) que no hubo diferencia significativa entre variedades, no obstante entre métodos la diferencia fue altamente significativa. El coeficiente de variación (19.36 por ciento) se encuentra entre los rangos aceptables para este tipo de pruebas. Al comparar los valores medios de actinomicetos detectados entre variedades en la prueba de Tukey al 0.01 por ciento no se observaron diferencias (Cuadro 4.14.) al comparar los valores medios de la incidencia entre los métodos se encontró diferencia significativa, no se observaron diferencias entre variedades (Cuadro 4.15.) aunque las variedades con mayor incidencia fueron la Júpiter con 1.66 por ciento en promedio, y la Huastecas-100 y la Santa Rosa con 1.0 por ciento.

Cuadro 4.13. Análisis de Varianza para el Porcentaje de Actinomicetos en Semilla de Soya de Seis Variedades en Tres Métodos de Incubación. UAAAN, 1998.

FV	gl	SC	CM	Fc	Probabilidad
Variedades	5	0.089401	0.017880	0.8494	0.518
Métodos de Incubación	2	0.223427	0.111713	0.3070	0.006**
Interacción Mét. X Var.	10	0.202553	0.020255	0.09622	0.521
Error	162	3.410126	0.021050		
Total	179	3.925507			

Coefficiente de Variación = 19.36 Por ciento.

**Significativo al 0.01 de Significancia.

Cuadro 4.14. Comparación de Medias de la Variable Porcentaje de Actinomicetos en Semilla de Soya en Diferentes Métodos de Incubación. UAAAN, 1998.

Método de Incubación	Medias	
Método Normal	1.66	A
Método I. de Luz	0.83	A
Método del Paraquat	0.00	B

(Tukey al 0.01)

Cuadro 4.15. Comparación de Medias de la Variable Porcentaje de Actinomicetos de Diferentes Variedades de Semilla de Soya en Tres Métodos de Incubación. UAAAN, 1998.

Variedad	Medias	
Júpiter	1.66	A
Huastecas-100	1.00	A
Santa Rosa	1.00	A
Tapachula-86	0.66	A
UFV-1	0.33	A
Huastecas-200	0.33	A

Inoculación con *Dps*

Los resultados de porcentaje de germinación de la semilla de soya a los ocho días después de ser inoculada con los diferentes métodos de inoculación con *D.p.s.* Que se presentan en el Cuadro 4.16. muestra diferencia significativa al ($P < 0.05$) entre cantidades de semillas y altamente significativa ($P < 0.01$) en la interacción métodos de inoculación / cantidad de semillas, Así como en métodos de inoculación y por lo tanto fue necesario descomponer dicha interacción en sus efectos simples (Métodos de inoculación / Cantidades de semillas), (Cantidad de semilla / Métodos de inoculación). También se utilizó la prueba de rango múltiple (Tukey 0.05) donde se observan diferencias entre las cantidades de semilla (Cuadro 4.17) siendo la de mayor germinación la cantidad de semilla 2 con 49.37 por ciento, resultados semejantes se obtuvieron en las cantidades 3, 5, 4,7 y

Cuadro 4.16. Análisis de Varianza para el Porcentaje de Germinación de Siete Cantidades de Semilla de Soya en Cuatro Métodos de Inoculación con *Dps.* UAAAN, 1998.

FV	gl	SC	CM	Fc	Probabilidad
Repeticiones	3	833.203125	277.734375	9.3422	0.001
Cant. de Semilla	6	573.906250	95.651039	3.2174	0.025*
Error A	18	535.125000	29.729166		
M. de Inoculación	3	127532.421875	42510.80859	769.7062	0.000**
Interacción	18	122.781250	284.598969	5.1530	0.000**
Error B	63	3479.484375	55.229912		
Total	111	138076.921875			

C.V. = 16.39 Por ciento.

• Significativo al 5 Por ciento.

** Significativo al 1 Por ciento.

6 y por último la 1 con 47.81, 45.08, 44.70, 44.62, 43.23 y 42,5 por ciento de germinación respectivamente. En el cuadro 4.18 se observa diferencia entre métodos de inoculación (Tukey 0.01), presentándose la mayor germinación en el (M.I.T), siguiéndole el (M.I.A.) con 89.14 y 63.11 por ciento respectivamente, encontrando valores más bajos en (M.I.A.H.R.) 29.07 por ciento, inhibiendo totalmente la germinación el (M.I.C.A.). En la prueba de (Tukey 0.01) para los efectos simples Cantidad de semillas / Métodos de inoculación (Cuadro 4.19.) se encontró diferencia entre las cantidades de semilla en el Método (M.I.A.) variando el porcentaje de germinación de 77.5 en la cantidad de semilla 2 a 47.9 en la cantidad de semilla 6, en el método de inoculación

(M.I.A.A.H.R.) también se puede observar diferencia entre las cantidades de semilla, teniendo el mayor porcentaje de germinación la cantidad de semilla 3 con 42.50, difiriendo de las cantidades de semilla 2, 7, 6, 5 y 4, y por último la cantidad 1, no se encontró diferencia entre las cantidades de semillas en los métodos (M.I.C.A.) y (M.I.T.).

Cuadro 4.17. Comparación de Medias de la Variable Capacidad de Germinación de Diferentes Cantidades de Semilla de Soya en Cuatro Métodos de Inoculación. UAAAN, 1998.

Cantidad de Semilla	Medias	
2	49.3750	A
3	47.8125	AB
5	45.0812	AB
4	44.7062	AB
7	44.6250	AB
6	43.2344	AB
1	42.5000	B

(Tukey al 0.05)

Cuadro 4.18. Comparación de Medias de la Variable Capacidad de Germinación en Semilla de Soya en Diferentes Métodos de Inoculación. UAAAN, 1998.

Método de Inoculación	Medias	
Testigo	89.1411	A
Aspersión	63.1161	B
Aspersión Alta Humedad Relativa	29.0768	C
Crecimiento Activo	0.0000	D

(Tukey al 0.01)

Cuadro 4.19. Comparación de Medias de la Variable Capacidad de Germinación de Cantidades de Semilla / Métodos de Inoculación. UAAAN, 1998.

Cantidad de Semilla / M.I.A. *			Cantidad de Semilla / M.I.A.H.R. *		
2	77.5000	A	3	42.5000	A
1	75.0000	AB	2	37.5000	AB
3	61.2500	ABC	7	33.2500	AB
4	61.2500	ABC	6	28.4375	AB
5	60.3750	BC	5	27.4750	AB
7	58.9375	BC	4	24.3750	BC
6	47.9375	C	1	10.0000	C

Cantidad de Semilla / M.I.C.A.			Cantidad de Semilla / M.I.T.		
1	0.0000	A	6	96.5625	A
2	0.0000	A	4	93.2000	A
3	0.0000	A	5	92.4750	A
4	0.0000	A	3	87.5000	A
5	0.0000	A	7	86.7500	A
6	0.0000	A	1	85.0000	A
7	0.0000	A	2	82.5000	A

* (Tukey al 0.01)

Infección de la Semilla de Soya con *Dps.*

Este parámetro se evaluó como el porcentaje de semilla de soya infectada con *Dps.* A los ocho días después de ser inoculada con los diferentes métodos de inoculación. Los resultados obtenidos al realizar el análisis de varianza Cuadro 4.20 muestran que hubo diferencia altamente significativa al ($P < 0.01$) entre cantidades de semillas, métodos de inoculación y en la interacción de estos y por lo tanto fue necesario descomponer dicha interacción en sus efectos simples.

Cuadro 4.20. Análisis de Varianza para el porcentaje de Infección de Siete Cantidades de Semilla de Soya en Cuatro Métodos de Inoculación con *Dps.* UAAAN, 1998.

FV	gl	SC	CM	Fc	Probabilidad
Repeticiones	3	333.187500	111.062500	2.1973	0.123
Cant. de Semilla	6	2646.296875	441.049496	8.7260	0.000**
Error A	18	909.796875	50.544270		
Mét. De Inoculación	3	159738.015625	53246.003906	825.4147	0.000**
Interacción	18	4486.265625	249.23984	3.8636	0.000**
Error B	63	4064.015625	64.508186		
Total	111	172177.578125			

C.V. (Error B) = 18.35 Por ciento.

** Significante al 1 Por ciento.

La prueba de rango múltiple de Tukey al 0.01 por ciento de significancia Cuadro 4.21. muestra diferencia entre las cantidades de semilla, también se puede observar que la cantidad 6 presentó el mayor porcentaje de infección con un 50.02 por ciento, siendo estadísticamente iguales las cantidades 5, 4, 7, con 47.17, 46.87 y 46.06 por ciento respectivamente, siendo las de menor porcentaje la cantidad 3 y 2 con 41.87 y 39.37 y por último la 1 con 35 por ciento.

Cuadro 4.21. Comparación de Medias de la Variable Porcentaje de Infección en Diferentes Cantidades de Semilla de Soya en Cuatro Métodos de Inoculación. UAAAN, 1998.

Cantidad de Semilla	Medias	
6	50.02	A
5	47.17	AB
4	46.87	AB
7	46.06	AB
3	41.87	ABC
2	39.37	BC
1	35.00	C

(Tukey al 0.01)

El Cuadro 4.22 indica que el método de mayor efectividad en infección a la semilla de soya fue el (M.I.C.A.) , siguiéndole el (M.I.A.A.H.R.) y el (M.I.A.) y por último el (.I.T.) con 100, 54.11, 20.96 y 0.00 por ciento respectivamente. En los efectos

simples para las diferentes cantidades de semilla en cada uno de los métodos de inoculación se observaron diferencias en el (M.I.A.) siendo las más infectadas las cantidades de semilla 6 y 7 con 35 y 33 por ciento respectivamente, teniendo menos infección las cantidades de semilla 3, 5 y 4 con 23.7, 22.4 y 17.5 por ciento de infección respectivamente y por último las cantidades de semilla 2 y 1 con 10 y 5 por ciento de infección respectivamente. Para el (M.I.A.A.H.R.) muestra que la mayor infección se presentó en la cantidad de semilla 4 con 70 por ciento, observándose valores similares de infección para las cantidades 5 y 6 con 66.22, 65.08 por ciento respectivamente, Siguiéndole la cantidad de semilla 7, 2 y por último, la cantidad 3 y 1, también se muestra que no se encontró diferencia entre cantidades en el (M.I.C.A.) teniendo estas valores del 100 por ciento de infección respectivamente, Cuadro 4.23.

Cuadro 4.22. Comparación de Medias de la Variable Porcentaje de Infección de Semilla de Soya en Diferentes Métodos de Inoculación. UAAAN, 1998.

Método de Inoculación	Medias	
Crecimiento Activo	100.0000	A
Aspersión Alta Humedad Relativa	54.1161	B
Aspersión	20.967	C
Testigo	0.0000	D

(Tukey al 0.01)

Cuadro 4.23. Comparación de Medias de la Variable Porcentaje de Infección de Cantidades de Semill / Métodos de Inoculación. UAAAN, 1998.

Cantidad de Semilla / M.I.A. *			Cantidad de Semilla / M.I.A.A.H.R. *		
6	35.0000	A	4	70.0000	A
7	33.0000	A	5	66.2500	AB
3	23.7500	AB	6	65.0875	AB
5	22.4750	AB	7	51.2500	ABC
4	17.5000	AB	2	47.5000	BC
2	10.0000	B	3	43.7500	C
1	5.0000	B	1	35.0000	C

Cantidad de Semilla / M.I.C.A.			Cantidad de Semilla / M.I.T.		
1	100.0000	A	1	0.0000	A
2	100.0000	A	2	0.0000	A
3	100.0000	A	3	0.0000	A
4	100.0000	A	4	0.0000	A
5	100.0000	A	5	0.0000	A
6	100.0000	A	6	0.0000	A
7	100.0000	A	7	0.0000	A

* (Tukey al 0.01)

DISCUSION

Los resultados del ensayo de germinación muestran una alta capacidad germinativa mayor del 80 por ciento mínimo aceptable, demostrándose con esto que las semillas de las variedades utilizadas son de alta viabilidad, lo que se requiere para este tipo de pruebas, semillas que hayan sido cosechadas en el ciclo anterior inmediato para tener resultados satisfactorios en la germinación. Las pequeñas diferencias en germinación entre las variedades, aun cuando se cosecharon en el mismo ciclo, puede haberse debido a diferencias entre variedades, esto concuerda con Knapp (1988), que cita algunos factores que afectan la germinación de la semilla y el desarrollo de las plántulas como : especie, variedad, madurez de la semilla y el medio ambiente durante la maduración y cosecha.

Al observar los resultados de los métodos de detección para el desarrollo de microorganismos sobre las semillas se obtuvo muy baja incidencia, esto se debió tal vez a que la semilla era de cosecha reciente y a la forma de almacenamiento a que estuvieron expuestas, lo que concuerda con González (1989), que menciona que por lo general la contaminación de patógenos, no alcanza un porcentaje muy elevado en semilla verdadera, pero aun que esto varía mucho según el cultivo y la enfermedad; un porcentaje muy bajo de semilla infectada puede significar una fuente de inóculo primario suficiente para causar una epifitias severa, ya que los propagulos del patógeno van directamente asociados con el hospedante susceptible y se favorecen con las mismas condiciones que influyen en la viabilidad de las semillas.

Aun cuando las semillas de soya potencialmente transporta una gran variedad de microorganismos, este potencial incluye hongos, bacterias principalmente, algunos de los cuales pueden causar enfermedades en plántulas y semillas de soya lo que concuerda también con Sinclair (1993) que menciona que poblaciones de semillas y semillas individuales dentro de una población pueden variar con el tiempo, en el tipo y número de microorganismos que sean transportados.

La incidencia total de microorganismos encontrados en las diferentes muestras de semilla de soya fue muy variada, encontrándose hongos con mayor incidencia como *Macrophomina phaseolina*, *Phomopsis*, *Alternaria*, *Cercospora kikuchii* y *Diaporthe*, esto confirmado por Sinclair y Shurtleff 1975, quienes mencionan que dichos hongos se encuentran en semillas de soya, Demostrándose que el método de detección del papel secante incubación paraquat en semilla de soya reduce la calidad e incrementa la ocurrencia grandemente de estructuras de *Macrophomina phaseolina* lo que concuerda con Sinclair 1991, aunque el tratamiento con un desecante u otro herbicida no son recomendados para la detección de microorganismos en semilla de soya.

Se determino que la bacteria presente en las semillas de soya fue del grupo *Pseudomonas syringae* al ser identificada por las pruebas de tinción de Gram, pruebas de oxidasa, reducción de nitratos, cultivos en Kado D4, King B agar, producción de levana, (Schaad ,1988). Aunque en este trabajo no se midió el efecto de esta bacteria en la semilla de soya, se pudo observar que casi en todas las semillas que estaba presente esta bacteria inhibía la germinación, algo semejante reportó Nicholson et al., En 1973.

acerca de que esta bacteria inhibe la germinación *in vitro* en semilla de soya.

También se determino la presencia de actinomicetos, identificándolos por el tipo de crecimiento que mostraban en semillas en el medio de cultivo y lo observado en los montajes realizados. Stainer *et al.*, reporta en 1977 que en las semillas se pueden encontrar algunas especies de levaduras, estas forman micelio con fragmento corto y ramificado; al aislarlos, muestran poca tendencia a fragmentar su micelio formando colonias rugosas en medios sólidos.

Según los resultados obtenidos se deduce que al inocular a *D.p.s.* reduce grandemente la germinación de la semilla, pues se observaron porcentajes muy bajos de germinación. Lo que concuerda con Kmetz *et al.*, (1978), quien indica que semillas inoculadas con *D.p.s.* no germinan y se desintegran rápidamente en el suelo. *D.p.s.* fue capaz de invadir rápidamente y podrir la semilla durante los estados tempranos de germinación.

La asociación de *D.p.s.* y la reducción de la emergencia de plántulas detectada para la semilla de soya es confirmado previamente con información de este patógeno con datos de emergencia en laboratorio, como lo indica Wallen y Cuddy 1960 los cuales reportaron que la germinación de semilla de soya en una de las pruebas de laboratorio y suelo en pruebas de laboratorio fue afectado adversamente por la infección de *D.p.s.* Algunos otros investigadores reportaron una correlación inversa entre *D.p.s.* En semilla y la germinación en pruebas de laboratorio, así como de invernadero y campo, los reportes

posteriores indican que la infección de la semilla puede tener un efecto detrimental en germinación y emergencia, la discrepancia entre la infección de la semilla de soya con *D.p.s.* su funcionamiento puede ser debido parcialmente al grado o profundidad de la infección de *D.p.s.* en la semilla.

El presente estudio confirma la necesidad de la comprensión de la investigación, la influencia de infección de patógenos transmitidos por semilla de soya , y *D.p.s* en la calidad de la semilla y el funcionamiento de la soya, estos estudios han sido basados en pruebas de calidad.

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en que se llevó a cabo el experimento y de acuerdo a los resultados obtenidos podemos concluir que:

La microflora presente en los lotes de semilla de soya de las diferentes variedades utilizadas incluyó: Hongos y Bacterias.

Los hongos encontrados e identificados en las seis variedades fueron: *Alternaria* sp., *Aspergillus flavus*, *Cercospora kikuchii*, *Chaetomium* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Macrophomina phaseolina*, *Nematospora coryli*, *Penicillium* sp., *Phomopsis sojae*, *Diaporthe phaseolorum*.

Y la bacteria encontrada en este estudio fue del grupo : *Pseudomonas syringae*.

El método más eficiente para inocular el complejo *Diaporthe* / *Phomopsis* en semilla de soya fue: el Método de Inoculación Crecimiento Activo (M.I.C.A.), Semillas inoculadas con *Dps* no germinan y se desintegran rápidamente en el suelo. *Dps* fue capaz de invadir rápidamente y podrir la semilla durante los estados tempranos de germinación.

RESUMEN

La semilla de frijol soya, es la oleaginosa más importante en nuestro país, vinculada a una larga serie de cadenas de la industria alimentaria, sin embargo, la producción de esta semilla en los años noventa ha mostrado niveles de decremento significativos. Varios han sido los aspectos que han influido: falta de rentabilidad, ausencia de agua en algunas zonas productoras y problemas fitosanitarios que han provocado no solo la reducción de volúmenes producidos, sino también un crecimiento de las importaciones en abastecimiento a la demanda interna. El desarrollo de la infección de la semilla es importante, debido a las pérdidas directas, expresadas en términos de producción y reducción de la calidad de semilla en especial respecto a la germinación, tal es el caso de varios microorganismos y en especial *Diaporthe* spp., el cual tiene un efecto perjudicial en germinación y emergencia. Por lo tanto se hace necesario conocer los niveles de sanidad de los lotes de semilla en el mercado, detectando la presencia de patógenos de importancia en este cultivo. Aunado a esto, actualmente no existen estudios que den a conocer el impacto de microorganismos a nivel nacional y a esto se le agrega la presión que está ejerciendo la asociación de semilleros para la introducción de semillas libres de patógenos del extranjero.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la microflora presente en diferentes variedades de semilla de soya, así como determinar el efecto del complejo *Diaporthe* /

Phomopsis bajo diferentes métodos de inoculación sobre la germinación de semilla. Esta investigación se realizó en laboratorios e invernadero de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, las variedades evaluadas fueron la Huastecas-100, Huastecas-200, Júpiter, Santa Rosa, Tapachula-86 y UFV-1 . Para este trabajo se utilizaron pruebas de sanidad teniendo como sustrato papa dextrosa agar y papel secante con Paraquat, y para la germinación, emergencia e infección pruebas de laboratorio e invernadero. En la prueba de germinación estándar se encontró diferencia altamente significativa ($P < 0.01$) entre variedades, siendo las de mayor germinación la Huastecas-100, Tapachula-86 y la Júpiter. Al evaluar la germinación en los métodos de incubación se encontró diferencia altamente significativa ($P < 0.01$) entre los métodos de incubación, no encontrándose entre variedades, al igual que en la interacción métodos de incubación por variedades obteniendo la mayor germinación en los métodos normal e intervalos de luz. En lo referente a la microflora presente en semilla de soya, para hongos no se encontró diferencia significativa entre los métodos de incubación, variedades, ni en la interacción métodos de incubación por variedades. En bacterias se encontró alta diferencia significativa ($P < 0.01$) entre los métodos de incubación, no encontrándose en variedades, así como en la interacción métodos de incubación por variedades, siendo el método normal y el intervalos de luz donde se presentó la mayor incidencia de bacterias. Para el caso de actinomicetes se encontró diferencia altamente significativa ($P < 0.01$) entre métodos de incubación no encontrándose diferencia entre variedades ni en la interacción métodos de incubación por variedades, encontrándose en el método de incubación normal la mayor incidencia de actinomicetos. Los microorganismos obtenidos e identificados fueron, *Alternaria* sp; *Aspergillus flavus*; *Cercospora kikuchii*; *Chaetomium* sp;

Cladosporium sp; *Fusarium* sp; *Macrophomina phaseolina*; *Nematospora coryli*; *Penicillium* sp; *Phomopsis sojae*; *Diaporthe phaseolorum* y *Pseudomonas syringae*. Semilla de soya inoculada artificialmente con micelio y conidias del complejo *Diaporthe*, el organismo causal del tizón de la vaina y tallo, se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre cantidades de semilla y altamente significativa ($P < 0.01$) en la interacción métodos de inoculación / cantidad de semilla, así como entre los métodos de inoculación. En los resultados de semilla infectada con *Diaporthe* se encontró diferencia altamente significativa ($P < 0.01$) entre cantidades de semilla, métodos de inoculación y en la interacción de estos.

LIERATURA CITADA

- Agarwal, V.K. and J.B. Sinclair, 1987. Principles of seed Pathology. Vol (I). C.R.C., Inc: U.S.A. 168 p.
- Apoyos y servicios a la comercialización agropecuaria (ASERCA.) 1997. La producción de Soya en Méx. En la década de los noventa. En : Claridades Agropecuarias. México. D.F.
- Association of Official Seed Analyst (AOSA). 1973. Rules for Testing Seeds. Proc. Assoc. Off. Seed Anal. 606:1-116. U.S.A.
- Barnett, H. L. and B. B. Hunter. 1987. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth Edition. MacMillan Publishing Company. U.S.A.
- Berlyn, P. G. 1972. Seed germination and morphogenesis. In: Kozlowski, T.T. (De.) Seed Biology. Vol. II Academic Prees. U.S.A.
- Bidwel, S.G.R. 1979. Fisiología Vegetal. AGT. 2ª Edición. Editor. México., D.F.
- Christensen, C. M. and Kaufman, H.H. 1965. Deterioration of stored grains by fungi. Annual Review of Phytopathology. 3: 69-89. U.S.A.
- Copeland, L.O. and M.B. McDonald. 1985. Principles of seed science and technology. 2 de. McMillan Publishing Company. 321 p. U.S.A.
- Delouche, J.C., T.W. Still, M. Raspet y M. Lienhard. 1971. Prueba de viabilidad de la semilla con tetrazol. Centro regional de ayuda tecnica. Universidad Estatal de Mississipi. 71 p. México, / Buenos Aires.
- Ellet, C.W. and A.F. Schmitthenner. 1974. Isolation of seedborne *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis* from immature soybean plants. Plant. Dis. Reporter 58:978-982. U.S.A.
- Ellis, M.A., Illas, M.B. Tenne. F.D., Sinclair, J.B., And Palm, H.L. 1974. Effect of foliar application of benomyl on internally seedborne fungi and pod and stem blight of soybean Plant Dis. Rep. 58:760-763. U.S.A.
- Foor, S.R., and Sinclair, J.B. 1976. Measuring the germination potential of soybean seeds. (Abstr) Proc. Am. Phythopathol. Soc. 3:296. U.S.A.

- French, E.R. and B.W. Kennedy. 1963. The role of *Fusarium* in the root rot complex of soybean in Minnesota. Plant Dis. Rep. 47:672-6776. U.S.A.
- Garay, E.A. 1985. Calidad de las semillas y su importancia en la productividad. Curso Tecnología de semillas. CIAT. 1/5p. Cali, Colombia.
- Garzonio, D.M. and McGee, D.C. 1983. Comparison of seeds and crop residues as sources of inoculum for pod and stem blight of soybeans. Plant Disease. 67:1374-1376. U.S.A.
- González, L.C. 1989. Introducción a la Fitopatología. Quinta reimpresión, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (ICCA) San José, Costa Rica.
- Harris, M.R. and C.W. Ellett. 1945. A *Penicillium* disease of soybeans. Phytopathology 35:144-145. U.S.A.
- Hepperly, P.R., and Sinclair, J.B. 1978. Quality losses in *Phomopsis*-infected soybean seeds. Phytopathology 68:1644-1687. U.S.A.
- Hobbs, T.W., A.F. Schmitthenner, and Geoffrey A. Kuter. 1985. A new *Phomopsis* species from soybean. Mycologia 77(4):535-544. U.S.A.
- Illas, M.B., Dhingra, O.D., Ellis, M.A., and Sinclair, J.B. 1975. Location of mycellium of *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* and *Cercospora kikuchii* in infected soybean seeds. Plant. Dis. Rep. 59:17-19. U.S.A.
- Internacional Seed Testing Association (ITSA). 1985. Internacioanl rules for seed testing. Seed Science and Technol. 13(2):366-520.
- Jensen, J.D. 1983. The development of *Diaphorte phaseolorum* var. *sojae* in culture. Mycologia. 75:1074-1091. U.S.A.
- Jordan, E.G., Sinclair, J.B., Manandhar, J.B. and Thaplyal. 1992. Soil type and other field conditions affecting seed-boerne fungi in Illinois soybeans. Seed Sci. And Technol. 20:619-628. U.S.A.
- Knapp, D.A. 1988. Germinación de la Semilla. En: Curso Internacional sobre Tecnología de Semillas de Maíz. CIMMYT. Batán, Edo. De Méx..
- Kennedy, B.W. 1964. Moisture content, mold invasion and seed viability of stored soybean. Phytopathology. 54:771-776. U.S.A.
- Kilpatrick. 1955. Effect of planting date on incidence of fungus infection of soybean seeds grown at Walnut Hill, Florida. Plant Dis. Rep. 9:174-176.

- Kmetz, K.T., A.F. Schmitthenner, and C.W. Ellet. 1978. Soybean seed decay : Prevalence of infection and symptom expression caused by *Phomopsis* sp., *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*, and *D. p.* var. *caulivora*. *Phytopathology* 68: 836-840. U.S.A.
- Kmetz, K.T., Ellet C.E. and Schmitthenner A.F. 1979. Soybean seed decay: Sources of inoculum and nature of infection. *Phytopathology* 69: 798-801. U.S.A.
- Kulik, M.M. and Yaklich, R.W. 1991. Soybean seed coat structures: Relationship to weathering resistance and infection by the fungus *Phomopsis phaseoli*. *Crop. Sci.* 31:108-113. U.S.A.
- Kunward, L.K., Singh, T., and Sinclair J.B. 1985. Histopathology of mixed infection by *Colletotrichum truncatum* and *Phomopsis* spp. or *Cercospora sojina* in soybean seeds. *Phytopathology* 75:489-492. U.S.A.
- McGee, D.C., Brandt, C.L. and Burris, J.S. 1980. Seed mycoflora of soybeans relative to fungal interactions, seedling emergence, and carry over of pathogens to subsequent crops. *Phytopathology* 70: 615-617. U.S.A.
- McGee, D. C. 1981. Seed pathology its place in modern seed production. *Plant Dis.* 65:638-642. U.S.A.
- Neergaard, P. 1979. *Seed Pathology*. Vol 1. The Mcmillan Press Ltd. Great Britain. 839 p.
- Neto, F. J.B., and West, S.H. 1989. Problems in evaluating viability of soybean seed infected with *Phomopsis* spp. *J. Seed Technology* 13:122-135. U.S.A.
- Nicholson and Sinclair J.B. 1971. Amsoy soybean seed germination inhibited by *Pseudomonas glycine*. *Phytopathology* 61: 1390-1393. U.S.A.
- Nicholson, J.C., J.F. Nicholson, and J.B. Sinclair and L.K. Joshi, 1973. Seedborne *Pseudomonas glycine* and fungi affect soybean seed quality in India. *Plant Dis. Rep.* 57:531-533. U.S.A.
- Ploper, 1987. Influence of Soybean genotype on rate of seed maturation and its impact on seedborne fungi. *Plant Dis.* 76:287-292.
- Riggle, J.H., and J.M. Dunleavy. 1974. Histopathology of leaf infection of susceptible and resistant soybeans by *Peronospora manshurica*. *Phytopathology* 64:522-526.
- Roy, K.W., and T.S. Abney. 1976. Purple seed stain of soybeans. *Phytopathology* 66:522-526. U.S.A.
- _____. 1977. Antagonism between *Cercospora kikuchii* and other seedborne fungi of soybeans. *Phytopathology* 67:1062-1066. U.S.A.

- Rupe, J.C. and Ferris, R.S. 1986 Effects of pod moisture on soybean seed infection by *Phomopsis* sp. *Phytopathology* 76:273-277. U.S.A.
- Sayers R., 1982. Pruebas de germinación. En Asociación Mexicana de Semilleros. (De.) Memorias del I Curso de Actualización Sobre tecnología de Semillas. U.A.A.A.N. Buenavista Saltillo, Coah. México.
- Schaad, N. W. 1988. Laboratory guide for identification of plant pathogenic of bacteria, Second Edition. APS. Press. Minnesota. 158 p. U.S.A.
- Schwartz, H.F., G.E. Gálvez, E.A. Van Schoonhoven; R.H. Howeler; P.H. Graham and C. Flor. 1978. Seed pathology. In: Field problems of beans in Latin America. Centro Internacional de Agricultura Tropical. (CIAT) Colombia.
- Short, B.J., Grybauskas, A.P., Tenne F.D. and Sinclair J.B. 1981. Epidemiology of *Phomopsis* seed decay in Illinois. *Plant Dis.* 65:62-64. U.S.A.
- Sinclair J.B. and O.D. Dhingra. 1979. Annotated bibliography of soybean diseases. INTSOY Publ. N.º. 7. Univ. Illinois Press, Urbana.
- Sinclair, J.B. and M.C. Shurtlef. 1975. Compendium of soybean diseases. 1ª De. American Phytopathological Society, St. Paul. M.N. 69 p.
- Sinclair, J.B. 1982. Compendium of soybean diseases. 2ª De. American Phytopathological Society, St. Paul. M.N. 104 p.
- _____ 1991. Latent infection of soybean plants and seeds by fungi. *Plant Dis.* 75:220-224. U.S.A.
- _____ 1993. *Phomopsis* seed decay of soybeans a prototype for studying seed disease. *Plant Dis.* 77:329-333. U.S.A.
- Sivori, M. E., E. R. Montaldi y O. H. Caso. 1980. Fisiología Vegetal. 2ª Edición. Hemisferio Sur. Argentina. Pp 613-628.
- Stanier, R. Y., M. Douroff y E. A. Adelberg. 1977. Microbiología. 1ª Edición. Aguilar. España. 932 p.
- Steel R., G. D. y J.H. Torrie. 1996. Bioestadística: Principios y procedimientos. 2ª Edición. Editorial McGraw Hill. Méx.
- Tachibana, H., Od. Jowett and W.R. Fehr. 1971. Deterioration of losses in soybeans caused by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 61:1444-1446. U.S.A.

- Tekrony, D.M., D.B. Egli, R.E. Stuckey and J. Balles. 1983. Relationship between weather and soybean infection by *Phomopsis* spp. *Phytopathology* 73:914-918. U.S.A.
- Tenne, F.D., C. Drasartsee, C.C. Machado and J.B. Sinclair. 1974. Variation in germination and seed borne pathogens among soybean seed lots from three regions in Illinois. *Plant Dis. Rep.* 58:411-413. U.S.A.
- Wallen, V.R. and Cuddy, T.F. 1960. Relation of seed-borne *Diaporthe phaseolorum* to the germination of soybeans. *Proc. Assoc. of Seed Anal.* 50:137-140. U.S.A.
- Wallen, V.R., and Seaman W.L. 1962. *Diaporthe phaseolorum* in soybean seed. *Proc. Can. Phytopathol. Soc.* 29-18. Canada.
- _____ 1963. Seed infection of soybean by *Diaporthe phaseolorum* and its influence on host development. *Can. J. Bot.* 41:14-21. Canada.
- Welch, A.W., and J.C. Gilman. 1948. Hetero and homothallic types of *Diaporthe* on soybeans. *Phytopathology* 38:628-637. U.S.A.
- Williams, R.J. and McDonald, D. 1983. Grains molds in the tropics: problems and importance. *Annual Review of Phytopathology* 21:153-178. U.S.A.

_____. 1963. Seed infection of soybean by *Diaporthe phaseolorum* and its influence on host development. Can. J. Bot. 41:14-21. U.S.A.

Welch, A.W., and J.C. Gilman. 1948. Hetero - and - homo -thallic types of *Diaporthe* on soybeans Phytopathology. 38:628-637. U.S.A.

Williams, R.J. and McDonald, D.1983. Grains molds in the tropics: problems and importance. Annual Review of Phytopathology. 21:153-178. U.S.A.