

Semillas

**Inspección, análisis, tratamiento
y legislación**

Velia Arriagada

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia por darme los motivos para emprender esta aventura; a mis amigos por el apoyo y los consejos; al Servicio Agrícola y Ganadero por haberme proporcionado la inquietud para abordar el tema; a la Pontificia Universidad Católica de Chile por haberme preparado para enfrentar la tarea.

Agradezco a Dios por mi familia, mis amigos, mi trabajo y mis oportunidades.

Quiero destacar en forma especial el apoyo y la ayuda brindados por el Dr. Julio Delgado, el Dr. Patricio Parodi P., el Dr. Mario Álvarez A., la ingeniero agrónomo Rina Acuña P. y el ingeniero agrónomo Sergio Díaz C.

Esta publicación fue posible de concretar gracias al apoyo y al auspicio del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA-O.E.A.), a través de la Dirección Regional Sur.

INDICE

LA SEMILLA	7
CAPÍTULO I	
INSPECCIÓN FITOSANITARIA DE SEMILLA SECA, SÍNTOMAS Y SIGNOS	11
Impurezas	11
Decoloraciones, manchas, deformaciones	12
Cuerpos frutales fungosos	15
Presencia de pesticidas	15
Referencias	16
CAPÍTULO II	
MUESTREO Y ANÁLISIS FITOSANITARIO DE SEMILLAS	19
1. Muestreo de semillas	19
2. Análisis fitosanitario de semillas	27
2.1. Métodos generales fitopatológicos para análisis de semilla	30
2.1.1. Análisis de semilla sin incubar	33
??Análisis de semilla seca	33
??Análisis de semilla ablandada, remojada o procesada	36
??Examen del líquido resultante del lavado de las semillas	38
2.1.2. Análisis de semillas después de incubación	40
??Incubación en cámara húmeda	42
??Incubación en agar	44
2.1.3. Pruebas de crecimiento	46
2.1.4. Métodos específicos para bacterias, virus y viroides	48
Referencias	63

CAPÍTULO III	
TRATAMIENTO DE SEMILLAS	71
1. Tipos de tratamientos erradicantes en semillas y sus efectos	73
1.1. Tratamientos físicos	73
1.2. Tratamientos biológicos	75
1.3. Tratamientos bioquímicos	76
1.4. Tratamientos químicos	76
1.4.1. Condiciones que regulan la eficiencia de un tratamiento químico de semillas	77
1.4.2. Desinfecciones	78
1.4.3. Formulaciones en las que se presentan los productos químicos	79
2. Tipos de tratamiento de desinfección, según la forma de aplicación	80
2.1. Tratamiento seco	80
2.2. Inmersión en solución o suspensión acuosa	80
2.3. Slurry o pasta acuosa	80
2.4. Nebulización	81
2.5. Inmersión en solventes orgánicos	81
2.6. Revestimiento en películas	82
3. Tipos de tratamientos de desinfección, según el organismo que controlan	83
3.1. Tratamientos fungicidas	83
3.2. Tratamientos bactericidas	88
3.3. Tratamientos insecticidas	91
Referencias	94
CAPÍTULO IV	
LEGISLACIÓN FITOSANITARIA	97
Principios de cuarentena vegetal	97
Legislación sanitaria en semillas	100
Referencias	105
GLOSARIO	107
ÍNDICE ANALÍTICO	111

LA SEMILLA

Botánicamente, la semilla de las angiospermas es un óvulo maduro, encerrado dentro del ovario o fruto y consta de tres partes básicas: el embrión, los tejidos de almacenamiento y las cubiertas.

El embrión es una nueva planta que resulta de la unión durante la fertilización del gameto femenino por el gameto masculino. Su estructura es un eje con puntos de crecimiento en ambos extremos (uno para el tallo y otro para la raíz) y una o más hojas seminales o cotiledones fijadas en el eje embrionario. Los tejidos de almacenamiento de la semilla pueden estar formados por las cubiertas mismas, por los restos de la nucela y, a veces, por parte del fruto. Las cubiertas de la semilla proporcionan protección mecánica al embrión, haciendo posible su manejo sin dañarlo y permitiendo su transporte a grandes distancias y su almacenamiento por largos períodos.

Las semillas constituyen una de las formas en que las especies vegetales sobreviven. Ellas protegen y sostienen su vida, presentando una serie de mecanismos organizados, estando equipadas con fuentes especiales de alimentos que las facultan para soportar un largo tiempo dormantes, hasta que confluyan las condiciones favorables que permitan el desarrollo de las nuevas plantas.

Las semillas son los vehículos principales para propagar la vida. Sin embargo, en su misión de ser portadoras de las características genéticas, agronómicas y morfológicas generadas por la investigación

fitotécnica pueden servir también de vehículo para transportar patógenos que pueden producir deterioros de la producción agrícola.

La semilla ofrece las condiciones nutricionales adecuadas para sí misma y para otros seres vivos que se asocian a ella en busca de alimentos y oportunidades de sobrevivencia. Neergaard (20) afirma que el 90% de los cultivos destinados a la producción de alimentos puede sufrir algún tipo de enfermedad y sus agentes, en su mayoría, son transmitidos por la semilla. Se ha encontrado cerca de 1.500 organismos presentes en lotes de semillas de aproximadamente 600 géneros de plantas, por lo que se puede concluir que la mayoría de los patógenos asociados a la semilla pueden ser transportados por ella misma, sin embargo, no todos los microorganismos transportados por ella son obligatoriamente causantes de enfermedades.

La efectividad del transporte de patógenos y la transmisión de enfermedades por la semilla dependen de una serie de factores bióticos y abióticos. En general, las causas de transmisión de patógenos aumentan en la medida en que el inóculo se ubique más internamente en la semilla.

La patología de semillas es la ciencia que estudia las implicaciones relativas a la asociación de patógenos con la semilla, considerando todas las etapas del sistema de producción y uso de las mismas y teniendo como objetivo principal el control de los patógenos transmisibles por ella.

Considerando la importancia económica internacional del rubro de producción de semillas, se puede decir que la patología tiene gran trascendencia para que la producción de las diferentes especies llegue a feliz término y en condiciones económicas favorables.

El objetivo principal de controlar los patógenos que se transmiten por semilla se logra a través de la aplicación de varias estrategias destinadas a reducir estos riesgos. De este modo, la inspección y el análisis de las semillas permiten la detección oportuna de los microorganismos asociados a ellas; los tratamientos permiten protegerlas de dichos microorganismos y, en algunos casos, erradicarlos. Finalmente, una legislación sanitaria adecuada permite regular y orientar el necesario intercambio internacional de semillas, desarrollando esquemas de

certificación, que son las normas legales para calificar las semillas asegurando su identidad genética, su pureza física, su germinación y la ausencia de malezas y de patógenos transmitidos por ella misma, logrando obtener y ofrecer semillas sanas.

CAPÍTULO I

INSPECCIÓN FITOSANITARIA DE SEMILLA SECA, SÍNTOMAS Y SIGNOS

La inspección de semilla seca es una acción preliminar que, dependiendo de la especie de semilla, puede dar por resultado la necesidad de practicar pruebas más especializadas para verificar el estado sanitario de la misma.

Este examen permite determinar, fundamentalmente, impurezas, decoloraciones, manchas o deformaciones, cuerpos frutales fungosos signos de la presencia de un organismo de esta naturaleza, pesticidas y, por último, la presencia de otras semillas consideradas malezas.

Impurezas (14,15)

Se pueden considerar como tales a esclerocios, insectos, agallas de nematodos, masas de carbón y semillas de malezas.

Entre los esclerocios más comunes acompañantes de semillas se pueden citar los pertenecientes a los géneros *Claviceps*, *Slerotinia*, *Botrytis* y *Rhizoctonia* (22). La confirmación de la estructura extraña como esclerocio y su determinación final corresponde a la instancia de laboratorio, pero durante la inspección visual se puede evaluar el grado

de presencia de dichas estructuras, ya que pueden ser vistas a ojo desnudo.

En las agallas producidas por nematodos, como el caso de *Anguina*, se pueden observar estructuras semejantes a las semillas, pero que carecen del embrión que caracteriza a una semilla normal y son menos fáciles de aplastar y sin olor, si se comparan con las agallas que producen los carbones. La confirmación de la estructura como una agalla y la determinación del nematodo involucrado requiere del análisis de laboratorio especializado. Estas estructuras también pueden ser observadas a ojo desnudo (8,9).

Con respecto a insectos, hay varias especies que pueden ser detectadas entre las semillas y dentro de ellas. En algunos casos, se puede observar, en forma evidente, los agujeros por donde han emergido insectos de la familia *Bruchidae*, *Torymidae* y *Eurytomidae*, entre otras. En otros casos, el insecto puede estar presente sin existir ningún síntoma evidente de su presencia, como los cálidos en semillas de umbelíferas y coníferas.

En cuanto a carbones, hongos basidiomicetos de los géneros *Ustilago*, *Tilletia* y *Sphaceloteca*, pueden ser distinguidos a simple vista, si se encuentran en cantidades apreciables en los granos; no obstante, es necesario hacer su identificación posterior en laboratorio. Si su presencia no es tan evidente, pero existe la sospecha, el analista puede practicar una prueba de lavado, filtrado y centrifugación para comprobar su existencia (16,18).

Finalmente, con respecto a las malezas, algunas tienen semillas que son muy obvias y otras, excesivamente pequeñas; algunas, muy distintas al hospedante y otras, parecidas a las semillas que se están inspeccionando. Su determinación y análisis requieren de la participación de un taxónomo de semillas.

Decoloraciones, manchas y deformaciones (14,15)

Las decoloraciones y los defectos producidos por patógenos sobre la semilla pueden, en algunos casos, ser conspicuos y reconocibles, debiendo observarse -además- los restos vegetales asociados y restos

inertes en los cuales se puede transportar patógenos. Esta observación tiene un valor restringido como herramienta única de diagnóstico, pero puede ser el indicador de la necesidad de un análisis de laboratorio más profundo.

Hay varios patógenos que pueden producir una sintomatología más o menos típica en diferentes especies.

Por ejemplo, en arvejas, *Pisum sativum*, las semillas infectadas con *Colletotrichum* sp. y *Ascochyta* spp. pueden presentar lesiones necróticas muy visibles, que pueden llegar a penetrar el interior de los cotiledones (2,20). Si las semillas presentan ataque severo por *Pseudomonas syringae* p.v. *pisi*, muestran lesiones necróticas que podrían confundirse con las producidas por *Mycosphaerella pinoides*. La diferencia entre ambos patógenos es que las manchas producidas por la bacteria son, en un principio, de apariencia húmeda, lo que permitiría, en parte, su diferenciación de otras manchas producidas por causas distintas (19). La presencia de Pea Early Browning Virus podría producir semillas arrugadas y con una decoloración gris verdosa en su cubierta (20).

En arroz, *Oryza sativa*, *Cochliobolus miyabeanus* (*Drechslera oryzae*) produce pudrición de la semilla y causa el síntoma denominado "pecky rice" que no sólo afecta la apariencia, sino también la calidad molinera, volviendo a las semillas infectadas quebradizas y decoloradas (12,20).

En cebada, *Hordeum vulgare*, atacada por Barley Stripe Mosaic Virus, se producen semillas anormalmente arrugadas y pequeñas, ya que la presencia del virus causa un gran número de semillas triploides y aneuploides, las cuales presentan normalmente el aspecto descrito (1,20).

En frejoles, *Phaseolus vulgaris*, las semillas severamente infectadas con *Colletotrichum lindemuthianum* muestran lesiones de color marrón con centros blanquecinos, las que se podrían definir como canchales deprimidos que pueden ser pequeños o afectar gran parte de la cubierta de la semilla. En las variedades de color oscuro, los síntomas son difíciles de detectar (7,24). Las semillas provenientes de vainas severamente afectadas por *Xanthomonas phaseoli* p.v. *phaseoli* no se desarrollan o permanecen arrugadas y sin valor. Cuando las vainas

están menos afectadas, las semillas se desarrollan normalmente y no muestran los síntomas de la enfermedad o se ven solo ligeramente arrugadas y con una decoloración amarillento pálida posible de observar solo en semillas blancas (24). En el caso de las semillas afectadas por *Curtobacterium (Corynebacterium) flacumfaciens*, la bacteria puede penetrar el hilum y formar una masa amarilla bajo la cubierta de la misma, lo cual es más notorio en las semillas claras con alto nivel de infección (24). El Broad Bean Mosaic Virus produce una mancha o decoloración oscura en forma periférica, con necrosis café de la cubierta de la semilla (20). Las semillas que provienen de plantas infectadas con Tobacco Streak Virus pueden presentar manchas en anillos concéntricos.

En garbanzo, *Cicer arietinum*, las semillas severamente infectadas con *Ascochyta rabiei* son pequeñas y arrugadas y muestran una decoloración que va de marrón a negra, observándose, a veces, lesiones concéntricas irregulares con o sin picnidios (5).

En maíz, *Zea mays*, *Helminthosporium carbonum* produce sobre los granos una excrecencia mohosa de color negro que les da una apariencia carbonosa y *Physalospora zeae* se detecta por la presencia de rayas o pecas negras en el pericarpio de la semilla (13).

En soya, *Glycine max*, *Cercospora kikuchii* produce áreas púrpuras sobre la cubierta de la semilla, lo cual está, además, frecuentemente asociado con grietas anchas y transversales (4,25).

En cilantro, *Coriandrum sativum*, las semillas infectadas con *Protomyces macrosporus* se presentan total o parcialmente hipertrofiadas y son, generalmente, más grandes que las normales (6).

En haba, *Vicia faba*, las semillas severamente infectadas con *Ditylenchus dipsaci* tienen su cubierta rajada y manchas necróticas en los cotiledones (10).

A pesar de lo descrito, es importante reconocer que la mayoría de las especies patógenas transmisibles a través de semillas no producen síntomas evidentes y, por lo tanto, la simple observación visual tiene un valor restringido como herramienta única de diagnóstico y es sólo una orientación para solicitar pruebas específicas de laboratorio.

Cuerpos frutales fungosos (14,15)

Mediante el uso de lupa estereoscópica se pueden detectar restos de hifas, masas de esporas y fructificaciones sobre el exterior de la semilla. Las observaciones posteriores a su detección permiten determinar su identificación directa o la necesidad de realizar pruebas de laboratorio especializadas, las cuales pueden requerir de períodos de incubación bajo ciertas condiciones para que el patógeno se exprese y sea identificable.

Ejemplos de esta situación podrían ser los picnidios producidos por *Septoria apiicola* sobre semillas de apio (24), *Septoria nodorum* sobre semilla de cebada (3), *Diplodia zae* sobre el pericarpio de la semilla de maíz (13), los acérvulos de *Colletotrichum capsici* sobre la semilla de pimentón (24), los cleistotecios de *Erysiphe graminis* sobre la semilla de trigo o las oosporas de *Peronospora manshurica* sobre la semilla de soya (11).

Presencia de pesticidas

Los restos de pesticidas sobre la semilla deben considerarse desde diferentes puntos de vista. Por una parte, su presencia puede enmascarar los síntomas y signos de un patógeno y, por otra, si aún estando presente un determinado pesticida, los análisis revelan la presencia viable de un patógeno, podría ser necesario repetir los tratamientos.

Se debe advertir a los analistas la presencia de un pesticida que no sea notorio y su ingrediente activo para que tomen las medidas y precauciones en la manipulación de las muestras y para considerar dicho compuesto en los análisis que se efectúen (14).

REFERENCIAS

1. American Phytopathological Society. 1987. Compendium of barley diseases. D.E. Mathre (Ed) APS Press. 78 pp.
2. COSAVE. 1991. Métodos analíticos. Hoja de trabajo N°8 *Ascochyta pisi* Lib.
3. COSAVE. 1991. Métodos analíticos. Hoja de trabajo N°9 *Septoria nodorum* Berk.
4. COSAVE. 1991. Métodos analíticos. Hoja de trabajo N°14. *Cercospora kikuchii* (Matsumoto & Tomoyasu) M.W. Gardner.
5. COSAVE. 1991. Métodos analíticos. Hoja de trabajo N°18 *Ascochyta rabiei* (Pass) Labr.
6. COSAVE. 1991. Métodos analíticos. Hoja de trabajo N°21 *Protomyces macrosporus* Ling.
7. COSAVE. 1991. Métodos analíticos. Hoja de trabajo N°25 *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Mang) Briosi et Cav.
8. COSAVE. 1991. Métodos analíticos. Hoja de trabajo N°32 *Anguina agrostis* (Steinbuch) Flipjev.
9. COSAVE. 1991. Métodos analíticos. Hoja de trabajo N°34 *Anguina tritici* (Steinbuch) Flipjev.
10. COSAVE. 1991. Métodos analíticos. Hoja de trabajo N°37 *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Flipjev.
11. COSAVE. 1991. Métodos analíticos. Hoja de trabajo N°44 *Peronospora manshurica* (Naum) Syd.
12. Description of pathogenic fungi and bacteria N°302. *Cochliobolus miyabeanus* (conidial state *Echslera oryzae*) M.B. Ellis & P. Holliday.

13. Dickson, J.G. 1963. Enfermedades de las plantas de gran cultivo. Colección Agrícola Salvat. Barcelona, España. 584 pp.
14. De Tempe, J. 1961. Routine methods for determining the health condition of seed in the seed testing station (General information). Proc. Int. Seed Test Ass. Vol 26 N°1.
15. De Tempe, J. y Binnerts, J. 1961. Introduction to methods of seed health testing. Seed Sci. & Technol. 7, 601-636.
16. EPPO. 1982. Data Sheets on quarantine organism. *Tilletia controversa* Kühn. EPPO Bull. 12 N°1.
17. EPPO. 1991. Quarantine procedure N°34 Barley Stripe Mosaic Hordeivirus. EPPO Bull. 21, 257- 259.
18. EPPO. 1991. Quarantine procedure N°37 *Tilletia indica*. EPPO Bull. 21, 265-266.
19. Fernández Valiela, M.V. 1978. Introducción a la Fitopatología. Vol. III Hongos. Colección Científica INTA. 778 pp.
20. Neergaard, Paul. 1979. Seed Pathology. Vol. I y II. Revised edition. Mac Millan Press Ltda. Gran Bretaña. 1.025 pp.
21. Pacheco Camargo, C. 1988. Importancia de la patología de semillas para los programas de semillas. IX Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines "ASCOEFI". Pasto Nariño, Colombia.
22. Shoen, F.J. 1983. Identification of seed like structure. Seed Sci. & Technol. 11, 639-650.
23. Shepard, J.W. 1983. Detection of seed borne bacterial blight of bean. Seed Sci. & Technol. 11, 561- 567.
24. Sherf, A.F. y Macnab, A.A. 1986. Vegetables diseases and their control. Second Ed. John Wiley & Sons. USA. 728 pp.

25. Velicheti, R.K. y Sinclair, J.B. 1994. Production of Cercosporin and colonization of soybean seed coats by *Cercospora kikuchii*. Plant Disease 78: 4, 342-346.
26. Zillinsky, F. 1984. Guía para la identificación de enfermedades en cereales de grano pequeño. CIMMYT. El Batán, México. 141 pp.

CAPÍTULO II MUESTREO Y ANÁLISIS FITOSANITARIO DE SEMILLAS

1. Muestreo de semillas

La transmisión de patógenos por semilla es el método más efectivo de distribución al azar del inóculo primario de los mismos en los diferentes cultivos. En términos generales, existe poca información sobre los programas destinados a certificar las semillas como libre de patógenos y sobre los problemas asociados con esta actividad.

El desarrollo de programas de análisis para certificación tiene como objetivo asegurar que el nivel de infección de un lote de semillas destinado a los agricultores es aceptable en un contexto agrícola dado o que los lotes están libres de determinados patógenos. Con esto se busca minimizar el riesgo de introducción de plagas cuarentenarias a áreas donde no han sido reportadas. Por lo tanto, en un programa de certificación se debería determinar el grado más bajo detectable de transmisión de un patógeno por semilla, el grado más alto de transmisión que puede ser tolerado en el campo sin producir pérdidas económicas y el límite físico o número de semillas que pueden ser procesadas en un análisis de laboratorio (27).

Los métodos utilizados para la detección de patógenos transmisibles por semilla pueden agruparse en dos grandes grupos: i) inspección directa de semillas y plántulas y ii) ensayos indirectos para el patógeno.

El procesamiento de la información disponible tiene como objetivo proponer tamaños de muestras de semillas y número de pruebas a efectuar para lograr detectar lotes de semillas contaminados con distintos patógenos con un alto porcentaje de confianza (27).

El tamaño de los embarques de semillas puede ser desde unos pocos gramos de germoplasma hasta bodegas completas de barcos. Considerando lo anterior, para obtener una muestra de semilla que, al ser probada, dé un resultado representativo de la condición de todo el embarque, se deben seguir algunas reglas específicas formuladas por la International Seed Testing Association ISTA (27).

La eficiencia del muestreo dependerá de la cantidad total de semilla de donde se extrajo la muestra, por lo que se introdujo el término "lote de semillas". Este término se define como la porción de un embarque que se supone razonablemente uniforme o como una cantidad específica de semillas físicamente identificable, respecto de la cual se puede emitir un Certificado Internacional de Análisis (27).

En el cuadro N°1 se dan algunos ejemplos de tamaño máximo de lotes. Los embarques que superen estas cantidades se deben subdividir en unidades menores (33).

Cuadro N°1
Máximos tamaños de lote (?)

Tamaño de semilla	Especie tipo	Tamaño máximo (Kilos)
Semillas grandes	Maíz	40.000
Semillas de cereales	Trigo	20.000
Semillas más pequeñas que cereales	Tomate	10.000
Semillas ornamentales grandes	<i>Lathyrus</i>	10.000
Semillas forestales grandes	<i>Quercus</i>	5.000
Semillas ornamentales pequeñas	<i>Achillea</i>	5.000
Semillas forestales pequeñas	<i>Eucaliptus</i>	1.000

(?) ISTA (33)

El problema fundamental en el muestreo de semillas es que es casi imposible obtener un lote perfectamente uniforme. Un lote de semillas puede estar envasado de diferentes maneras: ser parte de un embarque marítimo, estar en un contenedor, en sacos, en latas de distintos tamaños, en pequeños sobres, etc. La falta de uniformidad, los diferentes envases y las variaciones en el tamaño de las semillas hacen necesario adoptar diferentes metodologías de muestreo y equipos para los mismos (27).

En la acción de muestreo se extrae un número específico de **muestras primarias** de cada lote. Una muestra primaria es una pequeña cantidad de semilla, tomada de un solo lugar del lote. Varias muestras primarias, tomadas de diferentes partes de un lote, se mezclan para formar una sola gran muestra, **la muestra compuesta**.

Después de obtenida la muestra compuesta, se extrae de ella una submuestra que es enviada al laboratorio y de la cual, el laboratorio extrae, a su vez, **muestras de trabajo**, que son las cantidades de semillas sobre las cuales se ejecutarán las pruebas de laboratorio (27).

El concepto de submuestra no es aplicable al trabajo cuarentenario, en el cual las muestras de trabajo se preparan a partir de la muestra compuesta.

Cuadro N°2
Tamaños de muestras para algunas especies (?)

Tamaño de semilla	Especie tipo	Tamaño de la muestra (gr.)
Semillas grandes	Maíz	1.000
Semilla de cereales	Trigo	1.000
Semillas más pequeñas que cereales	Tomate	15
Semillas ornamentales grandes	<i>Lathyrus</i>	400-600
Semillas forestales grandes	<i>Quercus</i>	500
Semillas ornamentales pequeñas	<i>Achillea</i>	5
Semillas forestales pequeñas	<i>Eucaliptus</i>	15-60

(?) ISTA (33)

En el cuadro N°2 se presentan algunos ejemplos de tamaño de muestra según la ISTA.

La extracción de la muestra primaria se puede realizar con diversos instrumentos, siendo los más comunes los caladores.

El calador de Nobbe es un tubo de acero hueco, de largo suficiente para alcanzar el centro del envase y tiene un agujero oval cerca de la punta aguzada. Este es el instrumento más conveniente para muestrear semillas envasadas en bolsas, para lo cual se inserta el calador en un ángulo de 30°, hasta alcanzar el centro de la bolsa, dependiendo del tamaño de la semilla a ser muestreada.

El calador Sleeve consta de dos tubos de metal, uno inserto dentro del otro, ambos con ranuras en las paredes. El tubo interior puede girar dentro del exterior y cuando las ranuras coinciden se forman aberturas que dejan pasar las semillas al tubo interior, el que puede tener compartimentos separados o una sola cavidad del largo del tubo. Este calador se usa para el muestreo de grandes contenedores o bolsas. El modelo con compartimentos puede ser usado en posición horizontal y vertical, mientras que el modelo con una sola cavidad, sólo se puede usar en posición horizontal (33).

Las muestras primarias pueden también tomarse a mano, removiendo puñados de semillas desde posiciones al azar. Esta acción tiene algunas dificultades, ya que es difícil introducir la mano profundamente dentro de la masa de semilla y puede ser necesario vaciar parcialmente los sacos o contenedores para obtener muestras primarias desde la capa inferior de los contenedores. Este muestreo es aceptable sólo en algunas circunstancias (32,33).

Para asegurar la cobertura completa del lote de semillas, ISTA propone el número mínimo de envases y posiciones de las que se debe extraer la muestra (cuadro N°3).

Cuadro N°3
Mínimo número de envases a muestrear(?)

Número de envases en el lote de semillas	Mínimo número de envases a ser muestreados
1-5 inclusive	Todos los envases al menos en 5 posiciones
6-14	Lo menos 5 envases
15-30	Lo menos 1 envase de cada 3
31-49	Lo menos 10 envases
50-400	Lo menos 1 envase de cada 5
400-560	Lo menos 80 envases
561 o más	Lo menos 1 envase de cada 7

(?) ISTA (33)

Para los profesionales del ámbito de cuarentena vegetal, cuyo interés es evitar el ingreso de patógenos cuarentenarios, es muy importante el muestreo de semillas envasadas en pequeñas latas selladas o en sobres listos para la distribución al detalle o en pequeños paquetes de germoplasma.

En el caso de latas o sobres sellados, cada paquete o lata de 100 kilos es una muestra primaria. En el caso de germoplasma, cada paquete, independiente del tamaño del mismo, es considerado un lote y no se puede aplicar el principio de extracción de una muestra primaria. En estos casos, cada semilla puede ser examinada o analizada por los métodos no destructivos disponibles (32).

En un lote, un cierto porcentaje de semillas "I" puede estar contaminado por un patógeno. Esta contaminación puede ser desde una infestación superficial hasta una infección del embrión. Todas serán designadas como semillas infectadas, porque tienen un propágulo viable del patógeno, aunque algunos embriones o plantas pueden no estar infectados (27).

En un programa de análisis destinado a detectar infecciones, no es posible certificar que no hay absolutamente ninguna contaminación, aún cuando no se observe ninguna plántula enferma en una muestra (27).

Al realizar los análisis y evaluar los resultados, el investigador debe decidir sobre un nivel tolerable de infección "It", pequeño y no importante. Esta infección tolerable debe ser más baja que el nivel mínimo no tolerable, que tiene el potencial de causar pérdidas económicas en un cultivo (27).

En las pruebas directas de la muestra de semillas, un número "N" de semillas se coloca individualmente sobre el medio de crecimiento y se observa el número de semillas o plántulas enfermas resultantes, las que se designan como "x". El porcentaje observado de plántulas enfermas "I" es una estimación de la verdadera infección en el lote de semillas (27).

Si la infección tolerable "It" y la no tolerable "Int" están establecidas por información bibliográfica, el punto crítico "C" de decisión para aceptación o rechazo de un lote será un valor entre ambos. El lote será aceptado si la infección "I" es menor que el punto crítico "C" y será rechazado, si es mayor. Este es un problema estadístico de prueba de hipótesis, en el que se pueden producir dos tipos de errores, debido a problemas en el muestreo: i) que se acepte un lote de semillas con un nivel de infección mayor que el tolerable o ii) que se rechace un lote con una infección menor que la tolerable (27).

Los programas de análisis se deben desarrollar examinando un número suficiente de plántulas, de manera que se minimice la probabilidad de que se produzca cualquiera de los errores descritos (27).

Cuando el porcentaje de semillas enfermas en un determinado lote es muy bajo, la probabilidad de detectar dichas semillas en la muestra extraída sigue la distribución de Poisson. Para aplicar esta distribución y lograr establecer tamaños de muestra, están las cartas Thorndike, de la probabilidad acumulada de Poisson. Los tamaños de muestra varían con los diferentes requerimientos de confianza y con la definición de los niveles de infección tolerables y no tolerables. Mientras más exigentes sean estos estándares, mayor será el tamaño de la muestra requerido (27).

En los bioensayos indirectos, se utilizan muestras unitarias, extrayéndose varias muestras "K", cada una con un número "N" de semillas. Sobre el extracto de cada muestra se realizan las pruebas para el patógeno en cuestión y los resultados de la prueba demostrarán la presencia o ausencia del mismo (27).

Hay dos elementos que determinan el resultado de las pruebas:

- ?? que la muestra contenga alguna semilla infectada y
- ?? que la técnica de ensayo pueda detectar la contaminación

Por lo tanto, la probabilidad de obtener un resultado positivo en una muestra unitaria en ensayo dependerá de la probabilidad de tener semillas contaminadas en la muestra con la sensibilidad de la técnica analítica. La probabilidad de que existan semillas contaminadas en una muestra unitaria depende del verdadero porcentaje de infección en el lote de semillas y del tamaño "N" de la muestra, según la distribución de Poisson. La sensibilidad es una característica del método analítico y se debe determinar antes de usar el método de ensayo en los programas de análisis (27).

Para cumplir los objetivos de control fitosanitario, se debe determinar el número apropiado de semillas en una muestra unitaria y el número apropiado de análisis, de manera que se pueda detectar cualquier nivel de contaminación en un lote de semillas, con una alta probabilidad de éxito (27).

La ventaja de los ensayos directos es que se puede obtener la verdadera tasa de incidencia de un patógeno en la población mediante la observación del número de plantas enfermas. Sus desventajas son el tiempo, el trabajo y los costos. El ensayo indirecto, aunque preferible, no proporciona seguridad sobre la verdadera tasa de incidencia del patógeno (27).

Para ilustrar lo señalado se puede analizar el caso de *Pseudomonas syringae* p.v. *phaseolicola* en semillas de frejol. Al respecto, hay investigadores que han indicado que un nivel de infección en la semilla de un 0,02% puede producir el desarrollo de una epidemia. Se ha sugerido que una semilla infectada de entre 16.000 es capaz de producir pérdidas completas del cultivo, bajo condiciones ambientales favorables

al patógeno. Por lo tanto, las pruebas para esta bacteria en semilla de frejol deben tener una sensibilidad de 0,02 a 0,06%. Guthrie, Huber y Fendwick (1965) desarrollaron una prueba serológica para *Pseudomonas syringae* p.v. *phaseolicola* en semillas de frejol y prepararon un cuadro que mostraba el número y los tamaños de muestra necesarios para detectar un número dado de semillas infectadas con un 95% de confianza (44).

Cuadro N°4
Muestras necesarias para detectar un nivel de infección
de 0,0067% con 95% de confianza

Tamaño de muestra (gramos)	Número de muestras
2.268	5
1.361	10
567	20
454	30
340	40

Adaptado de Gauthrie et.al. (44)

Cuando se analizan semillas que han sido tratadas con productos bactericidas que pudieran reducir la incidencia de la infección, se debe aumentar el tamaño o el número de las muestras (44).

En cuanto a los virus, actualmente, se requiere de un pequeño número de pruebas para determinar si la infección de un lote de semilla está sobre o bajo los límites de tolerancia. Por ejemplo, para la detección de Pea Seedborne Mosaic Potyvirus (PSbMV) en semillas de arveja se requiere de una prueba sobre 7 grupos de 200 semillas con respecto a 0,5% de límite de tolerancia (41).

2. Análisis fitosanitario de semillas

La sanidad de semillas se refiere a la presencia o ausencia de organismos causantes de daños (como insectos) o de enfermedades (como hongos, bacterias, virus y nematodos) además de algunas condiciones fisiológicas como deficiencias o fitotoxicidades (22).

La participación de la patología de semillas es de fundamental importancia en el control fitosanitario, pues la mayor parte de las veces las semillas son portadoras de patógenos que no producen síntomas y para su detección es necesario que se utilicen técnicas de laboratorio específicas.

El objetivo general de cualquier técnica de análisis fitopatológico es determinar la condición fitosanitaria de una muestra representativa de semillas y, por inferencia, del lote del cual se extrajo (22). Los análisis específicos de laboratorio pueden servir para:

- ?? detectar infecciones de fitopatógenos cuarentenarios y de importancia económica que no fueron observados en el campo;
- ?? estudiar la condición fitosanitaria, como uno de los factores que determinan el valor de la semilla;
- ?? decidir la necesidad de efectuar un tratamiento;
- ?? evaluar la prevalencia de una infección transmitida por semilla o investigar, en algunas ocasiones, las causas de una baja emergencia, cuando está afectada la germinación (21).

Los análisis de laboratorio permiten ofrecer una mayor seguridad en el intercambio de germoplasma y constituyen una herramienta importante en la toma de decisiones en empresas de producción, investigadores y profesionales de las Organizaciones Nacionales de Protección Fitosanitaria. El diagnóstico correcto de cualquier enfermedad es un prerequisite para un adecuado control. Mientras más rápido y con mayor seguridad se identifique un organismo causal, más rápido y certeramente se dispondrán las medidas terapéuticas que corresponden (50,51).

La elección de la técnica de laboratorio depende de varios factores, tales como propiedades y características de las semillas, características del o

los fitopatógenos que pueden transmitirse por medio de ellas y de los propósitos de la técnica.

Si el propósito de la técnica es decidir si o no realizar un tratamiento sobre la semilla o evaluar el valor de campo de ella, bastará una aproximación a la condición sanitaria de la misma, sobre todo considerando que el grado de desarrollo de muchas enfermedades en el campo no sólo depende de la cantidad de inóculo transmitido por la semilla, sino también de las condiciones de crecimiento en el terreno mismo. Para cumplir con ambos propósitos hay un amplio número de pruebas o técnicas posibles de usar, para los que no se requiere de un gran tamaño de muestra (21).

Este razonamiento no es válido, si se sabe que la infección está presente en trazas y es, además, de importancia económica. Para fines cuarentenarios o con fines de detección de enfermedades transmisibles por semilla, pero aún ausentes o restringidas en un país importador, la presencia de trazas de una infección puede ser muy peligrosa y, por lo tanto, los tamaños de muestra deben aumentarse, usando las pruebas de mayor sensibilidad. Esto también es válido para aquellas infecciones, en las que trazas de la misma pueden comenzar el desarrollo de una enfermedad de importancia económica en el campo, ya sea porque el patógeno tiene una excepcional capacidad de dispersión (muchas bacterias y virus) o porque el desarrollo de la enfermedad es mayor en estadios más tardíos del huésped, de modo que con una baja cantidad de inóculo en la semilla hay suficiente tiempo para producir una explosión poblacional del patógeno (caso de *Ascochyta pisi* en arvejas) (21).

En la mayoría de los métodos fitopatológicos, los aspectos cuantitativos se limitan al porcentaje de semilla infectada, mientras se ignora la cantidad de inóculo por semilla o su naturaleza. Por ejemplo, conidias superficiales versus micelio profundo e infección ligera versus severa. Esto constituye una limitación cuando se estudian ciertas enfermedades en las que la cantidad de inóculo por semilla y su localización sobre o dentro de ella interactúa con las condiciones de siembra y decidirá la sobrevivencia del inóculo y el hecho de que éste pueda causar la enfermedad (21).

Las infecciones de semillas que están bajo cierto umbral pueden ser detectadas en una prueba de laboratorio, pero sin tener consecuencia alguna en el campo. Otras semillas pueden estar seriamente afectadas y desarrollar plántulas anormales en laboratorio, pero en el campo estas plántulas pueden no emerger y, por lo tanto, no originar una epifitía durante el crecimiento del cultivo. Sin embargo, si el patógeno es transmitido también por el suelo, los restos vegetales enfermos o infectados pueden causar la enfermedad en las próximas temporadas (21).

De todo lo anterior se concluye que no es posible proporcionar reglas estrictas para efectuar y evaluar las técnicas fitosanitarias en semillas. Es necesario conocer cada tipo de infección posible de ser transmitida por las semillas y la enfermedad que pueden originar para decidir cuántas semillas deben ser probadas y qué análisis emplear (21).

Para la generalidad de los casos, la prueba analítica debe cumplir los siguientes requisitos:

- ?? el patógeno debe ser identificable con facilidad y certeza,
- ?? los resultados deben ser reproducibles y comparables entre diferentes muestras,
- ?? excepto en el caso de infecciones causadas por fitopatógenos cuarentenarios, el resultado debería informar el posible comportamiento de campo de la semilla, lo que significa que la relación entre el resultado de la prueba de laboratorio y el desarrollo de la enfermedad en el campo debiera ser muy estrecha.
- ?? el método debiera ser simple, económico, rápido y, en lo posible, estandarizado con respecto al uso internacional (21).

Sin embargo, estos requisitos son difíciles de cumplir. La sanidad de semillas es un tema complejo que depende no sólo del patógeno mismo transmitido por la semilla, sino también de la presencia de otros microorganismos que pueden tener efectos antagónicos o sinérgicos durante la prueba (21).

Una semilla puede ser vista como una unidad ecológica, que consta de la semilla y su micropoblación: hongos, bacterias y otros patógenos y saprófitos. Esto complica las pruebas fitosanitarias, especialmente cuando se usan los métodos de incubación, que son, precisamente, los

más utilizados. Durante las pruebas de incubación se desarrollan varios microorganismos que interactúan entre sí. Pequeños cambios en las condiciones de la prueba pueden causar grandes diferencias en los resultados, lo que restringe la seguridad de los métodos (21).

2.1. Métodos generales fitopatológicos para análisis de semillas

En la tabla siguiente se entrega un listado de los métodos utilizados para el análisis de semillas, junto con la patología que se distingue y el instrumento de observación que se debe utilizar.

Indicadores

OD	Ojo desnudo
LM	Lupa de mano
LE	Lupa estereoscópica
MAP	Microscopio de alto poder
MF	Microscopio fluorescente
ME	Microscopio electrónico

Análisis de semilla sin incubar

Análisis de semilla seca

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

Análisis de semilla ablandada, remojada o procesada

- ?? Detecta masas de esporas y fructificaciones fungosas y nematodos que son visibles después de remojar las semillas en agua o lactofenol. LE-MAP
- ?? Detecta micelio dentro de la semilla MAP
- ?? Detecta insectos dentro de la semilla OD-LE

Examen del líquido resultante del lavado de la semilla

- ?? Detecta esporas o micelios MAP
- ?? Detecta nematodos LE-MAP
- ?? Detecta presencia de pesticidas evidenciado por sustancias colorantes OD

Análisis de semillas después de incubación

Análisis de semilla después de incubar en cámara húmeda

- ?? Detecta pudriciones, decoloraciones y malformaciones características. OD
- ?? Detecta crecimiento evidente de patógenos. OD
- ?? Detecta esporas de hongos o cuerpos frutales. LE
- ?? Detecta bacterias, esporas o micelios típicos y cuerpos frutales en las preparaciones microscópicas. MAP
- ?? Detecta insectos y sus daños OD
- ?? Detecta la presencia de pesticidas, indicada por cambios de color de la semilla o del sustrato o por el control de crecimiento de algunos microorganismos previamente inoculados al sustrato. OD-LM

Análisis de semilla después de incubar sobre agar	
?? Detecta la presencia de patógenos sobre o rodeando la semilla: después de pretratamiento al usar medios no selectivos. sin pretratamiento al usar medios selectivos	OD- MAP
?? Detecta la presencia de pesticidas sobre la semilla, por inhibición de microorganismos sobre agar inoculado con ellos.	OD
Pruebas de crecimiento	
?? Análisis de plantas que provienen de semillas sospechosas.	OD-MAP
?? Plantas comprobadamente sanas son inoculadas con organismos obtenidos de semillas sospechosas.	OD- MAP
Métodos específicos para bacterias, virus y viroides	
?? Pruebas bioquímicas (Bacterias)	OD-LE
?? Método de los bacteriófagos (Bacterias)	OD-LE
?? Microscopía electrónica (Virus)	ME
?? Electroforesis (Virus)	
?? Métodos serológicos	
Prueba de microprecipitación (Bacterias, Virus)	OD-LE
Prueba de aglutinación (Bacterias, Virus)	OD-LE
Prueba de difusión en agar	
Difusión simple (Virus)	OD-LE
Difusión doble (Bacterias, virus)	OD-LE
Inmunodifusión directa (Bacterias)	OD
Inmunoelectroforesis (Virus)	
Inmunofluorescencia (Bacterias, Virus)	ME
Inmunofluorescencia directa (Virus)	
Inmunofluorescencia indirecta (Bacterias)	
Tinción inmunofluorescente de colonias IFC (Bacterias)	
ELISA (Bacterias, virus)	OD
RIA	
RISA (Virus)	ME
SPRIA (Virus)	ME
SSEM (Virus)	ME
?? PCR (Virus, bacterias, hongos, nematodos)	
?? MASH (Viroides)	
?? R. PAGE (Viroides)	

2.1.1. Análisis de semilla sin incubar

Análisis de semilla seca

a. Impurezas

La muestra proveniente de un lote de semillas se inspecciona en estado seco para observar la presencia de impurezas como esclerocios, insectos y agallas debidas a nematodos, de granos carbonosos y de otras semillas que pudieran revestir peligro, como malezas. En un análisis rutinario de pureza, todas estas estructuras son separadas y derivadas a análisis sanitario para su identificación (21).

Cuando se detectan esclerocios es necesario tener la capacidad de distinguir entre los esclerocios de distintos géneros de hongos que los forman como *Claviceps*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Botrytis*, etc. Su relación con la especie vegetal de las semillas analizadas puede ser útil para su identificación final. Así, los esclerocios de *Claviceps* relacionados con especies de cereales y otras gramíneas, son cuerpos de color negro azulado, visibles entre los granos, de forma similar a la cariopsis del huésped al que reemplazan (25).

Como la identificación directa de los esclerocios de diferentes hongos es casi imposible, es necesario obtener cultivos puros desde la superficie esterilizada del mismo, haciéndolos germinar e incubándolos durante varias semanas, a menudo, para que se desarrollen las estructuras de identificación. Después de una incubación óptima, un esclerocio viable puede producir micelio vegetativo (miceliogénico), esporas asexuales (esporogénico) o cuerpos frutales (cargogénicos) (53).

Para distinguir entre esclerocios de *Claviceps* y agallas de *Anguina* en semillas de diferentes especies de gramíneas es necesario realizar comprobaciones mediante preparaciones microscópicas (21). Las agallas producidas por *Anguina tritici* en semillas de trigo son café negruzco, de 2-3 mm. por 3-5 mm., carecen de cepillo y de las marcas del embrión que caracterizan a las semillas normales. Cuando la infección tiene lugar en los últimos estados de desarrollo de las semillas, las larvas pueden ser transmitidas por semillas de apariencia normal (16). En otras gramíneas, las agallas son elongadas, desproporcionadamente angostas o de forma aguzada y de color negro brillante o ámbar. Las glumas y paleas pueden tener longitudes varias

veces mayores a su tamaño normal. *Anguina agrostis* es la principal causa de agallas en muchas especies destinadas a praderas y céspedes (17).

Bajo el nombre de carbones, se incluyen cuatro géneros de la clase Basidiomicetes, los cuales son patógenos de cereales que producen masas de esporas negras (teliosporas) que reemplazan total o parcialmente las espigas, espiguillas o granos. Todos son patógenos que se transmiten por la semilla y/o por el suelo. Así, cuando existe infección por *Ustilago* spp. se observa que las florecillas son reemplazadas por masas negras de teliosporas, las que son muy pequeñas (5-10 milimicrones de diámetro) y están encerradas en una membrana delgada. En el caso de *Tilletia* spp. también se observa que los granos son reemplazados total o parcialmente por teliosporas envueltas en una membrana dura de color gris oscuro. Sin embargo, la identificación de las distintas especies de *Tilletia* sólo sobre la base de las características morfológicas de la teliospora, es una tarea difícil (61). Algunas de las especies de mayor importancia incluyen *Tilletia indica*, *Tilletia controversa*, *Tilletia barclayana*, *Tilletia caries* y *Tilletia foetida*. Debido al rompimiento de los soros o agallas durante la cosecha, este patógeno se puede transmitir por semilla aparentemente sana (61).

Otros carbones de importancia son los pertenecientes a los géneros *Urocystis* y *Sphaceloteca*. *Sphaceloteca reilliana* ataca sorgo y maíz e infecta las plántulas a través de las raicillas y coleoptilos desde esporas ubicadas sobre la semilla o en el suelo. El primer síntoma aparece con la emergencia de la panoja, la cual llega a estar parcial o completamente convertida en una masa de soro. Cada soro está cubierto por un peridermo grisáceo blanquecino, el cual pronto se rompe para mostrar las teliosporas, de color café rojizo, esféricas y densamente equinuladas, con tamaños que varían entre 9,9 y 13,2 milimicrones (38).

En relación con los insectos, existen algunas especies cuya presencia es detectada en forma fácil entre las semillas, pero hay muchas otras que se encuentran escondidas dentro de las mismas. Algunas semillas pueden mostrar los agujeros de salida desde los cuales han emergido especies de brucus (*Bruchus* spp., *Bruchidius* spp., *Callosobruchus* spp., *Acanthoscelides* spp., etc.), Torymidae (*Megastigmus* spp., *Syntomapsis* spp., *Torymus* spp.), Eurytomidae (*Bruchophagus* spp., *Systole* spp., *Eurytoma* spp.). Algunas de ellas pueden ser plagas polífagas, como el

caso de *Sitophilus spp.* o tener un rango de alimentación más restringido como *Acanthoscelides obtectus* "bruco del frejol" y *Spermophagus subfasciatus* "bruco brasileño del frejol" o pueden estar restringidos a un solo huésped, en cuyo caso no pueden alimentarse en semillas maduras, pero pueden encontrarse vivos en semillas secas y solo rompiéndolas y removiendo su cubierta se puede exponer el insecto o su daño (21, 22, 23).

En los insectos que infestan internamente las semillas, las larvas pasan la mayor parte de su vida en una sola semilla, reduciendo su viabilidad y predisponiéndola a pudriciones por hongos o bacterias.

Considerando que las semillas infectadas son difíciles de detectar, puesto que es posible que no exhiban signos de tal condición hasta que el adulto emerge, el intercambio internacional de semillas implica el riesgo de introducir nuevas especies de insectos en lugares donde las condiciones pudieran ser favorables para su establecimiento. Es el caso de las semillas de coníferas atacadas por avispas del género *Megastigmus*, en las que, además de las dificultades de detección, se une su dificultad de control, pues son capaces de sobrevivir a la fumigación con bromuro de metilo en dosis de 36 gr./m³ por 2 horas a 34°C con alto vacío inicial, resistencia que parece estar asociada con el fenómeno de diapausa del insecto (46). Un importante elemento de ayuda para detectar estos insectos de alimentación interna en semillas lo constituye el uso de rayos X (22).

b. Manchas, decoloraciones y malformaciones indicativas de la presencia de patógenos

Las decoloraciones y manchas debidas a organismos patógenos son, generalmente, fáciles de detectar, pero tienen un valor restringido para el diagnóstico, existiendo la necesidad de practicar análisis más específicos. Sin embargo, la gran mayoría de las enfermedades transmisibles por semilla no producen síntomas evidentes en ella.

En algunos casos, la evaluación de la semilla seca puede apoyarse en el uso de luz ultravioleta. Bajo esta luminiscencia, *Ascochyta* en arvejas produce una fluorescencia amarillo verdosa, *Ustilago nuda* en trigo produce una fluorescencia azulada. También se ha observado que los

frejoles blancos infestados con *Pseudomonas syringae* p.v. *phaseolicola* se encuentran en la fracción fluorescente de la muestra.

Este método constituye un mejoramiento de la inspección de semilla seca con luz ordinaria y sirve para obtener una impresión rápida del grado de infección de ciertas especies (21).

c. Fructificaciones fungosas sobre semilla seca

Para la detección de fructificaciones fungosas o restos de micelio sobre semillas, se requiere del uso de lupa estereoscópica. Este método se puede aplicar, por ejemplo, cuando se desea detectar picnidios de hongos del género *Colletotrichum* en semillas de varias especies, complementándolo con la verificación de la identidad del hongo mediante examen microscópico (21).

d. Presencia de pesticidas sobre semilla seca

Los pesticidas presentes sobre semilla seca son, a menudo, visibles a simple vista, debido a que generalmente los productos usados contienen sustancias colorantes distintivas. Es importante considerar la presencia de pesticidas sobre la semilla para tomar las precauciones y las consideraciones correspondientes en su manipulación y análisis (21).

Análisis de semilla ablandada, remojada o procesada

a. Fructificaciones fungosas, masas de esporas y nematodos en semilla remojada

La acción de remojar y lavar las semillas permite que los síntomas y signos de la enfermedad sean más visibles. Por ejemplo, en el caso de *Septoria apii* cuando se remoja la semilla en agua o lactofenol los picnidios del hongo se agrandan revelando más fácilmente la presencia del patógeno (21).

Después de detectada la presencia de un cuerpo frutal se requieren de pruebas complementarias de viabilidad e identificación. El método sirve también para la detección de esporas típicas de algunos hongos y estados de nematodos. Así, por ejemplo, el contenido de las agallas producidas por *Anguina* puede ser investigado de esta forma (21).

b. Detección de infecciones internas después del procesamiento de la semilla

Esta técnica puede ilustrarse con la detección de *Ustilago nuda*, carbón que se encuentra presente dentro del embrión de las semillas de trigo y cebada en forma de cordones de hifas. Uno de los métodos de detección consiste en remojar la semilla, partirla, teñirla con fuccina y observarla bajo luz ultravioleta para detectar la fluorescencia característica del hongo. Otro método es el canadiense, en el cual las semillas se maceran con una solución de hidróxido de sodio, aislando y tiñendo los embriones con los que se identifican las hifas características con un bajo aumento (alrededor de 20X) (21). La prueba de los embriones tiene la ventaja de dar resultados rápidos y seguros, sin influencia ambiental (45).

Una técnica similar se puede usar para determinar cuantitativamente la presencia de *Ustilago avenae* en semilla de avena. Las hifas de este carbón se establecen en la cubierta de la semilla después de la infección floral, por lo que, removiendo la semilla desde las glumas cerradas e incubándola en cámara húmeda, es posible separar la cubierta de ella, la cual se tiñe y observa con aumentos de 450X, permitiendo detectar de esta manera las hifas características de este carbón (21).

Las hifas de los hongos que producen las enfermedades llamadas "downy mildew" comúnmente están presentes en los espacios intercelulares de la cubierta de la semilla y la maceración, clareamiento y teñido de ellas permite detectar su presencia. No se puede realizar la identificación específica sólo sobre la base de observación de las hifas, pero la detección de hifas no septadas, obtenidas por este método en semillas de arvejas, sugieren la presencia de una especie de *Peronospora*. Si, además, hay oosporas presentes, se podría determinar con certeza el género y la posible especie involucrada (21).

Es un hecho establecido que los virus transmitidos por semilla son llevados dentro del embrión. En una planta infectada, los virus infectan un gran número de testas de semilla, como si infectaran extensivamente el tejido parenquimatoso materno. Sin embargo, los virus en testas maduras no juegan ningún papel en la transmisión por semilla, debido a la imposibilidad de los mismos para moverse hacia el embrión, después

de la resorción del suspensor. Excepcionalmente, las testas maduras infectadas por ciertos virus estables como Tobacco Mosaic Tobamovirus TMV, pueden ser una fuente de inóculo para la población de plántulas (41).

Ya que la presencia del virus en la cubierta de la semilla no se relaciona con la transmisión desde semillas a plántulas, los ensayos serológicos de semilla entera no son adecuados para estimar las tasas de transmisión por semilla. En muchos casos, las testas son removidas para evitar las reacciones de falsos positivos y para determinar correctamente la tasa de transmisión por semilla en un lote. En el caso de Barley Stripe Mosaic Virus, en semilla de cebada, el embrión tiene que ser separado no sólo de las testas, sino también del endospermo para evitar la reacción falso positivo mientras se detectan virus transmitidos por semilla (41).

c. Insectos dentro de la semilla ablandada o remojada

Los insectos dentro de las semillas pueden detectarse remojando una muestra de las mismas en hidróxido de sodio e inspeccionándola luego bajo la lupa estereoscópica. El simple remojo de las semillas en agua facilita abrirlas para la inspección interna (21).

Examen del líquido resultante del lavado de las semillas

a. Elementos fungosos en solución proveniente del lavado de la semilla

Este sistema, con algunas modificaciones, se ha desarrollado para la detección de teliosporas de *Tilletia spp.* (21). Se considera que *Tilletia indica* es una de las especies de mayor importancia económica en este género. Para evitar la introducción de este carbón en áreas libres, se debe contar con un método analítico sensible, que permita la adecuada separación de sus teliosporas de las de otras especies morfológicamente similares. El método usado para la separación de las esporas de *T. indica* es la combinación de la técnica de filtración y centrifugación. La filtración se realiza mediante el uso secuencial de papeles filtro con adecuados tamaños de poros destinados a separar el material grueso que dificulta la observación y, finalmente, retener las teliosporas del

patógeno en cuestión. El tamaño de poro que los investigadores han considerado adecuado para retener estas teliosporas es de 12 milimicrones. En la observación posterior hay que considerar que existe otra especie, *Tilletia barclayana*, agente causal del falso carbón del arroz con esporas similares en tamaño y morfología y que puede encontrarse como contaminante en semilla de trigo. La prueba más certera de identificación, posterior a la separación y centrifugación, es el uso de la reacción en cadena de la polimerización (PCR) (11).

El análisis de la solución proveniente del lavado de semillas puede usarse con cada hongo que posea esporas características que se encuentren localizadas en la superficie de la semilla (21).

b. Nematodos en la solución de lavado de las semillas

Se conocen varios géneros de nematodos transmitidos por semilla como *Anguina*, *Aphelenchoides* y *Ditylenchus*, los cuales pueden infestar semillas de cereales, leguminosas y cebollas. En muchos casos, la infección de la semilla es el medio predominante de supervivencia de este tipo de patógenos (21).

Los nematodos se dispersan adheridos a la superficie de las semillas, con restos vegetales acompañantes, dentro de los cotiledones o como masas sólidas. Es así como se ha encontrado estados de *Ditylenchus dipsaci* deshidratados adheridos a la cubierta y dentro de la semilla de trébol, alfalfa, vicia y cebolla. El nematodo se desarrolla en la inflorescencia, produciendo deformación y engrosamiento de las yemas florales y se ha encontrado en la mayor parte de los desechos asociados con las semillas de las especies ya mencionadas (21).

Para su extracción y análisis, se coloca una muestra de semillas sobre un papel filtro, el cual debe estar puesto dentro de un embudo Baerman con la salida cerrada, luego, se le agrega agua; con ella, los nematodos empiezan a moverse pasando a través del papel filtro y acumulándose cerca del punto de salida. Al día siguiente, se sacan unas alícuotas y se observan con lupa estereoscópica y, si es necesario, con microscopio para llegar a la determinación de la especie (21).

Aphelenchoides besseyi es otro nematodo parásito transmitido por semilla. Este tiene la capacidad de permanecer en estado quiescente

mientras está deshidratado y reactivarse con la hidratación, dependiendo su detección cuantitativa de esto último. El método de detección requiere realizar el descascaramiento manual de las semillas infectadas, colocándolas en un disco Petri con una pequeña cantidad de agua y, luego, transfiriendo su contenido a un embudo Baerman. Después de 24 horas, se pueden extraer los nematodos para su observación microscópica. Si la semilla se tritura y luego se pasa por el embudo se detecta menor número de nematodos y si las semillas se colocan directamente sin descascarar, disminuye sustancialmente la sensibilidad del método (31).

c. *Pesticidas en la solución de lavado de las semillas*

El lavado de las semillas es un buen método para probar la presencia de tratamientos pesticidas en polvo o líquidos.

En un examen directo es posible detectar las partículas de tratamientos pesticidas en polvo, no obstante, los pesticidas líquidos aplicados sobre semillas oscuras no son siempre notorios. En este caso, al agitar la semilla con agua, alcohol, tetracloruro de carbono u otro solvente se puede revelar la presencia del compuesto por el cambio de color del solvente (21).

Determinar la presencia de una sustancia puede ser importante para tomar las precauciones en la manipulación de la semilla durante los análisis y considerarla en los efectos sobre los mismos. Para tener una información más detallada sobre la identidad de las partículas pesticidas, se requiere de un análisis de un laboratorio especializado (21).

2.1.2. Análisis de semilla después de incubación

La incubación se puede definir como la acción de mantener las semillas en un ambiente favorable para el desarrollo de los patógenos o sus síntomas (32). Los métodos de incubación se usan para estudiar hongos y bacterias y son los más utilizados, a pesar de estar sujetos a una fuente adicional de error, debido a las posibles variaciones en las condiciones de incubación. Estas variaciones pueden ser importantes, considerando que los patógenos son parte de un complicado y sensible sistema ecológico.

Existen dos métodos de incubación, uno que usa como sustrato papel absorbente humedecido y otro que usa agar nutritivo. Al comparar ambos métodos para una misma infección, se observa que se obtienen mejores resultados con el agar nutritivo. La razón es que el agar es un medio rico en nutrientes y los patógenos se desarrollan saprofiticamente, mientras que en el papel absorbente, la nutrición puede ser deficiente.

El antagonismo juega también un rol importante en los resultados de ambos métodos. Cuando se usan medios de cultivo de bajo pH como agar papa dextrosa (APD) o agar malta, las bacterias presentes en la semilla pueden crecer en forma exuberante e impedir el desarrollo característico de las colonias fungosas. Por ello, es normal adicionar antibióticos al medio de cultivo para evitar el crecimiento desmedido de las bacterias. Esta situación también se puede presentar con el uso de papel absorbente, ya que un sustrato con altos niveles de humedad estimula el crecimiento de estas bacterias saprófitas, especialmente si las semillas son pequeñas o viscosas, siendo posible también en este medio corregir la situación adicionando antibióticos.

El antagonismo entre hongos es más difícil de controlar selectivamente. El desarrollo abundante de hongos saprófitos puede impedir el crecimiento y detección de hongos patógenos. Igualmente, el crecimiento excesivo de algunos hongos patógenos puede entorpecer la observación de otros patógenos con hábitos de crecimiento más moderado. El antagonismo puede disminuirse durante la incubación en agar usando medios específicos o selectivos y haciendo pretratamientos a las semillas; sin embargo, su uso, antes de efectuar la incubación, también puede afectar los resultados. Si el inóculo del patógeno está presente en la superficie de la semilla, el pretratamiento lo reducirá afectando el diagnóstico. Si la infección superficial tiene la capacidad de causar una enfermedad seria en condiciones normales de campo, la reducción del inóculo disminuirá el valor predictivo de la prueba; si la infección es inofensiva bajo condiciones de campo, su valor predictivo aumenta, al reducir la infección a un nivel agrícolamente justificable (21).

Incubación en cámara húmeda

Para realizar la incubación en cámara húmeda se pueden usar discos Petri o bandejas rectangulares de distintos tamaños acondicionados con papel filtro o absorbente. La distancia a la que se colocan las semillas en el disco o bandeja dependerá del tamaño de las mismas, de las características del patógeno que se espera determinar, especialmente de su capacidad de dispersión y prevalencia, y de la duración de la prueba. Si el patógeno que se está investigando está presente en trazas sobre una determinada especie de semilla, éstas se pueden colocar muy cerca entre sí, aunque el patógeno se disperse de semilla a semilla durante la incubación. Para la evaluación cuantitativa de una prueba bajo estas condiciones se pueden contar centros de infección en lugar de semillas infectadas, considerando cada centro como una semilla infectada. El método de colocar las semillas muy cerca entre sí es útil para aquellos casos en que se aplica cero tolerancia (21).

Para contar con la suficiente humedad durante la prueba, las semillas se colocan sobre un papel absorbente grueso, blanco y liso, lo que permite su adecuada observación. Se debe evitar agregar agua durante la incubación, ya que el papel absorbente no debe estar excesivamente húmedo para no estimular el crecimiento de bacterias antagónicas. Esto último se puede controlar humedeciendo el papel absorbente sólo con una solución antibiótica en lugar de agua. Se recomienda, por lo tanto, usar una gruesa capa de papel, que provea de suficiente humedad para el hinchado y eventual germinación de las semillas, por una parte, y que permita el desarrollo del patógeno, por otra (21).

En algunos casos, puede ser conveniente propiciar la inhibición de la germinación de las semillas, lo que permitirá colocar mayor número de ellas sobre la misma superficie, permaneciendo ordenadas sin que la germinación impida la observación final de la prueba. La interrupción de la germinación se puede realizar mediante el uso de sustancias como el 2,4,D (0,1-0,2%) o a través del congelamiento de la semilla hinchada, sometiéndola a -20°C por 12 horas (21).

Cuando la prueba contempla la germinación de la semilla, la observación y el análisis posteriores pueden ser sólo de aquellas plántulas aparentemente enfermas y de las semillas no germinadas; si se inhibió

la germinación es necesario inspeccionar cada una de las semillas de la muestra (21).

La identificación de patógenos fungosos depende de sus conidias o esporas y fructificaciones; por lo tanto, las condiciones de incubación deben ser tales que promuevan su formación. Así, para los hongos de clima templado, la temperatura de incubación no debería ser superior a los 20°C, debido a que la esporulación se inhibe a temperaturas altas; las infecciones de clima cálido se desarrollan mejor con temperaturas de incubación sobre los 20°C. El valor predictivo de las pruebas con papel absorbente aumenta, si se usan temperaturas de incubación aproximadas a las temperaturas de siembra en el campo (21).

La esporulación de muchos patógenos se estimula también usando luz ultravioleta, alternando ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Si el patógeno en estudio no es sensible a los ciclos de luz/oscuridad, la luz ultravioleta servirá para reducir la formación micelial de los hongos saprofíticos, facilitando así la observación del patógeno (18).

Respecto al uso de la luz ultravioleta, hay que considerar un adecuado diseño de la iluminación, ya que las lámparas UV pueden causar aumentos de temperatura de 2 ó 3°C sobre los óptimos de incubación, con lo que se podría reducir la esporulación. Asimismo, las lámparas situadas por debajo de las estanterías donde se colocan las bandejas con los sustratos humedecidos pueden causar el secado de los mismos, obligando a la práctica de readicionar agua (21).

La duración de las pruebas depende de la velocidad de desarrollo del patógeno que se desea detectar. Es necesario hacer varias observaciones, debido a que durante el período de prueba se pueden presentar varios patógenos con diferentes velocidades de desarrollo y aquellos de desarrollo más rápido pueden estar enmascarando la presencia de otros de crecimiento más lento (21).

Si se requiere de pruebas posteriores, los papeles absorbentes pueden secarse sin deteriorar la identificación de los microorganismos, pues la mayoría de los hongos patógenos mantienen sus características por bastante tiempo en estado seco.

La incubación en cámara húmeda se usa especialmente en aquellas infecciones en las que se carece de experiencia y como condición general se recomiendan períodos de incubación de 8 días a 20°C, con ciclos alternados de luz ultravioleta.

Después de una incubación en cámara húmeda, es posible observar síntomas sobre las plántulas emergidas que pueden ser lo suficientemente característicos para un correcto diagnóstico o requerir análisis posteriores más especializados. También es posible observar el crecimiento de los patógenos mismos, especialmente micelio, esporas y/o sus fructificaciones. Si estos patógenos son lo suficientemente característicos, su identificación será definitiva (21).

Las condiciones de incubación en cámara húmeda hacen que las semillas se abran fácilmente, lo que permite detectar la presencia de insectos internos o su daño.

En relación con la detección de pesticidas mediante este sistema, si después de una incubación en cámara húmeda se observa abundante desarrollo de hongos en las semillas y/o plántulas, se puede concluir que no hay un fungicida presente o si lo está, su cantidad no fue efectiva. En otros casos, para evidenciar la presencia de fungicida sobre la semilla, se remojan las toallas absorbentes en una suspensión de esporas de un hongo que esporule bien en ese sustrato y, luego, se colocan las semillas en estudio sobre él. Si no se observa crecimiento fungoso alrededor de ellas, significa que las semillas estaban desinfectadas con una dosis adecuada de fungicida (21).

Incubación en agar

La incubación en agar contempla el uso de distintos medios de cultivo. Los medios de cultivo con bajo pH como APD o agar malta, son los más convenientes para hongos patógenos usuales sobre semillas y para los saprófitos comunes; los medios neutros tales como agar bactonutrientes o agar bactopectona son los más adecuados para bacterias.

La adecuada elección del medio de cultivo enfatiza la presencia de ciertos microorganismos, restringiendo el antagonismo. La necesidad de realizar pretratamientos depende de la especie de semilla y de la

condición bajo la cual ha madurado; en la mayoría de los casos, es común hacer una desinfección superficial con hipoclorito de sodio al 1% o al 0,5%. Cuando las pruebas están destinadas a analizar hongos, se pueden agregar trazas de terramicina (alrededor de 50 ppm.), o estreptomina (100 ppm.), con el objeto de controlar el crecimiento bacteriano (21).

Aislar con éxito un patógeno sobre agar depende de la eficiencia del agar semiselectivo, de los niveles de contaminación del lote y del contenido de organismos saprófitos de la muestra, obteniéndose los mejores resultados en aquellos lotes que están fuertemente contaminados con el patógeno y que contienen relativamente pocos organismos saprófitos. La detección sobre agar semiselectivo puede ser muy sensible cuando se logra un buen control de estos últimos.

Para realizar la colocación de las semillas en el medio nutritivo se requiere de una cámara de flujo laminar, que impida la contaminación por hongos transmitidos por el aire. El número de semillas por disco Petri depende del tamaño de la semilla, del patógeno esperado y del nivel de infección (21).

En la incubación de semillas de clima templado, la fructificación de los hongos puede estimularse con luz ultravioleta en los últimos días de incubación. Por ejemplo, se aplican 5-6 días de oscuridad y, luego, 2 ó 3 días con luz ultravioleta en ciclos de 12 horas luz y 12 horas oscuridad. En algunos casos, se usan retardantes de crecimiento a fin de que las colonias formen poco micelio y esporulen profusamente, permitiendo una identificación más rápida y fácil.

Cuando se usan medios de cultivo específicos, el pretratamiento con cloro no es necesario, pero generalmente se usa para llevar los porcentajes de infección a niveles razonables, eliminando las infecciones muy leves, que en condiciones normales de siembra no se expresarían.

Si la prueba de incubación sobre agar tiene por objeto determinar la presencia de un fungicida sobre la semilla, se puede proceder de la misma forma que en la incubación sobre papel absorbente, colocando las semillas sobre placas de agar inoculadas con una especie fungosa de rápido crecimiento. Después de pocos días de incubación, las zonas claras libres de crecimiento de ese hongo son evaluadas comparándolas

con muestras testigo de semillas correctamente tratadas. Los resultados permitirán saber si la sustancia existe en la semilla, si su distribución fue uniforme y su dosis fue correcta (21).

2.1.3. Pruebas de crecimiento

Los métodos que requieren del crecimiento y desarrollo de la semilla hasta el estado de plántula o más allá y de su examen para observar síntomas o signos de enfermedad, son métodos directos, en los que el patógeno se detecta sin realizar una extracción. En algunos casos, es el único método para determinar la presencia de ciertos hongos, bacterias o virus. La prueba puede consistir en sembrar muestras de semillas sospechosas y esperar el desarrollo de síntomas y/o signos de enfermedad o usar el inóculo obtenido de semillas enfermas e inocularlo en plantas comprobadamente sanas (21).

Las pruebas de crecimiento son adecuadas para estudiar organismos que están presentes en altos niveles poblacionales o altos porcentajes de semillas infectadas (1-10%). En el caso de las bacterias, esta no es una situación usual, siendo el porcentaje de semillas contaminadas de 0,1% o menos y, por lo tanto, la densidad del inóculo bacterial por semillas es baja. Tales niveles de contaminación hacen necesario sembrar muchas muestras de gran tamaño (más de 10.000 semillas), lo que requiere de mucho espacio y tiempo (52).

En general, las pruebas de crecimiento tienen la desventaja de ser de alto costo, ya que se necesita mucho tiempo y espacio para realizarlas y son, con frecuencia, inciertas en sus resultados. Esto último constituye una desventaja importante, la que se debe a la imposibilidad de controlar totalmente las condiciones ambientales y mantener las plantas testigo libres de enfermedades y de la interferencia causada por otros organismos. El control de las condiciones ambientales es muy importante para aquellas infecciones que, para expresarse, dependen de factores como la temperatura y humedad del suelo, el vigor de la semilla, etc. Para otras enfermedades, la probabilidad de contaminación, desde fuentes circundantes, es un riesgo importante a considerar. En la práctica, este método está restringido a un número limitado de patógenos y debe ser complementado con pruebas posteriores de laboratorio (21).

El aumento en el intercambio de semillas de germoplasma, que pueden estar contaminadas por virus, ha generado la necesidad de certificar que están libres de los mismos, a través de estrictas medidas de cuarentena. Es necesario hacer notar que las medidas de cuarentena que se aplican a los recursos genéticos no son las mismas que se aplican a los lotes comerciales de semillas. En estos casos, las técnicas de crecimiento son adecuadas para ayudar a la detección de aquellos virus que se presentan en concentraciones por debajo de los límites de la detección serológica o los cuales permanecen latentes en los primeros estados de crecimiento de la planta. Además, este es el único método que puede revelar la infección de semillas por virus desconocidos o no caracterizados, a través de la expresión de síntomas (41).

En el método de inoculación, los microorganismos sospechosos son aislados desde las semillas y plántulas enfermas y se identifican por los síntomas que causan en una prueba de inoculación usando semillas o plantas sanas. Las plantas huéspedes pueden ser inoculadas con extractos de semillas, por inyección o por aspersión, con o sin mezcla de arenas abrasivas. Alternativamente, las semillas pueden ser infiltradas al vacío con el extracto y sembradas en cámara húmeda (21).

La principal desventaja de esta técnica es que algunos organismos saprófitos, algunos métodos inapropiados de inoculación o un ambiente inadecuado pueden causar síntomas similares a los del patógeno en estudio. Por lo tanto, el organismo debe ser aislado de cualquier lesión resultante, debe ser cultivado y se debe determinar su patogenicidad. Tales requerimientos hacen que esta prueba también sea de alto costo, lenta y difícil de interpretar (21).

Una variación de este método lo constituye la detección de bacterias por reacción hipersensitiva. La hipersensibilidad es una reacción de defensa de las plantas a los patógenos y ha sido usada para demostrar la patogenicidad de numerosas bacterias fitopatógenas, ya que las bacterias saprofitas son incapaces de inducir dicha reacción. Se puede usar este método para detectar bacterias transmitidas por semilla, además de algunos hongos (34).

Generalmente, los síntomas de una enfermedad sobre o en las semillas no son visibles. Sólo en muy pocas ocasiones, una infección bacteriana masiva puede ser observada con una inspección visual; la reacción de

hipersensibilidad, por consiguiente, es un buen método de detección. La planta indicadora más adecuada para esta prueba es el tabaco. El sistema consiste en infiltrar una suspensión bacterial, mediante una inyección en un espacio vegetal intercelular. En una hoja de tabaco se puede llegar a estudiar 8 a 10 strains de un determinado patógeno. El tejido en el área inyectada se colapsa 6 a 10 horas después en el caso de bacterias del género *Pseudomonas* y 10 a 24 horas en el caso de las del género *Xanthomonas*. Las plantas deben ser incubadas a temperatura ambiente para *Pseudomonas* y entre 30 y 32°C para *Xanthomonas* (34).

2.1.4. Métodos específicos para bacterias, virus y viroides

Todos los métodos descritos tienen un valor limitado para estudiar infecciones bacteriales y virales en semillas, por lo que es necesario complementarlos o confirmar sus resultados usando métodos altamente especializados. Estos métodos especializados son indirectos y no siempre requieren de organismos vivos, ya que su identificación se basa en reacciones químicas. Tienen la ventaja de ser más rápidos y menos costosos que los métodos que requieren de organismos vivos, siendo su principal desventaja la interpretación de resultados (52).

La exitosa detección de bacterias en semillas depende del desarrollo de procedimientos apropiados para optimizar la extracción y aislamiento del patógeno elegido. Un método para la detección de bacterias patogénicas debería cumplir con las siguientes características: permitir un alto porcentaje de recuperación del patógeno, ser efectivo con muestras provenientes de diversas áreas geográficas que difieren en las densidades de inóculo del patógeno, ser útil para la extracción simultánea de múltiples patógenos y ser suficientemente flexible y fácil de conducir por personal no especializado en laboratorios no especializados sobre la base de una rutina segura, repetible, rápida, adaptable a pruebas de rutina de muchas muestras, barata, que no requiera de un espacio y un equipamiento excesivo y adaptable a varios ensayos de identificación.

En el caso de los virus, la transmisión por semilla juega un rol clave en la epidemiología de la enfermedad, especialmente en virus que no tienen una planta huésped invernante como Soybean Mosaic Potyvirus (SMV) o

virus que no tienen un vector conocido como Barley Stripe Mosaic Hordeivirus (BSMV). En estos casos, los brotes epidémicos de la enfermedad viral son completamente dependientes del inóculo primario del virus llevado por la semilla al comienzo de la estación de crecimiento. Más aún, a menudo, las bajas tasas de transmisión por semilla, en conjunto con la dispersión secundaria por vectores, pueden originar la introducción del virus en nuevas áreas con el consiguiente desarrollo de una epidemia. Por lo tanto, la certificación para virus transmitidos por semilla ayudará, en el corto plazo, a mantener las enfermedades bajo control. Como consecuencia del aumento en la sensibilidad de las técnicas de detección de virus, la metodología para pruebas a gran escala puede ser ahora muy simplificada, posibilitando lograr los objetivos de la certificación (41).

A modo de ilustración de algunos aspectos de la transmisión de virus por semilla, en el cuadro N°5 se muestra el número de virus transmitidos por semillas en diferentes grupos de virus. De acuerdo con esta información, alrededor del 18% de los virus vegetales descritos son transmitidos por semilla en uno o más huéspedes (41).

Cuadro N°5
Número de virus transmitidos por semillas
en diferentes grupos de virus

Número de virus	Grupos de virus
1	Alfamovirus, Capillovirus, Fabavirus, Machlovirus, Enamovirus, Bymovirus, Rymovirus, Tombusvirus, Tospovirus
2	Bromovirus, Furovirus, Hordeivirus, Tobravirus
3	Carmovirus, Potexvirus, Tobamovirus, Tymovirus
4	Carlavirus, Cucumovirus, Rhabdovirus, Sobemovirus
7	Comovirus
8	Ilarvirus
18	Nepovirus
20	Potyvirus
2	No agrupados
7	Desconocidos

Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas como la tinción de Gram, solubilidad al hidróxido de potasio, pigmentación, formación de leván, oxidaciones, hidrólisis de la gelatina y almidón, reducción de nitratos, utilización de compuestos carbonados, carbohidratos y ácidos orgánicos, entre otros, son reacciones usadas en los procesos de identificación de bacterias fitopatógenas (40).

Método de los bacteriófagos

Los bacteriófagos se definen como virus destructores de bacterias que causan lisis de sus células y que, cuando estas estructuras son específicas, sirven para identificar la especie o raza sobre la que se realiza la inoculación. El procedimiento consiste en agregar un cultivo de bacteriófagos a la semilla en prueba, la cual ha sido desinfectada superficialmente, macerada y remojada durante 24 horas a temperatura ambiente. El líquido se muestrea después de 8 a 12 horas y se determina la titulación del bacteriófago. Un aumento en su titulación es prueba de que el patógeno está presente en la semilla.

La mayor desventaja de la técnica de los bacteriófagos es su especificidad, pudiendo ocurrir que algunas razas del patógeno no sean susceptibles a ellos, siendo necesario, a menudo, hacer una mezcla de razas de bacteriófagos, por lo estrecho del rango de huéspedes de cada uno de ellos. Otro fenómeno observado es la resistencia de algunas especies de bacterias a bacteriófagos específicos, la cual puede variar entre un 18 a un 20%. A pesar de lo anteriormente expresado, el método es sensible y no requiere de cultivos puros de bacterias (2).

Microscopía electrónica

El microscopio electrónico es una herramienta indispensable en el conocimiento de los virus, ya que permite determinar la morfología y el tamaño de los mismos. La técnica de observación consiste en colocar una grilla de malla 300 sobre una gota de extracto del material enfermo durante 3 minutos. Una vez que la grilla se seca se coloca sobre una gota de contrastante durante 3 a 5 minutos y, luego, se observa bajo el microscopio.

También se pueden realizar observaciones de cortes histológicos del material infectado, determinando las inclusiones formadas por los virus en las células. Las muestras se cortan en pequeños trozos de aproximadamente 1 mm², se fijan, deshidratan y se embeben en plástico. Posteriormente, usando un ultramicrotomo, se realizan cortes finos los que son teñidos para su observación con acetato de uranilo al 2% y citrato de plomo (1,30).

Electroforesis

La prueba electroforética se basa en la detección y caracterización de los ARN de doble hebra virales. Todas las plantas con virus presentan ARN de doble hebra, siendo estas moléculas características de los diferentes tipos de virus. La técnica consiste en pasar extractos de plantas infectadas con virus a través de dos columnas de celulosa, precipitando y concentrando solo los ARN de doble hebra, los cuales se caracterizan en un gel electroforético. Cada grupo de virus tiene un patrón electroforético definido, siendo el número de bandas y el peso molecular de cada uno de ellos una propiedad específica (20).

Métodos serológicos

La serología es la ciencia que estudia las reacciones, las preparaciones y el uso de los sueros (47) y constituye una herramienta muy valiosa para el diagnóstico de patógenos bacteriales y virales sobre varias especies de semillas. Su mayor dificultad de aplicación radica en la falta de estandarización en la producción de antisueros, lo que puede producir variaciones en la especificidad de diferentes antisueros preparados contra las mismas especies patogénicas. Las pruebas se basan en la reacción entre un antisuero que corresponde a un suero sanguíneo con anticuerpos específicos producidos por inyección en animales de laboratorio y una preparación de antígeno viral o bacterial.

Las pruebas son específicas, ya que un anticuerpo combina solamente con el antígeno, el cual contiene grupos similares de secuencia de aminoácidos (26,50).

Es necesario destacar que durante la utilización en gran escala de una técnica serológica, hay un riesgo inherente al seleccionar variantes que pueden no reaccionar con los anticuerpos específicos. Esa es la razón

por la cual es necesario controlar periódicamente los resultados de las pruebas ELISA por indexing biológico, lo que podría revelar la emergencia de variables que escapen a la detección por esta técnica (41).

a. Prueba de microprecipitación

Es una prueba serológica simple, en la cual al colocar gotas de un extracto, crudo o purificado, de semillas contaminadas y combinarlo con su anticuerpo específico, se produce un precipitado visible macroscópica y microscópicamente. La prueba puede realizarse sobre portaobjeto, tubos o placas de cultivo y es adecuada para la identificación de virus con formas de bastones o partículas isométricas, que son antígenos solubles (1,4).

b. Prueba de aglutinación

También corresponde a una de las pruebas serológicas simples aplicadas al diagnóstico de fitopatógenos (4). En este método se usan como sitios de reacción materiales como bentonita, cloroplastos o látex de poliestireno sintético, los cuales se aglutinan después de que la reacción tiene lugar. Estas pruebas son adecuadas para partículas virales elongadas las cuales no difunden a través del gel y para bacterias (1).

En la técnica de aglutinación de los cloroplastos, se coloca una gota del extracto vegetal en estudio en un portaobjeto o en un disco y se agrega el antisuero. Dentro de los 10 a 20 minutos siguientes, con poco aumento, se puede observar la aglutinación de los cloroplastos sobre los cuales están adsorbidos los antígenos. La prueba es rápida y de bajo costo, pero requiere de una mayor concentración de antígeno en los tejidos del huésped que otras pruebas más refinadas, pudiendo realizarse con extractos crudos no centrifugados (4).

Como los cloroplastos y otras partículas celulares también quedan atrapadas en la red de los precipitados, existen mayores probabilidades de precipitaciones no específicas y por esto la prueba es menos sensible en comparación con otras (1). Para evitar estas precipitaciones no específicas, derivadas del uso de material biológicamente activo, éste es reemplazado por un material biológicamente inerte como bolas de látex de poliestireno, las cuales son cubiertas con anticuerpos vía adsorción (1). Luego, estas partículas de látex son mezcladas con el antígeno

(viral o bacterial), detectándose la aglutinación en pocos minutos. Es una prueba rápida y sensible (49).

c. Prueba de difusión en agar

Las pruebas de difusión se efectúan en un medio semi sólido como es el agar gel, en el cual, anticuerpos y antígenos se difunden antes de que tenga lugar la reacción serológica (1). En estas pruebas, las relaciones antígeno anticuerpo se establecen en las mismas condiciones ambientales (uno al lado del otro en el mismo medio de cultivo) y al aplicarlas se pueden determinar algunas características físicas de los antígenos, como coeficiente de difusión, patrón electroforético y pesos moleculares relativos (5).

Esta prueba no es adecuada para virus con forma de varilla y partículas pequeñas que tienden a agregarse, a menos que las partículas virales sean divididas. Sin embargo, es más confiable y específica que las pruebas de microprecipitina (1).

Existen dos tipos de técnica de difusión: la simple y la doble.

En la **difusión simple**, el antígeno difunde dentro de un medio agar que contiene el antisuero. El antígeno (extracto de semilla o plántulas infectadas) se coloca en una excavación realizada en la placa que contiene el agar con un suero específico uniformemente disperso en él, formándose anillos de precipitación, a su alrededor, indicativos de una reacción positiva, es decir, el antígeno difunde radialmente en la placa de cultivo (1,5,46). La difusión simple se puede realizar también en tubos en la llamada **técnica de Oudin**. En este procedimiento, el antígeno es una fase líquida que difunde dentro de un medio agar-suero en tubos de ensayo pequeños. La reacción positiva se evidencia por bandas de precipitación que migran hacia el fondo del tubo (6).

En la **difusión doble**, anticuerpo y antígeno difunden uno hacia el otro en el medio de cultivo. En el sitio donde se juntan, la reacción positiva se visualiza por una línea de precipitación (1). El procedimiento puede realizarse en tubos, **técnica de Oakley y Fulthorpe**, preparando tres capas alternadas, una de agar con antisuero, otra de agar puro y otra de agar con antígeno. Durante la difusión anticuerpo y antígeno se encuentran en óptima proporción en la columna de agar puro, formándose zonas de precipitación (7).

En la difusión doble en placas, **técnica de Ouchterlony**, antígeno y anticuerpo se colocan en puntos separados dentro de una placa de agar, difundiendo uno hacia el otro. En el punto donde ambos se encuentran en óptima proporción se forman las bandas de precipitación (8).

La prueba de difusión doble es adecuada para virus isométricos pequeños (esféricos), los cuales difunden fácilmente a través del agar, pero se puede aplicar a virus no isométricos, si son sometidos a un proceso de partición viral (1).

La prueba de difusión doble de Ouchterlony es una prueba cualitativa; ha sido usada con éxito en los principales géneros de bacterias fitopatógenas para determinar antígenos estrechamente relacionados, confirmar identidad y clarificar posición taxonómica (9). Al usar la difusión doble con bacterias, estas deben estar muertas para obtener un antígeno soluble (1). Esta prueba requiere de concentraciones altas y equivalentes de antígenos y anticuerpos para desarrollar las bandas de precipitación, por lo cual es el menos sensible de todos los métodos serológicos para bacterias (9).

La inmunodifusión directa se desarrolló para la identificación de colonias bacteriales directamente en la placa de aislamiento. El método es una modificación de la difusión doble de Ouchterlony, más rápido y menos complicado para su aplicación a procedimientos rutinarios de identificación de razas bacteriales en cultivos puros y colonias sobre placas de dilución. Consiste en preparar series de dilución de la muestra en estudio sobre agar semiselectivo. Paralelamente, a modo de control, se prepara una serie similar de diluciones de muestras que se sabe están infectadas. Se incuban por un tiempo tan corto como sea posible, bajo condiciones apropiadas para que se expresen las colonias tipo de la bacteria elegida. Luego, a una distancia de entre 7 y 15 mm. de las colonias sospechosas, se excavan depresiones que se llenan con el antisuero y se observa la placa para detectar la formación de las bandas de precipitación (59).

Un método especial lo constituye la inmunoelectroforesis, la que combina la prueba de difusión doble en agar con la electroforesis y se usa para diferenciar entre virus serológicamente relacionados y mutantes. Es decir, permite diferenciar antígenos que tienen el mismo comportamiento en la prueba de difusión doble y que difieren en sus

patrones electroforéticos. Su mayor uso ha sido en el estudio de virus isométricos (56).

d. Inmunofluorescencia

En la técnica de inmunofluorescencia, el antisuero se marca con un compuesto fluorescente y se agrega a la preparación del antígeno, usándose para la detección de virus en tejidos y células (1).

En el método directo, el fluorocromo (compuesto fluorescente) se adhiere directamente al anticuerpo específico, llamado anticuerpo primario para el antígeno en estudio. En el método indirecto, el anticuerpo primario está sin titulación y es localizado en una segunda reacción, usando fluorocromo conjugado con proteína A o con un anticuerpo llamado anticuerpo secundario. El método indirecto es, generalmente, más sensible que el método directo, debido a que la doble reacción tiene efectos amplificadores, produciendo más moléculas de fluorocromo por molécula de antígeno durante la secuencia de acoplamiento de los reactantes (28). El procedimiento de inmunofluorescencia es también útil para la determinación de razas bacteriales, para la detección de bacterias en semillas, etc. (20). Se requiere usar antisueros muy selectivos para discriminar entre reacciones específicas y no específicas, siendo su sensibilidad muy alta, pudiendo usarse con preparaciones crudas de bacterias sin que las bacterias saprófitas interfieran con el resultado de la prueba (58). Es una prueba que se usa como filtro (screening) para distinguir rápidamente muestras de semillas infectadas de las no infectadas (26).

La inmunofluorescencia se usa con éxito en pruebas de rutina para la determinación de bacterias patógenas transmitidas por semilla en frejol, pero su aplicación rutinaria para otras bacterias transmitidas por semilla de otras especies, como tomate y repollo, es aún limitada, debido a las interferencias que producen algunas partículas, como restos de semillas, microorganismos de reacción cruzada y fungicidas autofluorescentes, lo que restringe la sensibilidad de la prueba (58). La inmunofluorescencia indirecta (IIF) usada para la detección de *Xanthomonas campestris* p.v. *phaseoli*, en semillas de frejol, detecta este patógeno con niveles de infección tan bajos como 0,001%.

La tinción inmunofluorescente de colonias (Immunofluorescence Colony Staining, IFC) se desarrolló para mejorar la sensibilidad de detección y

aislación, combinando el aislamiento directo con la identificación serológica de colonias. La técnica IFC permite distinguir entre microorganismos, facilitando la detección de colonias fluorescentes mediante el uso de microscopio ultravioleta con un bajo aumento (10-60X). Los resultados se pueden obtener en 1 a 3 días y su interpretación es más fácil que en la tinción inmunofluorescente de células (60).

La microscopía de inmunosorción inmunofluorescente (Immunosorbent Immunofluorescence Microscopy, ISIF) es un real mejoramiento de los métodos de inmunofluorescencia. Su principal ventaja es que sólo las bacterias homólogas pueden ser adsorbidas a la fase sólida inmunoabsorbente del portaobjeto y las partículas de plantas, otros microorganismos y partículas fungicidas son removidas mediante lavado. Luego, tiñendo la bacteria inmunoabsorbida se puede procesar por inmunofluorescencia directa (58).

e. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

La prueba ELISA ha sido reconocida por su potencial en la detección de fitopatógenos como bacterias, organismos semejantes a microplasma y virus, siendo una prueba rápida, sensible y que no requiere del uso de reactivos inestables (42).

ELISA ofrece una mayor sensibilidad de detección que las primeras técnicas y es capaz de analizar un gran número de muestras por día, convirtiéndose en la técnica elegida para pruebas a gran escala de virus transmitidos por semilla (41).

Al usar ELISA para detectar virus transmitidos por semilla, el primer paso es obtener anticuerpos específicos (antisueros) para el patógeno en estudio. Esto se hace inyectando conejos con un virus purificado o proteína; luego, los animales son desangrados y la gammaglobulina es separada del suero de la sangre y purificada. Posteriormente, a la gammaglobulina se le adhiere una enzima apropiada, formando el complejo o conjugado enzima-anticuerpo. La gammaglobulina específica no conjugada se usa para cubrir la fase sólida (camas plásticas de poliestireno) en las cuales se coloca, como prueba, una porción de la muestra de semilla o planta en forma de extracto. Si el antígeno viral está presente en la muestra, se adhiere al anticuerpo específico de la

fase sólida; luego, se agrega la gamaglobulina conjugada con la enzima, la cual también se liga al antígeno viral.

Para cuantificar la cantidad de antígeno viral en la muestra, se adiciona una sustancia que reacciona con la enzima adherida a la gamaglobulina, produciéndose una reacción colorimétrica que puede evaluarse visualmente o por un espectrofotómetro. Entre cada uno de los pasos de la prueba ELISA, se realizan lavados con un detergente no iónico para eliminar reacciones no específicas (33). El método es adecuado tanto para virus filamentosos como isométricos en una gran cantidad de especies de semillas (1). También es una de las pruebas comúnmente usada dentro del grupo de trabajo bacteriológico de la ISTA. La aplicación de las pruebas serológicas a bacteriología ha mejorado sus perspectivas con el desarrollo de la producción de anticuerpos monoclonales y las pruebas que permiten caracterizar y aislar antígenos específicos (26).

Recientemente, una nueva variante de ELISA, el Tissue Blot Immuno Assay (TBIA) ha sido considerado como muy útil en pruebas para virus transmitidos por semilla, en semilla germinada (41).

f. Radioinmuno ensayos (RIA)

La prueba de Radio Inmuno Absorción (Radio Immunosorbent Assay, RISA) está basada en un ELISA "sandwich" de doble anticuerpo que usa una gamaglobulina radioactiva en vez de una gamaglobulina conjugada.

A pesar de las ventajas que ofrece la prueba ELISA, no es lo suficientemente sensible para detectar un virus en concentraciones muy bajas, específicamente, cuando están cercanas a los límites de detecciones (1 semilla infectada en 500 ó 1.000). Con el fin de superar este obstáculo, se diseñó el método RISA, cuya ventaja es, además, la ventaja de detectar razas de virus que difieren serológicamente (35).

Otro radio ensayo es el radio inmuno ensayo en fase sólida (Solid Phase Radio Immuno Assay, SPRIA), el cual consiste en revestir una fase sólida (poliestireno) con anticuerpos de un determinado virus. Luego, se agrega a esta fase sólida un extracto crudo homogeneizado de semilla, ligándose el antígeno a ese anticuerpo, si la muestra está infectada. Posteriormente, se agregan anticuerpos radioactivos para el virus,

siendo la cantidad del antígeno viral en la fase sólida directamente proporcional a la cantidad de radioactividad medida. Si no hay antígenos virales presentes, no habrá sitios de conjugación para los anticuerpos radioactivos, los cuales serán removidos al lavar la fase sólida. Este método permite la detección de antígenos virales en presencia de material extraño a la semilla y se ha usado para la detección de todas las razas del virus del mosaico de la soya en semillas de esta especie (1,35).

g. Microscopía electrónica serológicamente específica (SSEM)

En esta técnica, las rejillas de cobre del microscopio electrónico se revisten con carbono y, luego, con una película de parlodión, se adsorbe el antisuero del virus en prueba. Luego, las rejillas así preparadas son embebidas con el extracto de semilla en prueba, logrando que partículas completas del virus se ligen al anticuerpo previamente adsorbido. Por último, las rejillas se embeben en una solución de acetato de uranilo, tiñendo las partículas del virus, las cuales se visualizan usando un microscopio de transmisión electrónica.

Los límites de detección del método pueden ser mejorados, concentrando el virus en el extracto de semilla, mediante centrifugación. Esta técnica ha sido superior a la técnica ELISA en la detección de virus en lotes de semillas que presentan el 5% de semillas infectadas, en los que no hubo detección con esta última técnica (1, 10, 24, 35).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El reciente desarrollo de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa y su adopción para detectar virus en semillas ha producido una inmensa ganancia en la sensibilidad de la detección (41).

Este método enzimático permite copiar en forma exponencial una zona concreta de un genoma, pudiendo obtener millones de copias de ella. Este proceso se lleva a cabo cíclicamente en un instrumento llamado termociclador. Cada ciclo está dividido temporalmente en tres fases térmicas: desnaturalización (separación de las dos hebras de ADN), acoplamiento (unión de los "primers" o partidores) y polimerización

(síntesis de la hebra complementaria). Los elementos necesarios para una prueba PCR son: el ADN de la muestra, dos oligonucleótidos o "primers", la enzima de polimerización, la mezcla de cuatro nucleótidos de los que está formado el ADN y un tampón que lleva como ión Mg^{2+} (19).

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa se puede dividir en tres etapas: extracción, amplificación y detección. Si el genoma de un virus está constituido por ARN, es necesario, después de extraerlo, sintetizar un ADN complementario (cADN) al ARN extraído, mediante el sistema de transcripción reversa. Una vez obtenido el cADN, se realiza la reacción en cadena de la polimerasa, utilizando un ADN polimerasa, un buffer adecuado, un deoxinucleósido trifosfato (DNTP), un par de partidores complementarios a cada una de las cadenas de ADN y al cADN obtenido de la transcripción reversa. Esto es incubado en un termociclador que efectuará los ciclos que se programen, los cuales constan de una desnaturalización del ADN, hibridación de la hebra de ADN con los partidores o "primers" y finalmente una extensión.

Los productos de la reacción son visualizados mediante una electroforesis en agarosa o poliacríamida para una mayor sensibilidad, donde se observará la presencia o ausencia de una banda correspondiente al tamaño del segmento de ácido nucleico que se quiere detectar (19).

Recientemente, usando PCR en transcripción reversa, se han detectado ciertos virus en semillas tales como Pea Seed-Borne Potyvirus (PSbV) en semilla de arveja, Cucumber Mosaic Cucumovirus (CMV) en semilla de lupino, Bean Common Mosaic potyvirus (BCMV) en semilla de frejol y Alfalfa Mosaic Virus (AIMV), Bean Yellow Mosaic Virus (BYMV), Clover Yellow Vein Potyvirus (CYVV), Cucumber Mosaic Cucumovirus (CMV) y Subterranean Clover Mottle Sobemovirus (SCMV) en germoplasma de trébol subterráneo y semillas medicinales (41).

El uso de PCR como rutina en pruebas de semillas para determinar la presencia de virus podría requerir de la extracción de ARN desde un gran número de semillas, lo cual es inconveniente por lo laborioso y el tiempo requerido. Además, el ácido nucleico extraído de las muestras no puede ser usado para la detección simultánea de bacterias y hongos transmitidos por semilla, porque la detección de estos dos tipos de

patógenos es facilitado por bio PCR, el cual detecta los mismos después de enriquecimiento sobre medio de cultivo (41).

En este caso, PCR inmunocaptura (IC-PCR), una variante de PCR que utiliza anticuerpos para atrapar partículas virales sin una extracción anterior del ARN, se supuso que facilitaría el uso rutinario de PCR. Sin embargo, se observó un bajo nivel de sensibilidad y dificultades de realización, por lo que requiere aún de adaptaciones antes de que pueda ser rutinariamente usada (41).

Hibridación molecular (MASH)

Es un método de detección de viroides. Un viroide es una entidad que consta de una molécula de bajo peso molecular con filamentos simples de ARN. Uno de los representantes más típicos transmisibles por semilla verdadera de papa y tomate es el Potato Spindle Tuber Viroid (PSTV). Para su detección no es posible usar la técnica ELISA, ya que PSTV no tiene la cubierta proteica antigénica de un virus.

Una de las pruebas de diagnóstico es MASH y se aplica para la detección de PSTV en brotes de tubérculo y en semilla verdadera de papa. Este método está basado en la hibridación entre moléculas de ADN recombinante altamente radioactivo, las cuales son complementarias al PSTV que está contenido en una membrana de nitrocelulosa. Los híbridos resultantes ADN-ARN son detectados por autoradiografía. Con este método se puede detectar una semilla de papa infectada en 80 semillas sanas. Es una técnica más sensible y confiable que PAGE (poliacrymide Gel Electrophoresis) (35,47).

Electroforesis reversa (R. PAGE)

Esta técnica utiliza elevadas temperaturas como agente desnaturalizante y permite la detección de PSTV en muestras que contienen 50 pg. de viroide. El sistema es utilizable tanto para semilla verdadera de papa como para hojas y tubérculos (56).

Para concluir este capítulo, en el cuadro N°6 se presenta la importancia relativa que tienen varias características de las pruebas de laboratorio,

dependiendo de su aplicación final. De ellas, los índices de sensibilidad y especificidad diagnóstica son los aspectos epidemiológicos más importantes en la evaluación de pruebas (56).

Cuadro N°6
Importancia relativa de las características
de las pruebas de laboratorio

Factor	Objetivo	
	Screening	Confirmación
Simplicidad	+++	+
Aplicación masiva	+++	++
Costo	+++	+
Precisión	++	++++
Exactitud	++	+++
Sensibilidad diagnóstica	++++	+++
Especificidad diagnóstica	++	++++

+ Menor
 +++ Mayor
 Shepard, Wright, De Savigni (55)

++ Moderada
 ++++ Crucial

En relación con lo anterior, es posible definir algunas características importantes de las técnicas serológicas usadas comúnmente en la detección de bacterias y que se resumen en el cuadro N°7.

Cuadro N°7
Propiedades de las pruebas serológicas
usadas en la detección de bacterias

Propiedades	Pruebas			
	ELISA	Doble difusión de ouchterlony	Inmuno Fluorescencia	Aglutinación
Especificidad analítica	2-3 +	1	2	3
Sensibilidad analítica	3 ++	4	2	3
Potencial de estandarización	1 +	1	2	1-2
Potencial de aplicación masiva	1 +	2-3	2	2

+ 1 Muy alto, 2 Alto, 3 Moderado, 4 Bajo

++ 1 Muy Alto: 10^2 - 10^3 células /ml. 2 Alto: 10^3 - 10^5 células/ ml.

3 Moderado: 10^5 - 10^7 células/ ml. 4 Bajo: Mayor que 10^7 células/ml.

Franken y Van Vuurde (26)

REFERENCIAS

1. Agarwall, Vijendra K. y Sinclair, J.B. 1987. Principles of seed pathology. Vol. II. CRC Press Inc. Boca Ratón, Florida EUA.
2. Agrios, G.N. 1988. Plant pathology. Academic Press Inc. San Diego, California, EUA. 802 pp.
3. Baker, K.F. 1979. Pathology of flower seed. Seed Sci.& Technol. 8, 575-589.
4. Ball, E.M. 1993. Microprecipitation (virus) and micro-agglutination (bacteria). Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A laboratory manual. R. Hampton, E. Ball, S. De Boer Eds. APS Press. St. Paul, Minnesota USA.153-160
5. Ball, E.M. 1993. Agar diffusion technique, Introduction. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A laboratory manual. R. Hampton, E. Ball, S. De Boer Eds. APS Press. St. Paul, Minnesota USA.97-100.
6. Ball, E.M. 1993. Agar Single diffusion, Tubes (Oudin technique). Introduction. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A laboratory manual. R. Hampton, E. Ball, S. De Boer Eds. APS Press. St. Paul, Minnesota USA.101-103
7. Ball, E.M. 1993. Agar double diffusion, tubes. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A laboratory manual. R. Hampton, E. Ball, S. De Boer Eds. APS Press. St. Paul, Minnesota USA.109-110
8. Ball, E.M. 1993. Agar double diffusion, plates. (Ouchterlony): viruses. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A laboratory manual. R. Hampton, E. Ball, S. De Boer, Eds. APS Press. St. Paul, Minnesota, USA. 111-120.
9. Bouzard, H. y Moore, L.W. 1993. Ouchterlony double diffusion, plates: Bacteria. Serological methods for detection and identification of

viral and bacterial plant pathogens. A laboratory manual. R. Hampton, E. Ball, S. De Boer Eds. APS Press. St. Paul, Minnesota USA. 129-140.

10. Brlansky, R.H. y Derrick, K.S. 1979. Detection of seed borne plant viruses using serologically specific electron microscopy. *Phytopathology* 69, 96-100.

11. Castro, C.; Schaad, N.W y Bonde, H.R. 1994. A technique for extracting *Tilletia indica* teliospores from contaminated wheat seed. *Seed Sci. & Technol.* 22, 91-98.

12. Caubel, Georges. 1993. Nematodes as pest of quarantine significance in seed. Quarantine for seed. FAO plant production and protection paper 119. S.B. Mathur y Manandhar, H.K., Eds. Roma, Italia. 140-146.

13. Caubel, Georges. 1993. Seed health testing for nematodes. Quarantine for seed. FAO plant production and protection paper 119. S.B. Mathur y Manandhar, H.K., Eds. Roma, Italia. 185-188.

14. Colhoun, J. 1983. Measurement of inoculum per seed and its relation to disease expression. *Seed Sci.& Technol.* 11, 665-671.

15. COSAVE. 1995. Método analítico de Praga. Potato Spindle Tuber Viroid. VI reunión de grupo de trabajo permanente de Procedimientos y Métodos Analíticos. Santiago, Chile. 4-8 de septiembre de 1995.

16. COSAVE. 1991. Métodos analíticos. Hoja de trabajo N°34 *Anguina tritici* (Steinbuch) Flipjev.

17. COSAVE. 1991. Métodos analíticos. Hoja de trabajo N°32 *Anguina agrostis* (Steinbuch) Flipjev.

18. Chuprasit, C.; Mathur, S.B. y Neergaard, P. 1974. The light factor in seed health testing. *Seed Sci.& Technol.* 2, 457- 475.

19. Dasi, M.A. y Ledesma, E. 1994. Reacción en cadena de la polimerasa. En: Procedimientos y técnicas de diagnóstico. Principios básicos. L. Navarro, P. Moreno, J.K. Ballester, M. Cambra, Editores. Instituto Valenciano de Investigaciones Agropecuarias, Valencia, España.

20. De Boer, S.H. 1993. Immunofluorescence for bacteria. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A laboratory manual. R. Hampton, E. Ball, S. De Boer Eds. APS Press. St. Paul Minnesota USA. 295-298.
21. De Tempe, J. y Binnerts, J. 1961. Introduction to methods of seed health testing. Seed Sci. & Technol. 7, 601-636.
22. De Tempe, J. 1961. Routine methods for determining the health condition of seed in the seed testing station. (General information). Proc. Int. Seed Test Ass. Vol. 26 N° 1.
23. De Tempe, J. 1963. On methods of seed health testing. Principles and practice. Proc. Int. Seed Test Ass. Vol. 28 N°1, 97- 105.
24. Derrick, K.S. 1993. Serologically specific electron microscopy (SSEM). Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A laboratory manual. R. Hampton, E. Ball, S. de Boer Eds. APS Press. St. Paul Minnesota USA. 313-319.
25. Dickson, J.G. 1963. Enfermedades de las plantas de gran cultivo. Colección Agrícola Salvat. Barcelona, España. 584 pp.
26. Franken, A.A.J.M. y Van Vuurde, J.W.L. 1990. Problems and new approaches in the use of serology for seed borne bacteria. Seed Sci. & Technol. 18, 415- 426.
27. Geng, Shu; Campbell, R.N.; Carter, M. y Hills, F.J. 1983. Quality control program for seed borne pathogens. Plant Disease Vol. 67, N°2, 236-242.
28. Gingery, R.G. 1993. Fluorescent antibody test, viruses. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A laboratory manual. R. Hampton, E. Ball, S. De Boer Eds. APS Press. St. Paul, Minnesota USA. 287-293.
29. Hampton, R.O. 1983. Seed borne viruses in crop germoplasm resource: disease dissemination risk and germoplasm reclamation technology. Seed Sci. & Technol. 11, 535- 546.

30. Herrera, G.; Madariaga, M.; Sepúlveda, P.; Ramsollel, D. 1994. Técnicas para la detección de virus en frutales. Apuntes curso de Biotecnología. INIA, Santiago, Chile.
31. Huang, C.S. 1983. Detection of *Aphelenchoides besseyi* in rice seed and correlation between seed infection and crop performance. Seed Sci.&Technol. 11, 691- 696.
32. ISTA. 1985. International rules for seed testing. Seed Sci.& Technol. 13, 299-355.
33. Jarskov Hansen, Henrick. 1993. Sampling procedure. Quarantine for seed. FAO plant production and protection paper 119. S.B.Mathur and H.K. Manandhar. Eds. FAO, Roma, Italia.
34. Klement, Z. 1983. Detection of seed borne bacteria by hipersensitive reaction. Seed Sci.&Technol.11, 589- 593.
35. Kulik, M.M. 1984. New techniques for detection of seed borne pathogenic viruses, viroids, bacteria, and fungi. Seed Sci.& Technol. 12, 831- 840.
36. Kulik, M.M. y Stanwood, Ph. 1984. Horticultural seed pathology. An introduction. Journal of Seed Technology. Vol 9 N° 1, 1-19.
37. Lange, L.; Tien, P. y Betgrup, J. 1983. The potential of ELISA and ISEM in seed health testing. Seed Sci.& Technol.11, 477- 490.
38. Lynch, K.V.; Edgington, L.V. y Bush, L.V. 1980. Head smut, a new disease of corn in Ontario. Canadian Journal of Plant Pathology 2, 176- 178.
39. Makkouk, K.M. y Bos, L. 1993. Detection of seed borne viruses in seed. Quarantine for seed. FAO Plant Production and Protection Paper 119. S.B. Mathur and H.K. Manandhar Eds. FAO, Roma, Italia. 179-184.
40. Manandhar, H.K. y Mortensen, C.N. 1993. Seed health testing for bacteria. Quarantine for seed. FAO Plant Production and Protection

Paper 119. S.B. Mathur and H.K. Manandhar Eds. FAO, Roma, Italia.169-178.

41. Maury, Y.; Duby, C. y Khetarpal, R.K. 1998. Seed certification for viruses. En Plant Virus Disease Control. A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa Eds. APS Press. St. Paul, Minnesota. 237-248.

42. Mc. Laughlin, R.J. y Chen, T.A. 1993. ELISA method for plant pathogenic prokaryotes. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A laboratory manual. R. Hampton, E. Ball, S. De Boer, Eds. APS Press. St. Paul, Minnesota USA.197-204.

43. Pacheco Camargo, C. 1988. Importancia de la patología de semillas para los programas de semillas. IX Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias afines. ASCOEFI. Pasto Nariño, Colombia.

44. Ralph, W. 1977. Problems in testing and control of seed borne bacterial pathogens: a critical evaluation. Seed Sci.& Technol. 13, 299-355.

45. Rennie, W.J. y Seaton, R.D. 1975. Loose smut of barley. The embryo test a means of assesing loose smut infection in seed stocks. Seed Sci.&Technol. 3, 697- 709.

46. Richardson, H.H. y Roth, H. 1965. Hydrocyanic acid and other fumigants for control of *Plemeliella abietina* and *Megastigmus spp.* in imported spruce seed. Journal of Economic Entomology. Vol. 61 N°1, 214- 216.

47. Salazar, L.F.; Owens, R.A.; Smith, D. y Dienner, T.O. 1983. Detection of Potato Spindle Tuber Viroid by nucleic acid spot hybridization: evaluation with tuber sprout and true potato seed. American Potato Journal. 587- 597.

48. Slack, S.A. y Ball, E.M. 1993. Latex agglutination for viruses and bacteria. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A laboratory manual. R. Hampton, E. Ball, S. de Boer Eds. APS Press. St. Paul, Minnesota USA. 307-312.

49. Slack, S.A. y Ball, E.M. 1993. Agar single diffusion, plates. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A laboratory manual. R. Hampton, E. Ball, S. de Boer Eds. APS Press. St. Paul, Minnesota USA. 105-108.
50. Schaad, N.W. 1979. Serological identification of plant pathogenic bacteria. *Ann.Rev.Phytopathol.* 17, 123- 147.
51. Schaad, N.W. 1982. Detection of seed borne bacterial plant pathogen. *Plant Disease* 66, N°10, 885- 890.
52. Schaad, N.W. 1989. Detection and identification of bacteria. Detection of bacteria in seed and other planting material. A. W. Saettler, N.W. Schaad and D.A. Roth Eds. APS Press. St.Paul, Minnesota, USA.9-16.
53. Shoen, F.J. 1983. Identification of seed like structure: taxonomic review of sclerotial forming fungi. *Seed Sci.&Technol.* 11 639-650.
54. Shepard, J.W. 1983. Detection of seed borne bacterial blight of bean. *Seed Sci.&Technol.*11, 561- 567.
55. Shepard, J.W.; Wright, P.F. y De Savigny, D.H. 1986. Methods for the evaluation of EIA test for use in the detection of seed borne diseases. *Seed Sci.&Technol.*14, 49- 59.
56. Singh, R.P.; Boucher, A. y Seabrook, J.E.A. 1988. Detection of mild strain of Potato Spindle Tuber Viroid from single true potato seed by return electrophoresis. *Phytopathology* Vol. 78 N° 6, 663- 667.
57. Tremaine, J.H. 1993. Immunoelectrophoresis. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A laboratory manual. R. Hampton, E. Ball, S. de Boer Eds. APS Press. St. Paul, Minnesota USA. 165-168.
58. Van Vuurde, J.W.L. y Van Renten, C. 1983. Immunosorbent Immunofluorescence microscopy (ISIF) and Immunosorbent dilution plating (ISDP): New methods for the detection of plant pathogenic bacteria. *Seed Sci. & Technol.* 11, 523-533.

59. Van Vuurde, J.W.L. y De Vries, Ph. M. 1993. Direct Immunodiffusion for bacterial colonies on agar plates. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A laboratory manual. R. Hampton, E. Ball, S. De Boer Eds. APS Press. St. Paul, Minnesota USA. 141-143.
60. Van Vuurde, J.W.L. 1993. Immunofluorescence colony staining. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A laboratory manual. R. Hampton, E. Ball, S. De Boer Eds. APS Press. St. Paul, Minnesota USA. 299-305.
61. Zillinsky, F. 1984. Guía para la identificación de enfermedades en cereales de grano pequeño. CIMMYT. El Batán, México. 141 pp.

CAPÍTULO TRATAMIENTO DE O SEMILLAS III

Como ya se dijo, la transmisión por semillas es el medio más eficiente para introducir fitopatógenos a nuevas áreas geográficas. La transmisión de un patógeno por semillas se puede disminuir o evitar, seleccionando áreas de producción desfavorables para los patógenos, con prácticas de cultivo, procedimientos de cosecha y limpieza, con inspecciones visuales de campo, indexación de semillas y, con lo que es el tema de este capítulo, los tratamientos ya sean físicos o químicos (2).

Los patógenos involucrados en la transmisión por semilla pueden estar asociados con ésta como acompañantes o ser portados externa o internamente. En el caso de los acompañantes, los patógenos no están adheridos a la semilla sino que la acompañan en forma independiente. Los patógenos pueden ser llevados como esclerocios mezclados con las semillas, como semillas de otras especies como el caso de *Cuscuta spp.*, sobre trozos infectados de tejidos (pústulas de algunas royas) o en suelo infectado (2).

Si está ubicado externamente, el patógeno es llevado pasivamente sobre la superficie de las semillas como esclerocio, esporas, células vegetativas o larvas de nematodos (2).

Cuando son llevados internamente, los patógenos están incluidos en las partes de la semilla, que son esenciales para la producción de una nueva planta. El patógeno se puede presentar como esporas de varios tipos o más comúnmente como estructuras vegetativas, como es el caso de micelio de *Phoma lingam* y *Alternaria brassicicola*, penetrando los cotiledones de varias especies de semillas de *Brassica*. En otros hongos transmitidos por semilla, como *Septoria apiicola* sobre semilla de apio y *Didymella lycopersici* en semilla de tomate, el micelio puede producir cuerpos frutales (picnidios) dentro del tejido de la semilla (2,15).

Para los fines de control, es necesario distinguir entre la infección al embrión, donde la transferencia del patógeno de la semilla a la planta está generalmente asegurada, y la infección del endospermo o cubierta de la semilla, que puede no resultar en la transferencia semilla-planta del patógeno (15).

Mientras es relativamente fácil eliminar contaminantes superficiales, las infecciones situadas profundamente son difíciles de tratar, debido al peligro de dañar los tejidos de la semilla y, por lo tanto, afectar adversamente la germinación (15).

Entre los métodos para prevenir o disminuir la transmisión de patógenos por semilla están los tratamientos, los cuales, según la naturaleza del agente usado se pueden clasificar en físicos, químicos, biológicos y bioquímicos.

Los tratamientos de semilla pueden ser usados efectivamente para controlar enfermedades a una escala local, nacional o internacional y se realizan para mejorar la uniformidad de la población del cultivo, cuando se siembra directamente en el campo, destruyendo los microorganismos patógenos llevados en la semilla y evitando que las plántulas se enfermen por la presencia de ciertos microorganismos en el suelo (15,5).

En términos generales, los tratamientos pueden ser de tipo preventivo o erradicante. Los tratamientos preventivos están destinados a proteger las semillas de los ataques de microorganismos del suelo y son de poco o ningún valor para evitar la transmisión de patógenos por la semilla. Los tratamientos erradicantes eliminan un patógeno o plaga, ya sea del huésped o del ambiente, pero en la práctica, la completa eliminación del

patógeno es imposible y, en el mejor de los casos, los tratamientos a la semilla reducen el número de semillas infectivas a un nivel extremadamente bajo, al cual los patógenos no pueden experimentar explosiones poblacionales que causen daños de importancia económica (15).

Los tratamientos erradicantes son más útiles cuando la semilla es la principal o única fuente de transmisión de una determinada enfermedad. Estos tratamientos, ya sea físicos o químicos, deben ser de aplicación fácil, inocuos para el ambiente, baratos y dejar al cultivo virtualmente libre de enfermedades (15).

Cuando las semillas se siembran sin tratamientos, o con tratamientos inefectivos, las epifitias resultantes pueden requerir de costosos programas posteriores de control (15).

1. Tipos de tratamientos erradicantes en semillas y sus efectos

Los tratamientos erradicantes son más especializados que los preventivos y están diseñados para eliminar un patógeno específico por medios físicos o químicos (15).

1.1. Tratamientos físicos

Pertencen a este grupo los tratamientos donde la destrucción de los organismos patógenos se hace mediante la acción de un agente físico como calor o radiaciones (28).

Una de las primeras medidas físicas de control de fitopatógenos la constituyen los procesos comerciales de limpieza de semillas, que se han desarrollado para dejarlas mismas libres de restos vegetales, de semillas de malezas, de semillas que no germinarán o semillas vanas, pudiendo reducir totalmente la contaminación por algunos patógenos, pero que pueden contribuir a distribuir otros, uniformemente, sobre el resto de la semillas (2).

En general, los tratamientos físicos utilizan el calor seco o húmedo para la exterminación de los patógenos. Este proceso está directamente relacionado con la diferencia entre puntos letales del patógeno y la semilla, diferencia que puede ser alterada por los siguientes factores:

- a) Humedad de la semilla (mientras mayor es la humedad, menor es la temperatura letal).
- b) Dormancia (las semillas dormantes son más resistentes al calor).
- c) Deterioro de la semilla (a mayor deterioro, menor es la resistencia al calor).
- d) Genotipo (del que dependen las variaciones que presentan las diferentes especies y cultivares a las diferentes temperaturas).
- e) Origen de la semilla (la resistencia al calor de las semillas de origen tropical es mayor que las originarias de zonas templadas).
- f) Condición del patógeno (las clamidosporas de algunos hongos son más resistentes que la forma vegetativa o micelio) (18).

En 1885, Jensen (15) fue el primero en aplicar calor en forma de agua caliente para eliminar *Phytophthora infestans* en tubérculos de papa. En 1888, el método fue adaptado para eliminar carbones producidos por *Ustilago avenae* y *Ustilago nuda* en avena y cebada por inmersión de la semilla en agua a 54,8°C por 5 minutos (15).

Los tratamientos de agua caliente han sido el principal método para eliminar bacterias transmitidas por semilla, como el caso de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* desde especies de *Brassica*. También en este género, el agua caliente reduce la infección de *Alternaria brassicicola*, pero no ha sido satisfactorio para erradicar *Phoma lingam*. Los tratamientos de agua caliente tienen la ventaja de ser baratos en su aplicación; sin embargo, la necesidad de elevar rápidamente la temperatura de las semillas, permite tratar sólo pequeñas cantidades de ellas a la vez, debiendo considerarse, además, las reducciones en la germinación especialmente en las semillas más viejas (15).

El vapor que se ha usado por muchos años para esterilizar suelos, también es usado para el tratamiento de semillas, con la modificación al procedimiento realizada por Baker (15), agregando aire al vapor. El humedecimiento que produce el vapor se reduce al introducir aire, lo que también modifica la temperatura. Se usan temperaturas de 56 a 57°C por 30 minutos y la eficiencia del método aumenta, si el contenido de humedad de la semilla se eleva para facilitar la penetración del calor. El tratamiento es muy efectivo sobre semillas pequeñas, reduciendo su eficiencia en semillas más grandes como las de arvejas y, al igual que el método anterior, sus limitaciones son la cantidad de semilla a tratar y los posibles daños a la germinación (15).

Uno de los últimos esfuerzos en busca de alternativas a los tratamientos térmicos de semillas para el control de hongos, es el uso de radiación microonda. A pesar de que hay estudios que han demostrado que los aumentos de temperatura en la semilla producen una disminución en la germinación y la formación de manchas cloróticas en los cotiledones; se observó también, que los hongos transmitidos por semillas disminuyeron después del tratamiento. Las esporas fungosas unicelulares irradiadas tenían menor viabilidad, mientras que las multicelulares fueron afectadas en menor grado. Las esporas oscuras fueron, a su vez, menos afectadas que las hialinas.

El método de irradiación con microondas (1.420 W., 2.450 MHZ) parece ser promisorio para eliminar propágulos fungosos sin fungicidas, sin embargo, se requiere aún de mucha investigación sobre el tema (6).

1.2. Tratamientos biológicos

Los tratamientos biológicos están basados en el antagonismo que los microorganismos puedan presentar entre sí. El principal objetivo del tratamiento de semillas con agentes biológicos es proteger las semillas sanas contra los agentes patogénicos existentes en el suelo. La aplicación práctica de los controles biológicos en lotes de semillas ya infectadas con patógenos es mucho más difícil, especialmente en los casos en que el patógeno está localizado internamente en las semillas.

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

En el primer caso no se conocen ejemplos de investigación en semilla. En el segundo caso, el patógeno es excluido en función de la competencia por nutrientes o espacio en el medio. El tratamiento de semilla de arveja con *Trichoderma hamatum* y quitina que es una fuente de alimento para *T. hamatum*, propició un mejor control de caída de plantas, que el tratamiento solo con el microorganismo.

En el tercer caso se puede considerar la aplicación de *Agrobacterium radiobacter*, raza AK- 84, para el control de las agallas del cuello. La raza mencionada produce un antibiótico llamado bacteriocin que es efectivo solamente para razas sensibles de *Agrobacterium tumefaciens* (1, 18).

Otros microorganismos factibles de usarse en tratamientos de semillas son *Bacillus subtilis* y *Streptomyces griseoviridis*, este último efectivo contra *Fusarium*, *Alternaria* y *Phomopsis* (26).

1.3. Tratamientos bioquímicos

Están basados en la fermentación anaeróbica, con producción de ácidos que inactivan o inhiben el desarrollo del patógeno (18). Como ejemplo de este tratamiento, se puede citar la extracción ácida de semillas de tomate para el control de bacteriosis transmitidas por semilla.

1.4. Tratamientos químicos

En la actualidad, la aplicación de productos químicos para el control de patógenos transmitidos por semilla es el método más seguro, barato y efectivo.

La ventaja principal de los tratamientos químicos de semillas consiste en que, cuando se logra fijar el producto con exactitud, uniformidad y seguridad, éste queda ubicado en el sitio donde su acción es más eficaz. Son, además, económicos, pues el ingrediente activo se aplica en dosis menores que si fuera un cultivo en crecimiento. Es más, las cantidades

reducidas de productos químicos en los tratamientos de semillas producen menor impacto ecológico en comparación con las aplicaciones de pos emergencia (1).

Los tratamientos químicos pueden ser efectivos contra estados de infección profundos, ya que pueden penetrar el tejido de las semillas y matar patógenos sin causar fitotoxicidad. Muchos compuestos sistémicos tienen esa capacidad (15).

Los tratamientos químicos pueden clasificarse en dos grandes grupos, las desinfecciones y las fumigaciones, estas últimas se tratan en los tratamientos insecticidas.

1.4.1. Condiciones que regulan la eficiencia de un tratamiento químico de semillas

Los tratamientos químicos de semilla son directamente afectados por el tipo de tratamiento, el producto usado y su dosificación. Su mecanismo está determinado por la forma física del agente y el proceso de la mezcla en el tratamiento.

Cuando la semilla se remoja en una solución diluida hay una distribución completa y uniforme del desinfectante y se obtiene un completo cubrimiento de la semilla, dado que esta permanece suficiente tiempo en la solución para asegurar el completo humedecimiento de la masa.

Debido a la necesidad de un subsecuente secado, se introdujo la aplicación de productos en polvo y con el uso de estos se hizo evidente el problema del insuficiente cubrimiento, debido, fundamentalmente, a las dosis relativamente bajas aplicadas. Incluso, la aplicación slurry puede no presentar un cubrimiento total de la semilla y sin ello, el control de los patógenos también es incompleto.

La efectividad del tratamiento también está relacionada con la buena adhesión del producto y esta depende de la textura del polvo, tipo y condición de la semilla y método de aplicación. Para tener máxima efectividad, el método usado debe permitir la aplicación uniforme del producto sobre la superficie de la semilla y que este forme una cubierta bien adherida a la misma, a fin de evitar que el material se desprenda

antes de la siembra y la semilla quede menos protegida, disminuyendo la eficacia del mismo (18).

Por último, el tratamiento debe efectuarse conociendo, previamente, los patógenos involucrados y su localización en la semilla (18) y al momento de elegir un tratamiento, deben considerarse, además, los posibles daños que el producto puede producir en la semilla. Hay numerosos factores que influyen en el daño que un producto puede producir, siendo los principales: el grado de humedad de la semilla al hacer la aplicación, la volatilidad del producto usado, la dosis aplicada, la duración del periodo de almacenamiento, la especie de semilla y las condiciones de la cubierta, ya que cubiertas agrietadas o quebradas aumentan las posibilidades de daño (28).

Con respecto a la dosis, una mala aplicación puede alterar la misma, al concentrar producto usado en parte de la masa de la semilla dejando otras sin tocar. Esto podría implicar alcanzar niveles fitotóxicos en los lugares de concentración, dejando desprotegidos otros. Esta situación de puede dar en tratamientos en polvo, en los cuales no se humedece la semilla para lograr la adherencia adecuada.

1.4.2. Desinfecciones

La aplicación de desinfectantes no está limitada, como los tratamientos físicos, por el tamaño de la semilla o su cantidad y es factible usarlo como rutina comercial. Un proceso de desinfección química de semilla sigue brevemente la siguiente secuencia: la semilla se mezcla con el producto químico, el cual es mecánicamente distribuido en forma de polvo, pasta (slurry) o líquido, cubriendo la superficie de la semilla y adhiriéndose a ella. Después de un tiempo de la aplicación mecánica, el producto difunde en la masa de las semillas, penetrando entre y dentro de las mismas. Esta difusión y penetración puede ocurrir en estado líquido o gaseoso y durante ella, parte del producto es absorbido por el tejido de la semilla y por los organismos patógenos transmitidos por ella, los que responden por reacción específica. Esta reacción puede continuar por algún tiempo, dependiendo de los componentes del producto químico, de la clase de organismo involucrado y de las condiciones de almacenamiento de la semilla.

En terreno, el material adherido y absorbido sobre y en la semilla está expuesto a las mismas condiciones que determinan la germinación de ella, produciéndose una dilución y difusión de la sustancia química en el suelo que rodea la semilla y posteriormente la plántula.

Por absorción de agua, la fase dormante de la semilla y el organismo transmitido por ella son llevados a la fase vegetativa y la plántula y el microorganismo pueden entonces reabsorber el compuesto y responder con una reacción renovada, pero también parte del producto puede ser absorbido por los coloides del suelo, reduciendo sus efectos químicos terapéuticos.

El tiempo de acción del producto químico, ya sea que actúe durante el tratamiento y almacenaje de la semilla o después de sembrada, depende principalmente del método de aplicación.

Sin embargo, entre los productos químicos, hay considerables diferencias en el modo de acción bajo condiciones dadas de aplicación. Algunos son más volátiles y ejercen su efecto antes de la siembra, otros son absorbidos por el patógeno más fácilmente. Los productos químicos que no son fácilmente absorbidos pueden dejar más material en la superficie de la semilla y este residuo provee las condiciones para un efecto germicida posterior a la siembra. Por el contrario, los productos químicos que son fácilmente absorbidos pueden no ejercer ese efecto (17).

1.4.3. Formulaciones en las que se presentan los productos químicos

Polvos mojables:

Esta clase de formulación se presenta en forma de un polvo capaz de ser mojado y mantenerse en suspensión en agua durante un tiempo más o menos largo. El principio activo, generalmente insoluble o poco soluble en agua, está dispersado en un material inerte. A la formulación se le agregan coadyuvantes tales como humectantes, agentes de suspensión, adherentes y, cuando es necesario, estabilizantes para impedir la descomposición cuando están almacenados (3). Esta formulación es adecuada para efectuar tratamientos slurry y nebulización (1).

Polvos:

Esta formulación se puede usar en estado seco, pero se recomienda humedecer levemente las semillas para mejorar la adherencia. Son también adecuados para usarlos en tratamientos slurry o nebulización (1).

Suspensiones concentradas:

Es una suspensión que se puede aplicar directamente o después de diluirla y sirve para realizar el tratamiento de la semilla vía húmeda siendo adecuados para tratamientos de remojo o nebulización (1).

Polvo soluble:

Son polvos para ser disueltos en agua antes de aplicarlos a la semilla (3) y también sirven para el tratamiento vía húmeda, siendo adecuados para usarlos en tratamiento slurry o nebulización (1).

2. Tipos de tratamiento de desinfección según la forma de aplicación

2.1. Tratamiento seco

Consiste en la aplicación directamente sobre la semilla, de productos formulados como polvos y se usa cuando el tratamiento slurry o inmersión no es posible. Las formulaciones deben ser adecuadas para este uso y, aún así, se debe humedecer levemente la semilla, para facilitar la adherencia (1).

2.2. Inmersión en solución o suspensión acuosa

Implica sumergir la semilla en una solución o suspensión por un tiempo que depende del tipo de semilla y del producto usado. Generalmente, este tratamiento se usa cuando la cubierta de la semilla es gruesa y se recomienda usarlo justo antes de sembrar (1).

2.3. Slurry o pasta acuosa

Para realizarlo, se usan formulaciones que se dispersan en agua como polvos solubles o polvos mojables con las cuales se forma una pasta. La mayoría de los fungicidas para semillas pueden ser usados con este tipo de tratamiento (1).

2.4. Nebulización

En este tratamiento, una suspensión desinfectante se quiebra en finas gotas durante el proceso, considerándose uno de los métodos más efectivos, ya que se logra que las semillas sean cubiertas uniformemente con el fungicida (1).

2.5. Inmersión en solventes orgánicos

Una desventaja del remojo acuoso es que la semilla queda totalmente embebida y requiere de un secado inmediato. Mientras esto es factible para semillas pequeñas como las de *Brassica*, apio y remolacha, manejadas en poca cantidad, es menos apropiado para grandes cantidades de semilla como las de arveja y frejol, las cuales aumentan su volumen durante el remojo, creando problemas de manejo durante el secado.

Para superar algunas de estas desventajas, se desarrolló el concepto de aplicar fungicidas en solventes orgánicos volátiles. Los solventes disuelven muchos fungicidas e insecticidas insolubles en agua, facilitando su entrada dentro del tejido de la cubierta de la semilla y evaporándose después del tratamiento, quedando las semillas secas.

La exacta función de los solventes no está clara, pero es posible que ellos ayuden a la penetración del compuesto químico, ya sea por reducción de la tensión superficial de la mezcla líquida o por una mejor penetración de la fase lipofílica del tejido de la semilla.

Los fungicidas sistémicos disueltos en solventes orgánicos son retenidos en los tejidos de la cubierta de la semilla y no penetran el tejido de los cotiledones, excepto donde la cubierta de la semilla está quebrada o cuando las semillas tratadas son sembradas y absorben agua desde el suelo y están, por lo tanto, idealmente situados para penetrar

profundamente y erradicar hongos internos durante la germinación, la cual, salvo excepciones, no es perjudicada por los solventes.

La infección interna de semilla de espárrago por *Fusarium moniliforme* y *Fusarium oxysporum* se erradicó por inmersión de la semilla en 2,5% de benomyl en acetona, por 24 horas, sin afectar la germinación de la semilla. Sin embargo, un tratamiento similar no resultó efectivo contra infecciones de *Alternaria brassicicola* en semilla de coliflor.

Uno de los riesgos del uso de solventes volátiles para tratamiento de semillas lo constituye el peligro de los vapores que emite el solvente y su efecto sobre los operadores del tratamiento (17).

2.6. Revestimiento en película

El revestimiento con capas delgadas o películas es una tecnología relativamente nueva, que recién se empieza a usar comercialmente. La técnica del revestimiento ha sido desarrollada por adaptación de los sistemas de peletización (27).

El peletizado es básicamente la aplicación de suficiente material inerte alrededor de la semilla para formar una pequeña esfera. El material inerte tiene adyuvantes, los cuales le permiten adherirse firmemente a la semilla y secarse rápidamente, teniendo la propiedad, además, de absorber humedad. El peletizado es una técnica útil en aquellos cultivos que requieren de una siembra de precisión, que no se puede lograr en las condiciones naturales de la semilla, como es el caso de la remolacha azucarera (*Beta vulgaris*). Sin embargo, hay algunas semillas pequeñas que no requieren de esta siembra de precisión como cebolla y zanahoria, y entonces se usa el revestimiento en películas en lugar del peletizado (27).

El revestimiento se aplica cuando es necesario tratar la semilla con productos químicos, sin alterar demasiado su peso o su forma general. Con la peletización se aumenta el peso de la semilla unas diez veces, en cambio, con el revestimiento sólo se usa el mismo peso de la semilla o menos en materia inerte, más el producto químico. Los adyuvantes usados con el producto químico no deben interferir con los adyuvantes

usados en el revestimiento, lo que implica que la formulación del primero es extremadamente importante (5).

Los compuestos que se aplican a la semilla van disueltos o dispersos en un adherente líquido, usualmente una solución coloreada de un polímero en el que se sumergen momentáneamente las semillas, o el que se puede asperjar sobre las mismas. Otro método consiste en añadir el producto formulado como polvo, después de que las semillas se han impregnado de un adhesivo, logrando un efecto de capas concéntricas al cambiar la formulación a intervalos. Después de realizado el revestimiento, el compuesto queda incorporado sobre la superficie de la semilla en forma de una capa dura, pero permeable (5).

Esta técnica presenta una serie de ventajas sobre los métodos convencionales, representados por las aplicaciones con polvos o pastas líquidas, las cuales hacen que el producto químico aglomere irregularmente las semillas, problema que se supera con el revestimiento, logrando que las mismas fluyan mejor en los conductos de la sembradora, eliminando las dificultades causadas por las semillas rugosas como las de zanahoria. Además, la semilla revestida causa menos problemas durante su manejo y siembra, pues no se pierde material químico y no aparece polvo en el aire, reduciendo los riesgos de contaminación del ambiente y de los operarios con compuestos tóxicos. Las continuas mejoras de los equipos, formulaciones y técnicas de aplicación, seguramente ampliarán las aplicaciones actuales del revestimiento de semillas (5, 27).

3. Tipos de tratamiento de desinfección, según el organismo que controlan

3.1. Tratamientos fungicidas

Los tratamientos fungicidas son usados para prevenir o reducir las pérdidas por enfermedades fungosas, causadas por organismos asociados a la semilla o presentes en el suelo.

Los fungicidas de tipo orgánico no sistémico, aplicados ya sea como polvos, pasta acuosa o en solventes, son protectores y no tienen

propiedades erradicantes. Estos fungicidas al ser preventivos deben aplicarse antes de aparecer la enfermedad siendo su acción fungistática, ya que inhiben primordialmente la germinación de las esporas de los hongos y el desarrollo subsecuente de la enfermedad, protegiendo los tejidos vegetales en tanto dure su persistencia sobre las partes tratadas, no protegiendo las nuevas superficies creadas con el crecimiento vegetativo (3).

Algunos fungicidas orgánicos no sistémicos usados en tratamiento de semilla son los siguientes:

Derivados ditiocarbámicos	Zineb, Maneb, Mancozeb, Thiram, Metiram.
Derivados imídicos	Captan, Folpet
Derivados guanidínicos	Guazatina, Iminoctadine
Nitroderivados	PCNB o Quintozene
Derivados del imidazol	Imazalilo
Derivados aromáticos	Clorotalonilo
Derivados ureicos	Pencycuron

El modo de acción de estos compuestos fungicidas es variado. Algunos de los compuestos interfieren en los procesos de energía a nivel celular, bloqueando los procesos de deshidrogenación de los nucleótidos de adenosina nicotinamida en la cadena respiratoria. Otros productos como el Maneb, Zineb, Captan y Clorotalonilo pueden tener una acción inespecífica que se relaciona con la interferencia de enzimas o compuestos metabólicos intermedios que actúan en la respiración. El Imazalilo inhibe la biosíntesis del ergosterol y el Quintozene, la síntesis de quitina de los hongos. En general, son productos efectivos contra Oomicetes y Hongos Imperfectos (15). Pencycuron, también de acción protectora, controla *Rhizoctonia solani* y *Pellicularia spp.* en semillas de arroz, algodón, remolacha, hortalizas y ornamentales (26).

Los fungicidas sistémicos tienen muchas ventajas prácticas. Son fáciles de aplicar como polvo, pasta acuosa o en forma líquida. Sus características químicas aseguran que penetran profundamente dentro de la semilla y que causan poca o ninguna fitotoxicidad, siendo su principal desventaja su selectividad para ciertos hongos, o sea, su espectro de acción es restringido comparado con la amplia acción de los

no sistémicos (15). El término sistémico se aplica a aquellos fungicidas que son móviles dentro de la planta (8).

Como fungicidas sistémicos se consideran los siguientes:

Azoles	Bitertanol, Difenoconazole, Etridiazole, Fenbuconazole, Flutriafol, Ipconazole, Mycobutanil, Procloraz, Triadimefón, Trifumizole, Triadimenol, Tebuconazole
Benzimidazoles	Benomilo, Carbendazima, Fuberidazol, Tiabendazol
Carbamato	Hidrocloruro de Propamocarb
Carboxiamida	Mepronil
Carboxianilida	Thifluzamide
Derivados de anilidas	Fenfuram, Metalaxyl
Dicarboximidas	Iprodione
Fenilpyrrole	Fenpiclonil, Hymexaxol
Fenilamida	Oxadixyl
Oxatinas	Carboxín
Pyrimidine	Ethirimol
Pyrimidinyl carbinol	Nuarimol

De los grupos nombrados, los Benzimidazoles han probado su efectividad para erradicar varias especies de hongos patogénicos pertenecientes a los Ascomicetes y Deuteromicetes desde varias especies de semillas, pero no son efectivos contra hongos Oomicetes que producen la caída de almácigos como *Pythium* y *Phytophthora* presentes en el suelo, como tampoco contra Hongos Imperfectos de esporas oscuras, como los pertenecientes a los géneros *Alternaria* y *Helminthosporium* (13,3,15,16).

Para remediar esta desventaja, los fungicidas sistémicos se formulan en combinación con fungicidas protectores como Thiram, asegurando así la protección de la germinación de la semilla, evitando la acción de los hongos que producen la caída de almácigos y erradicando, al mismo tiempo, los patógenos transmitidos por la semilla (15).

Como alternativa a los Benzimidazoles están los productos pertenecientes al grupo de las Dicarboximidias, especialmente Iprodione, el cual ha probado ser efectivo contra *Alternaria brassicicola* y *Alternaria brassicae* in vitro e in vivo cuando se aplica a semillas severamente infectadas con dichos hongos. Aunque Iprodione no es exactamente un fungicida sistémico, su aplicación a la superficie de la semilla controla la infección del tejido de los cotiledones siendo efectivo contra estados profundos de infección por *Phoma lingam*, erradicándolo y *Alternaria spp.*, en semillas de especies de *Brassica* (15).

Los tratamientos de semillas por aplicación tópica, tanto de Benzimidazoles como Dicarboximidias, dan un promedio de 99% de control de las fases de transmisión por semilla y, por lo tanto, son ejecutados para la virtual eliminación de ciertos patógenos. La actividad erradicativa de los Benzimidazoles puede ser mejorada por aplicación en solución acuosa o en solventes orgánicos. Los productos de este grupo actúan evitando el ensamble de los microtúbulos y, de este modo, inhiben el proceso de división celular, siendo útiles para el tratamiento de un amplio rango de enfermedades producidas, en su mayoría, por Ascomicetos u Hongos Imperfectos (15).

Entre los Benzimidazoles más comunes está Benomilo, el cual, bajo condiciones naturales, se degrada en Carbendazima compuesto que, en última instancia, es el que ejerce la acción antimicótica (3). El Metiltiofonate tiene un espectro de acción similar al Benomilo y también se degrada biológicamente a Carbendazima (3). Tiabendazol ha probado ser efectivo para el control de *Tilletia controversa*, lo que constituye una excepción por tratarse este de un hongo Basidiomicete (13).

Los Triazoles actúan inhibiendo la biosíntesis del ergosterol. La mayoría posee estereoisomerías, existiendo algunos isómeros más activos que otros (13). El Triadimefón, en pruebas in vitro, ha demostrado ser efectivo a 0,1 - 0,2 ppm., contra un amplio espectro de Ascomicetos, Basidiomicetos y Hongos Imperfectos. Es un compuesto fungitóxico débil, que debe gran parte de su acción antimicótica a Triadimenol, que es un derivado que se produce fácilmente por la eliminación del grupo carbonilo. Las plantas provenientes de semillas tratadas con este compuesto muestran algunos retrasos transitorios en la emisión de brotes, raíces y alteraciones del geotropismo (12).

El Bitertanol, aunque estructuralmente relacionado con el Triadimenol y Triadimefón, tiene un espectro de acción fungicida muy diferente. Los estudios *in vitro* muestran que su efecto contra Hongos Imperfectos es más pronunciado que los que produce Triadimefón. También controla *Tilletia controversa*, un patógeno difícil de controlar con otros fungicidas(14).

Propiconazole se caracteriza biológicamente por presentar un muy amplio espectro fungicida, el cual es activo a bajas dosis. Aunque se ha informado de una inhibición del crecimiento en hojas, raíces y coleótilos de plántulas de cebada provenientes de semillas tratadas con 25-50 gr. de Propiconazole por 100 Kg. de semilla, también se han descrito alteraciones benéficas, tales como la dilatación de la senescencia de la clorofila y un aumento de la tolerancia de las plántulas al estrés hídrico, heladas y exceso de sales (12).

El Flutriafol es un fungicida triazólico altamente sistémico que demostró un buen control de hongos de los géneros *Tilletia* y *Ustilago*, en tratamientos de semillas de cereales, en dosis de 7,5 gr. por 100 Kg. de semilla. Sin embargo, en semillas de trigo, dosis sobre 10 gr. por 100 Kg. de semilla causan leves caídas en la emergencia de plántulas. Este producto tiene también una buena actividad contra razas de *Erysiphe graminis*, las cuales han disminuido su sensibilidad al Triadimenol (12).

El Diniconazole también pertenece al grupo de los derivados Triazólicos con acción potente y amplio espectro, además de un efecto regulador de crecimiento. En dosis de 7,5 a 15 gr. por 100 Kg. de semilla demuestra buen control de *Ustilago spp.*, *Tilletia spp.* y *Pyrenophora graminea* (12).

El grupo de las Oxatinas se destaca por su efecto contra royas y su modo de acción es interferir los procesos de energía a nivel celular, siendo su principal representante el fungicida Carboxín. Su espectro de acción incluye royas, *Ustilago*, *Urocystis*, *Tilletia* y *Helminthosporium* (3).

Los derivados de la anilida penetran rápidamente y actúan inhibiendo el crecimiento del micelio y su modo de acción parece ser sobre la biosíntesis del ARN, impidiendo la acción de la enzima ARN polimerasa. Su principal representante es Metalaxyl, el que ha demostrado ser efectivo para el control de hongos patógenos del orden Peronosporales,

cuyo micelio y oosporas son encontrados dentro del pericarpio o adheridos a la cubierta de la semilla. Este producto da también adecuada protección contra hongos de los géneros *Pythium* y *Phytophthora* (14).

El producto Fenpiclonil, perteneciente al grupo de los Fenilpyrrole, es un fungicida de contacto, levemente sistémico, de largo efecto, con buen control de *Fusarium nivale*, incluyendo razas resistentes a Carbendazima. También es activo contra *Tilletia caries*, *Alternaria spp.*, *Ascochyta spp.*, *Aspergillus sp.*, *Fusarium spp.*, *Helminthosporium sp.*, *Rhizoctonia spp.*, *Penicillium sp.* Se usa en dosis de 20 gr. por 100 Kg. de semilla, siendo la principal desventaja su persistencia en el suelo (26).

Mepronil, perteneciente a las Carboxiamidas, inhibe la oxidación del ácido succínico durante la respiración metabólica. Controla las enfermedades que producen la caída de almácigos en hortalizas y tabaco (26).

Nuarimol actúa inhibiendo la biosíntesis del ergosterol, controlando *Cercospora*, *Septoria*, *Ustilago*, *Erysiphe*, entre otros patógenos, en semillas de cereales (26).

Hidrocloruro de Promocarbo es un inhibidor multisitio, sistémico con acción protectora. Controla *Pythium*, *Phytophthora*, *Aphanomyces*, *Bremia*, *Peronospora* y *Pseudoperonospora* en especies hortícolas y ornamentales (26).

Thifluzamide inhibe la acción de la enzima succinato dehidrogenasa y el ciclo del ácido tricarbóxico. Usado en semillas de cereales, controla hongos de los géneros *Ustilago*, *Tilletia* y *Pyrenophora* (26).

3.2. Tratamientos bactericidas

Los antibióticos son sustancias producidas por organismos vivos, que inhiben el desarrollo de otros organismos, como bacterias.

La obtención de antibióticos está basada en procesos de fermentación industrial producida por varios microorganismos. Los antibióticos de uso

agrícola más comunes son: la Estreptomina originada de *Streptomyces griseus*, la Terramicina originada de *Streptomyces rimosus* y Kasugamicina derivada de *Streptomyces kasugaensis*. La Terramicina y la Estreptomina fueron los primeros antibióticos que se usaron en forma comercial. Su modo de acción es por inhibición de la síntesis de proteínas, al bloquear la transferencia de aminoácidos y la formación de enlaces péptidos (3).

La Estreptomina es activa contra varias bacterias y se ha utilizado en tratamientos de semilla y pulverizaciones de cultivo contra bacterias pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Corynebacterium*. Produce cierta fitotoxicidad debido a que inhibe la síntesis de la clorofila, constatándose también la aparición de resistencia en varios patógenos (3).

La Kasugamicina es activa contra bacterias del género *Pseudomonas* y no presenta fitotoxicidad, incluso en dosis relativamente altas. Aunque desarrolla resistencia al emplearla en modo continuo, ésta decrece con rapidez cuando cesan los tratamientos y acaba por desaparecer (3).

La forma más común de uso de los antibióticos es la inmersión de las semillas en soluciones de estos productos. La erradicación de *Xanthomonas campestris pv. campestris* se logró mediante el remojo de las semillas de *Brassica spp.* en solución acuosa de Aureomicina, Estreptomina o Terramicina, en dosis de 500 mg./ml durante una hora, y aun cuando este tratamiento fue fitotóxico, el efecto dañino se neutralizó enjuagando las semillas tratadas en agua, seguida por una inmersión en hipoclorito de sodio al 0,5% por 30 minutos. La acción del hipoclorito de sodio fue probablemente reducir la toxicidad por inmovilización del antibiótico residual en y sobre la cubierta de la semilla (15). En la evaluación del tratamiento de crucíferas con Estreptomina, para el control de *X. campestris pv. campestris*, aunque se reportó reacción fitotóxica, el margen entre fitotoxicidad y efectividad fue tan pequeño que el tratamiento se considera rutinariamente exitoso (20).

Otro ejemplo de tratamiento erradicante está representado por el control de *Curtobacterium flaccumfaciens pv. betae*, en semillas de *Beta vulgaris*, mediante el remojo de las mismas en una solución de 400 ppm. de Estreptomina por 18 horas (20).

Para la erradicación de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* en semillas de frejol infectado, se ha recomendado el remojo de la misma en una solución de 2.000 ppm. de estreptomina por 2 horas, sin embargo, algunas variedades reaccionaron desfavorablemente al tratamiento (20).

En las semillas de arveja, que se remojan en una solución de Estreptomina, se ha sugerido que la reacción tóxica está relacionada con la tasa de imbibición. En las variedades de arvejas que embeben más rápidamente se produce una mayor absorción relativa de Estreptomina y esto se expresa en una reacción fitotóxica. Al mismo tiempo, otras semillas no reciben una dosis efectiva del antibiótico y por esta razón aunque se use un remojo en una solución de 10.000 ppm. de Estreptomina por 2 horas, no se logra erradicar la *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* de las semillas infectadas, siendo este tratamiento el más fuerte mencionado en la literatura (20).

El problema básico de estos tratamientos, además de la posibilidad de una reacción fitotóxica, es que la semilla necesita ser remojada en el antibiótico. Los tratamientos con Estreptomina en polvo a las semillas no son efectivos, debido a la rápida inactivación que ocurre con el antibiótico al momento de la siembra y debido a la absorción del mismo por los coloides arcillosos y a la degradación posterior que efectúan los microorganismos del suelo.

Los tratamientos de inmersión, aunque factibles sobre pequeñas muestras de semillas, son impracticables para grandes cantidades. Hay controversia sobre la eficacia de la Estreptomina aplicada como slurry. La aplicación en esta forma podría resultar en una escasa cantidad de antibiótico absorbido por la semilla, pero como la mayor parte del producto permanecería sobre la superficie de ella, se esperarían las mismas pérdidas de actividad que en el caso de su aplicación como polvo. El tratamiento slurry con Estreptomina solo reduce los niveles de infección y es, por lo tanto, más efectivo cuando se aplica para contaminaciones externas en semillas ligeramente infectadas (20,24).

La Kasugamicina, aislada y desarrollada en Japón, ha resultado muy efectiva aplicada como polvo mojable, en dosis de 3,8 gr. por kilo en semilla de frejol Kidney, para el control de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. En el caso de semilla de pepino, se recomienda la

inmersión en una solución de 200 ppm. por una hora, para el control de *Pseudomonas syringae* pv *lachrymans* (11). Este antibiótico tiene muchas propiedades positivas como sistematicidad y facilidad de aplicación. Desafortunadamente su actividad bactericida está limitada al género *Pseudomonas* (20).

El Ácido Oxolínico, bactericida desarrollado en Japón, es un compuesto de la familia de las quinolinas sintéticas que muestra una alta efectividad contra bacterias Gram negativas. Tiene eficacia preventiva y curativa contra enfermedades causadas por bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Erwinia*. Se usa en tratamiento de semilla de arroz, controlando *Pseudomonas syringae* pv. *glumae* por inmersión de la semilla en 1.000 microgramos por ml. durante 24 horas o 10.000 microgramos por ml. por 10 minutos o como tratamiento en polvo con una formulación polvo mojable al 20%, humedeciendo previamente la semilla para facilitar la adherencia (10).

Existen otros productos químicos de acción bactericida, como son los esterilizantes de superficie comunes como el hipoclorito de sodio, óxido de propileno, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido acético. El ácido clorhídrico 0,6 M, aplicado a semilla de tomate por 5 horas, o el acetato cúprico acidificado (ACA) al 0,25-0,50% por 20 minutos son tratamientos recomendados para la erradicación de *Clavibacter michiganensis* sub sp. *michiganensis* (9).

Otro compuesto es el Bronopol, el cual tiene una actividad bacteriostática más que bactericida y que en estudios *in vitro* se observó que inhibe el crecimiento de un rango de bacterias fitopatógenas, pero *in vivo*, su actividad parece estar reducida al género *Xanthomonas*.

En términos generales, y considerando la erradicación como una meta, los tratamientos bactericidas en semillas no han resultado tan efectivos en lograr este objetivo (20).

3.3. Tratamientos insecticidas

Pueden ser clasificados en preventivos y erradicantes. Los primeros son usados en forma tópica y están destinados a proteger las semillas de las plagas de insectos de almacenamiento y de aquellas que actúan en el

suelo cuando la semilla es sembrada. Entre los más usados están los insecticidas organofosforados como Pirimifos Metil, Malatión y Clorpirifós, usados en la protección de granos contra gorgojos. Entre los Piretroides, se usa la Deltametrina para este mismo fin. El Carbosulfán y el Imidacloprid protegen las semillas de insectos del suelo especialmente larvas de Coleópteros, Elateridae, Coleópteros, Curculionidae, Diptera y Anthomyidae.

Como tratamientos erradicantes se consideran las fumigaciones, cuyo objetivo es la eliminación de insectos llevados internamente o como acompañantes. Los productos usados con este objetivo son bromuro de metilo y fosfamina.

El bromuro de metilo es un gas que, en algunas circunstancias, produce pérdida y retardo en la germinación o daño en la viabilidad de las plantas jóvenes. Sin embargo, estos efectos nocivos tienen una relación directa con las condiciones de la fumigación y del material fumigado, entre las que se incluye temperaturas anormalmente altas, dosis y duración inadecuada del tratamiento y contenidos altos de humedad y aceites en la semilla. Se llega a la conclusión de que para realizar una adecuada fumigación de semillas con bromuro de metilo, éstas deben estar secas, idealmente con 12% de humedad y no más allá del 14%, no someterse a temperaturas sobre 25°C y evitar la repetición del tratamiento de fumigación con este gas, ya que más de una fumigación puede reducir el porcentaje de germinación de las semillas (4).

Sobre la fosfamina no hay información de que en condiciones normales influya o produzca efectos adversos sobre la germinación de la semilla; sin embargo, el crecimiento de plantas cuyas semillas se fumigaron repetidamente con fosfamina puede afectarse notoriamente (4).

Algunos insectos pueden presentar sobrevivencia a los tratamientos con fumigantes. Es el caso de las larvas de avispas del género *Megastigmus* (Hym. Torymidae) y larvas de *Plemeliella abietina* (Dip. Cecidomyidae), resistencia que parece estar relacionada con el fenómeno de diapausa (21).

En general, se pueden hacer las siguientes recomendaciones generales para realizar en forma exitosa una fumigación de semillas:

- ?? observar en forma estricta la dosis y los períodos de exposición recomendados. La dosis varía con el producto utilizado, la especie de semilla sobre la cual se use y con la plaga a prevenir o controlar;
- ?? evitar las temperaturas excesivas durante el tratamiento;
- ?? airear la semilla inmediatamente pasado el período de exposición;
- ?? no repetir el tratamiento de fumigación sobre un lote de semillas y asegurar que las semillas tengan una humedad igual o inferior a la normal para un almacenamiento prolongado, recomendándose menos del 12%.

REFERENCIAS

1. Agarwall, Vijendra K. Y Sinclair, J.B. 1987. Principles of seed pathology. Vol. I y II. CRC Press. Inc. Boca Ratón, Florida, USA.
2. Baker, K.F. 1979. Pathology of flower seed. Seed Sci.& Technol. 8, 575- 589.
3. Barberá, C. 1989. Pesticidas agrícolas. Cuarta edición revisada, ampliada. Omega. Barcelona, España. 603 pp.
4. Bond, E.J. 1986. Manual de fumigación contra insectos. Estudio FAO. Producción y protección vegetal N° 54. Roma, Italia. 413 pp.
5. Boten, John. 1990. Tratamiento de semillas. Agricultura de las Américas. Noviembre- Diciembre.
6. Calcavante, M.J.B. and J.J. Muchovej. 1993. Microwave irradiation of seeds and select fungal spores. Seed Sci.& Technol.21, 247- 253.
7. De Tempe, J. y Crosler, W.F. 1961. Pesticide treatment. Proc. Int. Seed Test Ass. Vol.26, N°1, 13- 25.
8. Edgington, L.V. 1981. Structural requirements of systemic fungicides. Ann. Rev. Phytopathol. 19, 107- 124.
9. Fatmi, M. 1991. Seed treatments for eradicating *Clavibacter michiganensis* sub sp. *michiganensis* from naturally infected tomato seeds. Plant disease. Vol. 75 N°4, 383- 385.

10. Hikichi, Y.; Noda, Ch. y Shimizu, K. 1989. Oxolinic acid. Japan Pesticide Information N° 55, 21- 23.
11. Hokko Chemical Industrie Co. Ltda. Tokyo, Japan. Kasugamycin. (Documento Técnico).
12. Kuck, K. H.; Scheinpflug, H. y Pontzen, R. 1995. DMI fungicides. Modern selective fungicide. Properties, application, mechanism of action. Professor Horst Lyr, De. 2nd. revised and enlarged edition. Gustav Fisher.
13. Latorre G., Bernardo, Editor. 1989. Fungicidas y nematocidas avances y aplicabilidad. Colección de agricultura. Publicación de la Facultad de Agronomía. Pontificia Universidad Católica de Chile. 215 pp.
14. Margot, P. 1983. Control of seed borne disease with Metalaxyl. Seed Sci.& Technol.11, 921- 933.
15. Maude, R.B. 1985. Erradicative seed treatment. Seed Sci.& Technol. 11, 907-920.
16. Molinero, Valeris, P. Lerax, B. Tivoli, R. Champion and J. Said. 1993. Resistance to Benzimidazole fungicide in pathogens of Ascochyta disease of peas. Seed Sci. & Technol. 21, 531- 535.
17. Neergaard, P. 1979. Seed pathology. Vol. I y II. Edición revisada. Mac Millan Press Ltda. Gran Bretaña. 1025 pp.
18. Pacheco C. 1988. Importancia de la patología de semillas para los programas de semillas. IX Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines, ASCOEFI, Junio 21- 25 Pasto Nariño, Colombia.
19. Philipps, P.M. 1985. Requirements and development in small grain seed treatment. Plant Disease Vol. 69, 1.009- 1.010.
20. Ralph, W. 1977. Problems in testing and control of seed borne bacterial pathogens: a critical evaluation. Seed Sci.& Technol. 5, 735-752.

21. Richardson, H.H. y Roth, H. 1965. Hydrocyanic acid and other fumigants for control of larvae of *Plemeliella abietina* and *Megastigmus spp.* in imported spruce seed. Journal of Economic Entomology. Vol. 61, N°1, 214- 216.
22. Shoemaker, P.B. y Echandi, E. 1976. Seed and plant bed treatments for bacterial canker of tomato. Plant Disease Reporter. Vol. 60, N°2, 163-164.
23. Sinclair, J.B. 1985. Fungicide sprays for control of internally seed borne fungi. Seed Sci.& Technol. 11, 959- 968.
24. Taylor, J.D. y Dye, D.W. 1976. Evaluation of streptomycin seed treatment for the control of bacterial blight of peas (*Pseudomonas pisi*) Sackelt. N.Z. Journal of Agricultural Research 19: 91- 95.
25. Thy, B.D.; Webb, Raymond; Jaworski, C.A. y Ratclife, T.J. 1973. Tomato bacterial canker: control by seed treatment. Plant Disease reporter Vol. 57, N° 11, 974-977.
26. Tomlin, C.D.S. Eds. 1997. The Pesticide Manual. A World Compendium. Eleventh Edition. British Crop Protection Council. United Kingdom. 1.606 pp.
27. Toms, A.M. 1983. New techniques in seed treatment. EPPO Bull. 13 (3) 471-474.
28. Vergara, Alicia; Obrador, J. y Arancibia, F. 1969. Tratamiento de semillas. INIA, Estación Experimental La Platina. Santiago, Chile.
29. Willis, William G. 1983. New developments in cereal and soybean seed treatment fungicide. Plant Disease. Vol. 67, N°3, 257- 258.

CAPÍTULO O IV

LEGISLACIÓN FITOSANITARIA

Principios de cuarentena vegetal

La Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF) fue establecida en 1951, revisada en 1979 y, posteriormente, en noviembre de 1997, en la 29ª Sesión de la Conferencia de la FAO. Su propósito es asegurar una acción común y efectiva para prevenir la diseminación e introducción a nuevos territorios de plagas de los vegetales y de sus productos y promover medidas para el control de las mismas.

Reconociendo la utilidad de la cooperación internacional para este propósito, especialmente a nivel de fronteras nacionales y para lograr que se estreche la coordinación de las medidas que necesariamente deben adoptarse, los países signatarios de la Convención se han

comprometido a adoptar las medidas legislativas, técnicas y administrativas especificadas en ella y sus Acuerdos Suplementarios.

Según el Nuevo Texto Revisado, la Convención se aplica específicamente a las plagas reglamentadas, incluidas las plagas cuarentenarias y no cuarentenarias reglamentadas, involucradas en el comercio internacional.

En la 3^{ra} Consulta Técnica de Organizaciones Regionales de Protección Fitosanitaria realizada en Roma en 1991, se recomendó la adopción de una serie de principios de acción cuarentenaria, los cuales fueron aprobados en la 4^{ta} Consulta Técnica realizada en El Salvador en mayo de 1992. Estos principios entregan el marco en el cual deben desenvolverse las actividades de intercambio internacional de vegetales y sus productos.

En estos principios se reconoce que los países pueden ejercer el derecho de **soberanía** para aplicar medidas fitosanitarias que regulen la entrada de plantas y productos vegetales y otros artículos reglamentados capaces de albergar plagas, pero que tales medidas se adoptarán exclusivamente por consideraciones fitosanitarias y para prevenir la introducción o dispersión de plagas reguladas en sus territorios. Esto último representa el principio de **necesidad**.

Además, las medidas fitosanitarias que los países adopten deben ser consistentes con el riesgo de plaga involucrado debiendo representar la medida menos restrictiva disponible y que produzca el **mínimo impacto** al movimiento internacional de personas, medios de transportes y envíos. Estas medidas fitosanitarias, en virtud del principio de **transparencia** deberán publicarse y distribuirse para que sean conocidas por todos los actores del comercio internacional y, si es necesario, incluirán las fundamentaciones de las mismas. Estas medidas responden a conocimientos y situaciones actuales, los cuales al cambiar deben producir las **modificaciones** inmediatas de las medidas fitosanitarias, ya sea por inclusión de nuevas regulaciones o por remoción de aquellas que hayan quedado obsoletas.

En lo posible, las medidas fitosanitarias deberán basarse en estándares, lineamientos y recomendaciones internacionales desarrollados dentro del marco de la Convención. En otras palabras, en la medida de lo posible

las medidas fitosanitarias entre los distintos países deberán ser **armonizadas**, reconociéndose como **equivalentes** aquellas que aunque no siendo idénticas, tienen el mismo efecto.

Las controversias entre los países, derivadas del establecimiento de medidas fitosanitarias, deben resolverse en primera instancia a nivel técnico bilateral. Sólo si la solución a las discrepancias no puede alcanzarse en un plazo razonable, se acudirá a instancias multilaterales de **solución de controversias**. En este aspecto, es de especial importancia la **cooperación** entre los países para prevenir la diseminación e introducción de plagas reglamentadas a nuevos territorios, compartiendo en forma transparente la información sobre el estado de situación de las mismas en sus correspondientes territorios; siendo de responsabilidad de los países signatarios de la CIPF establecer una Organización Oficial de Protección Fitosanitaria que represente la **competencia técnica** en este aspecto.

Para determinar qué plagas cumplen con las definiciones de cuarentenarias o no cuarentenarias reglamentadas y las intensidades de las medidas fitosanitarias que deberán adoptarse para evitar su introducción o dispersión, las Organizaciones Nacionales de Protección Fitosanitaria utilizarán el **Análisis de Riesgo de Plaga**, basado en evidencias biológicas y económicas. Dado que siempre existe riesgo de introducción de plagas cuarentenarias, los países deberán acordar una política de **manejo del riesgo** cuando formulen medidas fitosanitarias. Entre estas políticas de manejo del riesgo, los países se deberán reconocer la situación de áreas en las cuales una plaga o plagas específicas no ocurren (**áreas libres de plagas**), debiendo los países demostrar este estado de acuerdo con los procedimientos desarrollados dentro del marco de la Convención.

Los países están facultados para tomar **medidas de emergencia** inmediatas cuando están enfrentados a situaciones fitosanitarias nuevas. Estas medidas, adoptadas sobre la base de un análisis de riesgo preliminar, deberán ser de aplicación temporal y su validez estará sujeta a la estimación detallada del riesgo tan pronto como sea posible.

Los países importadores deberán **notificar** a los países exportadores de cualquier **incumplimiento** relacionado con los requerimientos fitosanitarios. Las medidas fitosanitarias deberán ser aplicadas **sin**

discriminación entre países de la misma situación fitosanitaria, si tales países pueden demostrar que ellos aplican medidas idénticas o equivalentes en el manejo de plagas. Para el caso de una plaga cuarentenaria presente en el país, estas medidas deberán aplicarse sin discriminación entre los envíos extranjeros y nacionales.

De todos estos principios, el de mayor significación se refiere a la aceptación de un cierto nivel de **riesgo mínimo**, en oposición a la tesis de riesgo cero, debiendo los países establecer su **Nivel Adecuado de Protección** o el **Nivel Aceptable de Riesgo**.

En el Nuevo Texto Revisado de la Convención aparece el concepto de Plaga Reglamentada, la que involucra las Plagas Cuarentenarias y No Cuarentenarias reglamentadas. Plaga cuarentenaria es aquella de importancia económica potencial para el área en peligro, cuando aún dicha plaga no está presente en ella o si está presente no se encuentra ampliamente distribuida y es oficialmente controlada; entretanto, la plaga no cuarentenaria reglamentada es aquella cuya presencia en las plantas para plantación afecta el uso propuesto de esas plantas con un impacto económico inaceptable y la cual está, por lo tanto, regulada dentro del territorio del país importador.

Para los propósitos de las definiciones del Nuevo Texto Revisado de la Convención de Protección Fitosanitaria de la FAO, se entiende por planta, las plantas vivas y sus partes, incluidas las semillas y germoplasmas.

Legislación fitosanitaria en semillas

El movimiento internacional de semillas se ha incrementado notablemente en volúmenes y diversidad de especies, debido al acelerado desarrollo de nuevas variedades, a la necesidad de intercambiar germoplasma y a la estrategia de las empresas semilleras de producir en áreas de contraestación para ganar tiempo en las multiplicaciones e investigaciones. Como consecuencia, este aumento sostenido del intercambio ha incrementado el impacto de los patógenos transmitidos por la semilla sobre las acciones de cuarentena.

Cuando los inspectores de cuarentena vegetal tienen éxito en detectar por inspección visual síntomas o la plaga misma en esquejes, estacas raíces, etc., contribuyen a las estadísticas de intercepción de dichos organismos sobre cada material. Un estudio de tales estadísticas revela que predominan ciertas plagas, las que corresponden a aquellas más fácilmente detectables a simple vista, lupas de mano o con mayor cuidado con una lupa estereoscópica. Obviamente, debido a su tamaño algunos insectos abundan en las estadísticas cuarentenarias (5).

El riesgo de introducción de plagas asociadas a los materiales de propagación puede ser evaluado en forma real, sólo si los procedimientos de inspección son adecuados (5).

Las técnicas de detección de plagas transmitidas por semilla dependen de la clase y del sitio de la infección. Los inóculos pueden estar: protegidos por los tejidos de la semilla, incluido el embrión; adheridos a su superficie como esporas, esclerocios o trozos de micelio o bien, pueden estar presentes como infección concomitante, con restos infectados de las plantas, esclerocios, quistes, partículas de suelo u otros mezclados con la semilla. Las cantidades de inóculo en las partidas de semillas pueden variar desde trazas a fuertes contaminaciones. La inspección visual de semilla seca no es concluyente, requiriéndose de procedimientos de prueba que generalmente incluyen incubación y análisis microscópico (5).

Como se mencionó en la primera parte de este capítulo, los controles cuarentenarios están basados en la categorización y selección de las plagas determinadas como objetivos cuarentenarios y en el establecimiento y selección de procedimientos de inspección realizables y con el uso y aplicación de técnicas adecuadas de análisis de las mismas (5).

La categorización de las plagas está basada en las definiciones antes hechas de plaga cuarentenaria y plaga no cuarentenaria reglamentada. El potencial patogénico directo de un organismo puede definirse como la cantidad de daño producido por la plaga sobre una planta individual, mientras que el potencial epidemiológico depende de su tasa de aumento y se define como el número de plantas o áreas de cultivo afectadas bajo condiciones dadas y por un período dado (5).

Teniendo presente la diferencia entre potenciales patogénicos, la categorización de objetivos cuarentenarios se basa en:

- ?? la situación local de la región de introducción, en términos de presencia o ausencia del fitopatógeno, incluidas sus razas patogénicas si las hay;
- ?? el potencial patogénico directo de la plaga;
- ?? el potencial epidémico de la plaga.

Según esto, se pueden establecer las siguientes categorías de objetivos cuarentenarios:

- ?? Plagas Cuarentenarias A-1: aquellas plagas de alta importancia económica, no presentes en la región de introducción, que tienen un alto o considerable potencial epidémico. Muchas de las plagas pertenecientes a esta categoría se encuentran en las semillas en trazas y, en cuyo caso, no es aconsejable la ejecución de muestreo para definir su condición fitosanitaria.
- ?? Plagas Cuarentenarias A-2: incluyen también plagas de alta importancia económica, presentes en forma restringida en la región de introducción. Tienen un moderado potencial epidémico y están sujetas a control oficial.
- ?? Plagas no cuarentenarias reglamentadas: aquellas de importancia para la calidad sanitaria de la semilla, es decir, que afectan su uso propuesto (reproducción o multiplicación). Están presentes en el área de introducción, pero están sometidas a control oficial.

Por último, están todas las plagas que son posibles de ser transmitidas por semilla, presentes en el territorio y que no son estrictamente objetivos de control.

Una consideración cuarentenaria que se requiere evaluar en relación con las plagas de transmisión por semilla, es el riesgo de introducción de nuevas razas, lo que podría incidir en los programas locales de resistencia genética establecidos para las razas locales de dichas plagas. En este caso, una raza no presente de una plaga conocida como existente en un país puede ser considerada como Plaga Cuarentenaria A-1, si se ajusta a las condiciones que las caracteriza.

Para determinar la significación cuarentenaria de las plagas transmitidas por semilla, el equipo de científicos pertenecientes al “Biological Assesment Support” del Plant Protection and Quarantine (PPQ) perteneciente al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (United State Departament of Agriculture, USDA), desarrolló 16 criterios a aplicar para evaluarlos.

Criterios de evaluación de riesgo cuarentenario para plagas transmitidas por semillas

CRITERIOS	NIVELES DE CALIFICACION	
1. Daño económico que produce la plaga	Alto Bajo	Muchos cultivos un cultivo
2. Ocurrencia de la plaga en el país	Presente	No presente
3. Rango de huéspedes de la plaga	Amplio rango	Estrecho rango
4. Facilidad de dispersión de la plaga desde plántulas infectadas por inóculo transmitido por semilla.	Fácil dispersión	Difícil dispersión
5. Facilidad de detección de la plaga en muestras inspeccionadas por personal de cuarentena usando métodos y equipos disponibles en el lugar de inspección.	Fácil detección	Difícil detección
6. Longevidad, supervivencia en ausencia de un huésped, dormancia.	Largo periodo	Corto periodo
7. Facilidad de establecimiento en el suelo como resultado de sembrar semillas infectadas o contaminadas.	Fácil	Difícil
8. Transmisible por semilla en otros huéspedes que son también importados como semillas.	Ningún otro huésped lo transmite por semilla	Muchos huéspedes lo transmiten por semilla
9. Facilidad de dispersión desde un cultivo anual a un cultivo perenne o maleza.	Fácil dispersión	Difícil dispersión
10. Uso propuesto de la semilla importada.	Propagación	Usos no propagativos
11. Razas exóticas de una plaga presente en el territorio.	Ninguna	Muchas
12. Porcentaje de transmisión a través de la semilla.	Bajo	Alto

13. Probabilidad de que la plaga pueda entrar por otros medios dispuestos por el hombre o naturales.	Alto	Bajo
14. Volumen de semillas que se importa.	Alto	Bajo
15. Facilidad de detección y/o erradicación, si una plaga transmisible por semilla entra sobre ella y se establece.	Fácil	Difícil
16. Si el destino es no propagación (consumo o industrialización), facilidad de dispersión desde los locales de acopio.	Fácil	Difícil

Basados en su categorización, es posible establecer la intensidad de las medidas fitosanitarias a adoptar, con el propósito de minimizar el riesgo de introducción o dispersión de plagas cuarentenarias, transmitidas por semilla.

Estas medidas podrían enunciarse de la siguiente manera:

?? *Que las semillas provengan de áreas libres de plagas*, será una medida adecuada para una plaga no presente en el territorio de introducción, de alta importancia económica, con detección difícil por los métodos convencionales establecidos, con un bajo porcentaje de transmisión por la semilla y con dificultades para su detección precoz y posterior erradicación.

?? *Que las semillas provengan de un semillero que haya sido oficialmente inspeccionado durante la temporada de crecimiento activo y al que se le hayan practicado análisis adecuados para asegurar la ausencia de determinadas plagas*, podría ser adecuado para plagas de alta importancia económica, con detección sólo durante períodos de crecimiento y que se transmitan en bajo porcentaje por la semilla.

?? *Que los envíos de semillas estén libres de una plaga determinada y que lo mismo se compruebe por la aplicación de técnicas adecuadas de muestreo y análisis de laboratorio*, puede ser una intensidad de medida adecuada para plagas transmitidas en alto porcentaje por la semilla.

?? *Que los envíos de semillas estén libres de plaga determinada*, situación que puede ser corroborada mediante inspección visual, y

que sea posible certificar la ausencia de ciertos insectos que pueden detectarse fácilmente entre la semilla o por la aplicación de técnicas adecuadas de muestreo y análisis de laboratorio, puede ser una intensidad de medida adecuada para plagas transmitidas en alto porcentaje por la semilla.

?? *Que los envíos de semillas hayan sido sometidos a un tratamiento cuarentenario.* Esta medida es posible de recomendar si la plaga es de difícil detección, se transmite en bajo porcentaje en la semilla y tiene factibilidad de control por medios químicos o físicos.

REFERENCIAS

1. Canales, F. 1993. El libre acceso a los mercados y las medidas fitosanitarias. COSAVE Informa. Boletín N°2/92.
2. COSAVE. 1994. Estándares Fitosanitarios Regionales. Comité de Sanidad Vegetal del Cono Sur. Informe Técnico N° 34. Brasilia, Brasil.
3. Kobayashi, T. 1990. Impact of seed borne pathogen on quarantine in Japan. Seed Sci.&Technol.18, 427-433.
4. Manandhar, H.K. y Mortensen, C. 1993. Seed borne bacterial pathogen of quarantine significance. Quarantine for seed. FAO plant Production and Protection paper 1 19. S.B. Mathur and H.K. Manandhar Eds. FAO, Roma, Italia.
5. Neergaard, P. 1977. Quarantine policy for seed in transfer of genetic resource. Plant health and quarantine in international transfer of genetic resources. William B. Hewit and Luigi Chiarappa Eds. CRC. Boca Ratón, Florida, USA.

GLOSARIO

Acérvulo	Cuerpo fructífero asexual, subepidérmico y en forma de plato que produce conidióforos cortos y conidios.
Adsorción	Ligamiento no específico de moléculas a superficies sólidas en capas delgadas o monocelulares.
Anticuerpo	Molécula de inmuno globulina producida por los linfocitos B de un animal de laboratorio, en respuesta a un estímulo antigénico y capaz de ligarse a un antígeno.
Anticuerpo monoclonal	Población homogénea de anticuerpos producida por un clon de células formadoras de anticuerpos.
Antígenos	Sustancia, generalmente proteína o polisacárido capaz de inducir la producción de anticuerpos específicos y capaz de ligarse específicamente con ellos.
Areas Libres	Definición sanitaria, que significa un área en la cual una plaga específica no ocurre, como lo demuestra la evidencia científica y en la cual esta condición está siendo oficialmente mantenida.
Bacteriostático	Agente químico o físico que impide la multiplicación de bacterias sin destruirlas.
Cleistotecio	Fructificaciones esféricas que contienen una o más ascas, características de algunos hongos ascomicetos.

Cloroplasto	Son los plastidios que se encuentran en los órganos vegetales expuestos a la luz. Su pigmento característico es la clorofila.
Electroforesis	Emigración de elementos cargados en un campo electromagnético que atraviesan un medio líquido gelificado.
Epifitía	Rápido y masivo desarrollo de una enfermedad en una población vegetal determinada, un cultivo, en una extensa área geográfica.
Esclerocio	Masa compacta de micelio producida por algunos hongos con el propósito de sobrevivir períodos en condiciones ambientales adversas y secundariamente permite la diseminación y multiplicación de los hongos que producen este tipo de estructura.
Hibridación (o hibridación)	Término usado en biología molecular para definir el apareamiento de secuencias complementarias de ácidos nucleicos.
Inóculo	Es el organismo patógeno, o una parte del organismo, responsable de producir una infección.
Inmunoglobulina G	Término moderno para designar las gamas globulinas. Es la principal inmunoglobulina en el suero humano.
Oospora	Espora de origen sexual producida por algunos hongos Oomicetes, caracterizadas por la presencia de gruesas paredes que le permiten sobrevivir a condiciones adversas.
Patovar	Es una subdivisión, dentro la especie que refleja la habilidad para infectar determinados hospederos.

Picnidio	Fructificación asexual, globosa, ostiolada la cual contiene conidióforos y conidias que caracterizan a algunos hongos.
Poliacrimida	La polimerización de una mezcla de acrilamida y biacrilamida en medio líquido permite obtener un gel reticular de poliacrimida, cuya dimensión en las mallas depende de la concentración.
Prevalencia	Es la cantidad de enfermedad presente en una población conocida en un período de tiempo determinado.
Sinergismo	Parasitismo concurrente que sufre un hospedero por dos patógenos, en que los síntomas u otros efectos producidos son más notables que en el caso del conjunto de síntomas que ocasiona cada patógeno por separado.
Teliospora	Espora sexual, de resistencia y de pared gruesa de las royas y los carbones.
Transcripción	Función que, a partir de un modelo de ADN, conduce a la síntesis de un ARN mensajero o a partir de un ARN genómico se sintetiza un ARN mensajero.

ÍNDICE ANALÍTICO

A

Acanthoscelides: 34,35
Acanthoscelides obtectus: 35
Acérvulos: 15,31
Acetona: 81
Agallas: 11,12,31,33,34,36,76
Agar bactonutriente: 44
Agar bactopectona: 44
Agar, incubación en: 41,44
Agar malta: 41,44
Agar semiselectivo: 45,54
Aglutinación de los cloroplastos: 52
Aglutinación, prueba de: 32,52
Agrobacterium radiobacter: 76
Agrobacterium tumefaciens: 76
Agua caliente, tratamiento de: 74
Alfalfa: 39,59
Alternaria spp.: 86,88
Alternaria brassicae: 85
Alternaria brassicicola: 72,74,82,85
Análisis de semilla seca: 31,33
Análisis de semilla sin incubar: 31,33
Análisis de semilla ablandada: 31,36
Análisis sanitario: 33
Anilidas, derivados de: 85
Aneuploides: 13
Anguina: 12,33,36,39
Anguina agrostis: 34
Anguina tritici: 33
Antagonismo: 41,44, 75
Antibióticos: 41, 75, 88, 89
Anticuerpo primario: 55
Aphelenchoides: 39
Aphelenchoides besseyi: 39
Apio: 15, 72, 81
Área libre de plagas: 99
Aromáticos, derivados: 84
Arroz: 13, 39, 84, 91
Arvejas: 13, 28, 35, 37, 75, 90
Ascochyta: 13, 35, 88
Ascochyta pisi: 28

Ascochyta rabiei: 14, 16

Aureomicina: 89

Avena: 37, 74

B

Bacterias: 27, 29, 31, 32, 35, 40, 41, 42, 44, 46, 47, 48, 50, 52, 54, 55, 56, 59, 61, 62, 74, 88, 89, 91, 107
Bacterias, métodos específicos para: 32, 48
Bacteriófagos: 32, 50
Barley Stripe Mosaic Virus: 13, 38
Basidiomicetes: 34
Benomyl: 81
Benzimidazoles: 85,86
Beta vulgaris: 82,89
Bioquímicas, pruebas: 32, 50
Bitertanol: 85, 86
Botrytis: 11, 33
Broad Bean Mosaic Virus: 14
Bromuro de metilo: 35, 92
Bronopol: 91
Bruchidae: 12
Bruchidius spp: 34
Bruchus spp: 34
Bruchophagus spp: 34
Bruco: 35

C

Caída de almácigos: 85, 88
Caladores: 22
Calador de Nobbe: 22
Calador de Sleeve: 22
Cálcidos: 12
Callosobruchus spp: 34
Cámara húmeda: 31, 37, 42, 44, 47
Cámara de flujo laminar: 45
Carbendazima: 85, 86, 88
Carboxianilida: 85
Carboxiamida: 85, 88
Cebada: 13, 15, 37, 38, 74, 87

Cebolla: 39, 82
Centrifugación: 12, 38, 39, 58
Cercospora kikuchii: 14
Certificado Internacional de análisis: 20
Cicer arietinum: 14
Cilantro: 14
Claviceps: 11, 33.
Cleistotecios: 15
Cochliobolus miyabeanus: 13
Coliflor: 82
Colletotrichum sp: 13
Colletotrichum capsici: 15
Colletotrichum lindemuthianum: 13.
Competencia técnica: 99
Compuestos carbonados, utilización de: 50
Convención Internacional: 97
Cooperación Internacional: 97, 99
Coriandrum sativum: 14
Corynebacterium: 89
Corynebacterium flacumfaciens: 14
Cotiledones: 7, 13, 14, 39, 72, 75, 81, 85
Crecimiento, pruebas de: 32, 46
Cuarentena vegetal: 23, 97, 100
Cuerpos frutales: 11, 15, 31, 33, 72
Curtobacterium flacumfaciens: 14, 89
Cuscuta sp: 71

D

Decoloraciones: 11, 12, 31, 35
Deformaciones: 11, 12
Desinfecciones: 77, 78
Dicarboximidas: 85, 86
Didymella lycopersici: 72
Difenoconazole: 85
Difusión en agar: 32, 53
Difusión simple: 32, 53
Difusión doble: 32, 53, 54
Difusión doble en placas: 54
Diplodia zae: 15
Ditylenchus: 39
Ditylenchus dipsaci: 14
Downy mildew: 37
Drechslera oryzae: 13

E

Eficiencia de un tratamiento: 77
Electroforesis: 32, 51, 54, 59, 108

Electroforesis reversa: 60
ELISA: 32, 52, 56, 57, 58, 60, 62
Embudo Baerman: 39, 40
Ensayos indirectos: 19
Erysiphe graminis: 15, 87
Esclerocios: 11, 31, 33, 71, 101
Esclerocio esporogénico: 33
Esclerocio carpogénico: 33
Esclerocio miceliogénico: 33
Espárrago: 81
Esporas, masas de: 15, 31, 34, 36
Estreptomina: 45, 88, 89, 90
Ethirimol: 85
Etridiazole: 85
Eurytomidae: 12, 34
Eurytoma: 34
Examen del líquido de semillas: 31, 38

F

Fenfuram: 85
Fenbuconazole: 85
Fenilpyrrole: 85, 88
Fenpiclonil: 85, 88
Filtrado: 12
Fluorocromo: 55
Flutriafol: 85, 87
Folpet: 84
Formulaciones: 79, 80, 83
Fosfamina: 92
Frejoles: 13, 35
Fructificaciones fungosas: 31, 36
Fuberidazol: 85
Fumigaciones: 77, 92
Fungicidas orgánicos: 84
Fungicidas sistémicos: 81, 84, 85
Fusarium moniliforme: 81
Fusarium oxysporum: 81

G

Garbanzo: 14
Germinación, inhibición de la: 42
Germoplasma: 20, 23, 27, 47, 59, 100
Glycine max: 14
Guanidínicos, derivados: 84
Guazatina: 84

H

Helminthosporium sp: 88
Helminthosporium carbonum: 14

Hibridación molecular: 80
Hidrólisis: 50
Hidrocloruro de promocarbo: 88
Hidróxido de sodio: 37, 38
Hipersensibilidad: 47, 48
Hipoclorito de sodio: 45, 89, 91
Hordeum vulgare: 13

I

Imazalilo: 84
Imidazol, derivados del: 84
Imídicos, derivados: 84
Iminoctadine: 84
Immunofluorescence Colony Staining: 55
Immunosorbent Immunofluorescence Microscopy: 56
Impurezas: 11, 31, 33
Incubación, análisis después de: 40
Incubación en cámara húmeda: 42, 44
Incubación, condiciones de: 43
Infecciones internas: 37
Inmunoelectroforesis: 32, 54
Inmunodifusión directa: 32, 54
Inmunofluorescencia directa: 32, 56
Inmunofluorescencia indirecta: 32, 55
Inóculo: 8, 19, 28, 38, 41, 46, 48, 49, 101, 103, 108
Inspección directa: 19
Ipriconazole: 85
Iprodione: 85
ISTA: 20, 21, 22, 23, 57

K

Kasugamicina: 88, 89, 90

L

Lavado: 12, 31, 38, 39, 40, 56, 57
Látex de poliestireno: 52
Legislación sanitaria: 8
Leván, formación de: 50
Lote de semilla: 8, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 33, 58, 75, 93
Lupa estereoscópica: 15, 30, 36, 38, 39, 100
Luz ultravioleta: 31, 35, 37, 43, 44, 45

M

Maíz: 14, 15, 20, 21, 34

Malformaciones: 31, 35
Manchas: 11, 12, 13, 14, 31, 35, 75
Mancozeb: 84
Maneb: 84
Medios de cultivo: 41, 44, 45
Megastigmus: 34, 35, 92
Mepronil: 85, 88
Metiram: 84
Método canadiense: 37
Métodos directos: 46
Métodos serológicos: 32, 51, 54
Microscopía electrónica: 32, 50
Microscopía electrónica serológicamente específica: 58
Microprecipitación, prueba de: 32, 52
Mínimo impacto: 98
Modificación: 54, 74
Muestra de trabajo compuesta: 21
Muestra primaria: 21, 22, 23
Muestreo: 19, 21, 22, 23, 24, 102, 104
Muestreo, eficiencia del: 20
Muestreo, metodología: 21
Mycosphaerella pinoides: 13

N

Nebulización: 79, 80, 81
Necesidad: 11, 13, 15, 27, 35, 44, 47, 74, 77, 98, 100
Nitroderivados: 84
Nuairimol: 85, 88

O

Oakley y Fulthorpe, técnica de: 53
Oosporas: 15, 37, 87
Oryza sativa: 13
Ouchterlony, técnica de: 54, 62
Oudin, técnica de: 53
Oxadixyl: 85
Oxatinas: 85, 87
Oxidaciones: 50

P

Pasta acuosa: 80, 83, 84
PCNB: 84
PCR: 32, 39, 58, 59, 60
PCR Inmunocaptura: 60
Peletizado: 82
Phytophthora: 85, 87, 88
Phytophthora infestans: 74

Plaga: 34, 72, 91, 92, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 107

Plaga cuarentenaria: 91, 97, 99, 100, 101, 102, 104

Plaga reglamentada: 97, 99, 100, 101

Plaga no cuarentenaria reglamentada: 97, 100, 101, 102

Plemeliella abietina: 92

Polvos: 79, 80, 83

Polvos mojables: 79, 80

Polvos solubles: 80

Preventivos, tratamientos: 72, 73

Pyrimidine: 85

Pyrimidinyl carbinol: 85

Q

Quintozene: 84

R

Radiación microonda: 75

Radioinmuno absorción: 57

Radioinmuno ensayo: 57

Radioinmuno ensayo en fase sólida: 57

Rayos X: 35

Reacción en cadena de la polimerasa: 39, 58, 59

Reducción de nitratos: 50

Remolacha: 81, 82, 84

Revestimiento en películas: 82

Rhizoctonia: 11, 84, 88

R.Page: 32, 60

S

Sclerotinia: 33

Sclerotium: 33

Septoria apii: 36

Septoria apiicola: 15, 72

Septoria nodorum: 15

Serología: 51

Slurry: 77, 78, 79, 80, 90

Soberanía: 98

Solid Phase Radio Immuno Assay: 57

Sorgo: 34

Soya: 14, 15, 58

Sphaceloteca: 12, 34

Sphaceloteca reiliana: 34

Streptomyces griseus: 88

Streptomyces kasugaensis: 88

Streptomyces rimosus: 88

Submuestra: 21

Suspensión concentrada: 80

Syntomapsis: 34

Systole spp: 34

T

Tebuconazole: 85

Tiabendazol: 85, 86

Tissue Blot Immuno Assay: 57

Transparencia: 98

Tratamientos bactericidas: 88, 91

Tratamientos bioquímicos: 76

Tratamientos de desinfección: 80, 83

Tratamientos erradicantes: 72, 73, 92

Tratamientos fungicidas: 83

Tratamientos insecticidas: 77, 91

Tratamientos preventivos: 72

Tratamientos químicos: 77

Tratamiento seco: 80

Triadimefón: 85, 86

Triadimenol: 85, 86, 87

Triazol: 86

Trichoderma hamatum: 76

U

Urocystis: 34, 87

Ustilago: 12, 34, 87, 88

Ustilago avenae: 37, 74

Ustilago nuda: 35, 37, 74

V

Vapor: 74, 75

Vicia: 39

Vicia faba: 14

Virus, métodos para: 32, 48

Virus isométricos: 54, 55

X

Xanthomonas campestris pv. campestris: 74, 89

Xanthomonas campestris pv. phaseoli: 55

Xanthomona phaseoli pv, phaseoli: 13

Z

Zanahoria: 82, 83

Zea mays: 14

Zineb: 84

