

Capítulo I

Metodologías y técnicas empleadas para la detección de hongos en semillas

El flujo de germoplasma vegetal representa un riesgo significativo de diseminación de problemas fitosanitarios. Las semillas en particular son un vehículo eficaz para la propagación de plagas y enfermedades (Gergerich et al., 2015; Mancini et al., 2016). Incluso, una baja concentración de inóculo presente en una semilla puede conducir a graves pérdidas de cultivos, especialmente si se trata de un patógeno cuarentenario (Mancini et al., 2016). Esta estrecha relación entre los hongos y las semillas facilita la supervivencia a largo plazo y la propagación generalizada de estos patógenos (Brodal y Asdal, 2021; Mancini et al., 2016).

Muchos países cuentan con el respaldo de técnicas de detección de plagas y enfermedades en semillas para la formulación, preparación y desarrollo de políticas, planes, programas, proyectos, medidas y procedimientos para limitar o prevenir que aquellas puedan afectar su estatus sanitario y fitosanitario (Bebber et al., 2014; Buja et al., 2021; Comisión Europea, 2013). Generalmente, los bajos niveles de inóculo y la distribución desigual dentro de los lotes

de semillas hace que las pruebas de detección precisas y rápidas de contaminantes fúngicos para el cumplimiento de las reglamentaciones fitosanitarias sean una tarea más compleja (Kumar et al., 2020).

En muchos casos, para detectar la presencia de hongos en las semillas, se deben seguir varios pasos secuenciales que incluyen (figura 1): a) la toma de muestras representativas del lote de semillas; b) la elección de la técnica de detección; la cual implica c) la incubación de las semillas en medios de cultivo o sustratos específicos para favorecer el crecimiento de hongos; d) el aislamiento de los hongos; e) su caracterización (macroscópica y microscópica) e identificación, ya sea mediante f) la visualización de estructuras características o g) mediante pruebas serológicas y moleculares; h) finalmente, se deben desarrollar pruebas de germinación y patogenicidad con los aislamientos obtenidos.

Muestreo de semillas

Para verificar la calidad de las semillas de maíz, soya, arroz o sorgo, es importante seleccionar cuidadosamente la muestra de trabajo. Para ello, se sugiere seguir los lineamientos de la Asociación Internacional de Pruebas de Semillas (International Seed Testing Association [ISTA], 2018). De acuerdo con estas directrices, se recomienda tomar muestras primarias, que consisten en una porción inicial de semillas recolectadas de manera aleatoria de cada inventario. Esta tarea constituye el primer paso para obtener una muestra representativa del lote. Posteriormente, se mezclan las muestras primarias de un mismo lote para conformar una compuesta, de la cual se obtiene una muestra homogenizada para su análisis. Este proceso de selección de la muestra es esencial para garantizar que el lote sea debidamente representado y evaluado en términos de calidad.

Aspectos generales de las técnicas para la detección de hongos contaminantes en semillas

A la hora de detectar hongos en semillas, es importante elegir la técnica adecuada en función del tipo de hongo que se busca. Existen diversos métodos fundamentados en la morfología, fisiología y síntomas de los patógenos. Los métodos tradicionales implican la inspección directa de semillas secas bajo microscopio o estereoscopio, identificando esporas, estructuras de resistencia, cuerpos fructíferos o síntomas

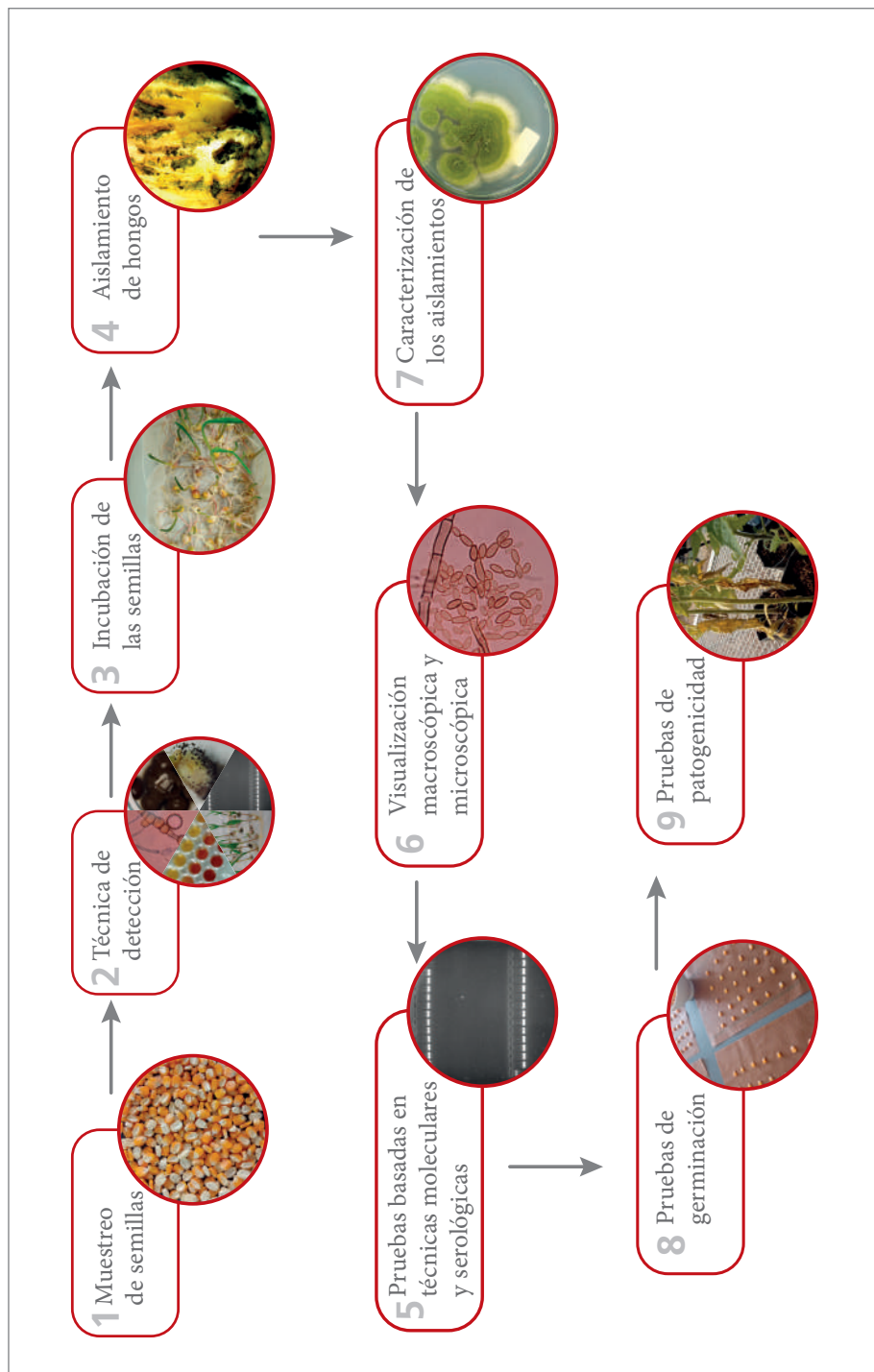


Figura 1. Pasos secuenciales para detectar la presencia de hongos en semillas.

Fuente: Elaboración propia

característicos del hongo. Otras más sofisticadas incluyen la aplicación de pruebas serológicas y el empleo de técnicas moleculares (Walcott, 2003). Estas técnicas varían en complejidad y alcance, desde la observación directa hasta el uso de herramientas de laboratorio más sofisticadas (Mancini et al., 2016). La elección de la técnica dependerá del objetivo de detección y de los recursos disponibles para llevar a cabo el análisis. A continuación, se presentan las técnicas más utilizadas:

1. Observación directa de semillas: consiste en examinarlas visualmente en busca de signos de contaminación por hongos, como manchas, crecimiento micelial o cambios en la textura (Mancini et al., 2016).
2. Incubación en papel húmedo (*blotter test*): consiste en colocar las semillas en papel absorbente humedecido y observar la aparición y desarrollo de hongos (Majumder et al., 2013).
3. Pruebas moleculares: mediante el uso de técnicas de biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se detecta y amplifica una sección del ADN de los hongos presentes en las semillas, lo que permite su identificación precisa mediante secuenciación del fragmento amplificado (Tsedaley, 2015).
4. Pruebas serológicas: se basan en la detección de proteínas específicas producidas por los hongos mediante la utilización de anticuerpos (Kumar et al., 2020).
5. Incubación en medios de cultivo: las semillas se siembran en medios de cultivo adecuados, donde los hongos presentes pueden crecer y ser identificados posteriormente (Marcinkowska, 2002).

En cualquier caso, una técnica de detección de contaminantes fúngicos en semillas debe cumplir seis requisitos esenciales (Mancini et al., 2016; Marcinkowska, 2002; Tsedaley, 2015):

1. tener la capacidad de distinguir un organismo objetivo en particular de otros que se encuentran en las semillas analizadas (especificidad);
2. permitir detectar organismos, incluso cuando la concentración del inóculo en las semillas es baja (sensibilidad);
3. ser rápida (velocidad) y simple, es decir, debe incluir el menor número de etapas posibles para reducir la probabilidad de ocurrencia de error (simplicidad);
4. poder ser efectuada por personal que no necesariamente sea altamente calificado;
5. ser barata (rentabilidad) y
6. ser una metodología reproducible y lo suficientemente robusta para que los resultados sean repetibles entre muestras del mismo lote de semillas, independientemente de quien la aplique.

Metodologías existentes para la detección de hongos en semillas

Incubación de las semillas

En estas pruebas la muestra de semillas se somete a unas condiciones de temperatura y humedad por un tiempo determinado con el fin de evidenciar el desarrollo de los signos característicos del hongo contaminante (Nasir, 2003). Una de las técnicas más frecuentes que emplean métodos de incubación son las pruebas en papel absorbente o *blotter test* (figura 2). Estas permiten la detección de hongos contaminantes (saprófitos y patógenos) y el desarrollo de la infección en las plántulas germinadas. Esta técnica combina las ventajas de las pruebas *in vitro* con las pruebas *in vivo*. Las semillas (muestra de trabajo) son dispuestas sobre o entre 1 y 3 capas de papel absorbente o almohadillas de celulosa humedecidos con agua estéril o una solución tampón. Una vez allí, son colocadas frecuentemente en recipientes plásticos herméticos para generar las condiciones de cámara húmeda (Mancini et al., 2016; Marcinkowska, 2002; Tsedaley, 2015), esta última se entiende como un ambiente controlado que simula las condiciones óptimas para el desarrollo de hongos en las semillas, es decir, altas temperaturas combinadas con alta humedad. Las condiciones de incubación usualmente son de temperaturas entre $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ y $\text{HR} \sim 90\% \pm 5\%$ por siete días. Al finalizar el proceso de incubación se determinan los porcentajes de germinación total, semillas sanas, semillas sanas germinadas y prevalencia de hongos contaminantes, diferenciados por género de hongo contaminante y semilla germinada o sin germinar (figura 3).



Foto: Manuel Alfonso Patiño M.

Figura 2. Montaje de pruebas de calidad sanitaria de semilla en papel absorbente dentro de cámara de flujo laminar.

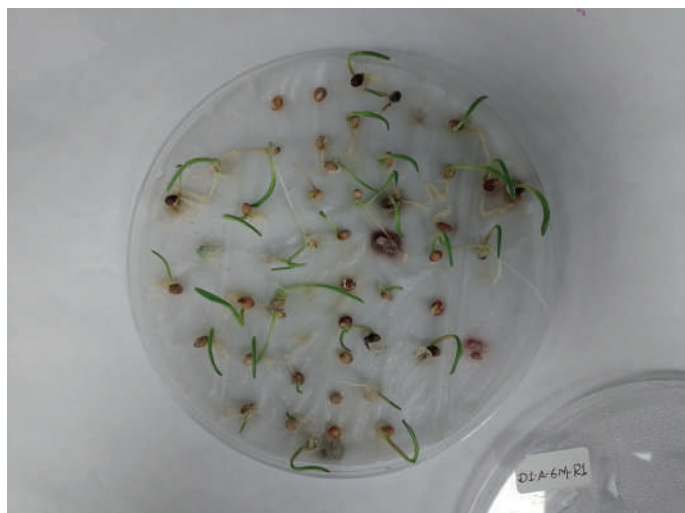


Foto: Manuel Alfonso Patiño M.

Figura 3. Lectura de pruebas de calidad sanitaria de semilla en papel absorbente.

Otra de las técnicas que emplea métodos de incubación es la prueba en medios de cultivo solidificados con agar, como agar papa dextrosa (PDA), o medios selectivos usualmente acidificados o con algún antibiótico de amplio espectro que inhiban el crecimiento de contaminantes bacterianos. Estos métodos proporcionan información sobre la viabilidad de un inóculo en una muestra de semilla infectada y son empleados cuando las pruebas en papel absorbente no proporcionan las condiciones adecuadas para el desarrollo de los signos del hongo contaminante en plántulas y semillas (crecimiento micelial, estructuras reproductivas, etc.) (Mancini et al., 2016; Üstün et al., 2021). Las semillas (muestra de trabajo) son dispuestas en el medio de cultivo para el crecimiento de hongos y sometidas a periodos determinados de tiempo, temperatura y luminosidad (figura 4). Generalmente, se someten a tiempos de incubación de 5 a 10 días aproximadamente, a temperaturas de 20 °C a 28 °C con el fin de promover sobre el agar el crecimiento de los hongos presentes en las semillas (Mancini et al., 2016; Marcinkowska, 2002; Üstün et al., 2021). Cuando los hongos contaminantes crecen muy lentamente en medios de cultivo artificiales o no desarrollan estructuras diagnósticas (cuerpos fructíferos, esporas, etc.), se emplean técnicas basadas en métodos de tinción, que consisten en la aplicación de colorantes específicos a las estructuras fúngicas para facilitar su visualización en el microscopio. Estas técnicas siguen siendo la base de las pruebas de calidad sanitaria en semillas, sin embargo, consumen tiempo, requieren una experiencia y un conocimiento de taxonomía especializados y a veces no son lo suficientemente sensibles para detectar niveles bajos de infección (Martín et al., 2022).

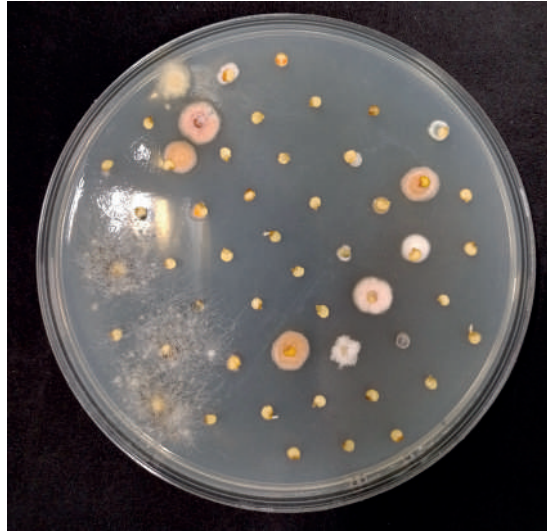
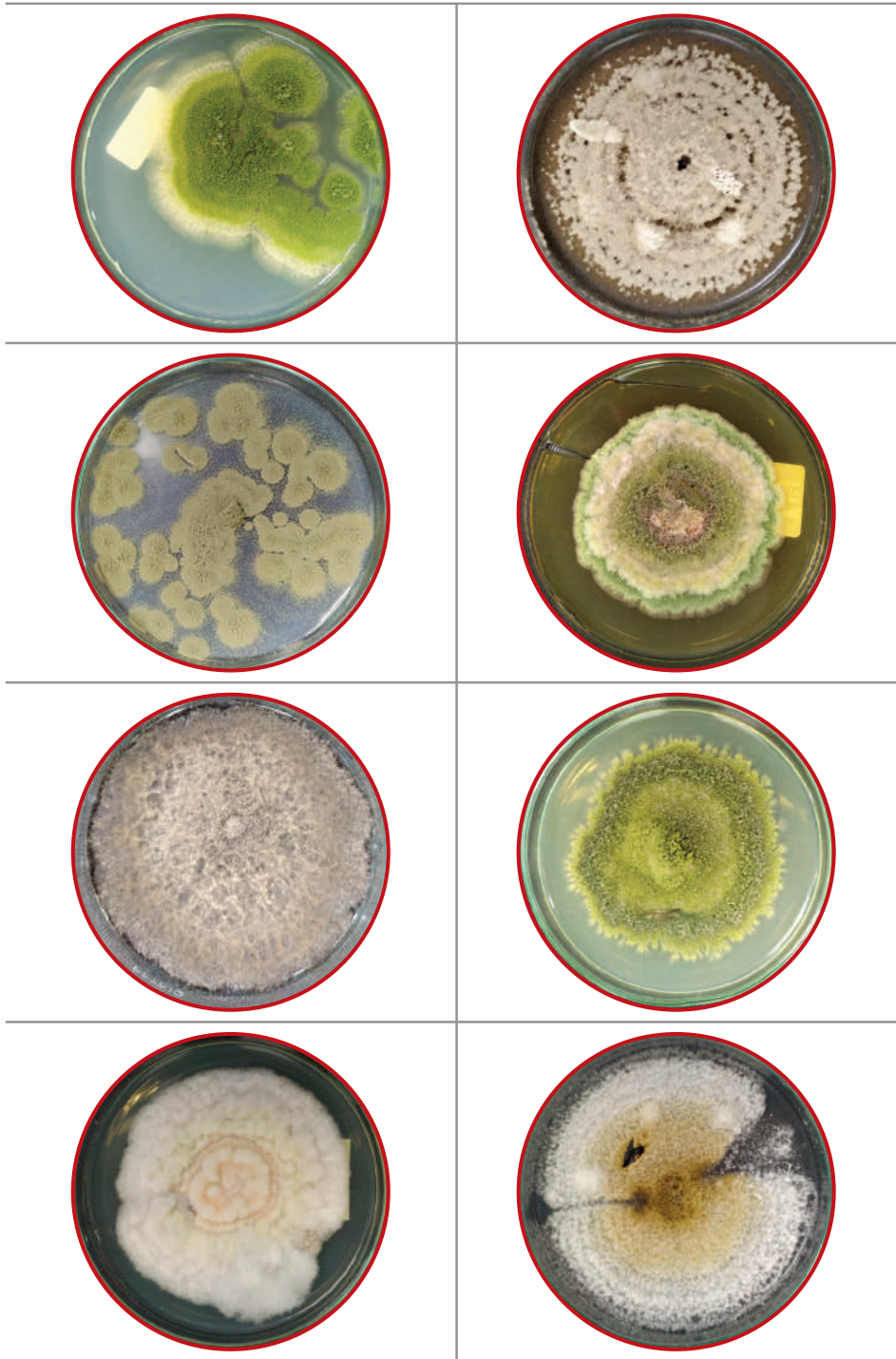


Foto: Manuel Alfonso Patiño M.

Figura 4. Lectura de prueba de calidad sanitaria de semilla en medio de cultivo solidificado con agar.

Aislamiento de hongos

Es el proceso posterior a la etapa de incubación de las semillas. Consiste en la separación del hongo de una muestra compleja, la siembra en un medio de cultivo y su posterior incubación bajo condiciones específicas para garantizar su purificación y poder llevar a cabo su caracterización. Para realizar el aislamiento, se requiere tomar un fragmento del micelio con un instrumento estéril como un asa, cuchilla o pinzas, dentro de una cámara de flujo laminar o bajo condiciones asépticas. Luego, se siembra en medios de cultivo no selectivos como PDA pH 4,5 (ajustado con ácido láctico), PDA + antibiótico de amplio espectro o medios específicos según el hongo de interés. Por lo general, los aislamientos se incuban en oscuridad a temperaturas de 25 °C a 28 °C durante un periodo de 7 días. Posteriormente, el micelio generado de los aislamientos de los tejidos se replica en el mismo medio de cultivo hasta obtener el crecimiento de una colonia pura del hongo contaminante (figura 5). Estas colonias puras obtenidas se utilizan para identificar el hongo a nivel de género y especie, preservarlas a largo plazo o ser empleadas como fuente de inóculo en pruebas de patogenicidad (Muñoz et al., 2020).



Fotos: Manuel Alfonso Patiño M.

Figura 5. Colonias puras de hongos contaminantes comunes en semillas.

Técnicas para la caracterización de hongos presentes en semillas

Se refiere al proceso de describir y determinar las características de un hongo, tales como su identidad, apariencia macroscópica y microscópica, su modo de reproducción, su patogenicidad, su respuesta a ciertos factores ambientales, entre otros aspectos.

En los siguientes apartados se explorarán tanto los métodos tradicionales como los moleculares utilizados para la caracterización de hongos contaminantes en las semillas. Estos enfoques van desde la observación microscópica y el cultivo en medios de agar, hasta las técnicas más avanzadas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos. A través de esta revisión, se buscará destacar las ventajas, limitaciones y aplicaciones de cada método, proporcionando una visión completa de las herramientas disponibles para la caracterización de hongos contaminantes.

Visualización macro y microscópica

La identificación de hongos puede llevarse a cabo a partir de su caracterización microscópica y macroscópica y, con esto, llegar al reconocimiento de algunas estructuras diagnósticas. Para la visualización de estas estructuras se realizan montajes directos de los hongos creciendo sobre las semillas o de los aislamientos puros.

Los montajes permiten examinar la colonia en su totalidad, tanto a nivel macroscópico como microscópico. Al observarla macroscópicamente, se analizan aspectos como la forma, el color, la textura y la producción de pigmentos, los cuales son de gran utilidad para identificarla. En cuanto a la morfología microscópica, se puede observar la presencia de cuerpos fructíferos, estructuras de resistencia, tipos de esporas, tamaño y disposición de las hifas (Barnett y Hunter, 1972). La preparación del material para la observación microscópica se realiza en fresco, a través de improntas hechas con cinta adhesiva transparente o mediante cultivo sobre portaobjetos (figura 6).



Fotos: Manuel Alfonso Patrino M.

Figura 6. Pasos para la visualización macroscópica y microscópica de hongos contaminantes en semillas.

Fuente: Elaboración propia

Pruebas basadas en técnicas moleculares

Tradicionalmente, las técnicas que se han usado para detección de hongos transmitidos por semillas se basan en la incubación y métodos de crecimiento. Estas técnicas consumen mucho tiempo, requieren habilidades micológicas y algunas veces no son muy sensibles a las concentraciones bajas de inóculo. Sin embargo, para mejorar la sensibilidad y especificidad en la detección de patógenos se han desarrollado técnicas moleculares, las cuales están basadas en el análisis del ADN, como la PCR

convencional, adecuada para la detección de hongos por su rapidez, especificidad, sensibilidad y fácil interpretación (Mancini et al., 2016). El análisis de ADN ayuda a diferenciar las especies de patógenos, ya que se ha comprobado que el genoma posee zonas que brindan muy buena información para su identificación taxonómica (Ramos-Fernández et al., s. f.). Las pruebas moleculares facilitan la detección del patógeno convirtiéndolo de indetectable a detectable, al facilitar la amplificación y multiplicación de la secuencia de ADN.

A continuación, se detallan técnicas recientes como la PCR anidada, que permite la detección a bajas concentraciones de inóculo; PCR múltiple para detectar simultáneamente varios patógenos; PCR en tiempo real y PCR por captura magnética, entre otras; además, se describen otras técnicas en la tabla 1. Así mismo, algunos cebadores comunes para la identificación de patógenos de semillas se detallan en la tabla 2.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional

Esta técnica de biología molecular se basa en la multiplicación de un gran número de copias de un fragmento de ADN en particular (González-Garza, 2017). La amplificación de ADN mediante PCR involucra varios elementos clave. En primer lugar, se emplea una enzima termoestable conocida como ADN-polimerasa, siendo la más común la Taq polimerasa, la cual es estable a 95 °C. Durante cada ciclo de amplificación se involucran dos cebadores (Marcinkowska, 2002). Estos cebadores son oligonucleótidos que permiten la duplicación del fragmento de ADN seleccionado y deben tener ciertas características, como una longitud entre 18 a 25 nucleótidos; entre un 40 a 60 % de contenido de Citocina y Guanina (C y G) —es recomendable que la terminación del extremo de la cadena sea C o G— y las temperaturas de fusión de los cebadores usados en la misma reacción no deben superar los 5 °C (Marcinkowska, 2002).

Para que la enzima termoestable funcione adecuadamente, se requieren cationes divalentes, especialmente el Mg^{2+} . Por otro lado, se hace uso de un *buffer* de amplificación para mantener el pH óptimo durante la reacción PCR. Así mismo, se incorporan adyuvantes como el Tritón X-100 o la formamida para mejorar la especificidad de la PCR. Por último, el ADN molde actúa como patrón a partir del cual se amplifica el fragmento de interés (Bartlett y Stirling, 2003).

Se emplean cuatro pasos:

1. Desnaturalización a alta temperatura, la cual oscila entre 94 y 95 °C para separar las hebras del ADN molde.
2. Hibridación de cebadores a su secuencia complementaria en sus dos hebras de ADN, en donde se asocian los cebadores al fragmento que se requiere amplificar. En este paso la temperatura desciende a un rango entre 40 y 60 °C, lo que facilita la unión del cebador a la secuencia complementaria.
3. Extensión o síntesis de la doble cadena que hace la ADN polimerasa a partir del extremo donde se unió el cebador. La temperatura se eleva a 72 °C, la adecuada para la actividad óptima de la enzima. Los pasos 1 a 3 se repiten al menos 40 ciclos con el fin de obtener el número de copias necesarias del fragmento de interés. Se realiza un ciclo de extensión o polimerización final que oscila entre 5 y 10 minutos, con el fin de que la ADN polimerasa sintetice fragmentos de ADN simple que no fueron amplificados (González-Garza, 2017).

Los fragmentos amplificados se pueden visualizar por electroforesis en un gel de agarosa (figura 7).

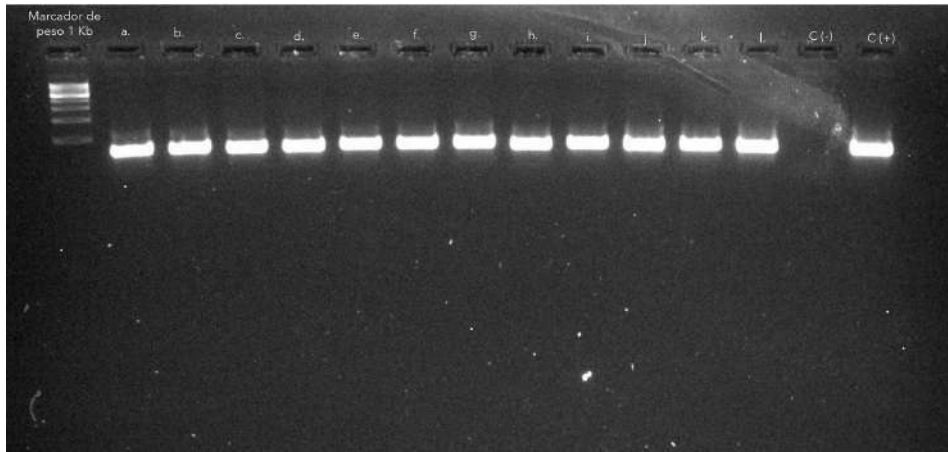


Foto: Manuel Alfonso Patiño M.

Figura 7. Gel de electroforesis donde se visualizan fragmentos de ADN amplificados de las muestras a. hasta la l. C (-) corresponde al control negativo y C (+) al control positivo.

Esta prueba se usa para la identificación molecular de muchos hongos en semillas, empleando los cebadores ITS1F-ITS4 (ITS1-F 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3' y ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para amplificar la región ITS1-5.8S-ITS2 (Henras et al, 2015).

PCR anidada

La PCR anidada o *Nested PCR* es usada para aumentar la sensibilidad de la PCR al realizar dos rondas de amplificación con distintos pares de cebadores en cada etapa. Inicialmente, se realiza una amplificación con los cebadores externos, cuyo producto se utiliza como molde para una segunda amplificación con cebadores internos, lo que incrementa la sensibilidad de la técnica. Esta técnica se usa generalmente cuando la concentración del patógeno es muy baja, además, resulta útil en la detección de fitoplasmas (González-Garza, 2017) y begomovirus en soya (Leyva et al., 2019).

Así mismo, ha sido utilizada para la detección en semilla de caña de las bacterias *Xanthomonas albilineans* y *Leifsonia xyli* subsp. *Xyli*, agentes causales de la escaldadura foliar y del raquitismo de las zocas, respectivamente; así como del fitoplasma SCYP (SUGAR CANE LEAF YELLOWS PHYTOPLASMA), causante del amarillamiento foliar. Estas tres enfermedades pueden permanecer latentes, por lo que la PCR anidada es una de las pocas técnicas utilizadas para su detección.

BIO-PCR

Es una técnica, previa a la PCR, que busca aumentar la biomasa del patógeno fúngico mediante una incubación de la semilla contaminada (Mancini et al., 2016). Este enfoque incluye un aumento previo de la biomasa del hongo contaminante en medio sólido enriquecido para, posteriormente, llevar a cabo la extracción de ADN y la PCR con sus cebadores específicos. El objetivo principal es aumentar la concentración de los patógenos y mejorar su detección.

El proceso comienza con el remojo de las semillas en una solución de 750 mL de Tween 20 al 0,01% en agua estéril, a una temperatura de 4°C durante la noche. Posteriormente, se toman submuestras del extracto de las semillas y se colocan en placas de agar peptona sacarosa (PSA) por duplicado. Estas placas se incuban a 27°C durante dos días hasta la aparición de las colonias de hongos; posteriormente, sobre esta biomasa fúngica, se realiza de forma convencional el proceso de extracción de ADN y amplificación *posteriori* por PCR (European and Mediterranean Plant Protection Organization [EPPO], 2007).

PCR en tiempo real

Es una técnica que permite monitorear de manera continua la acumulación de ADN amplificado durante el proceso de PCR. En esta metodología, el ADN amplificado se detecta y cuantifica en tiempo real a medida que la reacción avanza. Para lograrlo se utiliza una molécula fluorescente que se asocia al ADN amplificado. El incremento de la fluorescencia es proporcional al incremento de la cantidad de moléculas de ADN amplificado. Algunas de las sondas más conocidas son SYBR Green, una sonda reversible, rápida y de bajo costo, que se une a la doble cadena de ADN y aumenta su fluorescencia más de mil veces; y la sonda TaqMan, que es altamente específica y con la cual se puede realizar además PCR multiplex (Chirinos-Arias, 2015).

Esta técnica ha demostrado ser confiable para la detección de hongos y bacterias en semillas, como *Magnaporthe grisea* en arroz (Deza et al., 2015), y también para identificar *Xanthomonas* en arroz y otros hongos transmitidos por semillas (Cho et al., 2011). Una diferencia importante de esta técnica frente a la PCR convencional es que esta última arroja datos cualitativos, mientras que la PCR en tiempo real permite cuantificar los fragmentos de ADN amplificado. Esto se logra mediante un fluorómetro integrado que genera una señal fluorescente en tiempo real, proporcionando información sobre la cinética de la reacción (Mancini et al., 2019).

PCR multiplex

Es una técnica que utiliza varios cebadores en una misma reacción, y puede implementarse mediante PCR convencional, así como con PCR en tiempo real (Mancini et al., 2019). Al mezclar varios cebadores en la misma reacción, se logra amplificar simultáneamente varios patógenos, y los fragmentos amplificados se separan y visualizan por electroforesis (Hariharan y Prasannath, 2021).

El objetivo de esta técnica es obtener múltiples copias de secuencias específicas de ADN a partir de un proceso de amplificación, lo que permite obtener cantidades significativas de ADN de una sola molécula inicial (Méndez-Álvarez y Pérez-Roth, 2003). Esta técnica ha sido exitosamente aplicada en el diagnóstico de patógenos fúngicos en cultivos como maíz, al identificar especies como *Fusarium verticillioides* y *F. subglutinans*, así como en plátano para reconocer *Fusarium oxysporum*. Aunque el método es rápido y confiable (Hariharan y Prasannath, 2021), la PCR múltiple es relativamente costosa y susceptible de contaminaciones. Por lo tanto, se requiere de

personal especializado para evitar y controlar estos casos (Méndez-Álvarez y Pérez-Roth, 2003).

Tabla 1. Características de las diferentes técnicas de detección de patógenos fúngicos en semillas

Método de diagnóstico	Tiempo requerido	Sensibilidad	Especificidad	Facilidad de implementación	Ejemplo de patógenos detectados	Semillas
Examen visual	Muy alto	Baja	Baja	Requiere habilidades micológicas	<i>Phomopsis</i> spp. <i>Cercospora kikuchii</i> <i>Peronospora manshurica</i>	Soya
					<i>Cylindrocladium parasiticum</i>	Maní
					<i>Colletotrichum dematium</i>	Ají
Técnica de lavado de semilla	Muy alto	Baja	Baja	Requiere habilidades micológicas	<i>Peronospora manshurica</i>	Soya
Incubación en papel secante	Bajo	Bajo a moderado	Moderado	Requiere habilidades micológicas	<i>Alternaria dauci</i> <i>Alternaria radicina</i>	Zanahoria
					<i>Leptosphaeria maculans</i>	Brassicaceae
Incubación en agar	Bajo	Bajo a moderado	Moderado	Requiere habilidades micológicas	<i>Alternaria dauci</i> <i>Alternaria radicina</i> <i>Alternaria carotiincultae</i>	Zanahoria
					<i>Verticillium dahliae</i> <i>Fusarium</i> spp.	Cucurbitaceae
					<i>Botrytis</i> spp.	Cebolla
PCR convencional	Moderado a alto	Moderado a alto	Moderado a alto	Requiere habilidades en biología molecular, de fácil interpretación	<i>Burkholderia glumae</i>	Arroz
BIO-PCR*	Moderado	Muy alto	Alto	Requiere habilidades en biología molecular, de fácil interpretación	<i>Xanthomonas oryzae</i>	Arroz

(Continúa)

(Continuación tabla 1)

Método de diagnóstico	Tiempo requerido	Sensibilidad	Especificidad	Facilidad de implementación	Ejemplo de patógenos detectados	Semillas
PCR anidada	Moderado	Muy alto	Alto	Requiere habilidades en biología molecular, de fácil interpretación	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Fríjol
					Fitoplasma y Begomovirus	Soya
PCR en tiempo real	Alto	Muy alto	Alto	Requiere habilidades en biología molecular	<i>Xanthomonas</i> sp.	Arroz
					<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Fríjol
MCH-PCR	Alto	Muy alto	Alto	Requiere habilidades en biología molecular	<i>Didymella bryoniae</i>	Cucurbitaceae
					<i>Botrytis</i> spp.	Cebolla

Fuente: Elaboración propia con base en EPPO (2007) y Mancini et al. (2016)

Tabla 2. Cebadores comunes para la identificación de patógenos de semillas

Hongo	Región de interés	Secuencia de cebadores	Tamaño
Todos los hongos	ITS	Adelante: ITS-1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG (o) ITS-5 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG Reverso: ITS-4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC	Aproximadamente 600 pares de bases de la región ITS1-5.8S-ITS2 del gen ribosomal
Todas las levaduras	D1D2	Adelante: NL-1 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGA Reverso: NL-4 5'-TTGGTCCGTGTTTCAAGACG	Aproximadamente 620 pares de bases de la región 28S del gen ribosomal
<i>Fusarium</i>	Elongación Factor 1 α	Adelante: EF-1 5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC Reverso: EF-2 5'-GGARGTACCAGTSATCATG	Aproximadamente 717 pares de bases de la región codificante del gen <i>EF-1α</i> .
<i>Aspergillus Penicillium</i>	β -tubulina	Adelante: Bt2a 5'-GGTAAACCAAATCGGTGCTGCTTTC Reverso: Bt2b 5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	Aproximadamente 495 pares de bases de exones e intrones en el extremo 5' del gen de la β -tubulina

Fuente: Elaboración propia con base en Centers for Disease Control and Prevention [CDC] (2022)

Pruebas de germinación

Según la International Seed Testing Association [ISTA], la germinación es la emergencia y desarrollo de las plántulas en una fase en donde sus estructuras esenciales señalan si podrán desarrollarse totalmente y de forma normal bajo condiciones favorables de campo o en el proceso de siembra en su sitio definitivo. El porcentaje de germinación indica la proporción del número de semillas que han producido plántulas clasificadas como normales bajo condiciones y periodos de tiempo específicos (ISTA, 2018). Se considerarán como plántulas normales aquellas que muestran potencial para continuar su desarrollo hasta llegar a plantas, cuando crecen en suelos de calidad y bajo condiciones favorables de humedad, temperatura y luz. Dentro de este criterio se incluirán las plántulas intactas, con sus estructuras esenciales (sistema radicular, eje de brotación y cotiledón) bien desarrolladas, completas y sanas; las plántulas con defectos leves en sus estructuras esenciales, siempre que demuestren un desarrollo equilibrado y satisfactorio comparable al de las plántulas intactas de la misma prueba; y las plántulas con infección secundaria, tanto intactas como con defectos leves que han sido afectadas por hongos o bacterias de otras fuentes diferentes a la semilla original (ISTA, 2018).

Según ISTA (2018), las semillas que no germinaron al final del periodo y bajo las condiciones de evaluación se clasifican en: a) semillas duras: semillas que al final del periodo de análisis permanecen duras porque no absorbieron agua; b) semillas frescas: semillas que no han germinado en las condiciones de la prueba de germinación, pero que permanecen limpias y firmes, y tienen el potencial de desarrollarse junto con las semillas normales; c) semillas muertas: semillas ni duras ni frescas, que tampoco han producido ninguna parte de una plántula.

Las plántulas anormales serán aquellas que no muestren potencial de desarrollarse hasta una planta normal cuando crezcan en suelos de calidad y bajo condiciones favorables de humedad, temperatura y luz. Dentro de este componente se incluirán las plántulas con cualquiera de las estructuras esenciales faltantes o con daños graves e irreparables; las plántulas que presenten un desarrollo débil o cambios fisiológicos en los cuales las estructuras esenciales se deforman o están fuera de proporción y las plántulas con cualquiera de sus estructuras esenciales enfermas o descompuestas como resultado de una infección primaria, que impide el desarrollo normal (ISTA, 2018).

La determinación del tiempo que dura la prueba y el medio que se debe usar para esta (suelo, sobre papel o entre papel) dependerá de la especie que sea objeto del análisis. En semillas de arroz las pruebas se realizan sobre papel (SP), entre papel (EP) y sustrato

(s); en el caso de soya y maíz las evaluaciones se consideran validas en medio EP y S y, finalmente, para sorgo las pruebas de germinación se pueden realizar SP y EP.

Según recomendaciones de ISTA (2018) para las especies relacionadas en este manual, las pruebas de germinación en promedio deben estar bajo condiciones de temperatura de aproximadamente 25°C. Las lecturas iniciales se realizan a los 4 días para las especies maíz y sorgo, con lectura final de germinación a los 7 y 10 días respectivamente. Para las especies soya y arroz, la lectura de germinación inicial se realiza a los 5 días y finaliza a los 8 y 14 días respectivamente, tiempos en los cuales se pueden obtener lecturas correctas y aproximadas del poder germinativo de la semilla analizada. La prueba usualmente para todas las especies en mención requiere un mínimo de 400 semillas puras (100 por réplica × 4 réplicas), para evaluar el número de semillas no germinadas, plántulas normales y plántulas anormales. Los resultados para cada componente se expresarán como porcentaje.

Pruebas de patogenicidad

El hecho de que un hongo reportado como patógeno haya sido encontrado en un lote de semilla no significa que este sea un patógeno transmitido por semilla. Para asegurarse de que se trata de un patógeno transmitido por este medio es necesario llevar a cabo unas pruebas de patogenicidad (Istikorini et al., 2022; Shabana et al., 2021). El principio básico de estas pruebas consiste en inocular la semilla (en este caso) con el hongo, posteriormente se evidencia el desarrollo de la enfermedad en la planta y se cuantifica la incidencia y la severidad de la enfermedad, por último, se aísla dicho hongo del tejido enfermo o de la semilla producida (Wanjiku et al., 2020). Para esto es necesario estandarizar varios procesos con el fin de asegurar la confiabilidad y reproducibilidad de la prueba (Ramadan y Zrary, 2014).

Ajustar el protocolo de desinfección de la semilla que va a ser inoculada con el hongo

Esto implica establecer qué soluciones (etanol, hipoclorito de sodio, etc.), tiempos de desinfección y etapas secuenciales serán aplicadas a la semilla con el fin de remover todos los contaminantes microbiológicos superficiales, sin afectar negativamente su calidad fisiológica y asegurarse de que no serán los patógenos que no fueron eliminados con la desinfección los que causen la enfermedad.

Los protocolos existentes de desinfección superficial de semilla para maíz (Davoudpour et al., 2020), sorgo (Oyebanji et al., 2009), arroz (Miché y Balandreau, 2001) y soya (Escamilla et al., 2019) frecuentemente consisten en sumergir las semillas de forma secuencial en soluciones de hipoclorito de sodio, etanol en diferentes concentraciones y agua destilada estéril a diferentes temperaturas y por tiempos determinados (Kim et al., 2022). Se recomienda evaluar los protocolos en los materiales de interés y hacer los ajustes respectivos (Li, 2018; Si et al., 2022). A continuación (tabla 3), se presenta a manera de ejemplo un protocolo de desinfección de semillas con solución de hipoclorito de sodio al 5 %.

Tabla 3. Protocolo de desinfección de semillas para pruebas de patogenicidad

1. Materiales y reactivos necesarios:
<ul style="list-style-type: none"> • Semillas de maíz, sorgo, arroz y soya • Agua destilada estéril • Hipoclorito de sodio (solución al 5 %) • Papel de filtro estéril • Placas de Petri • Pinzas estériles • Gasa estéril • Colador
2. Preparación de la solución de hipoclorito de sodio:
<ul style="list-style-type: none"> • Diluir hipoclorito de sodio hasta alcanzar una concentración de 5 % en agua destilada. • Agitar suavemente para asegurar una mezcla homogénea.
3. Preparación de las semillas:
<ul style="list-style-type: none"> • Seleccionar semillas de calidad y libres de daños visibles. • Esterilizar las pinzas sumergiéndolas en alcohol al 70 % y flameándolas hasta que se hayan enfriado. • Tomar las semillas necesarias con las pinzas estériles y transferirlas a un papel de filtro estéril.
4. Desinfección de las semillas:
<ul style="list-style-type: none"> • Colocar las semillas sobre el papel de filtro o servilleta estéril. • Sumergir las semillas en la solución de hipoclorito de sodio al 5 %, asegurándose de cubrir todas las semillas de manera uniforme. • Dejar las semillas en inmersión durante 10 a 15 minutos.
5. Lavado y enjuague de las semillas:
<ul style="list-style-type: none"> • Retirar las semillas de la solución de hipoclorito de sodio con ayuda de un colador o una gasa y transferirlas a un recipiente limpio. • Lavar las semillas con agua destilada para eliminar el exceso de hipoclorito de sodio. • Repetir el lavado con agua destilada al menos tres veces.
6. Secado de las semillas:
<ul style="list-style-type: none"> • Transferir las semillas a un papel de filtro o servilleta estéril. • Dejar que las semillas se sequen al aire en condiciones estériles hasta que estén completamente secas. • Evitar la exposición a la luz solar directa durante el secado.

(Continúa)

(Continuación tabla 3)

7. Almacenamiento de las semillas:

- Transferir las semillas desinfectadas y secas a bolsas o recipientes estériles.
- Etiquetar adecuadamente las bolsas o recipientes con la información relevante, como la especie y variedad de la semilla y la fecha de desinfección.
- Almacenar las semillas en un lugar fresco, seco y oscuro hasta su uso en las pruebas de patogenicidad.

Fuente: Elaboración propia

Estandarizar el proceso de producción masiva del patógeno

La producción masiva es un paso crítico para evaluar la patogenicidad de un aislamiento. Esta consiste en producir la cantidad suficiente de estructuras infectivas para inocular el hospedero (en este caso, la semilla) y causar enfermedad. Estandarizar el proceso significa determinar el tipo de cultivo que se empleará, el medio o sustrato de multiplicación (fuentes de carbono, nutrientes, antibióticos, etc.), la concentración del inóculo inicial que se va a sembrar en el medio o sustrato, las condiciones de incubación (luz, temperatura, humedad relativa, agitación, tiempo, etc.) y el rendimiento en términos de cantidad de estructuras infectivas del patógeno (oosporas, zoosporas, clamidosporas, macroconidias, microconidias, esclerocios, micelio estéril, etc.) por cantidad de sustrato (Zhang et al., 2018). Por ejemplo, en el caso de *Fusarium verticillioides*, un hongo fitopatógeno transmitido por semilla de algunos cereales, la producción masiva se podría llevar a cabo mediante fermentación líquida en caldo estéril de PDA con extracto de raíz de maíz (4,5 g/L) bajo agitación orbital a 125 rpm durante 8 días a 25 °C, partiendo de una concentración inicial de 5×10^5 microconidias/mL, para obtener un rendimiento de 1×10^8 microconidias/mL de medio de cultivo agotado.

Definir el protocolo de inoculación de la semilla con el hongo

Constituye quizás uno de los puntos de consideración más importantes, ya que establece la forma en que se garantizará que el patógeno entre en contacto con la semilla para causar infección. Un protocolo de inoculación implica la definición de las estructuras infectivas del patógeno que serán aplicadas en las semillas y que fueron producidas de forma masiva previamente (oosporas, zoosporas, clamidosporas, macroconidias, microconidias, esclerocios, micelio estéril, etc.). Además, es necesario determinar la concentración y el volumen de inóculo que recibirá una determinada cantidad de semillas, por ejemplo, 50 mL de una suspensión del patógeno en

una concentración de 1×10^7 microconidias/mL (estimada a través de un recuento en cámara Neubauer) en 20 g de semilla. Así mismo, se debe establecer la forma de inoculación del patógeno en la semilla en la concentración establecida, ya sea por inmersión de la semilla en una solución del patógeno, aspersión de la semilla con el patógeno, inoculación del sustrato (*drench*, mezcla del sustrato con el patógeno, etc.), punción, etc. (Güney y Güldür, 2018; Li, 2018; Sukanya y Jayalakshmi, 2016). Algunas veces es necesario aplicar el patógeno mediante un recubrimiento de semillas. Esta técnica, empleada frecuentemente para el aprovechamiento de microorganismos benéficos de plantas, consiste en la aplicación uniforme de sustancias exógenas en la semilla, tales como goma arábica, vermiculita, perlita, quitosán, bentonita, carbonato de calcio, talco, tierra diatomácea, arena y polvo de madera, las cuales favorecen y aseguran la supervivencia y adherencia del microorganismo a la semilla (Paravar et al., 2023). A continuación, se presenta un protocolo general de inoculación de hongos para determinar su patogenicidad en semillas de cereales.

Tabla 4. Protocolo de inoculación de hongos en semillas de cereales para determinar su patogenicidad

Objetivo: Describir los pasos para llevar a cabo la inoculación de hongos en semillas de cereales con el fin de evaluar su patogenicidad.
Materiales requeridos:
<ul style="list-style-type: none"> • Semillas de cereales (por ejemplo, arroz, trigo, maíz, cebada) de calidad previamente desinfectadas • Colonias puras de los hongos que se desean evaluar • Medio de cultivo adecuado para el crecimiento de los hongos • Instrumentos estériles (espátulas, atomizador, etc.) • Cubetas plásticas con tapa de 2,5 L • Cámara de crecimiento • Agua destilada estéril • Solución salina NaCl al 0,85 % • Etanol al 70 %
Procedimiento:
1. Inoculación de las semillas:
<ul style="list-style-type: none"> • A partir de las colonias puras y esporuladas de los hongos de interés, preparar una suspensión de esporas de los hongos en solución salina NaCl al 0,85 %. La concentración de esporas debe ser ajustada en cámara de Neubauer para obtener una concentración de inóculo determinada, usualmente de alrededor de 1×10^5 esporas/mL. • Disponer las semillas esterilizadas en las cubetas plásticas, distribuyéndolas uniformemente. • Aplicar la suspensión de esporas sobre las semillas, asegurándose de que todas las semillas estén cubiertas uniformemente. Esto se puede lograr empleando un atomizador o sumergiendo las semillas en la suspensión de esporas. • Preparar cubetas control utilizando semillas desinfectadas sin la suspensión de esporas como testigo absoluto. • Transferir las semillas y colocarlas sobre servilletas estériles húmedas en cubetas con tapa con el fin de generar condiciones de cámara húmeda.

(Continúa)

(Continuación tabla 4)

Objetivo: Describir los pasos para llevar a cabo la inoculación de hongos en semillas de cereales con el fin de evaluar su patogenicidad.
2. Incubación y observación:
<ul style="list-style-type: none">• Colocar las cubetas con las semillas inoculadas y las cubetas de control en una cámara de crecimiento a la temperatura óptima para el crecimiento del hongo, generalmente entre 25 y 28 °C.• Mantener un registro de las condiciones de incubación, incluyendo la temperatura, humedad y duración del periodo de incubación.• Observar y registrar regularmente la aparición de síntomas de patogenicidad en las semillas inoculadas, como decoloración, manchas, pudrición o deformaciones.• Comparar los resultados obtenidos entre semillas inoculadas y sin inocular para determinar si los hongos inoculados son patógenos para las semillas de cereales.

Fuente: Elaboración propia

Determinar la metodología de evaluación de la incidencia y severidad de la enfermedad causada por el potencial patógeno

Una vez definido el protocolo de inoculación, será necesario determinar la metodología de evaluación de la incidencia y severidad de la enfermedad causada por el potencial patógeno transmitido por semilla. Esto dependerá del tipo de patógeno, los tipos de daño (*damping off*, podredumbre, chancro, manchas foliares, tizón, lesiones en raíz, etc.), los tejidos de la planta donde se observan los síntomas de la enfermedad, el tiempo de aparición de los síntomas, las condiciones ambientales para la expresión de la enfermedad (luz, temperatura, humedad relativa), etc. A manera de ejemplo, se presenta un formato (tabla 5) para el registro de las variables de incidencia y severidad de *damping off* en plántulas de maíz, cuya semilla fue inoculada con un aislamiento de *Fusarium oxysporum*.

Tabla 5. Ejemplo de diligenciamiento de formato para el registro de las variables de incidencia y severidad de *damping off* en plántulas de maíz

Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA																			
Nombre del Proyecto:		Evaluación de métodos de inoculación de semillas de maíz con aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i>																	
Profesional encargado:	Cecilia Chacón	Fecha inoculación:	15/02/2023		Variables														
Investigador tutor:	Daniel Puentes	Unidad experimental	Bandeja de 72 alveolos con 24 plántulas		Periodo de incubación: tiempo antes de la aparición de primeros síntomas de <i>damping off</i>														
Ubicación del experimento:	Invernadero Número 3 Nave 4		Incidencia: proporción de plantas con síntomas de <i>damping off</i>																
Diseño:	Diseño en Bloques completamente al azar																		
Métodos de inoculación evaluados	Punción y <i>drench</i>		Testigos		Absoluto, punción y <i>drench</i> con agua destilada estéril														
Aislamientos de <i>Fusarium</i>	Se evaluarán los aislamientos de los códigos FOX001, FOX043, FOX077																		
Aplicación de tratamientos	Semillas de maíz desinfectadas																		
Formato para el registro de la incidencia y severidad del <i>damping off</i> en plántulas de maíz																			
Registro	25/02/2023																		
Tratamiento	Bloque	Incidencia (n.º)	Plantas en cada grado de severidad (n.º)						Incidencia (n.º)	Plantas en cada grado de severidad (n.º)									
			0	1	2	3	4	5		0	1	2	3	4	5				
1. Absoluto	1	0	10	0	0	0	0	0	4.	1									
2. Testigo <i>drench</i>	1	100%	0	0	5	2	2	1	5.	1									
3. Testigo punción	1	90%	1	3	2	2	1	1	6.	1									

Fuente: Elaboración propia

La evaluación de la incidencia y severidad se lleva a cabo en laboratorio bajo condiciones *in vitro*, donde la plántula crece en un medio de cultivo sólido, semisólido o líquido estéril. También, se pueden llevar a cabo bajo condiciones de invernadero, casa de malla o casa de cristal donde las semillas inoculadas son sembradas en contenedores con suelo o sustrato previamente desinfectado (Sivachandra y Banniza, 2017). De igual forma, son posibles las evaluaciones en condiciones de campo abierto. Estas últimas son menos recomendables cuando se tratan de patógenos foliares, ya que no se garantiza que el inóculo provenga de la semilla infectada. Siempre será necesario desarrollar una escala de severidad visual que permita establecer el nivel de daño generado por el patógeno (Sivachandra y Banniza, 2017). Estas escalas consisten en la representación visual de una serie de plantas o partes de plantas que exhiben los síntomas de una enfermedad en diferentes niveles de severidad. Estas representaciones suelen ser ilustraciones o fotografías (figura 8) que permiten la evaluación de la severidad de la enfermedad de manera estandarizada y precisa (Hernández y Sandoval, 2015).

Fotografía	Grado y descripción de síntomas	Fotografía	Grado y descripción de síntomas
	<p>0. Sin síntomas</p>		<p>1. Clorosis en una o dos hojas (incluyendo cotiledones)</p>
	<p>2. Marchitamiento en 30-50 % de las hojas, clorosis moderada en primeras hojas verdaderas y leve en hojas de estrato medio</p>		<p>3. El 100 % de las hojas presentan marchitamiento, evidente pérdida de turgencia, clorosis moderada en estrato medio, absición de hojas cloróticas</p>
	<p>4. Clorosis severa con necrosis en hojas, defoliación moderada, marchitamiento severo, evidente retraso del crecimiento</p>		<p>5. Doblamiento de tallo, planta muerta</p>

Fotos: Manuel Alfonso Patiño M.

Figura 8. Escala visual y descripción de síntomas para evaluar la severidad de la enfermedad de marchitamiento vascular causada por *Fusarium oxysporum* 4 semanas después de la inoculación.

Fuente: Elaboración propia

Con los datos periódicos de incidencia y severidad, se calcula el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE), según la ecuación descrita por Campbell y Madden (1990):

$$ABCPE = \sum_{i=1}^{n-1} [(X_i + X_{i+1})/2](t_{i+1} - t_i)$$

Donde n es el número de evaluaciones, X_i es la proporción de la enfermedad y es el intervalo entre dos evaluaciones consecutivas. La estimación del área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) ha sido empleada con éxito para estimar la patogenicidad de aislamientos de hongos presentes en semillas de leguminosas (Li, 2018), cereales (Perelló et al., 2017) y forestales (Soleha et al., 2022). En la figura 9, se presenta un ejemplo de las curvas de incidencia, severidad y del ABCPE.

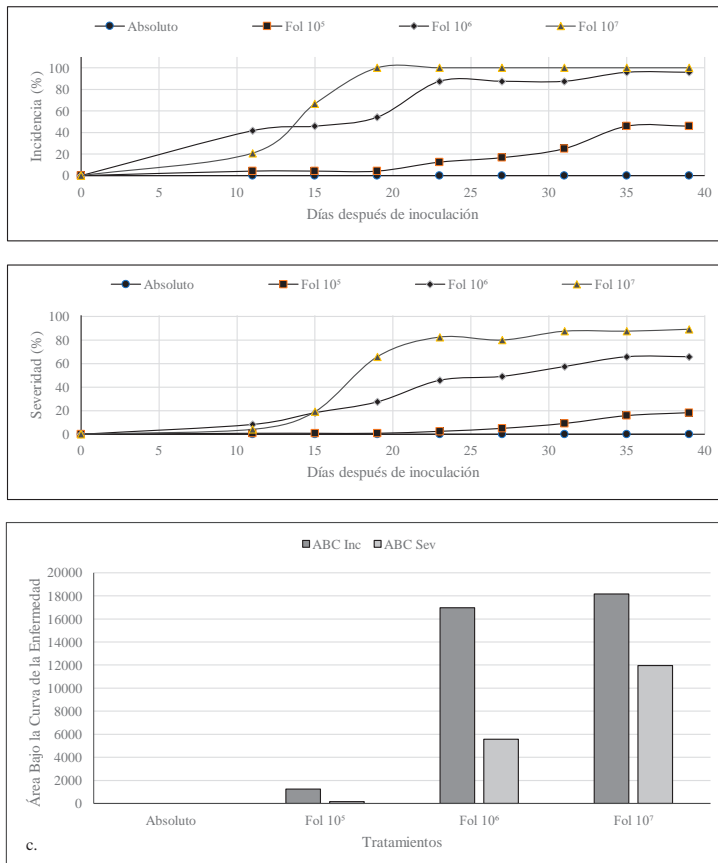


Figura 9. Curvas del progreso de la incidencia y severidad de la enfermedad y área bajo la curva del progreso de la enfermedad. a. Curva del progreso de la incidencia de la enfermedad; b. Curva del progreso de la severidad de la enfermedad; c. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad.

Fuente: Elaboración propia

