

Protocolo de sanidad para calidad de semilla de soya en Venezuela

Alex González-Vera^{1*}, Pastora Querales², Bárbara Gutiérrez³, Manuel Ávila¹, Alexander Hernández², Julitsa Jiménez², María Rangel², Nailleth Méndez², Carmen Guevara³, Elvis Rodríguez¹, Julia Arellano³

¹Fundación para la Investigación Agrícola Danac (Danac), San Felipe, Yaracuy.

²Posgrado de Agronomía de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA), Cabudare, Lara.

³Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, INIA-CENIAP, Maracay, Aragua.

RESUMEN

En Venezuela, se tiene poca experiencia en la producción de semilla de soya de calidad, siendo este el principal insumo y limitante de la producción nacional de este cultivo. La semilla es importada y llega a finales de julio solapándose con la época de siembra, ocasionando siembras tardías y falta de control fisiológico y fitosanitario oportuno. En consecuencia, se necesitan mecanismos expeditos para evaluar la calidad de la semilla destinada a la producción de soya en Venezuela. El objetivo del trabajo fue realizar una prueba interlaboratorios para validar un protocolo de sanidad de semilla certificada de soya bajo las condiciones particulares en diferentes laboratorios, como el de Protección Vegetal Danac, Micología de la UCLA y Patología de semilla del INIA-CENIAP. El protocolo fue implementado durante dos semanas del mes de noviembre de 2015, se analizaron dos muestras de 400 semillas de dos variedades 'CIGRAS-06' y 'FP90-6103', categorías registrada y experimental (sin protección), respectivamente y con diferentes grados de sanidad. Los resultados para la normativa ISTA fue de 97 al 100% de coincidencia en la prueba interlaboratorios e intralaboratorios, indicando una alta reproducibilidad del protocolo, además se detectó una alta precisión entre laboratorios mediante Tukey (5%), identificándose entre los géneros de hongos más frecuentes *Cladosporium*, *Fusarium* y *Aspergillus* y de menor frecuencia *Cercospora*, *Macrophomina* y *Phomopsis* entre los 14 géneros de hongos identificados. Los resultados obtenidos permiten inferir que el protocolo validado puede ser usado por diferentes laboratorios a fin de verificar la calidad sanitaria de la semilla de soya.

Palabras clave: *Glycine max*, patología de semillas, pruebas interlaboratorios, normas ISTA

* Autor de correspondencia: Alex González-Vera

E-mail: alex.gonzalez@danac.org.ve

Health protocol for soybean seed quality in Venezuela

ABSTRACT

In Venezuela, there is little experience in the production of soybean seed quality, being the main input and limiting domestic production of this crop. The seed is imported and comes in late July overlapping with the planting season, resulting in late plantings and lack of appropriate physiological and phytosanitary control. Therefore, expeditious mechanisms are needed to assess the quality of the seed for the production of soybeans in Venezuela. The aim was to make an interlaboratory test to validate a protocol for certified seed health soybean under the particular conditions in different laboratories as Danac Plant Protection, Mycology and Pathology at UCLA, and Seed Pathology from INIA-CENIAP. The protocol was implemented for two weeks in November 2015; two samples of 400 seeds of two varieties 'CIGRAS-06' and 'FP90-6103' registered and experimental (without chemical protection) categories respectively with different degrees of health were analyzed. The results for the rules ISTA was 97 to 100% match in the interlaboratory and intralaboratory test, indicating a high reproducibility of the protocol, in addition to high precision between laboratories detected by Tukey (5%), identifying among genera of fungi more frequent *Cladosporium*, *Fusarium* and *Aspergillus* and less frequently *Cercospora*, *Macrophomina* and *Phomopsis* among 14 genera of fungi identified. The results allow us to infer that the validated protocol can be used by different laboratories for purposes of verifying the sanitary quality of soybean.

Key words: *Glycine max*, seed pathology, interlaboratory test, ISTA rules.

INTRODUCCIÓN

La semilla de soya [*Glycine max* (L.) Merrill] requiere de grandes cuidados tanto en su producción, durante la cosecha, así como, en su manejo postcosecha. Esto contribuye con la obtención de un material de buena calidad, condición indispensable para el buen establecimiento del cultivo con alto valor productivo, al momento de la siembra (Fundacao MT, 2005). Delouche (1974) señaló dentro de los atributos de calidad de la soya: la pureza genética para la obtención de buenos rendimientos y uniformidad de la maduración, pureza física con un mínimo de materia inerte y ninguna contaminación por otras semillas, germinación mínima de 90% y vigor para emerger rápidamente. No obstante en la actualidad, a la calidad sanitaria se le ha dado énfasis por el impacto de los microorganismos patógenos asociados a la semilla sobre la germinación, viabilidad y la potencialidad de transmisión al siguiente cultivo, como fuente de inóculo primario (Henning, 2005; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2009).

Las semillas de soya también pueden ser invadidas por hongos durante el almacenamiento. Los géneros de hongos que se reportan con mayor incidencia

en la época de lluvias y que se pueden considerar importantes por su influencia en la reducción de la germinación y calidad de la semilla son: *Phomopsis*, *Fusarium*, *Cercospora*, *Colletotrichum*, *Macrophomina*, *Rhizoctonia*, *Curvularia* y *Aspergillus* (Solórzano *et al.*, 2005)

En Venezuela la calidad de la semilla de soya es afectada por las condiciones climáticas desfavorables en campo, principalmente desde su madurez fisiológica hasta la cosecha, en la cual cualquier humedecimiento y secado de las semillas dentro de las vainas, aunado a las temperaturas altas, ocasiona un fuerte deterioro que afecta la calidad fisiológica y sanitaria de la misma. Las investigaciones han estado dirigidas al estudio del comportamiento de germoplasma en distintas condiciones agroecológicas, que permitan la identificación de materiales de amplia adaptación. Sin embargo, ante la posibilidad de falta de tolerancia frente a tan amplia gama de patógenos, se deben considerar algunas medidas preventivas para tratar de evitar la propagación de enfermedades por medio de las semillas y mejorar las condiciones sanitarias en las cuales se va a producir la semilla certificada (Solórzano *et al.*, 2005).

Es poca la información sobre el reconocimiento y la utilización de metodologías específicas de laboratorio. En este contexto, la disponibilidad de un protocolo de sanidad para verificar la calidad de la semilla, ofrece una herramienta para el comercio de semilla de soya al momento de tomar decisiones comerciales, siendo esto, un paso importante para el avance de la producción sostenible y sustentable de la soya en Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra de semillas y laboratorios participantes

Se usaron dos variedades de soya, la ‘CIGRAS-06’ categoría registrada cosechada en el primer semestre de 2015 por la UCLA y la ‘FP90-6103’ experimental sin protección de ningún agroquímico cosechada en septiembre de 2015 en Fundación para la Investigación Agrícola Danac (San Felipe, Edo. Yaracuy, Venezuela); de cada una se tomaron 400 semillas al azar para cada prueba, según el reglamento ISTA (International seed testing association). Los laboratorios participantes fueron del INIA-CENIAP, UCLA y Danac, los cuales recibieron una muestra homogénea de 1 kg de semilla de cada lote correspondiente a cada variedad, el ensayo fue desarrollado el mes de noviembre de 2015. A fin de mantener la confidencialidad de los datos obtenidos, se asignó un número de tres cifras para identificar cada laboratorio, número por el cual son señalados en los cuadros y gráficos de resultados.

Papel secante y conservadores

Se utilizó una adaptación del método de papel filtro (Blotter), del cual se ha comprobado que es un método perfectamente viable y el más eficaz para el cultivo de semilla de soya (Henning, 2005). La modificación consistió en el

uso de toallas de papel secante doméstico PAVECA (229 mm x 279 mm), los cuales se cortaron a la medida de conservadores plásticos DELIPACK 500 cc o 17 onzas (11 cm x 9 cm), se envolvieron en papel aluminio, se esterilizaron por 20 min a 160 °C y se dejaron enfriar. Los conservadores plásticos se lavaron con jabón y agua de chorro, se desinfectaron con hipoclorito al 20% del producto comercial. Se colocaron cuatro hojas de papel al fondo de cada conservador que fueron humedecidos adicionando 10 ml de agua destilada estéril, según cálculo de la capacidad de retención.

Cálculo de Agua

Se siguió el lineamiento ISTA para calcular la capacidad de retención del papel usado como sustrato. El procedimiento consistió en cortar una pieza de 11 cm x 9 cm de papel nuevo destinado a la siembra, se pesó y luego se sumergió en agua destilada por dos minutos, sosteniéndolo con una pinza. Posteriormente, se dejó escurrir 30 segundos, luego se pesó y se calculó la diferencia de peso respecto del papel seco. Para calcular la capacidad de retención de la superficie de la hoja de papel se tomó en cuenta que 1 g = 1 ml (Cuadro 1), de esta manera se obtuvo la capacidad de retención total de la hoja de papel (Adaptación del normado en International Standard ISO 5269/1). Cada vez que se va a usar un nuevo lote de papel se debe calcular la capacidad de retención del mismo.

Siembra de la semilla en conservadores

Para esta actividad el analista usó guantes de látex y mascarilla de fibra desechable, bata de laboratorio limpia, pinzas estériles y trabajó sobre una superficie limpia y desinfectada (NaClO al 10%), lo primero que se hizo fue colocar cuatro hojas de papel filtro en cada contenedor y agregar 10 ml de agua estéril según los cálculos. La siembra consistió en colocar 20 semillas organizadas en 5 columnas x 4 hileras por cada conservador (Unidad experimental) hasta completar 5 conservadores, lo cual constituye una repetición de 100 semillas.

Cuadro 1. Cálculo de la capacidad de retención de la hoja de papel PAVECA (11 cm x 9 cm) usado en la prueba de papel secante para sanidad de semilla de soya

Repetición	Peso Inicial seco (g)	Peso Final húmedo (g)	Diferencia (g)
1	0,50	3,07	2,57
2	0,48	2,98	2,50
3	0,50	3,08	2,58
Promedio	0,49	3,04	2,55
		Σ 1-2-3	7,65
		Promedio	2,55*

*Hoja 11 x 9 cm = 99 cm², entonces se añadió 2,55 ml de agua destilada estéril por hoja de papel x 4 hojas de papel x conservador = 10,0 ml aproximado.

Cada repetición (I-IV) constó de 100 semillas, para un total de 400 semillas por lote o muestra de soya analizada (adaptado de Henning, 2005).

Incubación de la semilla

Después de la siembra, se ajustó la tapa herméticamente y se incubó bajo condiciones prefijadas de 20 ± 2 °C y 65-95% HR en cámara por siete días. Las repeticiones fueron colocadas bajo condiciones de temperatura, luz y HR lo más homogéneas posible, es decir, ubicados en un solo entrepaño o estante en cámara de germinación, una repetición por entrepaño. Vale resaltar que la luz es un factor limitante para las pruebas de sanidad de semilla de soya, buenos resultados se han obtenido con luz natural y luz blanca empleando ciclos alternados de 12 h de luz por 12 h de oscuridad (Henning, 2005). En la Figura 1, se muestran los diferentes ambientes de incubación donde la temperatura estuvo acondicionada por aire artificial y la humedad relativa en porcentaje (% HR) complementada con contenedores de plástico llenos de agua, los parámetros fueron medidas por termohigrómetro digitales en los laboratorios de INIA-CENIAP y Danac, respectivamente.

Evaluación del ensayo

Transcurrido el tiempo de incubación, para la evaluación se tomaron en cuenta la frecuencia de todos los hongos y bacterias desarrolladas (saprófitos, potenciales patógenos de campo y potenciales patógenos de almacén). En este

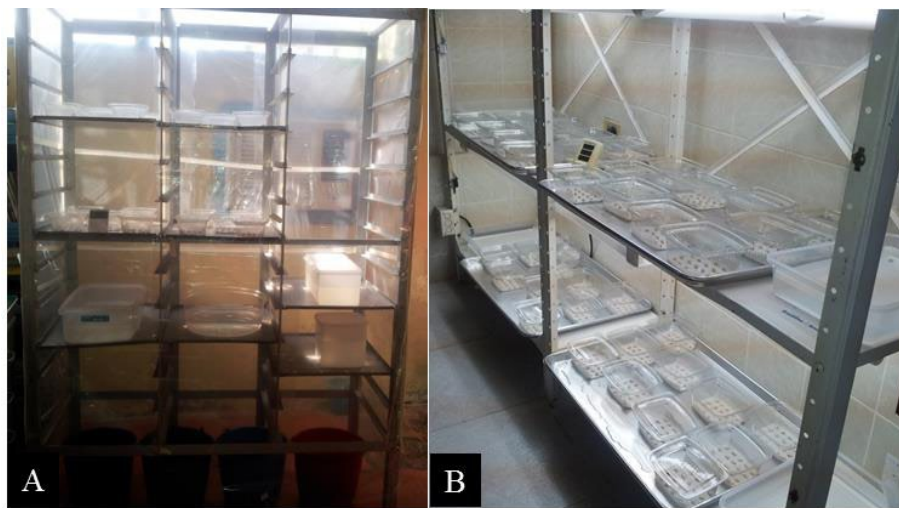


Figura 1. A. Semilla de soya incubada a 20 °C y 65 % HR promedio bajo condiciones de luz natural localizada en INIA-CENIAP. B. Semilla de soya incubada a 20 °C y 55 % HR promedio bajo condiciones de luz artificial en Danac

ensayo también se consideraron las semillas sanas. La evaluación consistió en observar bajo la lupa estereoscópica (10-40X) cada semilla de forma individual. Comenzando siempre en la semilla ubicada en la esquina previamente marcada, ubicándola como la esquina superior izquierda y avanzando en el sentido de la fila hacia la derecha, luego por la siguiente fila hacia la izquierda y así sucesivamente hasta completar todas las 20 semillas de un conservador, según esquema (Figura 2).

Estrategias de evaluación usadas:

1. Se evaluó el ensayo usando la escala desarrollo de plantas: 0= No creció, color amarillo; 1= Malo, raíz insipiente, color verde; 2: Regular, raíz menor de 1 cm; 3= Bueno, raíz mayor a 1 cm; 4= Muy bueno, raíz mayor a 2 cm. Los extremos 0 y 4 de la escala de estimación visual fue construida por los tamaños observados durante la prueba (Figura 2) y se registró en Microsoft Excel® asignando el valor 1.



Figura 2. Conservador con semillas a los siete días de incubación, se observa el marcaje azul en la parte superior izquierda del conservador y la disposición de la semilla en cinco columnas y cuatro filas. Las observaciones se realizaron para cada semilla siguiendo la numeración (sin recuadro) continua hasta 100 semillas (1 repetición), para completar las 400 semillas de una muestra. Dentro del cuadro se observa el valor de la escala visual del desarrollo de la raíz

- Se evaluó la colonización (adaptación de escala de colonización en maíz de Brown *et al.*, 1993): No se discriminaron patógenos, saprofitos u otros. Solo se observaron cuantas colonias diferentes hubo en una semilla indicativo de infección mixta y se colocó el número de colonias en una columna y se sumaron. Si no se presentaban dudas sobre el valor de la escala se asignó con el valor 1 en la columna correspondiente de la tabla de Microsoft Excel®.



Escala de colonización: 0= No hay crecimiento; 1= Crecimiento muy leve; 2= Menos del 50% de semilla colonizada; 3=La mayor parte de la semilla colonizada; 4= La semilla está totalmente colonizada

- Se hizo una impresión del micelio de la semilla por técnica de preparado microscópico con cinta adhesiva, para identificar los patógenos presentes (tabla Microsoft Excel®) usando el microscopio de luz compuesto.
- Se comparó con las estructuras características de cada género ilustrado en referencias (Barnett y Hunter, 1998; Goulart, 1997; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009; Leslie y Summerell, 2006), si no se presentaban dudas, se asignó el valor 1 a la tabla Microsoft Excel® de los géneros más comunes y luego se sumaron las cantidades por columna.
- Se tomó el registro fotográfico de las estructuras de los patógenos identificados, si no se presentaba dudas se asignó el valor 1 el cuadro de los géneros más comunes y luego se sumaron las cantidades por columna. Las microfotografías de buena calidad de un tamaño mayor a 400 pixel, fueron seleccionadas para elaborar una galería de imágenes.
- Finalmente, se llenó la planilla de Formato descripción de ensayo por laboratorio, tomando en cuenta si los equipos estaban calibrados, funcionaron bien o hubo alguna anomalía. Se tomó el registro de la temperatura, % HR promedio y se colocó en observaciones, además de otras observaciones durante el desarrollo de la prueba. También se calculó el promedio de la infección mixta y la sumatoria de las columnas por cada grado de las escalas respectivas.

Análisis de datos

Se calculó la frecuencia de los datos, repetibilidad y reproducibilidad según el manual de la ISTA (2013) y adicionalmente su conformidad se evaluó mediante Tukey, h Mandel y t Mandel, se realizó una prueba no paramétrica

Kruskal-Wallis (Analytical Software; 2003) para respaldar la confiabilidad de los resultados. Los laboratorios fueron sorteados por medio de una tabla de números aleatorios asignándoles un código tres cifras (Meilgaard *et al.*, 1999), para mantener la integridad de los resultados y de los laboratorios. No obstante, los laboratorios fueron notificados por carta de su valoración y de sus resultados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Prueba de papel secante

Como puede observarse en el Cuadro 2, los valores del rango o diferencia no superan la tolerancia de ISTA, permitiendo inferir que los resultados son confiables. El rango máximo de tolerancia para réplicas de 100 semillas para la prueba de germinación o sanidad se encuentra en la tabla 5.1 de la ISTA. Si el rango calculado excede al rango máximo tolerado se debe repetir la prueba, el uso de esta tabla es adecuada para evaluar repetibilidad o precisión. La tabla 5.2 de la ISTA es adecuada para evaluar la misma o diferentes muestras de un mismo lote analizadas en diferentes laboratorios (condición de reproducibilidad) y asume que el rango no puede superar el rango máximo de tolerancia (Bányai y Barabás, 2002).

Los datos sobre la frecuencia de hongos presentes en la semilla de soya por laboratorio fueron analizados conforme a Miles (1963) usando la tolerancia ISTA, aplicada para germinación y para sanidad de semilla siguiendo la fórmula: $T = sd_{\text{binomial}} \times F$. Donde $T =$ Tolerancia o diferencia máxima aceptada entre réplicas para un promedio dado; $sd_{\text{binomial}} =$ es la desviación estándar de una distribución binomial, y $F =$ El valor de F estudentizada de Tukey.

Si la media de los resultados de una evaluación de frecuencia fue 99% la desviación fue:

$$Sd_{\text{binomial}} = \sqrt{\frac{p(100-p)}{100}} = Sd_{\text{binomial}} = \sqrt{\frac{99(100-99)}{100}} = 0,9994 = 1$$

Luego ese valor de 1 se multiplicó por $F =$ valor de amplitud estudentizada de Tukey para 4 repeticiones con 2 grados de libertad (3 laboratorios). Ese valor fue tomado de la tabla de rangos estudentizada (q) de Tukey (0,05) = 3,31 (Cuadro 2).

Los resultados obtenidos indican que hubo coincidencia entre los laboratorios al detectar la misma frecuencia o número de microorganismos presentes en la semilla, confirmando que existe concordancia entre laboratorios o reproducibilidad para validar el protocolo de sanidad de la semilla; así mismo, los resultados demostraron la confiabilidad de resultados de las pruebas dentro de los laboratorios o repetibilidad. Con estos resultados se estaría cumpliendo

Cuadro 2. Resultados del análisis de los datos de frecuencia de hongos presentes en la semilla de soya por variedad bajo los diferentes ambientes o laboratorios

Variedad	Laboratorios	RI	RII	RIII	RIV	Promedio	Valor max	Valor min	Rango	Tolerancia ISTA
Cigras-06	125	97	100	97	98	98	100	97	3	6
	141	100	100	100	100	100	100	100	0	5
	746	100	100	100	99	99,75	100	99	1	5
					promedio	99,25				
					V. max	100				
					V. min	98				
					Rango	2				
					Tolerancia tab. Stud.	3,31				
FP90-6103	125	100	99	100	100	99,75	100	99	1	5
	141	99	98	99	100	99	100	98	2	5
	746	100	98	97	99	98,5	100	97	3	5
					promedio	99,08				
					V. max	99,75				
					V. min	98,5				
					Rango	1,25				

con la normativa ISTA (2013) que exige solo el requisito de tolerancia entre las muestras analizadas. Por lo tanto, todos los laboratorios permanecen o fueron aptos y sin discrepancias para validar el protocolo de sanidad de la semilla de soya propuesto.

Entre las observaciones generales que se pueden hacer, es que fue difícil conseguir otros laboratorios que tuvieran las facilidades y que trabajaran con el cultivo de la soya. No obstante, si bien el número de laboratorios participantes en el ensayo fue reducido, se cumplieron satisfactoriamente con las pruebas interlaboratorios, tales como establecer el registro de desempeño del instrumental, mostrar la confiabilidad de los métodos analíticos, detectar las necesidades de entrenamiento y resaltar las necesidades para mejorar el trabajo de laboratorio (González de Núñez y Verde, 2010).

Severidad

La severidad se verificó mediante el grado de colonización del hongo o infecciones mixtas en cada semilla. Se pudo observar algunos laboratorios que fueron menos estrictos en la evaluación de la severidad; sin embargo, los resultados fueron consistentes en la valoración de la colonización aunque no hubo diferencias significativas entre los laboratorios, entre muestras sí según el análisis de comparación de media de la frecuencia, crecimiento y severidad (Cuadro 3). En el caso de la muestra 'Cigras-06' se pudo observar un menor nivel de severidad y lo contrario ocurrió para 'FP90-6103' que tuvo mayor nivel de contaminación (Figura 3). Lo anterior pone de manifiesto la consistencia entre laboratorios para semillas con diferentes niveles de severidad, considerándose adecuada la escala utilizada para colonización en granos de maíz (adaptación de Brown *et al.*, 1993).

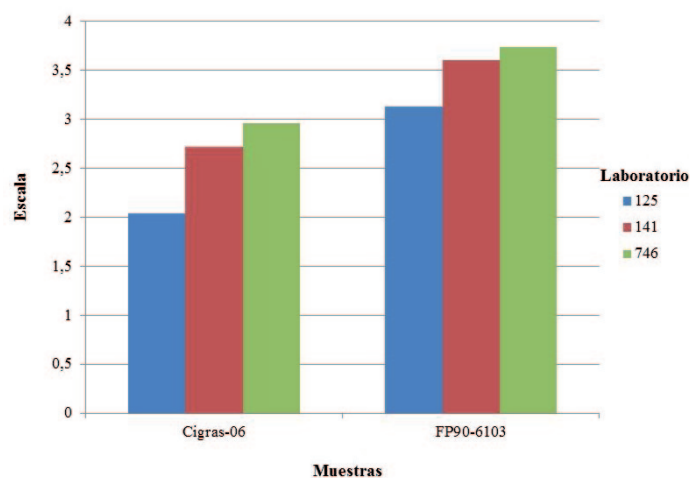


Figura 3. Severidad medida por la escala de colonización de hongos que infestan la semilla de soya categoría registrada 'Cigras-06' y 'FP90-6103'

Cuadro 3. Comparación entre laboratorios al evaluar frecuencia de aparición de hongos, desarrollo de la planta y severidad en semilla de dos cultivares de soya

Cultivar	Repetición	Frecuencia ¹		Desarrollo ^{2,3}		Severidad ^{2,4}			
		125	746	141	141	125	746	141	
Cigras-06	I	97,0 a	100,0 a	100,0 a	2,8 a	2,5 b	1,7 c	2,7 b	2,7 a
Cigras-06	II	100,0 a	100,0 a	100,0 a	2,9 a	3,1 a	2,0 b	2,7 b	2,6 a
Cigras-06	III	97,0 a	100,0 a	100,0 a	2,8 a	2,5 b	2,4 a	3,1 a	2,8 a
Cigras-06	IV	98,0 a	99,0 a	100,0 a	2,9 a	3,0 ab	1,9 bc	3,1 a	2,6 a
Cigras-06	Promedio ⁵	98,0 a	99,7 a	100,0 a	2,8 a	2,8 a	2,0 c	2,9 a	2,7 b
FP90-6103	I	100,0 a	100,0 a	99,0 a	1,2 a	1,4 a	3,0 a	3,7 b	3,4 a
FP90-6103	II	99,0 a	98,0 a	98,0 a	1,1 a	1,7 a	3,1 a	3,4 c	3,5 a
FP90-6103	III	100,0 a	97,0 a	99,0 a	0,6 b	0,8 b	2,9 a	3,9 a	3,6 a
FP90-6103	IV	100,0 a	99,0 a	100,0 a	0,8 ab	0,8 b	3,3 a	3,8 ab	3,7 a
FP90-6103	Promedio ⁵	99,7 a	98,5 a	99,0 a	0,9 c	1,2 b	3,1 b	3,7 a	3,6 a

¹Prueba de Kruskal Wallis. ²Prueba de medias Tukey. ³Escala de desarrollo de la planta (0-4). ⁴Escala de severidad (0-4). ⁵Medias con una letra común, entre replicas por laboratorio y entre cultivares entre laboratorios, no son significativamente diferentes (p > 0,05).

Como se observa en el Cuadro 3, los resultados de la frecuencia de aparición de los hongos fueron muy homogéneos para los tres laboratorios conformándose un solo grupo, esto coincide con los resultados del Cuadro 2 analizado mediante tolerancia ISTA (2013), esto confirma que la prueba interlaboratorios fue eficiente para validar el protocolo. Por otra parte, para el desarrollo de la planta, básicamente de la raíz en esta etapa de incubación, el laboratorio que alcanzó las mejores condiciones fue el 141, seguido por 125 (comparten la mayoría de los grupos homogéneos) y el que tuvo más variación ambiental fue 746, esto fue evidenciado por los registros de temperatura y HR (Figura 1).

La severidad fue un parámetro complicado para evaluar debido a la infección mixta que se presentó, el laboratorio 141 fue más consistente que el resto, seguido de 125, manteniéndose igual tendencia entre los tres laboratorios para la evaluación de las dos muestras. La temperatura de 20 ± 2 y el HR cercano a 65% recomendado por Henning (2005), fueron factores determinantes para el crecimiento controlado de las colonias, especialmente porque se observaron infecciones mixtas en la mayoría de los casos. Aunque existieron variaciones ambientales la prueba interlaboratorios fue robusta porque la diferencia en los grados de la escala severidad fue solo de un grado (Figura 3), esto no afectó los resultados de la frecuencia medidos mediante la tolerancia ISTA (2013), considerándose consistentes para la adaptación de la escala.

Frecuencia e identificación de géneros de hongos

Para determinar la frecuencia de patógenos, saprófitos y hongos de almacén se procedió al análisis estadístico de los resultados, tomando en cuenta las normas de procedimientos de la ISTA (2013) para la identificación de laboratorios anómalos, el cálculo de *r* (repetibilidad) y *R* (reproducibilidad) y las representaciones gráficas de estadísticas de Tukey, *h* y *k* de Mandel, los que permiten visualizar las discrepancias (González de Núñez y Verde, 2010). En el Cuadro 4, se pueden ubicar las variedades, géneros de hongos, los estadísticos utilizados y los códigos de los laboratorios excluidos,.

Con base a los resultados mostrados en el Cuadro 4, se puede inferir que los estadísticos de Tukey fue más estricto debido a que discriminó el mayor número de laboratorios anómalos con 13, seguido de ISTA con 12, *k*-Mandel con 11, mientras que *h*-Mandel no discriminó a ninguno, es decir que ninguno de los laboratorios fueron rechazados por este último. No obstante, existen diferencias entre los laboratorios excluidos en las diferentes pruebas existiendo mayor coincidencia entre las pruebas de Tukey y *k* Mandel, esto no quiere decir que haya discrepancias con la prueba de ISTA (2013), siendo consistente con los valores de tolerancia obtenidos en el Cuadro 2. Esto indica que hubo una alta coincidencia entre la frecuencia de los géneros de hongos identificados por los tres laboratorios.

Cuadro 4, Resultados de análisis de los hongos identificados por laboratorios según su código (125, 141, 746)

Cultivar/Hongo	Promedio	Rango	ISTA ¹	Tukey ²	h Mandel	k Mandel
Cigras 06						
Aspergillus	12,75	12,00	125	-	-	-
Fusarium	18,25	42,00	125	746	-	-
Alternaria	0,41	1,25	-	746	-	746
Cladosporium	91,00	19,75	125	746	-	-
Rhizopus	3,25	7,25	-	141	-	-
Curvularia	0,41	1,00	-	-	-	746
Penicillium	10,16	12,25	125/746	141	-	-
Cercospora	3,58	4,50	-	-	-	-
Bacteria	0,83	1,75	746	-	-	746
Mucor	3,50	9,25	-	125*	-	-
Phomopsis	0	0	-	-	-	-
Colletotrichum	0,08	0,25	-	-	-	125
Corynespora	0	0	-	-	-	-
Macrophomina	0	0	-	-	-	-
FP90-6103						
Aspergillus	43,16	25,75	141	141	-	-
Fusarium	51,41	47,5	141	141	-	-
Alternaria	0	0	-	-	-	-
Cladosporium	42,33	15,75	746	-	-	-
Rhizopus	1,33	1,06	746	-	-	-
Curvularia	1,41	4,25	-	746	-	746
Penicillium	23,00	26,00	-	746	-	-
Cercospora	5,41	9,25	125	746	-	125
Bacteria	0,83	2,25	-	-	-	141
Mucor	0	0	-	-	-	-
Phomopsis	4,16	8,00	-	746	-	125
Colletotrichum	0,16	0,50	-	-	-	125
Corynespora	2,83	8,50	-	141	-	141
Macrophomina	0,66	2,00	141	-	-	141

¹Laboratorio no consistente en la identificación de los géneros de hongos con el resto mediante ISTA, el cual fue excluido por discrepancia. ²Laboratorios excluidos mediante Tukey. *No hubo compatibilidad entre los laboratorios

Importancia de los hongos identificados

En el Cuadro 4, se observó a *Cladosporium* sp., como el más frecuente, el cual se encontró infestando la semilla de soya en 67 % promedio en los lotes analizados, el mismo actúa como contaminante o saprófito de la semilla de soya (Figura 4A) y no es causante de enfermedad para los futuros ciclos de siembra, pero sí del deterioro en almacén (Hening, 2005). Le siguió el hongo *Fusarium* spp., con una frecuencia de 35% promedio, este género es uno de los patógenos más comunes que causan enfermedades en el cultivo de la soya durante toda las etapas fenológicas, Diversas especies han sido reportadas pero la más común es *Fusarium semitectum* aislado en un 95% de los casos y provoca la pudrición en la región del cuello de la plántula (Dhingra y Silva, 1997), *Fusarium solani* causa la muerte súbita o la pudrición de las raíces y *Fusarium oxysporum* la pudrición de la semilla o la muerte de las plántulas (Hening, 2005). El crecimiento típico de *Fusarium* sp., en la semilla es de micelio color blanco, algodonoso y denso que puede variar a amarillo, salmón (Figura 4B) a marrón dependiendo del periodo de incubación en Blotter o papel secante. El hongo *Aspergillus* spp., tuvo una frecuencia de 28% promedio para las dos muestras analizadas, es un hongo que causa deterioro en la semilla por inadecuadas condiciones de almacenamiento (Figura 4C),

Otros géneros fueron identificados, pero tienen menor importancia en cuanto al daño ocasionado en la semilla de soya (Cuadro 4), uno de ellos fue *Penicillium* sp., con 17%. Sobre este hongo no hay señalamiento de daños para la semilla de soya; sin embargo, es un patógeno muy común de la semilla de maíz en lotes muestreados por Danac.

Se identificaron géneros de hongos de mucha importancia como patógenos potenciales de la semilla y del cultivo de soya, entre ellos *Cercospora kikuchii* con una frecuencia de 5% promedio. Este hongo produce la mancha púrpura de la semilla de soya, las semillas infectadas presentan una coloración morada en el tegumento (Figura 5A). El hongo también puede afectar las vainas (Henning, 2005). La infección de las semillas comienza 30 a 40 días después de la floración completa, cuando la semilla está cerca del 10 al 40% de su peso final.



Figura 4. A. Estructuras reproductivas de *Cladosporium* sp. B. Micelio de *Fusarium* sp. C. Estructuras reproductivas de *Aspergillus* sp., envolviendo la radícula. Las estructuras de los hongos se encuentran alojadas en o cerca del hilum (Fotos: A. González)

Las plantas originarias de estas semillas son menos vigorosas, con crecimiento menos vigoroso y menor producción (Dhingra y Silva, 1997).

Phomopsis sp., fue encontrada en 4% de la semilla 'FP90-6103', dicho hongo puede reducir la calidad sanitaria de la semilla, especialmente cuando ocurren periodos lluviosos con temperaturas altas durante la fase de maduración. Los síntomas en las plantas aparecen al final del ciclo, caracterizados por puntuaciones negras que son los picnidios, que pueden alinearse sobre los peciolos o en algunos casos sobre las vainas (Henning, 2005; Henning *et al.*, 2014). Las semillas infectadas después del periodo de incubación presentan un micelio blanco, compacto, sobre el cual aparecen los picnidios (Figura 5B). Algunas veces *Phomopsis* sp., apenas presenta picnidios sobre la semilla (Figura 6A), en esos casos la identificación debe ser hecha por medio del microscopio de luz compuesto al máximo aumento (100-400X), para observar la presencia de conidios α y β (Figura 6B).

Los conidios de tipo alfa (α) son los más frecuentes, hialinos, unicelulares, fusiformes y elipsoidales, de dos tabiques, uno en cada extremidad, tamaño $6-8 \times 2-2,5\mu\text{m}$; conidios tipo beta (β) son hialinos, alongados, filiformes, curvados, muchas veces fuertemente enganchados, dimensiones de $20-30 \times 0,5-1\mu\text{m}$ (Barnett y Hunter, 1998; Goulart, 1997; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009).

Macrophomina phaseolina solo afectó una pequeña proporción de las muestras de soya (0,66%), este hongo causa la pudrición negra y carbonosa de las raíces y ocurre con bastante frecuencia en condiciones de clima seco (Henning, 2005; Henning *et al.*, 2014). Las plantas afectadas en campo sufren deterioro del sistema radicular, con formación intensa de microesclerocios sobre la epidermis de las raíces, los cuales matan a la planta prematuramente (Henning, 2005; Dhingra y Silva, 1997). En el periodo de incubación durante la prueba de papel secante el hongo produjo abundante micelio oscuro con abundante producción de microesclerocios negros sobre la semilla (Figura 5C).

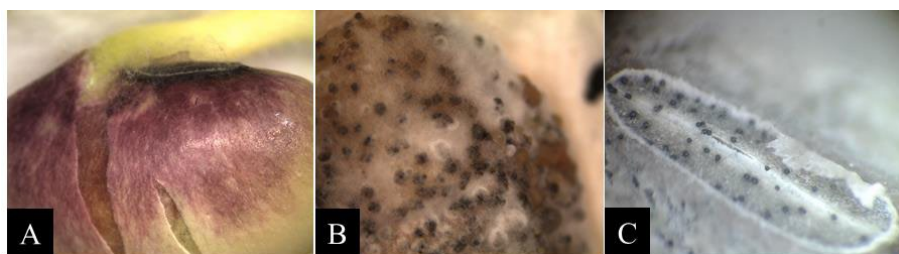


Figura 5. A. Tegumento de la semilla de soya cubierta parcialmente con micelio de *Cercospora kikuchii*. B. Micelio blanco a marrón cubriendo la semilla, picnidios globosos con masa de conidios coloración marrón-amarillento producido por *Phomopsis* sp. C. Microesclerocios y micelio de *Macrophomina phaseolina* en el hilum (Fotos: A. González y B. Gutiérrez)

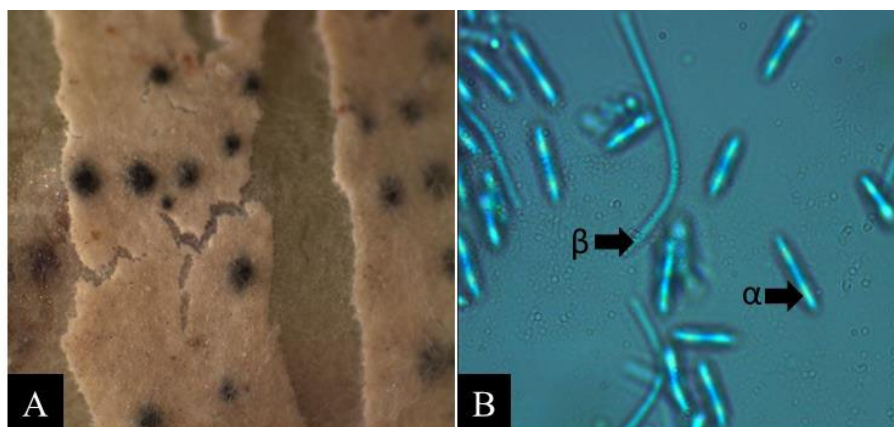


Figura 6. A. Picnidios de *Phomopsis* sobre el tegumento de la semilla de soja aumento de 10X. **B.** Conidios del tipo alfa y beta señalados por la flecha en aumento de 100X (fotos: A. González)

Este último hongo, fue una limitante para la producción de 100 ha de semilla certificada de soja en la zona del oriente venezolano durante el ciclo norte verano de 2015 (Gutiérrez, comunicación personal). *M. phaseolina* solo creció y fue identificado en el laboratorio 141, cuyas condiciones de temperatura de 20 °C y 65% HR promedio, dichas condiciones fueron muy favorables para el desarrollo del potencial patógeno; además, el analista poseía una amplia experiencia en el manejo del mismo. Lo anterior expuesto es congruente con los resultados del trabajo.

CONCLUSIONES

Fueron adoptadas las recomendaciones hechas para el método Blotter (Henning, 2005), sobre las condiciones ambientales y asepsia. En tal sentido, el método del papel secante planteado en el presente protocolo fue validado con éxito, los resultados de repetibilidad y reproducibilidad así lo demostraron. Hay que destacar que no se encontraron referencias sobre pruebas interlaboratorios realizadas anteriormente para verificar la sanidad de la semilla de soja.

En trabajos de rutina la experiencia han sido las constantes discrepancias entre laboratorios de diagnóstico y análisis de la semilla, siendo argumentada principalmente por fallas en el muestreo, la selección de la muestra de trabajo, el tiempo de recepción de la muestra y el procesamiento, y la experiencia de los analistas.

Los autores esperan que otros laboratorios adopten esta metodología por ser económica, segura y fácil de aplicar. A futuro, se puede realizar una prueba con mayor número de laboratorios en forma periódica para lograr el objetivo de

probar el desempeño del instrumental, detectar las necesidades de entrenamiento para los analistas, resaltar las necesidades para mejorar la calidad de trabajo del laboratorio y como fin último obtener una semilla de soya de alta calidad.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Plan Zamora y a las autoridades del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, pertenecientes Ministerio del Poder Popular para Agricultura y Tierras del Gobierno de la República Bolivariana de Venezuela; por el financiamiento al Proyecto PZ_OLE_SOY2 recibido a través de la Unidad Administrativa y Ejecutora del Plan Zamora, INIA-CENIAP, Maracay.

REFERENCIAS

- Analytical Software. 2003. Statistix 8.0 Analytical Software User's Manual. Tallahassee, FL. USA.
- Bányai, J.; Barabás, J. 2002. Handbook on statistics in seed testing. The International Seed Testing Methods (ISTA). Revised version. Basserdorf, Switzerland. 84 p.
- Barnett, H. L.; B. B. Hunter. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4th edition. APS Press. St. Paul, Minnesota. USA. 218 p.
- Brown, R. L.; P. J. Cotty; T. E. Cleveland; N. W. Widstrom. 1993. Living maize embryo influences accumulation of aflatoxin in maize kernels. J. Food Prot. 56: 967-971.
- Delouche, J, 1974, Maintaining soybean seed quality, In: Soybean production marketing and use, Tennessee Valley Authority, Bulletin Y-69, National Fertilizer Development Center, TVA, Muscle Shoals, Alabama, USA,
- Dhingra, O. D.; R. Silva. 1997. Patologia de semente de soja. Universidad Federal de Vicosa. Associação Brasileira das Editoras Universitárias. Viçosa, Brasil. 119 p.
- Fundacao MT. 2005. Boletín de Pesquisa de Soja 2005. Fundacao de Apoio a Pesquisa Agropecuaria de Mato Grosso-Fundacao MT. Rondonopolis-MT, Brasil. 122 p.
- González de Núñez, M.; O. Verde. 2010. Curso de confiabilidad de resultados. Centro de Investigaciones del Estado para la Producción Experimental Agroindustrial (CIEPE). San Felipe, Venezuela. 42 p.
- Goulart, A. C. 1997. Fungos em sementes de soja: detecção e importancia. Dourados: EMBRAPA-CPAO. Documentos 11. Londrina, Brasil. 58 p.

- Henning, A. A. 2005. Patologia e tratamento de sementes: Noções gerais, Documentos 264. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Londrina, Brasil. 72 p.
- Henning, A. A.; A. M. Rodrigues; C. Vieira; C. D. Santos; J. Tadashi; L. M. Costamilan; L. Pires; M. Conrado; R. Moreira; W. Pereira. 2014. Manual de Identificação de doenças de soja. Documentos 256. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Londrina, Brasil. 72 p.
- ISTA. 2013. Annexe to chapter 7 seed health testing. Seed health testing methods. Edition 2012/1. The International Seed Testing Methods (ISTA). Basserdorf, Switzerland.
- Leslie, J. F.; B. A. Summerell. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Press. Sydney, Al. USA. 388 p.
- Meilgaard, M.; G. V. Civille; B. Thomas. 1999. Sensory evaluation techniques. CRC Press. Whashington, DC. USA.
- Miles, S. R. 1963. Handbook of tolerances and of measures of precision for seed testing. Edité par l' Association Internationale d'Essais de Semences. Wageningen, Hollande.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2009. Anexo do Capítulo 9 (Teste de Sanidade de Sementes) das Regras para Análise de Sementes. Manual de análise sanitária de sementes. Brasília, DF. Brasil. 200 p.
- Solórzano, P. R.; J. A. Muños; M. A. Gamboa. 2005. El cultivo de la soya en Venezuela. AGROISLEÑA. Impresión Litostar S. A. La Victoria, Venezuela. 188 p.