

# EVALUACIÓN DE LA PATOGENEICIDAD DE LA MICROBIOTA FÚNGICA ASOCIADA A CINCO VARIEDADES AUTÓCTONAS ESPAÑOLAS DE JUDIÓN (*Phaseolus coccineus* L.).

<sup>1</sup>Daniel Palmero, <sup>2</sup>Concepción Iglesias

<sup>1</sup>Dirección Técnica de Evaluación de Variedades y Laboratorios. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Ctra Coruña Km 7,5 (28040) Madrid, <sup>2</sup>Unidad Docente de Genética y Fitopatología. EUIT Agrícola. Universidad Politécnica de Madrid Ciudad Universitaria s/n. 28040 Madrid. España, E-mail: daniel.palmero@upm.es

## Resumen

Se caracterizó la micoflora presente en las semillas de 5 cultivares de judiÓN (*Phaseolus coccineus* L.), procedentes de una explotación dedicada a la agricultura ecológica de Oteruelo del Valle (Parque natural de Rascafría, Madrid) y de 5 variedades incluidas en el Catálogo Común de variedades Comerciales de la Unión Europea.

Se analizaron un total de 3200 semillas de todos los lotes cosechadas en la campaña 2005-2006. Para ello se colocaron 5 semillas de cada muestra en placas de Petri con medio agar de patata glucosado (PDA) y 6 semillas por muestra en cámara húmeda, realizándose 20 repeticiones en cada caso, analizándose de esta manera al menos 220 semillas por muestra. Para conocer la presencia del género *Fusarium* se realizaron análisis específicos con todas las muestras, utilizando para ello medio selectivo para *Fusarium*, realizándose lecturas periódicas y anotando el número de especies presentes en cada semilla. Se identificaron un total de 11 especies fúngicas diferentes.

La presencia de los diferentes géneros varió entre los cultivares estudiados, siendo mucho menor, aunque no ausente en las semillas comerciales. Entre la microbiota fúngica aislada cabe destacar, por su potencial patogeneicidad o por su capacidad para la producción de micotoxinas o metabolitos secundarios, especies de los géneros *Aspergillus*, *Alternaria* o *Rhizoctonia*.

En una segunda parte del estudio se evaluó el efecto que dichos hongos tienen sobre la germinación y nascencia de las semillas, realizándose pruebas de patogeneicidad sobre un total de 200 semillas de *Phaseolus vulgaris* variedad Calgary. Las inoculaciones se realizaron con cada uno de los dos aislados de los seis géneros de mayor importancia cuantitativa del inventario (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Ulocladium*, *Rhizopus*, *Cladosporium* y *Alternaria*)

Los resultados de las inoculaciones muestran efectos negativos sobre los porcentajes de germinación en todos los tratamientos estudiados y muestran la diferente capacidad parasitaria de cada una de las especies estudiadas sobre *Phaseolus vulgaris*.

**Palabras clave:** Semilla, microbiota fúngica, agricultura ecológica.

## Summary

The micoflora from 5 runner bean landraces (*Phaseolus coccineus* L.), coming from an organic farmer in Oteruelo del Valle (Rascafría natural Park, Madrid), and 5 cultivars included in the Common Catalogue of commercial varieties of the European Union was characterized.

A total of 3200 seeds of all lots harvested in 2005-2006 campaign were analyzed. 5 seeds of each sample were placed in Petri plates with agar-dextrose-potato medium (PDA) and also 6 seeds per sample in humid chamber. At least 220 seeds were analyzed in 20 repetitions per sample.

Specific analyses using a selective medium with all the samples were made to identify the presence of *Fusarium* writing down the number of present species in each tested seed.

A total of 11 different fungal species were identified. The presence of the different genus varied among cultivars, being much more smaller, although not absolutely absent, in the commercial seeds. In the isolated fungal microbiota, it is necessary to emphasize, due to its potential patogeneicity or its capacity for mycotoxins or secondary metabolites production, genus such as *Aspergillus*, *Alternaria* or *Rhizoctonia*.

In the second part of the study, the effect that these fungi have on the germination of the seeds was evaluated. Patogeneicity tests were carried out on a total of 200 seeds of *Phaseolus vulgaris* var. Calgary. The inoculations were made with two isolates of the six genus of greater quantitative importance of the study (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Ulocladium*, *Rhizopus*, *Cladosporium* and *Alternaria*).

The results show negative effects on the percentage of germination in all the studied treatments and also show the different parasitic capacity of the studied fungal species on *Phaseolus vulgaris*.

**Key Words:** Seed, fungal microbiota, organic agriculture.

## Introducción

*Phaseolus coccineus* es una leguminosa trepadora y perenne, de consumo humano cultivada como anual, ampliamente distribuida en España, como lo atestiguan los diferentes nombres vernáculos de la especie "Judía escarlata", "Judión" o "Judía de España".

La especie, originaria de México, Guatemala y Honduras, aunque su centro de domesticación es aún hoy desconocido (Debouk & Smartt 1995, en Rodiño *et al.* 2006), fue introducida en Europa desde América Central. España se considera el punto de entrada de la especie en Europa (Rodiño *et al.* 2006).

En contra de lo esperable, la diversidad genética que presenta la especie en el territorio nacional no se ve reflejada en lo que a número de variedades comerciales puestas a disposición de nuestros agricultores se refiere.

La importancia de la semilla como vehículo de entrada de enfermedades criptogámicas que afectan a la germinación y nascencia de las especies vegetales ha sido ampliamente estudiada (Tello *et al.* 1990; Palmero *et al.* 2006), de la misma manera la microbiota fúngica de la judía (*P. vulgaris* L.) es estudiada por diferentes autores (Ruiz *et al.* 1996, González 2000, Tello *et al.* 1990, Bilbao *et al.* 2000).

Entre los hongos identificados en la semilla de judía destacan por su patogeneidad o por su asiduidad de aparición hongos de los géneros *Alternaria*, *Fusarium*, *Botrytis* o *Rhizoctonia* (Tu 1985, 1993, Gomes & Dhingra. 1983, Boland & Hunter 1988, Tello *et al.* 1990, Vaughan *et al.* 1988), *Sclerotinia* (Morton & Hall 1983, Tseng *et al.* 1995), *Colletotrichum lindemuthianum* (Rao *et al.* 1969) o *Cladosporium* (Boland & Hunter 1988) entre otros. Además, la capacidad de ciertos géneros fúngicos como *Aspergillus* (Hagler *et al.* 1987, Harman 1972) o *Alternaria* (Tietjen *et al.* 1983), de frecuente aparición en semillas de *Phaseolus*, para producir micotoxinas y metabolitos secundarios junto con la indispensable puesta en valor de nuestro patrimonio vegetal, adaptado a nuestras condiciones, unido a que uno de los problemas más importantes en el cultivo puede ser el estado sanitario de las semillas, se pone de manifiesto la necesidad de un estudio de las semillas de judión como el que aquí se presenta.

No se ha encontrado en la bibliografía consultada referencia alguna a la sanidad de las semillas de *P. coccineus*, aunque si hay referencias de trabajos donde se incluye la especie en el proceso de mejora de la judía común como fuente de resistencia a *Colletotrichum lindemuthianum* (Schmit & Baudoin 1992) o frente al virus del mosaico amarillo de la judía (BYMV) (González 2000)

El presente trabajo pretende aportar información sobre la microbiota presente en las semillas de judión utilizadas

en agricultura ecológica y evaluar el efecto que dichos hongos tienen sobre la germinación y nascencia de las semillas.

## Material y métodos

### Material estudiado

Se analizaron un total de 3200 semillas de judión (*Phaseolus coccineus* L.) correspondientes a las muestras Fv, Fo, De, Ng y Bl (Fig. 3A), cosechadas en la campaña 2005-2006 procedentes de una explotación dedicada a la agricultura ecológica de Oteruelo del Valle (Parque Natural de Rascafría, Madrid) y a las muestras codificadas como Wl, An, Rd, Cn y Ld, procedentes de muestras de semillas comerciales inscritas en el Catálogo Común de variedades comerciales de la Unión Europea.

Para los ensayos de germinación y los de patogeneidad, se utilizaron semillas de la variedad Calgary, variedad de judía de mata baja (*Phaseolus vulgaris* L.) protegida por la Oficina Comunitaria de Variedades Vegetales y procedente de la colección de referencia de judía de la Dirección Técnica de Evaluación de Variedades y Laboratorios (INIA), conservadas en cámara climática, en dosis de semillas no tratadas, a 4°C. La elección de la variedad responde al menor porte y mejor manejo en cámara de la judía de mata baja frente a las semillas de judión.

### Análisis de la microbiota

Se realizaron análisis con semillas de todos los lotes, colocando 5 semillas de cada muestra en placas de Petri (Fig. 3B) con medio de agar de patata glucosado (PDA), cuya preparación se hizo en el laboratorio (Echandi 1971), y en cámara húmeda (6 semillas por placas de Petri con papel de filtro humedecido en su interior) realizándose 20 repeticiones en cada caso y analizando de esta manera al menos 220 semillas por muestra. Las placas de Petri se incubaron en oscuridad a temperatura constante de 25°C entre 6 y 10 días, realizándose lecturas periódicas y anotando el número de géneros y especies presentes en cada semilla.

Para conocer la presencia del género *Fusarium* se realizaron análisis específicos con todas las muestras, utilizando para ello el medio selectivo para *Fusarium* (Komada 1975) y el mismo procedimiento que el indicado con el medio PDA, analizándose 100 semillas por muestra.

### Identificación de los hongos

La identificación de los distintos hongos se llevó a cabo mediante la lectura de sus características taxonómicas por

medio de la observación directa de las placas y preparaciones al microscopio óptico. Para la identificación se siguió la obra de Barnett & Hunter (1972). En el caso de la taxonomía de los géneros *Alternaria* y *Ulocladium*, se siguió la obra de Rotem (1994) y Ellis (1971) y, en el caso de *Aspergillus*, los criterios adoptados fueron los de Thom & Raper (1945).

### Determinación del poder germinativo de las semillas

Para la realización de los ensayos de germinación se utilizaron 10 cajas de Petri de vidrio de 90 mm de diámetro (6 semillas por placa) y ensayos sobre toallas de papel de filtro testándose un total de 100 semillas por variedad.

Las pruebas de germinación realizadas sobre substrato se llevaron a cabo en vasos de plástico con un tamaño de 110 mm de boca y 155 mm de profundidad y con orificios de drenaje. El substrato utilizado fue vermiculita, de granulometría variable entre 0,75 y 8 mm de diámetro, de esta manera se analizaron 10 vasos por cada tratamiento con 10 semillas sembradas en cada caja.

Todas las pruebas para la determinación del poder germinativo se llevaron a cabo en cámaras de fotoperiodo y temperatura controlados, incubando las muestras a 25°C y 12 h luz durante 8-9 días.

### Pruebas de patogenicidad

De entre todos los géneros de hongos presentes en las semillas analizadas se seleccionaron aquellos cuyo número de colonias era evidentemente superior al resto; dos aislados de *Rhizopus stolonifer* pertenecientes a las muestras Fv (Rhi-1) y BI (Rhi-2), dos aislados de *Penicillium* pertenecientes a las muestras de semillas Fo (Pe-1) y Dv (Pe-2), dos aislados de *Aspergillus niger* pertenecientes a las muestras de semillas Dv (A. nig-1), Fo (A. nig-2), dos aislados de *Aspergillus flavus* pertenecientes a las muestras de semillas BI (A. fla-1) y Fo (A. fla-2), dos aislados de *Cladosporium herbarum* pertenecientes a las muestras de semillas Ng (Cla-1) y Fv (Cla-2) dos aislados de *Alternaria alternata* pertenecientes a las muestras de semillas Dv (Al-1) y Fo (Al-2) y dos aislados de *Ulocladium botrytis* pertenecientes a las muestras de semillas BI (Ulo-1) y Dv (Ulo-2).

La producción de las masas miceliales y conidios necesarios para inocular las semillas se realizó sobre PDA, incubándolo en estufa a 25°C en oscuridad, durante 5-6 días.

Tras el periodo de incubación se añadieron a 400 ml de agua destilada el contenido de 2 placas de Petri por aislado y se homogeneizó el medio.

La aplicación se realizó repartiendo los 400 ml de inóculo sobre 100 semillas previamente desinfectadas y colocadas en 10 vasos de plástico sobre sustrato de vermiculita manteniendo condiciones de fotoperiodo

de 2500 lux durante 14h/día con salto térmico de 5°C oscilando entre 25°C (14h) y 20°C (10 h).

Este proceso se repitió 2 veces en el tiempo con cada aislado, ensayándose sobre un total de 200 semillas por aislado.

El conteo y la observación de daños producidos sobre las plántulas emergidas se efectuaron tras un período de 10 días después de inocular, momento en el que las plántulas presentaban sus dos primeras hojas verdaderas totalmente extendidas, realizándose paralelamente a cada uno de los ensayos controles sin inóculo.

La evaluación de plántulas se realizó conforme a las indicaciones de la Asociación de Analistas Oficiales de Semillas (1981) en sus Reglas para el género *Phaseolus*, distinguiéndose de esta manera plántulas normales, donde se agruparon y contaron las plántulas intactas junto a plántulas con ligeros defectos, anotándose ambas como plántulas normales emergidas y plántulas anormales o atrofiadas, donde se incluyeron plántulas que no presentaron capacidad para desarrollarse en una planta normal.

La medición se realizó sobre la longitud total de la raíz principal y sobre la distancia desde el punto de inserción de la primera raíz secundaria hasta la yema terminal.

## Resultados y Discusión

### Resultados del inventario fúngico

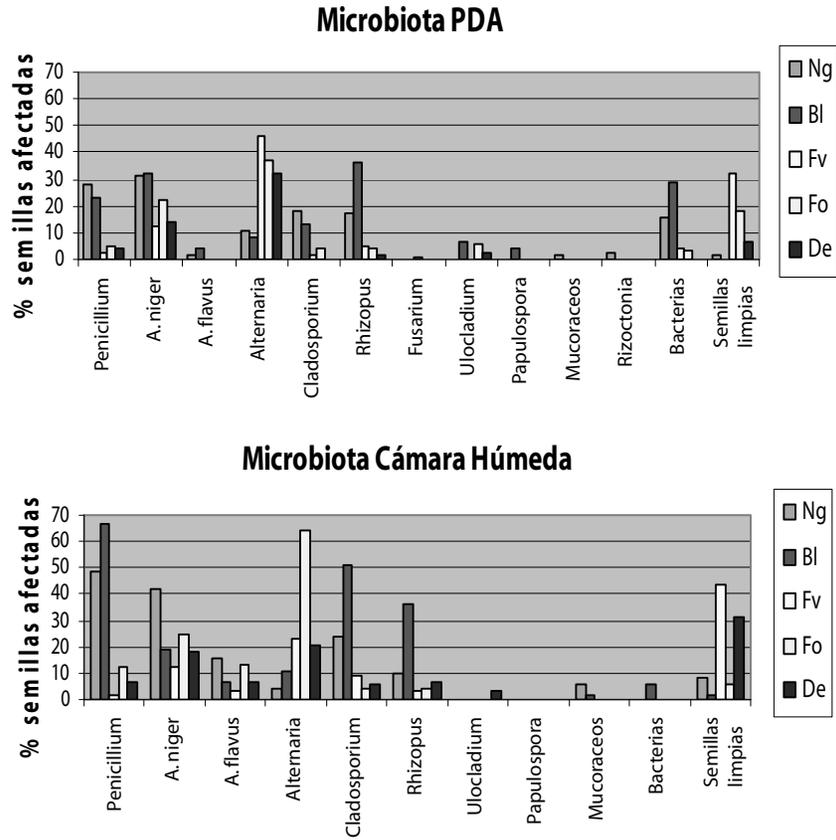
Se analizaron 1600 semillas de las cinco variedades locales en medio PDA y K, a partir de las cuales se obtuvieron un total de 10 géneros fúngicos diferentes (Figura 1A): *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Ulocladium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Rizoctonia*, *Mucor* y *Papulospora*. Los resultados de los ensayos muestran como la carga fúngica de las semillas de variedades locales de judión analizadas se compone casi inalterablemente por hongos comunes en las semillas almacenadas.

Como se refleja en las figuras 1A y 1B, cinco especies fúngicas aparecieron afectando a más del 10% de alguna de las muestras analizadas, mientras que el resto de especies aparecieron en porcentajes de semillas afectadas inferiores al 5% de la muestra.

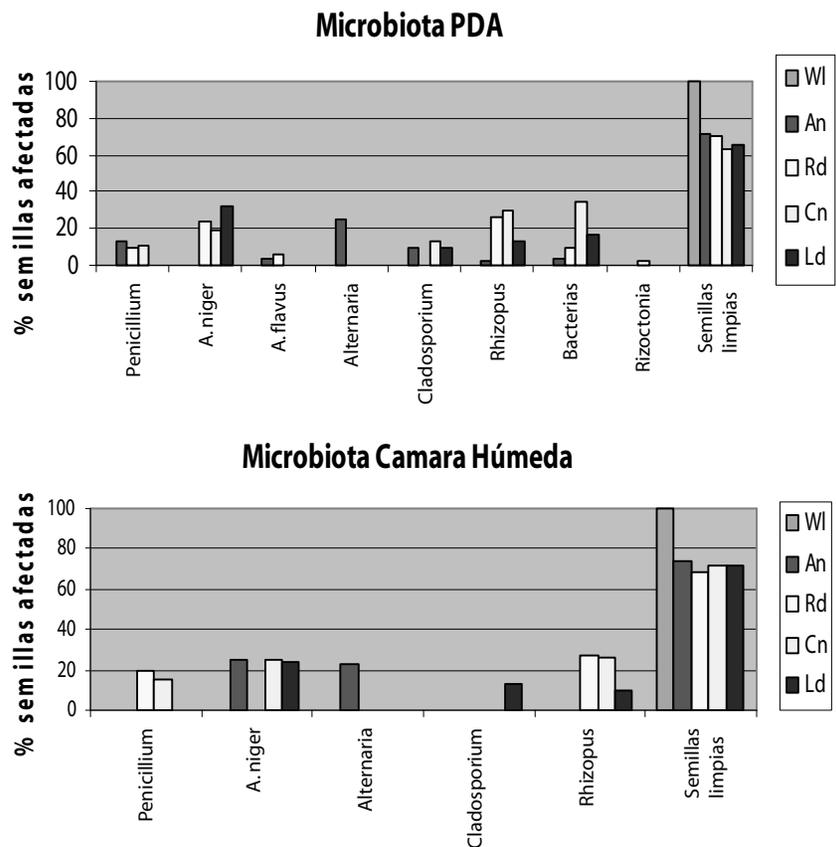
Los hongos mayoritariamente representados son *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer* y *Penicillium rugulosum*, con porcentajes de aparición de hasta un 46% de la semilla analizada, como en el caso de *Alternaria* sobre la variedad De.

Con menor frecuencia de aparición pero aún en porcentajes de semillas afectadas que llegaron hasta el 7% en algunos casos, se encuentran los géneros *Cladosporium*, *Ulocladium* y *Aspergillus flavus*.

Por último, es reseñable por su potencial patogenicidad la aparición, aunque con baja frecuencia, del género *Rizoctonia* en la muestra Ng.



**Figura 1A y 1B.** Hongos aislados a partir de los lotes de semillas de judión (*Phaseolus coccineus* L.), de variedades locales. Se expresa en porcentaje sobre el total de semillas analizadas en PDA y en cámara húmeda.



**Figura 2A y 2B.** Hongos aislados a partir de los lotes de semillas de judión (*Phaseolus coccineus* L.), de variedades comerciales. Se expresa en porcentaje sobre el total de semillas analizadas en PDA y en cámara húmeda.

En cuanto a las semillas que no presentaron ninguna contaminación fúngica destaca la variedad Fv que presentó un 32.5% de semillas limpias tras su incubación en el medio de cultivo, frente a la variedad BI, donde todas las semillas resultaron infectadas por algún miceto.

Los resultados de los análisis realizados en cámara húmeda se muestran en la Figura 1B, en ella se puede observar como en general al microbiota fúngica se mantiene constante, si bien es destacable el aumento de semillas afectadas por *Aspergillus flavus* especie cuya aparición no superó el 4% de semillas afectadas en los ensayos sobre medio de cultivo PDA, pero que en los ensayos en cámara húmeda han formado colonias sobre el 13 y 16% de las semillas analizadas de las muestras Fo y Ng, respectivamente.

En general, en los análisis en cámara húmeda, los porcentajes de semillas afectadas aumentan respecto a los análisis sobre medio de cultivo, aunque es necesario destacar el porcentaje de semillas que no se han visto afectadas por ningún hongo en la variedad Fv, porcentaje que aumentó respecto al análisis en medio de cultivo hasta un 44% de las semillas analizadas, muy por encima del resto de las variedades analizadas.

Estudios morfológicos de diferenciación de las cinco variedades locales (datos sin publicar) concluyen que las variedades Fv y Fo podrían tratarse del mismo cultivar, la diferencia de coloración de la cubierta sería debida a la madurez de la semilla. Se podría, por tanto, pensar que la diferencia observada entre la alta carga fungica del cultivar Fo y la presencia muy baja de micetos en las semillas del cultivar Fv podría tener su origen en la precocidad de la cosecha de Fv frente a Fo, lo que posibilitaría una recomendación de manejo de cultivo, pues con el mero hecho de no dejar la vaina seca en las plantas más allá del tiempo razonable para su recolección en madurez comercial se traduciría en una mejora sanitaria muy patente del material cosechado.

En cuanto a los análisis llevados a cabo con variedades comerciales, los resultados muestran una menor carga fúngica que la presente en las variedades locales (Fig. 2A y 2B), aunque únicamente una de las variedades estudiadas se encontró libre de cualquier miceto, se trata de la variedad codificada como W1 cuya semilla comercial era la única incluida en el estudio que presentaba un tratamiento fungicida.

Entre los hongos aparecidos en las otras 4 variedades comerciales destacan *Aspergillus niger*, potencial productor de micotoxinas y que presenta contaminaciones superiores al 20% en todos los lotes analizados. Por el contrario únicamente se ha aislado el género *Alternaria* en una de las variedades estudiadas (An), aunque en porcentajes superiores al 25% de las semillas analizadas.

No se han encontrado hongos fitopatógenos que afectan al género *Phaseolus*, como *Colletotrichum lindemuthianum* o *Ascochita* sp.

Tampoco se aislaron especies de *Fusarium* asociadas a las semillas de judía como *F. acuminatum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum* o *F. solani* f.sp. *phaseoli* en ninguno de los ensayos realizados sobre medio selectivo para flora fusárica (Komada 1975). La presencia de un 1% de semillas de la muestra Fv afectadas por *Fusarium equiseti* en los ensayos sobre PDA no se ha visto reflejado en la aparición de colonias en los ensayos en medio selectivo. El bajo porcentaje de aparición del género unido a su nula presencia en los ensayos específicos hacen posible postular que no se trata de un componente habitual de las semillas de judión estudiadas.

me, *F. oxysporum* o *F. solani* f.sp. *phaseoli* en ninguno de los ensayos realizados sobre medio selectivo para flora fusárica (Komada 1975). La presencia de un 1% de semillas de la muestra Fv afectadas por *Fusarium equiseti* en los ensayos sobre PDA no se ha visto reflejado en la aparición de colonias en los ensayos en medio selectivo. El bajo porcentaje de aparición del género unido a su nula presencia en los ensayos específicos hacen posible postular que no se trata de un componente habitual de las semillas de judión estudiadas.

### Resultados de las pruebas de patogenicidad

Previamente a proceder a los ensayos de inocular las semillas de la variedad Calgary de *Phaseolus vulgaris*, se realizó un ensayo de desinfección y se evaluó su influencia sobre la germinación.

En la determinación del poder germinativo de la variedad de judía utilizada en las inoculaciones se testaron tres tratamientos de desinfección previa diferentes: hipoclorito sódico sin diluir (40 g. de Cl. activo / L.) durante 5, 10 y 15 minutos de desinfección, y el testigo. Los resultados obtenidos en los ensayos mostraron mayores porcentajes de germinación en las semillas sumergidas durante 10 min. en hipoclorito sódico sin diluir, con porcentajes de germinación del 96%, superior en un 16% al testigo. Las diferentes concentraciones y tiempos de esterilización se muestran en el Tabla 1.

**Tabla 1.** Tratamientos de desinfección del poder germinativo de las semillas de la variedad inoculada Calgary.

Tratamientos	Tiempo	Ensayos en cajas de Petri
40 g. de Cl. activo / L.	5 min.	92 %
40 g. de Cl. activo / L.	10 min.	96 %
40 g. de Cl. activo / L.	15min.	86 %
Semilla pregerminada	Testigo	80 %

Estos datos hacen del método de desinfección consistente en sumergirlas durante 10 min. en hipoclorito sódico (40 g. de Cl. activo / L.) y posterior aclarado con agua adecuado para utilizar en los ensayos de patogenicidad. Una vez decidido este punto y para verificar los resultados del tratamiento elegido, se realizaron nuevos ensayos de germinación en cajas con vermiculita para observar su comportamiento en un substrato igual al que se utilizará en los ensayos de inoculación.

Se realizaron 10 repeticiones sobre cajas con vermiculita, comparando el tratamiento de desinfección seleccionado con el testigo sin tratar, los porcentajes finales obtenidos en el tratamiento con hipoclorito sódico con 10 minutos de inmersión fue del 94%, superior en un 17% al testigo sin tratamiento de desinfección.

**Tabla 2.** Análisis de la varianza para los caracteres germinación (%), atrofia (%), longitud de la parte aérea (mm) y longitud de raíz principal (mm).

Fuentes de variación	g.l	Suma cuadrados	Cuadrados medios
<b>Germinación</b>	7	72882,3	10411,8
Error	291	115809,0	397,97
Total	298	188692,0	
<b>Atrofia</b>	7	13410,0	1915,71
Error	292	38815,0	132,928
Total	299	52225,0	
<b>Long. raíz</b>	7	440,702	62,9574
Error	1070	12596,8	11,7728
Total	1077	13037,6	
<b>Long. planta</b>	7	2785,53	397,933
Error	1162	52350,9	45,0524
Total	1169	55136,4	

**Tabla 3.** Comparación múltiple de los caracteres germinación, atrofia, longitud de la parte aérea y longitud de raíz principal para los diferentes géneros inoculados (Diferencia mínima significativa con nivel de significación de 0.05)

Aislados	Porcentaje de emergencia	Porcentaje de atrofia	Longitud Raíz principal	Longitud parte aérea
T	93,0 ± 4,460 c	2,5 ± 2,578 a	10,942 ± 0,252 d	9,952 ± 0,474 ab
Al	41,794 ± 3,194 a	10,0 ± 1,822 b	9,495 ± 0,298 ab	8,603 ± 0,597 a
Cla	33,75 ± 3,154 a	15,25 ± 1,822 c	9,310 ± 0,357 ab	9,153 ± 0,678 ab
Rh	39,5 ± 3,154 a	14,75 ± 1,822 bc	9,629 ± 0,313 ab	14,284 ± 0,612 c
Afl	56,0 ± 3,154 b	14,75 ± 1,822 bc	9,793 ± 0,260 ab	9,233 ± 0,444 ab
Anig	38,25 ± 3,154 a	11,0 ± 1,822 bc	10,089 ± 0,309 bc	9,062 ± 0,617 ab
Pen	64,0 ± 3,154 b	29,5 ± 1,822 d	9,076 ± 0,314 a	10,475 ± 0,612 b
Ulo	59,5 ± 3,154 b	12,25 ± 1,822 bc	10,745 ± 0,297 cd	9,896 ± 0,530 ab

**Tabla 4.** Análisis de la varianza para los caracteres germinación (%), atrofia (%), longitud de la parte aérea (mm) y longitud de raíz principal (mm) realizado para los dos aislados de *Rhizopus*.

Fuentes de variación	g.l	Suma cuadrados	Cuadrados medios
<b>Germinación</b>	2	38653,3	19326,7
Error	57	14720,0	258,246
Total	59	53373,3	
<b>Atrofia</b>	2	2303,33	1151,67
Error	57	4270,0	74,9123
Total	59	6573,33	
<b>Long. raíz</b>	2	140,94	70,4701
Error	302	692,32	2,29245
Total	833,261	304	
<b>Long. planta</b>	2	55,643	27,8215
Error	308	449,074	1,45803
Total	504,717	310	

**Tabla 5.** Comparación múltiple de los caracteres germinación, atrofia, longitud de la parte aérea y longitud de raíz principal para los diferentes aislados del género *Rhizopus* inoculados (Diferencia mínima significativa con nivel de significación de 0.05)

Aislados	Porcentaje de emergencia	Porcentaje de atrofia	Longitud Raíz principal	Longitud parte aérea
T	93,0 ± 4,460 b	2,5 ± 2,578 a	10,942 ± 0,252 c	9,952 ± 0,474 a
Rh1	36,0 ± 4,245 a	12,0 ± 2,263 b	9,336 ± 0,178 a	17,711 ± 1,306 b
Rh2	43,0 ± 4,245 a	17,5 ± 2,263 a	10,068 ± 0,218 b	9,143 ± 1,600 a

### Resultados obtenidos en los ensayos de inoculación

La inoculación de los diferentes hongos dio como resultado efectos negativos sobre los porcentajes de germinación con todas las especies ensayadas, los resultados del conteo y medición de las plántulas fueron sometidos a un análisis de varianza unifactorial (Tabla 2). El porcentaje más alto de emergencia fue siempre el del testigo, con un 93 % de germinación.

El testigo mostró la totalidad de las plántulas emergidas intactas, con el primer par de hojas completamente extendido. En general no se apreció daño alguno sobre ellas, si bien algunas plántulas presentaron el ápice truncado hacia dentro. En cuanto a la raíz principal, el testigo presentaba gran cantidad de raíces secundarias sin daños aparentes. En la Tabla 3 se observan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los diferentes tratamientos y el testigo.

Los aislados de *Alternaria* no presentaron diferencias significativas entre sí, las inoculaciones provocaron graves descensos en la emergencia de las plántulas (Fig. 3C).

El porcentaje de plántulas anormales no fue tan alto como el causado por la inoculación con otros micetos, aunque los daños en las plántulas atrofiadas resultaron muy patentes, con hojas deformadas y sistemas radiculares atrofiados con necrosis en tallos y raíces. En cuanto a las plántulas clasificadas como intactas, presentaban un desarrollo algo retrasado respecto al testigo, con clara epinastia, posiblemente debida a la afectación por el hongo del sistema radicular, donde se observan diferencias significativas frente al tratamiento control que puede comprobarse directamente en la menor proliferación de raíces secundarias de las observadas en las plántulas del tratamiento control, ausencia acompañada de necrosis en los puntos de unión con la raíz principal.

La inoculación con los aislados de *Cladosporium* propició el mayor descenso en la emergencia de plántulas (60% menor al testigo), presentando diferencias significativa frente al control, aunque no entre los aislados inoculados. Al igual a como ocurriera con las inoculaciones con los aislados de *Alternaria*, es el sistema radicular el que se ve más claramente afectado por la inoculación, diferenciándose significativamente del testigo. Entre las plántulas clasificadas con ligeros defectos se observa un crecimiento anormalmente grande del epicotilo y hojas poco desarrolladas, en general se observa una ausencia casi total de sistema radicular secundario. En las plántulas anormales destacan las patentes necrosis estriadas de los tallos.

Los aislados de *Rhizopus stolonifer* presentaron diferencias significativas entre ellos, por lo que se realizó un análisis de la varianza para conocer el efecto que los dos aislados por separado tenían sobre la germinación-nascencia de las semillas de judía. Los resultados se muestran en las Tablas 4 y 5.

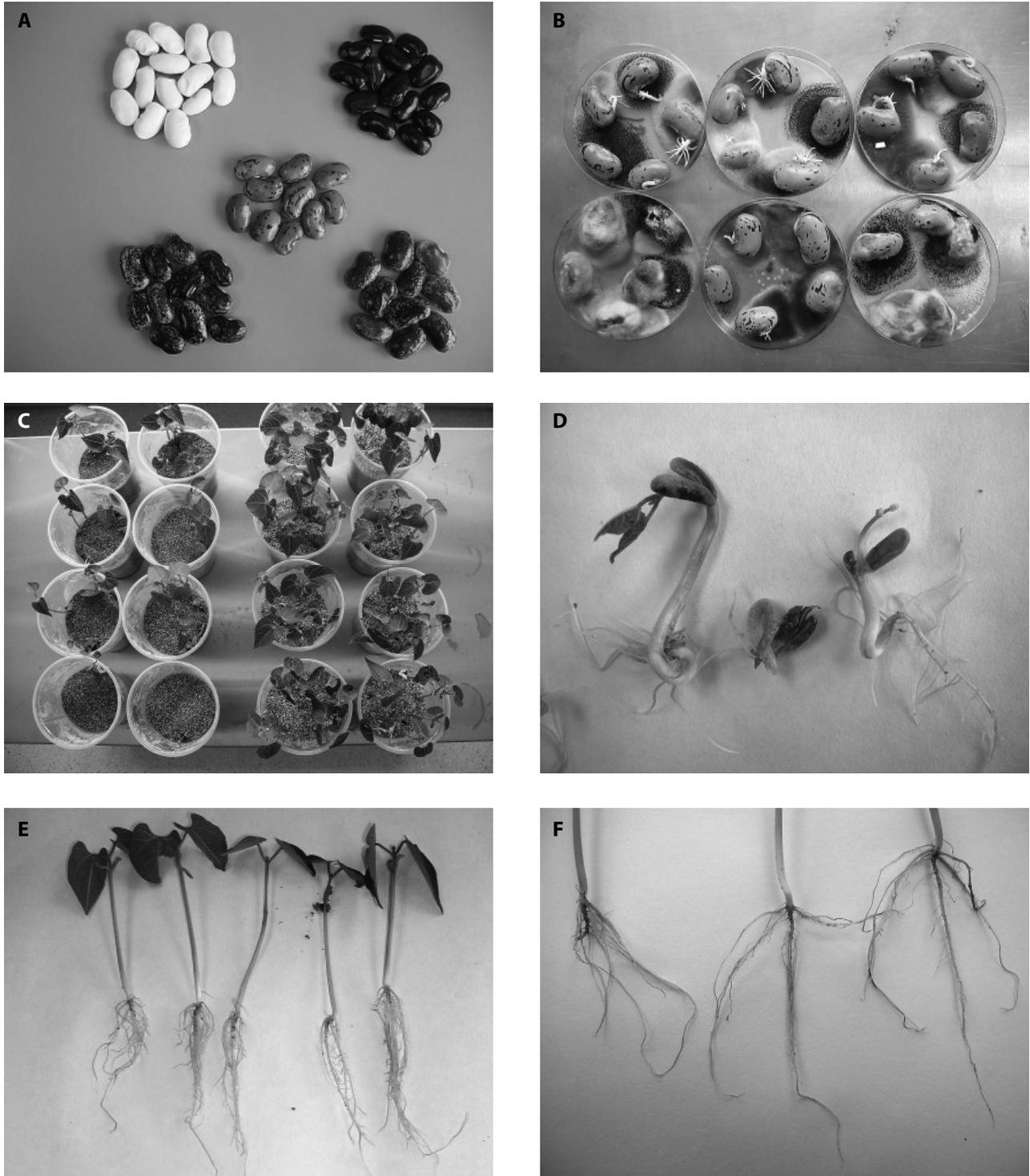
Aunque los dos aislados no presentan diferencias significativas en el número de plántulas emergidas tras el tratamiento, si que se aprecian diferencias en lo que a el tamaño final de las plántulas se refiere (Tabla 5). Hay que destacar el efecto claramente favorecedor del desarrollo de las plántulas inoculadas que presenta el aislado Rh1, cuya inoculación propició un aumento en la longitud de la parte aérea, medida desde la primera raíz secundaria hasta la yema terminal, significativamente diferente del control sin inocular. Destacan en las plántulas resultantes de la inoculación la baja afectación del sistema radicular.

Los resultados de las inoculaciones con los aislados de *A. flavus* difieren significativamente del tratamiento control en cuanto al porcentaje de emergencia, número de plántulas atrofiadas (Fig. 3D y 3E) y longitud de la raíz principal. La longitud de la parte aérea fue menor en las procedentes de semillas inoculadas, aunque no se observaron diferencias significativas frente al control sin inocular. Las plántulas evaluadas como normales presentaban epinastia y hojas de menor desarrollo que el tratamiento control, en las plántulas anormales, resultantes del 14,75 % de las semillas inoculadas, destaca el nulo desarrollo de las hojas y la presencia de abundante sistema radicular secundario, posiblemente propiciado por el ataque temprano del hongo a la raíz principal.

Al igual que la otra especie de *Aspergillus* presente en el estudio, la inoculación con *A. niger* afectó a la germinación y nascencia de las semillas, presentándose diferencias significativas. Destaca su efecto sobre la emergencia de plántulas, con un descenso en el porcentaje de plántulas emergidas del 55% frente al control sin inocular.

Al igual como sucediera con los aislados de *Rhizopus*, los resultados de las inoculaciones con los dos aislados de *Penicillium* se diferenciaron significativamente, procediéndose a estudiar dichas diferencias por separado frente al testigo mediante un análisis de la varianza. Los resultados se muestran en las Tablas 6 y 7.

Los resultados del análisis muestran la diferente capacidad parasitaria de ambos aislados, lo que indica la variabilidad genética del género. El aislado Pen1 afecta en mayor medida a la germinación y nascencia de la judía, destacando los porcentajes de plántulas atrofiadas que llegan hasta el 30,5 % del total de plántulas emergidas. Las plántulas anormales presentaron ciertas necrosis a lo largo del tallo y en el sistema radicular, donde la presencia de raíces secundarias fue muy baja (Fig. 3F). Al igual a como ocurría con uno de los aislados de *Rhizopus stolonifer*, la longitud de la parte aérea se ve aumentada en las semillas inoculadas con el aislado Pen2, si bien en este caso las diferencias no resultan significativas frente al control sin inocular.



**Figura 3.** A. Variedades cultivadas autóctonas de judión. B. Microbiota fúngica de las semillas. C. Drástica disminución de la germinación producida tras inoculaciones con *Alternaria alternata*. D-F. Plántulas intactas, y atrofiadas. Nótese las necrosis del sistema radicular y la ausencia de raíces secundarias.

Los resultados de la inoculación con los dos aislados de *Ulocladium botrytis* se muestran en la Tabla 3, presentándose diferencias significativas en los porcentajes de emergencia y atrofia, aunque no en la longitud de la parte aérea ni de la raíz principal.

Posiblemente el efecto de la inoculación sea muy temprano en la germinación y nascencia de las se-

millas provocando el descenso en la germinación, pero dicho efecto pernicioso se reduce una vez que las plántulas han comenzado a desarrollarse, lo que explicaría el hecho de ser el único género estudiado que no presenta diferencias significativas en la longitud de la raíz principal frente al control sin inocular.

**Tabla 6.** Análisis de la varianza para los caracteres germinación (%), atrofia (%), longitud de la parte aérea (mm) y longitud de raíz principal (mm) realizado para los dos aislados de *Penicillium*.

Fuentes de variación	g.l	Suma cuadrados	Cuadrados medios
<b>Germinación</b>	2	14103,3	7051,67
Error	57	16290,0	285,789
Total	59	30393,3	
<b>Atrofia</b>	2	9760,0	4880,0
Error	57	8725,0	153,07
Total	59	18485,0	
<b>Long. raíz</b>	2	285,698	142,849
Error	301	815,939	2,71076
Total	303	1101,64	
<b>Long. planta</b>	2	47,934	23,967
Error	317	10671,4	33,663
Total	319	10719,3	

**Tabla 7.** Comparación múltiple de los caracteres germinación, atrofia, longitud de la parte aérea y longitud de raíz principal para los diferentes aislados del género *Penicillium* inoculados (Diferencia mínima significativa con nivel de significación de 0.05)

Aislados	Porcentaje de emergencia	Porcentaje de atrofia	Longitud Raíz principal	Longitud parte aérea
T	93,0 ± 4,460 c	2,5 ± 2,578 a	10,942 ± 0,252 c	9,952 ± 0,474 a
Pen1	55,5 ± 3,780 a	30,5 ± 2,766 b	8,369 ± 0,251 a	9,834 ± 0,884 a
Pen2	72,5 ± 3,780 b	28,5 ± 2,766 b	9,476 ± 0,188 b	10,832 ± 0,66 a

Los géneros estudiados en este trabajo no se encuentran entre los de mayor importancia fitopatológica, sin embargo su papel en la germinación y atrofia o muerte de las plántulas de judión podría tener una trascendencia importante en la conservación de las variedades tradicionales cultivadas en nuestro país.

Es finalmente digno de destacar que las semillas procedentes de la agricultura ecológica, estudiadas en este trabajo no presentasen ningún hongo incitante de enfermedad en el cultivo, lo cual es tanto más significativo por cuanto las semillas no percibieron ningún tratamiento previo de desinfección.

### Agradecimientos

A Grupema S. L. por el apoyo económico otorgado (proyecto P060255833).

### Referencias

Association of Official Seed Analysts. 1981. Rules for testing seeds. J Seed Technol 6:1-126.

Barnett HL, Hunter BB. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess publishing company. Minneapolis, Minnesota: 241 pp.

Bilbao T, Fraga R, Montero D, Bueno L, Rojas T, Barroso A. 2000. Comportamiento y caracterización de la micoflora y entomofauna contaminante del frijol colorado (*Phaseolus vulgaris* L.) y el chícharo (*Pisum sativum* L.) durante su almacenamiento comercial

en condiciones ambientales. Alimentaria 37 (313): 69-74.

Boland GJ, Hunter JE. 1988. Influence of *Alternaria alternata* and *Cladosporium cladosporioides* on white mold of bean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. Canadian Journal of Plant Pathology 10(2): p. 172-177.

Díaz D, Tello JC. 1994. Un inventario fúngico de las semillas de lenteja (*Lens culinaris* Medik.) recolectadas en Castilla La Mancha. Bol. San. Veg. Plagas 20: 857-870.

Echandi 1971. Manual de laboratorio para fitopatología general. Ed. Herreros Hnos. S.A. México. 59pp.

Ellis MB. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Ed: C.A.B. Kew, Surrey, England. 608 pp.

Gomes JLL, Dhingra OD. 1983. *Alternaria alternata* a serious pathogen of white colored snap bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. Fitopatología Brasileira 8: 173-177.

González AJ. 2000. Microbiota patógena en semilla de judía tipo granja asturiana. Obtención de semilla saneada. Tesis Doctoral, Universidad de Oviedo, 132pp.

Hagler WM, Bowman DT, Babadoost M, Haney CA, Swanson SP. 1987. Aflatoxin, zearalenone and deoxynivalenol in North Carolina grain *Sorghum*. Crop Science 27: 1273-1278.

Harman GE. 1972. Deterioration of stored seeds by *Aspergillus ruber*, extraction and properties of a toxin. Phytopathology 62: 206-208.

- Komada H. 1975. Development of selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. Review of Plant Protection Research 8: 114-125.
- Morton JG, Hall R. 1983. Effect of spray timing and blossom coverage on field-scale control of white mold in white beans *Phaseolus vulgaris*, *Penicillium expansum*. Annual report of the Bean Improvement Cooperative. 26: p. 12-13.
- Palmero D, Iglesias C, Vares L, Sinobas J. 2006. Determinación de la capacidad parasitaria de la microbiota fúngica y de sus extractos acuosos en las semillas del cardo (*Cynara cardunculus* L.). Bol. San. Veg. Plagas 32: 659-672.
- Rao AV, Sivaprakasam K, Shanmugam N. 1969. New blight disease of onion caused by *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Bri. & Cav. Madras Agr J 56 (10): 667-669.
- Rodiño AP, Lema M, Páerez-Barbeito M, Santalla M, De Ron A. 2006. Assessment of runner bean (*Phaseolus coccineus* L.) germplasm for tolerance to low temperature during early seedling growth. Euphytica 155(1-2): p. 63-70.
- Rotem J. 1994. The genus *Alternaria*: biology, epidemiology and pathogenicity. APS Press. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota.
- Ruiz JA, Bentabol A, Gallego C, Angulo R, Jodral M. 1996. Mycoflora and aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* in greenhouse-cultivated green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Journal of food protection 59(4): p. 433-435.
- Schmit V, Baudoin JP. 1992. Screening for resistance to *Ascochyta* blight in populations of *Phaseolus coccineus* L. and *P. polyanthus* greenman. Field Crops Res. 30:155-165.
- Tello JC, González AJ, Vares F, Fuelle MA. 1990. Espermatoflora de las judías (*Phaseolus vulgaris* L.) para siembra de Asturias. ITEA, 86 (2): 67-74.
- Thom C, Raper KB. 1945. A manual of the Aspergilli. Balliere, Tindall & Cox, London.
- Tietjen KG, Schaller E, Matern U. 1983. Phytotoxins from *Alternaria carthami* chowdhury: Structural identification and physiological significance. Physiol. Plant Pathol. 23: 387-400.
- Tseng AC, Tu JC, Tzean SS, 1995. Mycoflora and mycotoxins in dry bean (*Phaseolus vulgaris*) produced in Taiwán and in Notario, Canada. Bot. Bull. Acad. Sin. 36: 229-234.
- Tu JC. 1985. Biology of *Alternaria alternata*, the causal agent of black pod disease of white bean in southwestern Ontario. Can. J. Plant Sci. 65: 913-919.
- Tu, JC. 1993; Effects of planting date, irrigation and rain on infection, disease severity and pod discoloration caused by *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Can. J. Plant Sci 73(1): p. 315-321.
- Vaughan DA, Kunwar IK, Sinclair JB, Bernard RL. 1988. Routes of entry of *Alternaria* sp. into soy bean seed coats. Seed Science and Technology 16: 725-731.