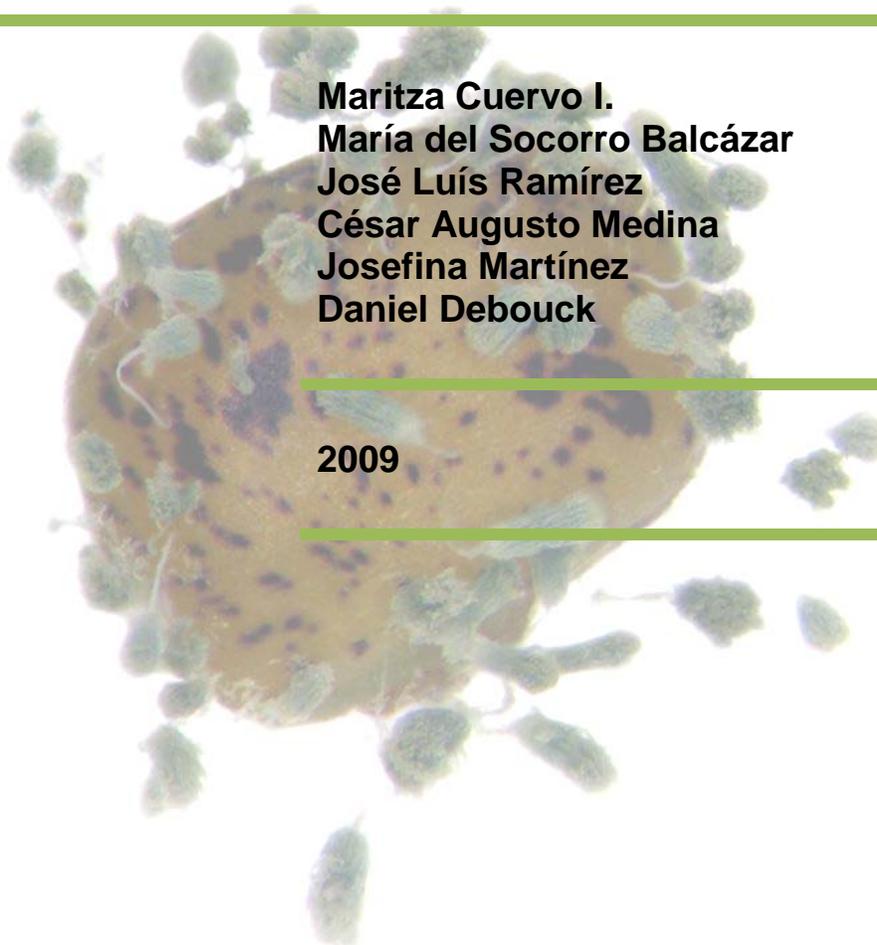


MANUAL DE OPERACIONES LABORATORIO SANIDAD DE GERMOPLASMA PROGRAMA RECURSOS GENÉTICOS



Maritza Cuervo I.
María del Socorro Balcázar
José Luís Ramírez
César Augusto Medina
Josefina Martínez
Daniel Debouck

2009



Centro Internacional de Agricultura Tropical
International Center for Tropical Agriculture
Consultative Group on International Agricultural Research



PROGRAMA DE
RECURSOS GENÉTICOS
Conservemos una Semilla de Soluciones

TABLA DE CONTENIDO

1.	Introducción.....	1
2.	Instalaciones	2
3.	Producción y manejo poscosecha.....	6
4.	Metodología para certificar el material genético a transferir.....	8
4.1	<i>Detección de hongos</i>	11
4.1.1	<i>Principales hongos en el cultivo de fríjol</i>	12
4.1.1.1	Mancha causada por <i>Alternaria</i> spp.....	12
4.1.1.2	Mancha de <i>Ascochyta</i>	14
4.1.1.3	Moho gris causado por <i>Botrytis cinerea</i> (estado asexual) y <i>Botrytinia fuckeliana</i> (estado sexual).....	14
4.1.1.4	Mancha de la hoja causada por <i>Cercospora canescens</i>	14
4.1.1.5	Antracnosis causada por <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	14
4.1.1.6	Amarillamiento o marchitamiento causado por <i>Fusarium oxisporum</i> y <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>Phaseoli</i>	15
4.1.1.7	Pudrición gris de la raíz y del tallo causada por <i>Macrophomina phaseolina</i>	15
4.1.1.8	Mancha angular de la hoja causada por <i>Phaeoisariopsis griseola</i>	16
4.1.1.9	Añublo de la hoja y tizón de la vaina, causado por <i>Phomopsis subcircinata</i> (estado asexual) y <i>Diaporthe phaseolorum</i> (estado sexual)	17
4.1.1.10	Mustia hilachosa causada por <i>Rhizoctonia solani</i> (estado asexual), <i>Thanatephorus cucumeris</i> (estado sexual)	17
4.1.1.11	Pudrición radical causado por <i>Rhizoctonia solani</i> (estado asexual), <i>Thanatephorus cucumeris</i> (estado sexual)	17
4.1.1.12	Moho blanco causado por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	18
4.1.1.13	Añublo sureño causado por <i>Sclerotium rolfsii</i>	18
4.1.2	<i>Procedimientos generales para el diagnóstico de hongos en semillas de fríjol (Phaseolus spp.)</i>	19
4.1.3	<i>Principales hongos en los cultivos de pastos tropicales y leguminosas forrajeras</i>	21
4.1.3.1	Mancha foliar causada por <i>Alternaria</i>	21
4.1.3.2	Mancha foliar causada por <i>Ascochyta</i>	22
4.1.3.3	Añublo de la inflorescencia y Pudrición del tallo causada por <i>Botrytis cinerea</i> ..	22
4.1.3.4	Manchas foliares causadas por <i>Cercospora</i> y géneros relacionados	23
4.1.3.5	Antracnosis.....	23
4.1.3.6	Mancha foliar y Añublo causado por <i>Curvularia</i>	24
4.1.3.7	Mancha foliar y Mancha en ojo causadas por <i>Drechslera</i>	25
4.1.3.8	Mancha foliar causada por <i>Helminthosporium</i> sp.	26
4.1.3.9	Decaimiento por <i>Fusarium</i> y pudrición de la raíz causada por <i>Fusarium oxysporum</i>	26
4.1.3.10	Carbón de la raíz causado por <i>Macrophomina phaseolina</i> (Tassi) Goid	27
4.1.3.11	Mancha foliar causada por <i>Pestalotiopsis</i> sp.	28
4.1.3.12	Mancha angular de la hoja causada por <i>Phaeoisariopsis griseola</i> (Sacc.) Ferraris	29

4.1.3.13	Mancha foliar causada por <i>Phoma sorghina</i>	30
4.1.3.14	Mancha foliar causada por <i>Phomopsis sp.</i> (Estado asexual: <i>Diaporthe phaseolorum</i> (Cooke and Ell.) Sacc.)	30
4.1.3.15	Mancha foliar causada por <i>Pyricularia</i> y Añublo del arroz	31
4.1.3.16	Añublo foliar causado por <i>Rhizoctonia solani</i>	32
4.1.3.17	Añublo de la inflorescencia, pudrición de collar y decaimiento causados por <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc. (Teleomrph. <i>Corticium rolfsii</i> Curzi).....	32
4.1.3.18	Ergot o añublo de la inflorescencia causado por el estado conidial de <i>Claviceps spp.</i> (<i>Sphacelia sp.</i>).....	33
4.1.3.19	Costra causada por <i>Sphaceloma arachidis</i>	33
4.1.3.20	Carbón causado por <i>Tilletia aryesii</i> Berk.	34
4.1.4	<i>Procedimientos generales para el diagnóstico de hongos en semillas de leguminosas forrajeras y pastos tropicales</i>	34
4.2	<i>Detección de bacterias</i>	37
4.2.1	<i>Principales enfermedades bacterianas en el cultivo de fríjol</i>	37
4.2.1.1	La bacteriosis común del fríjol.....	37
4.2.1.2	El añublo de halo.....	39
4.2.1.3	El marchitamiento bacteriano.....	39
4.2.2	<i>Principales bacterias en los cultivos de leguminosas forrajeras y pastos tropicales</i>	39
4.2.2.1	Añublo de la vaina, marchitez y muerte descendente.....	39
4.2.2.2	Añublo del halo.....	39
4.2.2.3	Bacteriosis	40
4.2.2.4	Marchitez bacteriana.....	40
4.2.3	<i>Procedimientos generales para el diagnóstico de bacterias en semillas de fríjol (Phaseolus spp.), leguminosas forrajeras y pastos tropicales</i>	40
4.2.3.1	Extracción y siembra.....	40
4.2.3.2	Identificación y diferenciación de las colonias bacterianas.....	42
4.2.3.3	Descripción de la serología usada en la identificación de las bacterias.....	43
4.3	<i>Detección de virus</i>	45
4.3.1	<i>Principales virus en el cultivo de fríjol</i>	47
4.3.1.1	Mosaico común del fríjol.....	47
4.3.1.2	Mosaico sureño del fríjol	47
4.3.2	<i>Principales virus en los cultivos pastos tropicales y leguminosas forrajeras</i>	48
4.3.2.1	El moteado del maní.....	48
4.3.2.2	Mosaico común del fríjol.....	49
4.3.2.3	Mosaico sureño del fríjol	49
4.3.2.4	Mosaico del Centrosema.....	49
4.3.3	<i>Procedimientos generales para el diagnóstico de virus en semillas de fríjol, leguminosas y pastos tropicales</i>	50
4.3.3.1	Método ELISA de doble sándwich (DAS-ELISA) realizado para el diagnóstico de SBMV.....	52
4.3.3.2	Método ELISA indirecto realizado para el diagnóstico de virus del género Potyvirus	54
5.	Documentación de los resultados de sanidad de fríjol y pastos tropicales.....	56
6.	Normas de seguridad en el laboratorio	58
7.	Bibliografía.....	60

8.	Anexos.....	63
8.1	<i>Anexo 1</i>	63
8.2	<i>Anexo 2</i>	64
8.3	<i>Anexo 3</i>	65
8.4	<i>Anexo 4</i>	66
8.5	<i>Anexo 5</i>	67
8.6	<i>Anexo 6</i>	68

1. Introducción

Las colecciones del Programa de Recursos Genéticos (PRG) del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) contienen 66,000 accesiones como muestras de semillas y de otros materiales vegetales reproductivos. Este germoplasma que representa 720 especies de fríjol, yuca y forrajes tropicales corresponde, en su mayor parte, a razas nativas no mejoradas.

Cada año, el PRG del CIAT distribuye en promedio de 5,000 a 6,000 muestras de material genético en respuesta a las solicitudes que se reciben interna y externamente, de diferentes partes del mundo. Estos materiales del banco de germoplasma pueden emplearse en la investigación, mejoramiento de cultivos, ensayos de campo, multiplicación de semilla, capacitación y en la misma conservación.

La conservación de germoplasma comprende un conjunto de actividades que van desde la adquisición, hasta la distribución, incluyendo los procesos de incremento, multiplicación, rejuvenecimiento y almacenamiento, en donde la sanidad juega un papel determinante en todas las etapas del proceso. Es de anotar que el PRG parte de la premisa que todo el material conservado debe ser un material certificado e inmediatamente disponible para ser distribuido.

La transferencia de este germoplasma libre de patógenos y plagas implica inicialmente una producción controlada de las semillas o del material vegetativo de propagación para intercambio, posteriormente un plan de manejo poscosecha que mantenga la sanidad de los materiales, y finalmente un proceso de análisis de laboratorio que certifique su calidad fitosanitaria. La primera parte del manual operativo del Laboratorio Sanidad de Germoplasma (LSG), se enfoca en las colecciones de semillas (fríjol y pastos tropicales) y la segunda parte se refiere a la certificación sanitaria de yuca.

Para minimizar los riesgos asociados al movimiento de germoplasma, especialmente el transporte de patógenos y plagas de interés cuarentenario, existe, mediante previo acuerdo, dentro de las instalaciones del CIAT, una oficina de la División de Sanidad Vegetal (Sección de Inspección y Cuarentena) del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), organismo adscrito al Ministerio de Agricultura de Colombia. Los objetivos de este acuerdo son:

- Prevenir la diseminación de enfermedades transmitidas por semilla y reducir al mínimo el riesgo accidental de introducir plagas y patógenos a Colombia.
- Supervisar los invernaderos de cuarentena donde se encuentra el germoplasma importado.
- Inspeccionar los lotes de multiplicación e invernaderos donde se realiza la multiplicación del germoplasma.
- Evaluar la sanidad de la semilla utilizada para los envíos internacionales basándose en las pruebas de sanidad realizadas en el Laboratorio Sanidad de Germoplasma (LSG).

Una vez cumplidas las etapas de producción y certificación, regularmente los materiales se despachan al país interesado, previa la obtención del certificado fitosanitario del Gobierno Colombiano. En el país receptor, los envíos son inspeccionados por las autoridades cuarentenarias respectivas.

2. Instalaciones

Dentro del PRG está el Laboratorio Sanidad de Germoplasma (LSG) que tiene la responsabilidad de informar sobre el estado fitosanitario del germoplasma que distribuyen el PRG y demás programas del CIAT certificando que esté libre de enfermedades cuarentenarias. En este laboratorio se realizan todas las pruebas sanitarias para el diagnóstico de patógenos como hongos, bacterias, virus y ocasionalmente nematodos y coleópteros que afecten las semillas. Adicionalmente, se realizan investigaciones en el manejo y caracterización de patógenos de interés cuarentenario y la estandarización de nuevas metodologías de diagnóstico que sean más eficaces y sensibles. Las instalaciones del LSG tienen 144.5 m² distribuidos en diferentes áreas que se describen en la Tabla 1 y Figuras 1 y 2.

Tabla 1. Descripción de las áreas del Laboratorio de Sanidad de Germoplasma (LSG).

Sección	Propósito	Área (m ²)	Equipos
Cuarto central	Recepción, etiquetado, registro, submuestreo, preparación de muestras y análisis microscópico.	53.7	Incubadora (2) Incubadora de precisión (1) Nevera de 4 °C (1) Congelador a - 20 °C (1) Cámara de extracción (1) Lupa (1) Estereoscopio (3) Microscopio óptico (2) Microscopio de fluorescencia (1)
Cuarto de diagnóstico molecular	Realización pruebas moleculares (RT-PCR).	6.9	Termociclador (1) Vortex (1) Microcentrífuga refrigerada (1) Microcentrífuga (1) Transiluminador de luz azul (1) Fuente de poder para electroforesis (1) Cámara de electroforesis (2)
Cuarto de Incubación	Incubación de las muestras bajo condiciones controladas de luz y temperatura, óptimas para el crecimiento de hongos.	6.9	Termómetro digital (1) Aire acondicionado (1) Estantería Lámparas de luz blanca Lámparas de luz cercana a UV
Cuarto de aislamiento para el análisis de hongos	Siembra de semillas en cajas petri y medios de cultivo para el diagnóstico de hongos.	7.3	Cámara de flujo laminar horizontal (1) Estantería
Cuarto de aislamiento para el análisis de bacterias	Siembra de semillas en cajas petri y medios de cultivo para el diagnóstico de bacterias. Pruebas de patogenicidad.	7.0	Cámara de flujo laminar horizontal (1) Cámara de flujo laminar vertical (1) Nevera (1) Incubadora (1)

Sección	Propósito	Área (m²)	Equipos
Detección de virus	Procesos para el diagnóstico de virus.	3.6	Máquina lavadora de platos de ELISA (1) Lector de ELISA (1)
Preparación de medios	Preparación, almacenaje de medios de cultivo y almacenamiento de reactivos.	9.3	Planchas eléctricas con agitadores magnéticos (4) pHmetro (1) Balanza analítica (2) Estantería
Área de lavado	Lavado del material de laboratorio.	14.4	Máquina de lavado de cajas petri (1) Lavaplatos (1) Estanterías con material de laboratorio
Cuarto de esterilización	Esterilización de medios y material de descarte.	6.5	Autoclave pequeña (1) Autoclave grande (1)
Cuarto frío	Almacenamiento de soluciones y muestras.	4.1	Termo de 25 l para N2 líquido (1) Estantería
Cuarto de maceración de muestras	Maceración y almacenaje de implementos de laboratorio.	10.1	Macerador de semillas grande (1) Maceradores de semillas pequeños (2)
Oficina principal	Ingreso de datos a la base de datos y reuniones.	7.48	Archivos con documentación (2) Estantería de libros (1) Computador (1)

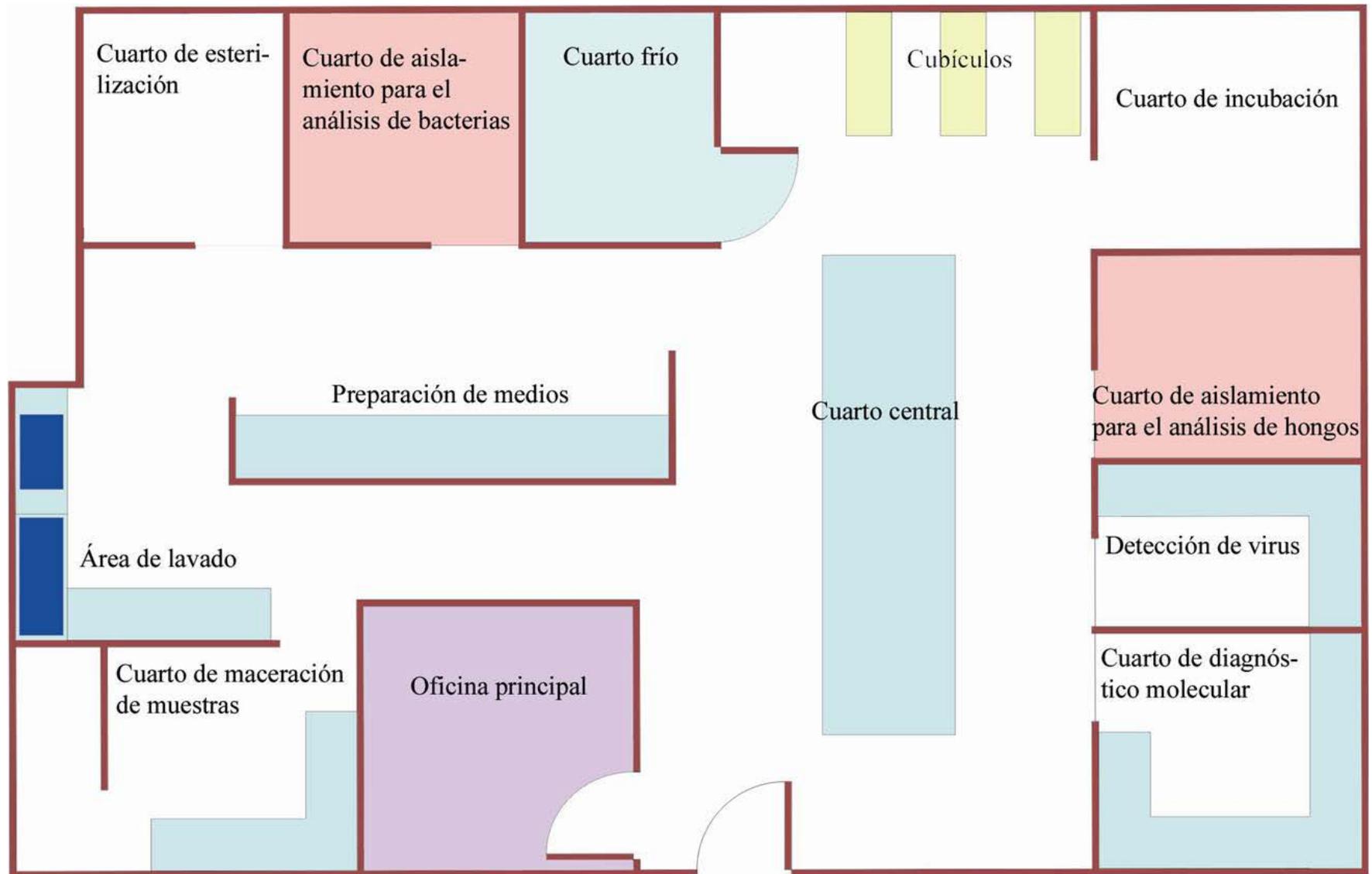


Figura 1. Plano del Laboratorio de Sanidad de Germoplasma (LSG).



Figura 2. Instalaciones del Laboratorio de Sanidad de Germoplasma. a) Área de preparación de medios, b) Cuarto de aislamiento para el análisis de bacterias, c) Cuarto de aislamiento para análisis de hongos, d) Cuarto de esterilización, e) Cuarto central, f) Cuarto de incubación, g) Cuarto de macerado de muestras, h) Cuarto de diagnóstico molecular, i) Detección de virus.



Advertencia: El Diseño del Laboratorio (distribución de áreas, instalaciones, procedimientos de trabajo, etc.) debe ser el adecuado para el mantenimiento de un buen nivel preventivo. El laboratorio, incluidas las zonas de paso, salidas, vías de circulación, equipos e instalaciones deben estar en perfecto estado de orden y limpieza, estableciendo para ello un mantenimiento periódico de las mismas.



Advertencia: Se debe disponer de las instalaciones de emergencia o elementos de actuación como extintores, que puedan ser de fácil acceso, siendo necesario que todo el personal conozca su funcionamiento.

3. Producción y manejo poscosecha

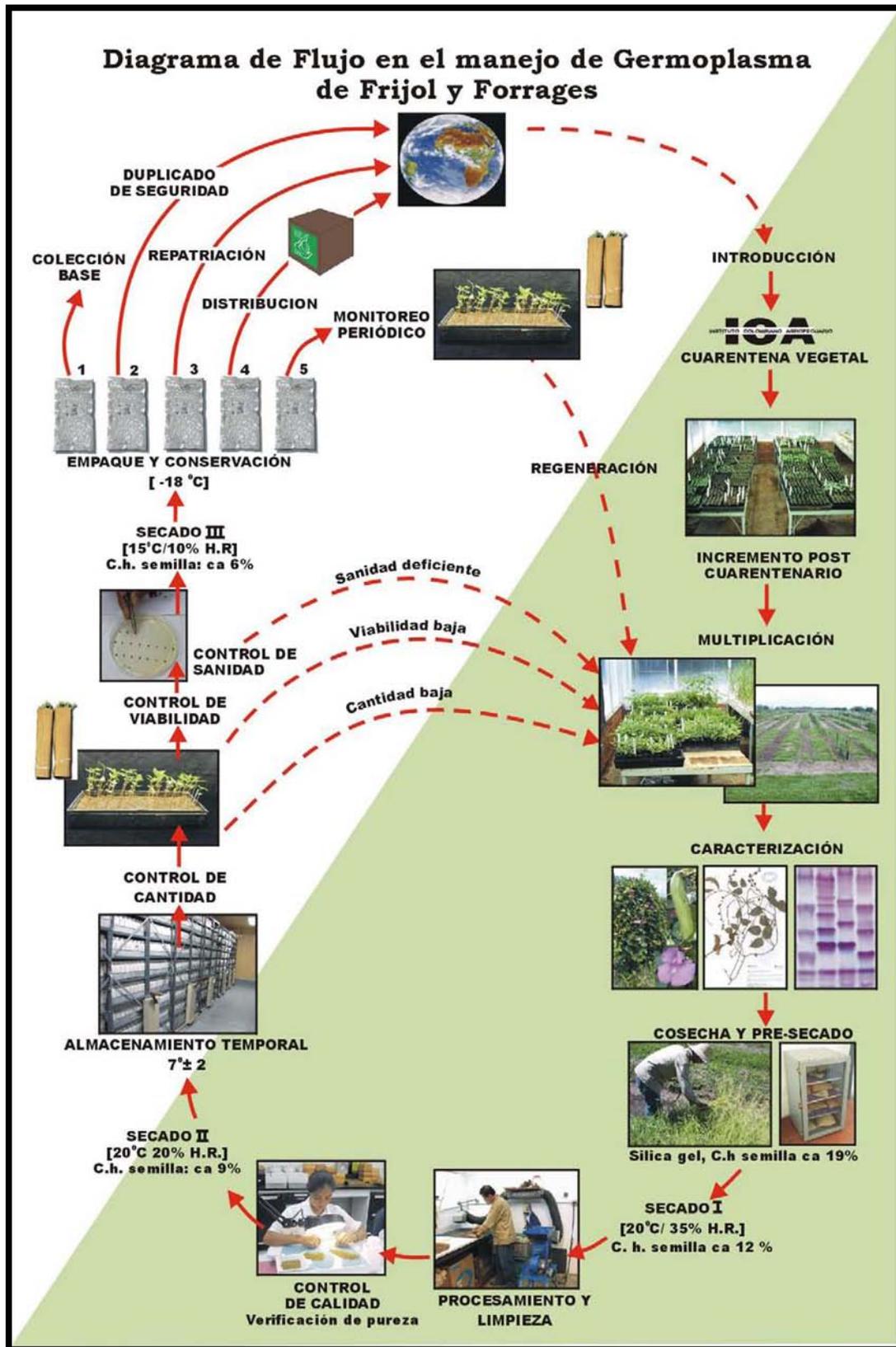
Para el PRG del CIAT es de gran importancia la producción y conservación de semillas de frijol, pastos tropicales y yuca de manera que cumplan con los requisitos de calidad requeridos para distribución internacional.

El germoplasma de frijol y forrajes se produce en parcelas controladas en las estaciones de Palmira, Popayán y Santander de Quilichao, campos aislados, invernaderos o casas de malla (Palmira, Popayán) en donde, además de otras medidas de control fitosanitario, cualquier planta que presente síntomas de una enfermedad conocida que se considere puede ser transmitida por semilla se remueve de inmediato.

Durante el proceso productivo, además de la supervisión de los científicos del programa o unidad respectiva, los lugares de producción son inspeccionados visualmente por un funcionario del ICA; quien verifica el buen manejo fitosanitario de los lotes para obtención de semilla y recolecta la información para expedir posteriormente el certificado fitosanitario.

La conservación de germoplasma y su distribución comprenden un conjunto de actividades que incluyen los procesos de adquisición, incremento, multiplicación, rejuvenecimiento, caracterización, control de calidad física y fisiológica y almacenamiento, en donde la sanidad juega un papel determinante (Flujograma 1).

Una vez los materiales han alcanzado su madurez fisiológica se cosechan, se clasifican, se seleccionan cuidadosamente, se inspeccionan para descartar los que muestran a simple vista síntomas de afecciones, y se verifica que no estén mezclados con esclerocios, quistes, insectos, partes de plantas, semillas de otros cultivos o cualquier otro material extraño. Después de esta limpieza, el material es enviado al LSG en donde es evaluado sanitariamente para patógenos de importancia cuarentenaria.



Flujograma 1. Diagrama de flujo en el manejo de Germoplasma de Frijol y Forrajes.

4. Metodología para certificar el material genético a transferir

No todos los organismos, virus, y otros agentes que se albergan en las semillas interna o externamente son patogénicos; sólo aquellos que son capaces de desencadenar un proceso infeccioso (enfermedad), en la semilla misma o en la planta, se les considera como patógenos transmitidos por semilla; el resto puede ser microflora saprofítica o degradadora, o simplemente contaminante que no ocasiona ningún daño o beneficio y no tienen importancia cuarentenaria.

La gran mayoría de patógenos que se encuentran en la semilla son los mismos que han afectado la planta madre durante su desarrollo y que, de una u otra manera, se establecen en esta importante estructura reproductiva. Generalmente, las infecciones ocurren bajo condiciones de campo por cuanto es el lugar en donde normalmente crecen los cultivos y en donde las plantas interactúan con los demás componentes del ecosistema.

La sanidad del germoplasma se refiere principalmente al estatus de enfermedad y la presencia o ausencia de plagas y microorganismos como hongos, bacterias, virus y nematodos en una muestra de semillas representativa de un lote o una accesión. Este procedimiento se hace con el fin de facilitar el intercambio de semilla evitando la dispersión de enfermedades y plagas en nuevas regiones [Kameswara et al. 2006].

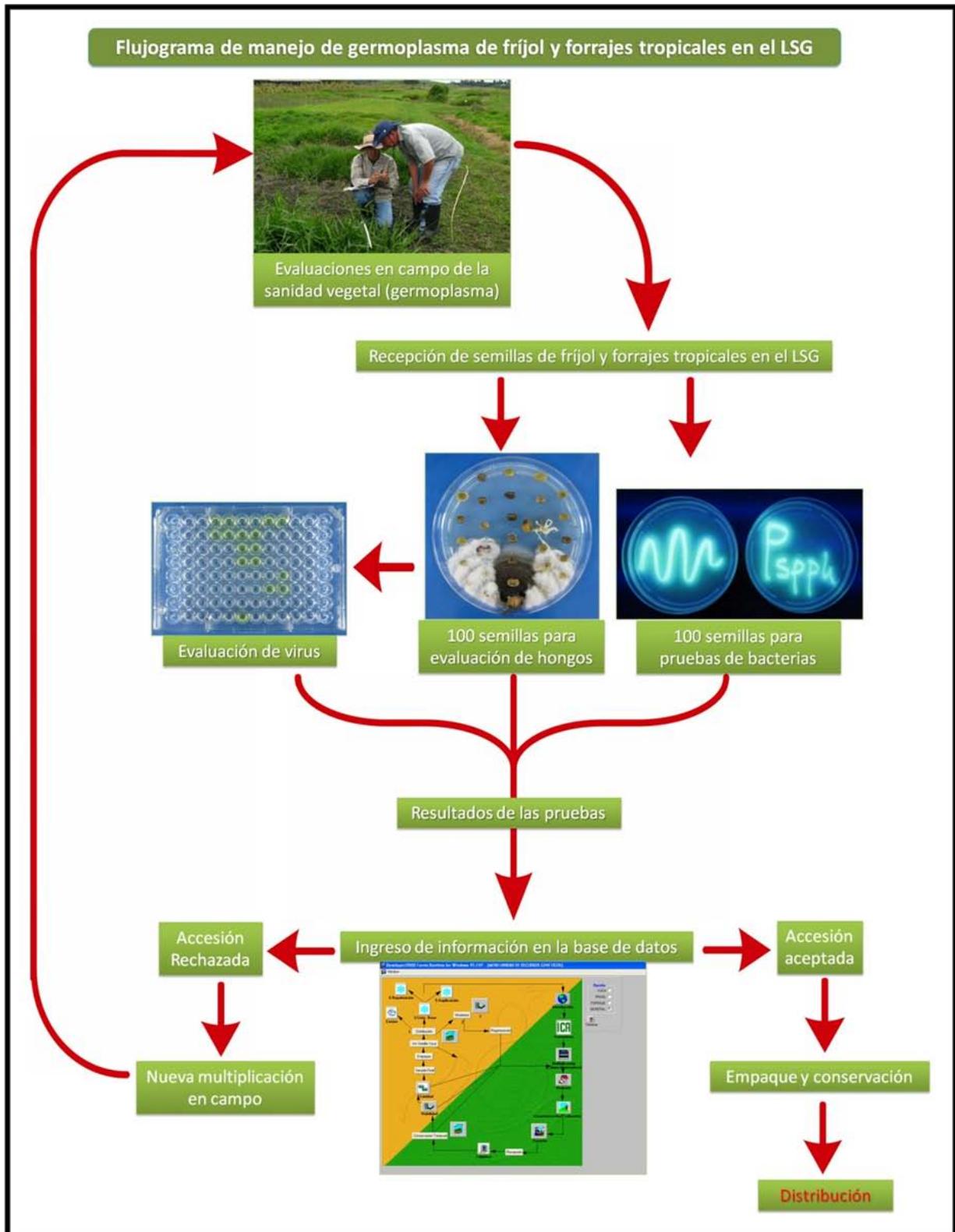
La metodología empleada para certificar la sanidad del material genético a transferir se fundamenta en los resultados de la inspección durante la producción y el procesamiento de las semillas realizando un control sanitario preventivo durante los ciclos de producción minimizando el riesgo de presencia de patógenos transmisibles por semilla, además de los resultados obtenidos en el análisis de sanidad en el laboratorio (Flujograma 2).

El laboratorio examina muestras de semillas para patógenos (hongos, bacterias, virus) de interés cuarentenario que ocurren en los lugares de producción o que se consideran como un riesgo sanitario de importancia en nuestro país o del país de destino, y que aparecen registrados en las guías técnicas para el movimiento de germoplasma (Frison et al. 1990). Adicionalmente se inspecciona la presencia de nematodos (*Meloidogyne spp.* y *Pratylenchus spp.*) y de algunos coleópteros (*Acanthoscelides sp.* y *Zabrotes spp.*) que pueden causar daño en las semillas (Tabla 2).

Los métodos para detectar patógenos pueden variar por cada organismo y huésped, y se requieren procedimientos definidos para una identificación precisa de la mayoría de patógenos [Kameswara et al. 2006].

Cuando un país determinado requiere pruebas adicionales con respecto a la sanidad de las semillas para otros patógenos, el LSG está en capacidad de realizarlas. Además en el laboratorio se cuenta con el recurso físico y humano para la realización de pruebas de diagnóstico molecular de diversos fitopatógenos.

Es de resaltar, que las muestras de germoplasma por analizar en el caso de fríjol, pastos tropicales y leguminosas forrajeras provienen del Área de Conservación y Empaque, previa limpieza y control de calidad. En el caso de yuca provienen del laboratorio de conservación *in vitro*.



Flujograma 2. Actividades para la realización de las pruebas de diagnóstico de fitopatógenos cuarentenarios en el LSG.

Tabla 2. Patógenos cuarentenarios evaluados en el LSG.

Frijol	Pastos Tropicales
Hongos	
<i>Alternaria</i> spp.	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler, Synonym: <i>Alternaria tenuis</i> (Nees).
<i>Ascochyta phaseolorum</i> Sacc. Current name: <i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i> Sacc. 1879	<i>Ascochyta</i> sp., <i>Ascochyta graminicola</i> Sacc., <i>Ascochyta paspali</i> (H. Sydow) Punith
<i>Botrytis cinerea</i> Pers. (Teleomorph. <i>Sclerotinia fuckeliana</i> (de Bary) Fuckel)	<i>Botrytis cinerea</i> Pers. (Teleomorph. <i>Sclerotinia fuckeliana</i> (de Bary) Fuckel)
<i>Cercospora canescens</i> Ellis & G. Martin	<i>Cercospora canescens</i> Ellis & G. Martin Synonym: <i>Mycosphaerella cruenta</i> Latham,
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. And Sacc.	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. And Sacc.
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (anamorph.), <i>Gloromella cingulata</i> (teleomorph.)	<i>Colletotrichum truncatum</i> (Schwein.) Andrus
<i>Colletotrichum truncatum</i> (Schwein.) Andrés	<i>Colletotrichum</i> spp.
<i>Fusarium oxysporum</i> Schldt. Y <i>F. solani</i> f. sp. <i>solani</i>	<i>Curvularia</i> spp.
<i>Macrophomina phaseolina</i> (Tassi) Goid	<i>Drechslera setaria</i> (S. Ito and Kuribay.) Dastur.; <i>D. sacchari</i> (Butler) Subram. and Jain
<i>Phoma exigua</i> Desmaz. var. <i>diversispora</i> (Bubak) Boerema	<i>Fusarium oxysporum</i> Schldt.
<i>Phomopsis subcircinata</i> (anamorph.), <i>Diaporthe phaseolorum</i> (teleomorph)	<i>Helminthosporium</i> spp.
<i>Phaeoisariopsis griseola</i> (Sacc.) Ferraris	<i>Macrophomina phaseolina</i> (Tassi) Goid
<i>Rhizoctonia solani</i> Kühn (Teleomorph <i>Thanatephorus cucumeris</i> (Frank) Donk.)	<i>Phoma exigua</i> Desmaz. var. <i>diversispora</i> (Bubak) Boerema
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Phoma sorgina</i> (Sacc.) Boerema, Dorenb, and van Kest.
<i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc. (Teleomorph. <i>Corticium rolfsii</i> Curzi)	<i>Phomopsis</i> sp. (Teleomorph. <i>Diaporthe phaseolorum</i> (Cooke and Ell.) Sacc.)
	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
	<i>Phaeoisariopsis griseola</i> (Sacc.) Ferraris
	<i>Pyricularia oryzae</i> Cavara o <i>Pyricularia grisea</i> (Cooke) Sacc.
	<i>Rhizoctonia solani</i> Kühn (Teleomorph <i>Thanatephorus cucumeris</i> (Frank) Donk.)
	<i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc. (Teleomorph. <i>Corticium rolfsii</i> Curzi)
	<i>Sphaceloma arachidis</i> Bitanc. & Jenk.
	<i>Sphacelia</i> sp. (Teleomorph. <i>Claviceps</i> spp.)
	<i>Tilletia aryesii</i> Berk.
Bacterias	
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>
<i>Curtobacterium flaccumfasciens</i>	<i>Curtobacterium flaccumfasciens</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Biotipo II	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Biotipo II
Virus	
	Centrosema Mosaic Virus (CMV)
Peanut Mottle Virus (PeMOV)	Peanut Mottle Virus (PeMOV)
Bean common mosaic virus (BCMV)	Bean common mosaic virus (BCMV)
Bean southern mosaic virus (BSMV)	Bean southern mosaic virus (BSMV)
Insectos	
<i>Acanthoscelides</i> sp.	<i>Acanthoscelides</i> sp.
<i>Zabrotes</i> spp.	<i>Zabrotes</i> spp.
Nematodos	
<i>Meloidogyne</i> spp.	<i>Meloidogyne</i> spp.
<i>Pratylenchus</i> spp.	<i>Pratylenchus</i> spp.

Para realizar los análisis de laboratorio, se toman al azar, de los paquetes a enviar o almacenar, muestras representativas no inferiores a 200 semillas; se subdivide la muestra principal en dos submuestras de 100 granos y se empaacan por separado en bolsas de papel nuevas. De esta manera son recibidas las muestras en el LSG. Al ingresar el germoplasma al LSG se le asigna un número secuencial interno con el fin de facilitar su manejo y evaluación, el cual llamaremos el número de muestra LSG.

Al recibir las muestras, paralelamente se recibe electrónicamente el listado de las accesiones con sus respectivas procedencias, el cual se verifica que corresponda a las muestras recibidas. Inmediatamente se realiza una tabla Excel en donde se registran todos los análisis por realizar con su respectivo número de muestra LSG (Anexo 1).

Este número de muestra LSG se escribe en las dos bolsas recibidas con las semillas para la realización de los respectivos análisis. Cada submuestra se procesa según el grupo de patógenos a diagnosticar mediante él o los procedimientos establecidos para cada uno, los cuales se describen a continuación.

4.1 Detección de hongos

Los hongos se definen como organismos eucariotas, productores de esporas, sin clorofila u otros pigmentos fotosintéticos, que se reproducen de manera sexual y asexual, y que pueden ser ameboideos o unicelulares, pero usualmente presentan estructuras somáticas ramificadas, filamentosas llamadas hifas y rodeadas de manera típica por paredes celulares que contienen quitina, celulosa, o ambas sustancias, junto con muchas otras moléculas orgánicas complejas [Alexopoulos & Mims, 1979; Argawal & Sinclair, 1987].

Estos patógenos pueden transportarse y transmitirse por semillas y por esta vía, es la forma más importante de perpetuación de los hongos fitopatógenos. Algunos hongos ingresan a las plantas y a las semillas a través de aperturas naturales, tales como los hidátodos, hilum, micrópilos, y aperturas estomatales, y a través de lesiones hechas por el granizo, la lluvia fuerte, la arena, animales, insectos, el hombre y otros microorganismos, aunque otros hongos utilizan mecanismos de presión, acción enzimática o ambos para penetrar directamente en las plantas y las semillas [Argawal & Sinclair, 1987].

Las enfermedades causadas por hongos producen en las plantas una amplia variedad de síntomas que incluyen putrefacción de las semillas, afección de plántulas en pre- y pos-emergencia, manchas cloróticas y necróticas, chancros, tizones, podredumbres húmedas o secas, agallas, abolladuras, costras, ahogamientos, marchitamientos y pústulas. Los síntomas de la enfermedad resultan de la acción de metabolitos tóxicos, disminución de nutrientes del huésped y/o sustitución mecánica de los tejidos del huésped [Argawal & Sinclair, 1987].

En el Laboratorio Sanidad de Germoplasma se hace la determinación del género de los hongos que aparecen en las semillas, teniendo especial interés en los hongos cuarentenarios (Flujograma 3). Esta determinación se realiza de acuerdo a los métodos de Blotter y de Agar plato aprobados como métodos estándar por la Asociación Internacional para la Evaluación de Semillas (ISTA) [Kameswara et al. 2006] y basados en claves taxonómicas para la identificación de hongos imperfectos como las de Gilman, 1957; Ellis, 1976; Nelson et al. 1983; Zillinsky, 1983; Hanlin, 1990; Hanlin, 1998; y Barnett et al. 1998.

4.1.1 Principales hongos en el cultivo de fríjol

La producción de fríjol se restringe mucho debido al ataque severo de enfermedades y plagas. Numerosos hongos pueden ser transmitidos internamente o como contaminantes superficiales de las semillas de *Phaseolus* spp. La mayoría de los hongos transmitidos por semilla se encuentran dentro de la testa; aunque también se pueden presentar algunas infecciones en el cotiledón o el embrión [Schwartz & Morales, 1994].

El efecto que los organismos transmitidos por semilla tienen en la germinación del fríjol no está bien documentado; sin embargo, se sabe que muchos hongos transmitidos en las semillas disminuyen la germinación en campo [Schwartz & Morales, 1994].

4.1.1.1 Mancha causada por *Alternaria* spp.

Estos hongos se consideran parásitos de heridas. Por lo general forman lesiones sólo sobre el tejido senescente durante los períodos de alta humedad y relativamente frescos. Sin embargo, *A. tenuis* también puede penetrar en la hoja y semilla directamente a través de los estomas [Schwartz, 1994]. Por lo general, las pérdidas en rendimiento por *Alternaria* no son considerables [Cardona et al., 1995]. Los conidios de *Alternaria* tienen septos transversales y longitudinales y se los conoce como dictiosporas, además son pardos y puntudos. (Fig. 3).

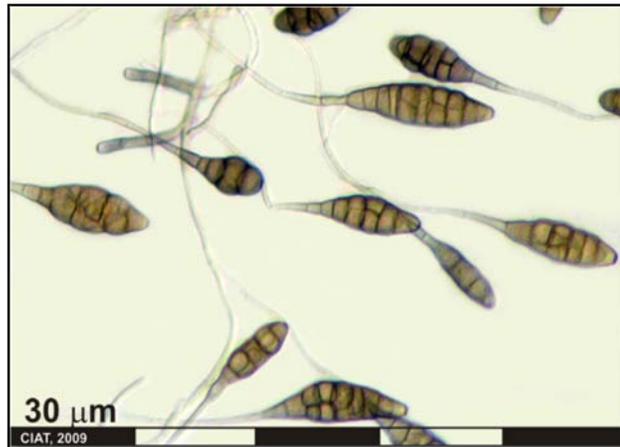
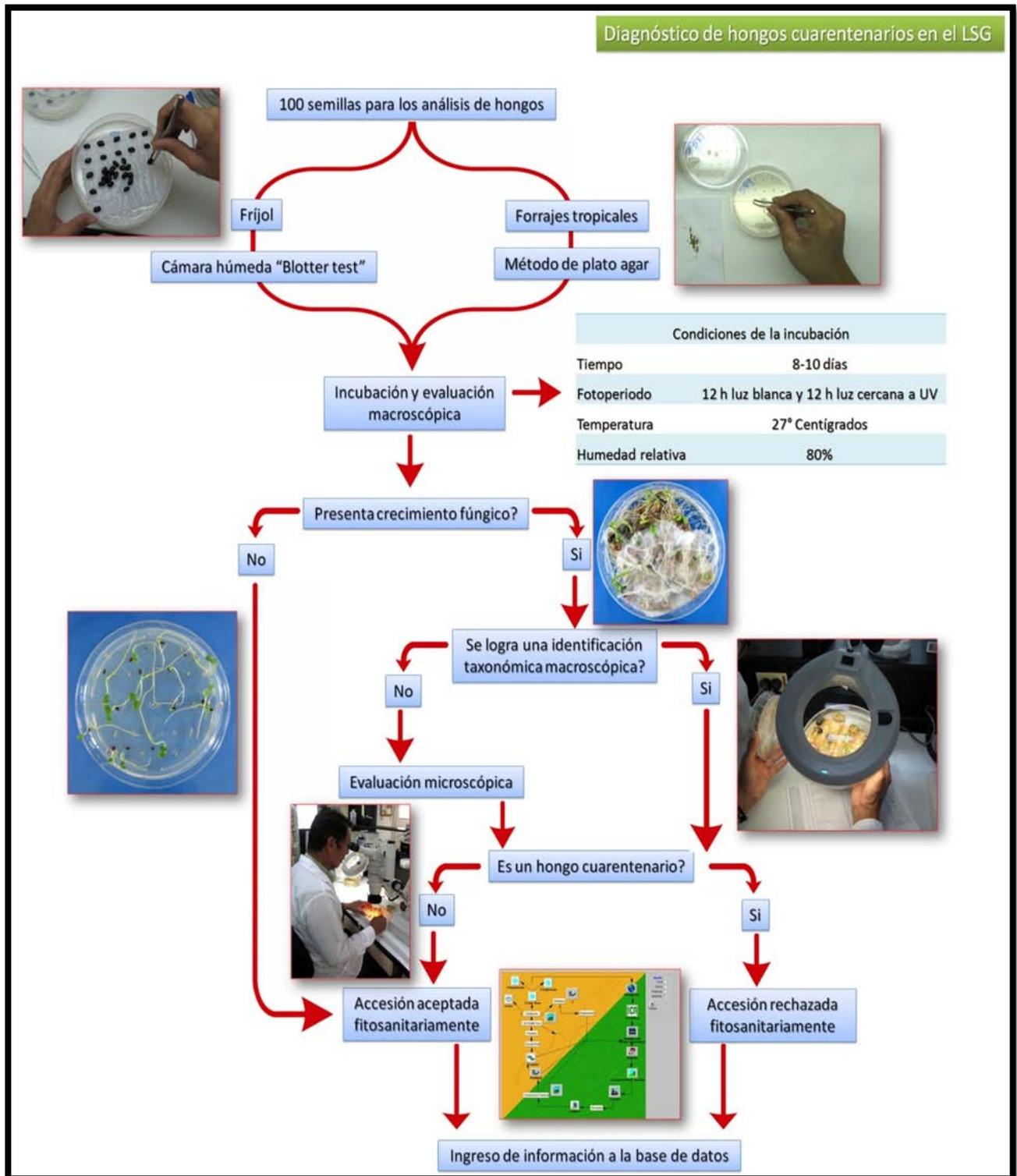


Figura 3. Conidios de *Alternaria alternata* a través de microscopio óptico.

Los síntomas comunes en las hojas incluyen manchas pequeñas, irregulares, de color café rojizo, rodeados por un borde más oscuro, que al agrandarse pueden formar orificios redondos en la lámina foliar. Las semillas pueden ser portadoras de *Alternaria* spp. de manera interna (cotiledones, embrión) [Cardona et al. 1995; Schwartz, 1994], aunque comúnmente es considerado como un saprófito o un parásito débil contaminando también la cubierta de la semilla y el pericarpo [Neergaard, 1977] y no es una causa importante de rechazo fitosanitario de las semillas.



Flujograma 3. Diagnóstico de hongos cuarentenarios en el LSG.

4.1.1.2 Mancha de *Ascochyta*

Esta enfermedad causada por *Ascochyta phaseolorum* y *Phoma exigua* var. *diversispora* es muy severa en regiones con más de 1500 msnm, con temperaturas frías a moderadas y alta humedad. Las lesiones son manchas de color café a gris casi circulares y concéntricas; el resultado de estas lesiones es la quemadura severa de las hojas [Cardona et al. 1995]. Las lesiones pueden formar anillos alrededor del tallo y causar la muerte de la planta [Schwartz, 1994].

El hongo puede difundirse sistémicamente en toda la planta incluyendo las semillas y causar la caída prematura de las hojas y muerte de la planta. El hongo puede transmitirse por los residuos contaminados de cosechas pasadas y por semilla, estableciéndose firmemente en la testa y siendo difícil de controlar por tratamientos de semillas [Cardona et al. 1995; Neergaard, 1977; Schwartz, 1994].

4.1.1.3 Moho gris causado por *Botrytis cinerea* (estado asexual) y *Botrytinia fuckeliana* (estado sexual)

El moho gris es una pudrición común en fríjol, es favorecida por heridas en los tejidos de la planta y puede ser más severa durante los periodos de alta humedad. Las plántulas pueden ser atacadas, pero por lo general, el daño es más común en las plantas más maduras que tienen vainas en contacto con el suelo [Cardona et al. 1995].

Los tejidos infectados del patógeno pueden formar varias estructuras como estomas negros y esclerocios sobre los cuales se pueden desarrollar conidios y apotecios similares a los producidos por *Sclerotinia sclerotiorum* [Cardona et al. 1995]. Los esclerocios de este hongo por lo general están adheridos a la cubierta de las semillas y el pericarpo [Neergaard, 1977].

4.1.1.4 Mancha de la hoja causada por *Cercospora canescens*

Los síntomas de esta enfermedad se manifiestan como lesiones de color café o amarillo a rojizo; tienen tamaños y formas variables. Con frecuencia las lesiones por *C. canescens* ocurren en las hojas más viejas, pero también en las vainas y en las ramas. Los síntomas se presentan en forma irregular, con un centro gris y un borde levemente rojizo. Algunas veces estas lesiones se secan, se desprenden y dejan un agujero [Cardona et al., 1995].

Este hongo puede ser transmitido por la semilla [Schwartz, 1994] y se ha descrito que la infección se encuentra en la cubierta de la semilla para *Cercospora kikuchii* en soya [Neergaard, 1977].

4.1.1.5 Antracnosis causada por *Colletotrichum lindemuthianum*

La Antracnosis es probablemente la enfermedad más importante de frijol en todo el mundo. La enfermedad puede ser devastadora. Causa completa pérdidas de rendimiento sobre los cultivares susceptibles de fríjol, o cuando se siembra la semilla muy contaminada y las condiciones favorables prevalecen durante todo el ciclo de crecimiento [Pastor-Corrales y Tu, 1994].

El desarrollo de la enfermedad es favorecido por temperaturas moderadas entre 13 y 26 °C, y humedad relativa mayor del 92%. Los síntomas aparecen en el envés de las hojas, localizados a lo largo de la nervaduras y peciolos, como manchas pequeñas de color rojo ladrillo a púrpura [Cardona et al. 1995].

El hongo puede sobrevivir tanto en semilla como en residuos de cultivos infectados; en la semilla puede sobrevivir por lo menos dos años, pero esto puede variar dependiendo de las condiciones ambientales. En las vainas los síntomas se muestran como lesiones casi circulares que se transforman en chancros

oscuros delimitados por un anillo negro; estos, en condiciones de baja temperatura y alta humedad contienen masas rosadas de esporas [Cardona et al. 1995]. Este hongo puede ser transmitido por la semilla después de penetrar las paredes de la vaina [Schwartz & Morales, 1994].

Colletotrichum lindemuthianum sobrevive como micelio latente dentro de la testa de la semilla y a veces, inclusive en las células de los cotiledones, o como esporas entre los cotiledones, o en otros sitios de la semilla. Para la germinación de las conidias, la incubación y la esporulación, se requiere una humedad superior al 92% [Pastor-Corrales & Tu, 1994].

4.1.1.6 Amarillamiento o marchitamiento causado por *Fusarium oxisporum* y *Fusarium solani* f. sp. *Phaseoli*

La infección ocurre generalmente a través de heridas en las raíces o en los hipocótilos y causa una coloración rojiza en el sistema vascular de la raíz, del hipocótilo, del tallo y de los peciolos. Los síntomas son amarillamiento y envejecimiento prematuro de las hojas, que progresan hacia las hojas jóvenes ubicadas en la parte superior de la planta y disminución en la producción de vainas y semillas [Cardona et al. 1995]. Estos patógenos penetran los tejidos radicales, generalmente por las puntas de la raíz. Después de la penetración, las hifas crecen inter-o intracelularmente e invaden los vasos del xilema en desarrollo. El hongo también puede crecer sobre la superficie del tejido infectado de la planta produciendo abundante micelio rosado y conidias. En *F. solani* f. sp. *solani*, las conidias pueden permanecer latentes en el suelo, o en el tejido infectado, con poca movilidad por un largo tiempo [Abawi, 1994].

El patógeno puede ser transportado por semilla en forma de esporas adheridas a la superficie de la testa, por suelo infectado, residuos de cosecha, o el agua de drenaje y riego [Abawi, 1994]. Los ataques en las plántulas producen plantas más pequeñas y atrofiadas [Cardona et al. 1995]. En pruebas de Blotter test la semilla infectada forma un micelio blanco algodonoso, que fácilmente coloniza las semillas cercanas (Fig. 4).



Figura 4. Semillas de frijol atacadas por *Fusarium oxisporum*.

4.1.1.7 Pudrición gris de la raíz y del tallo causada por *Macrophomina phaseolina*

El fitopatógeno tiene muchos hospederos. La enfermedad es muy severa en plantas de frijol que sufren estrés de sequía bajo temperaturas altas [Cardona et al., 1995].

Los síntomas se pueden observar como chancros negros en plántulas, antes o inmediatamente después de la emergencia, deprimidos en los tallos cerca de la superficie del suelo en la base de los cotiledones.

Los chancros, que tienen bordes bien definidos, a menudo presentan bordes concéntricos. La infección puede destruir el punto de crecimiento de la planta o quebrar el tallo en el lugar debilitado por el chancro. La lesión avanza hacia el hipocótilo y las raíces, y hacia los peciolo de las hojas primarias. En plantas viejas puede causar clorosis, defoliación prematura, atrofiamiento, y muerte [Schwartz, 1994].

En la semilla de fríjol se desarrolla un micelio oscuro, afectando todo el grano. Sus picnidios son oscuros, globosos, y largos, que contienen conidias grandes, uniceluladas fusiformes con puntas redondeadas, con un tamaño de 15 a 30 µm de largo [Schwartz, 1994] (Fig. 5).

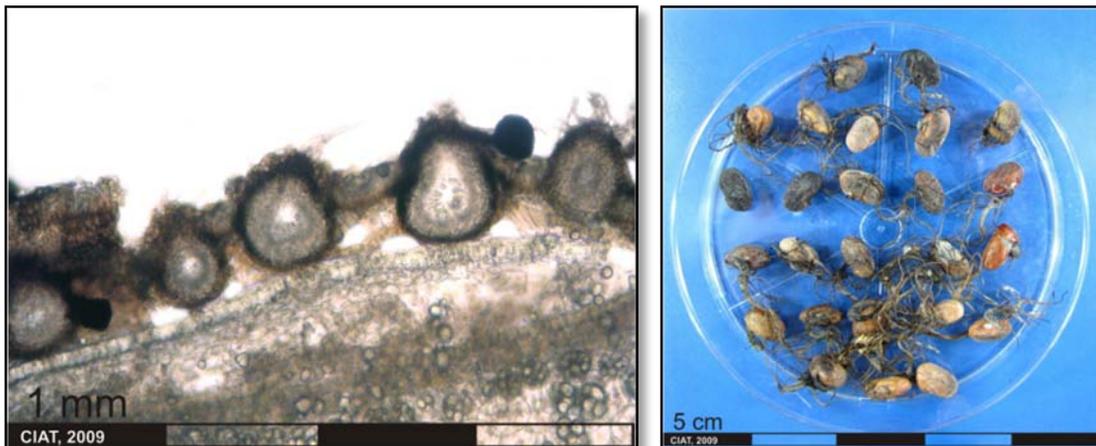


Figura 5. Semillas de fríjol infectadas con *Macrophomina phaseolina*. Al lado izquierdo se puede observar un corte longitudinal de los picnidios sobre la testa de la semilla de fríjol (nótese las conidias dentro de los picnidios). Al lado derecho se pueden ver los síntomas en semillas de fríjol con *M. phaseolina* (coloración negra sobre la testa de la semilla de fríjol y pudrición de la radícula).

4.1.1.8 Mancha angular de la hoja causada por *Phaeoisariopsis griseola*

La mancha angular causada por *Phaeoisariopsis griseola* es una de las enfermedades más importantes del frijol y se encuentra distribuida tanto en países del trópico y subtrópico

Los síntomas de la mancha angular causada por *Phaeoisariopsis griseola* se presentan en todas las partes aéreas de la planta. Las lesiones son más comunes en las hojas primarias. Inicialmente son lesiones grises o pardas, que pueden estar rodeadas por un halo clorótico, con márgenes definidos; aproximadamente nueve días después de la infección se tornan necróticas, y bien definidas con la forma angular típica [Correa-Victoria et al. 1994].

Las lesiones en las vainas se pueden ver como manchas ovales a circulares con centros rojizos-pardos, a veces rodeados por bordes de color más oscuro. Las vainas infectadas presentan semillas mal desarrolladas o arrugadas [Correa-Victoria et al. 1994].

La humedad es probablemente el factor individual más importante en el desarrollo de epidemias de Mancha Angular, y es un prerrequisito para la infección y la esporulación. La infección y el desarrollo de la enfermedad pueden ocurrir en un rango de temperaturas que va desde 16 hasta 28 °C. La semilla contaminada es una fuente de inóculo primario. El hongo está generalmente asociado con el área del hilo de la testa, aunque el hongo puede estar en otras partes de la testa [Correa-Victoria et al. 1994].

4.1.1.9 Añublo de la hoja y tizón de la vaina, causado por *Phomopsis subcircinata* (estado asexual) y *Diaporthe phaseolorum* (estado sexual)

Los síntomas iniciales aparecen sobre las hojas como manchas de forma irregular, de color marrón, con borde bien definido. Picnidios oscuros (estructuras sexuales) y ocasionalmente peritecios (estructuras asexuales) se distribuyen sobre la superficie total de la lesión. Se pueden presentar infecciones en las vainas, como lesiones descoloridas con presencia de picnidios. El hongo puede ser transmitido por semilla en plantas de frijol y soya.

Diaporthe phaseolorum produce hialina, ascosporas de forma oblonga, de un tamaño de 10-12 por 2-4 µm y presentan septas. Las ascosporas son producidas dentro de los peritecios de color oscuro y miden 300 µm de diámetro.

4.1.1.10 Mustia hilachosa causada por *Rhizoctonia solani* (estado asexual), *Thanatephorus cucumeris* (estado sexual)

Esta enfermedad prevalece más en el trópico húmedo con temperaturas entre moderadas y altas, y en estas condiciones la enfermedad puede causar pérdidas muy altas y destruir completamente un cultivo de frijol [Cardona et al., 1995].

Los primeros síntomas son pequeñas lesiones acuosas circulares en las hojas. En condiciones húmedas las lesiones crecen rápido y se unen formando áreas de color café rodeadas de bordes oscuros. Eventualmente el área afectada puede cubrir toda la planta, uniendo las hojas, peciolo, flores y vainas con un micelio en forma de telaraña, si las condiciones ambientales lo permiten [Cardona et al., 1995].

Las vainas de frijol se pueden infectar durante la etapa de llenado de grano. Cuando la vaina es joven, frecuentemente las lesiones son pardas claras y de forma irregular. El hongo puede infectar las semillas en el endospermo, extremo de la radícula del embrión y en la superficie de la testa [Gálvez et al., 1994]. La fuente principal de inóculo es la infección por esclerocios y fragmentos de micelio que se encuentren libres en el suelo o por desechos infectados [Cardona et al. 1995].

4.1.1.11 Pudrición radical causado por *Rhizoctonia solani* (estado asexual), *Thanatephorus cucumeris* (estado sexual)

La enfermedad se desarrolla en temperaturas de moderadas a bajas y en humedad del suelo de moderada a alta. El patógeno es transportado de manera interna en la semilla, puede atacar severamente las plántulas y causar podredumbre del pie ("damping off"), pudrición radical y chancros en el tallo (Cardona et al. 1995).

Los síntomas característicos de las plantas infectadas son chancros o depresiones de color café rojizo. Después, estos chancros aumentan de tamaño, se tornan más profundos y más rojizos y llegan a la medula, se presenta retraso en el crecimiento y eventualmente puede matar la planta.

Muchas veces se pueden encontrar esclerocios sobre los chancros o en el interior del tallo. Los esclerocios sirven como fuente de inóculo y pueden sobrevivir en el suelo. Este patógeno puede infectar vainas y ramas que estén en contacto con el suelo, causando manchas acuosas y lesiones profundas de color rojizo-pardas con bordes definidos a su alrededor. Las semillas contaminadas presentan decoloramiento y pueden transportar el hongo [Abawi, 1994].

4.1.1.12 Moho blanco causado por *Sclerotinia sclerotiorum*

Este patógeno está diseminado por todo el mundo, pero es más importante en las zonas templadas del hemisferio norte. El patógeno coloniza los tejidos senescentes de las plantas y después penetra en el hospedero a través de los tejidos con heridas. Inicialmente causa lesiones húmedas o acuosas seguidas por el crecimiento de un moho blanco, algodonoso [Cardona et al. 1995].

La infección del tallo va acompañada por el marchitamiento del follaje. Después de la infección el hongo produce esclerocios, los cuales al caer al suelo se diseminan al formar las estructuras reproductivas (apotecios) que liberan las esporas e infectan el tejido vegetal. El hongo también puede ser portado internamente por la semilla en los cotiledones y las semillas infectadas son completamente colonizadas por el hongo antes de la germinación y/o la emergencia de las plántulas [Cardona et al. 1995; Schwartz & Steadman, 1994]. El crecimiento de este hongo es similar al de *Sclerotium rolfsii*; sin embargo, se diferencia por la producción de esclerocios gruesos y oscuros.

4.1.1.13 Añublo sureño causado por *Sclerotium rolfsii*

La enfermedad se encuentra presente en muchas regiones, sobre todo en aquellas con temperatura y humedad altas. Inicialmente los síntomas se presentan como un amarillamiento de las hojas inferiores acompañado de una lesión oscura y acuosa, ubicada en el tallo o hipocótilo, debajo de la superficie del suelo. En la base del tallo es común observar la presencia de un micelio blanco y de esclerocios redondos y blancos a café claro. Las vainas en contacto con el suelo son atacadas y se pudren [Cardona et al., 1995].

Los cordones de micelios que se originan en residuos infectados o en esclerocios en germinación penetran al tejido del frijol, a través de aperturas naturales, heridas, o por penetración directa del tejido intacto. Después de la penetración, el hongo se ramifica rápidamente en los tejidos del tallo y de la raíz dando lugar a hidrólisis y muerte del tejido antes de la invasión [Abawi, 1994]. La forma de transmisión en semilla aún no está del todo clara [Neergaard, 1977].

Al realizar el diagnóstico por la técnica de blotter test el hongo produce en las semillas un micelio blanco densamente lanoso con producción de numerosos esclerocios globosos de colores café olivo a café claro (Fig. 6). Es de destacar que su micelio es estéril ya que no producen conidias [Gilman, 1957].

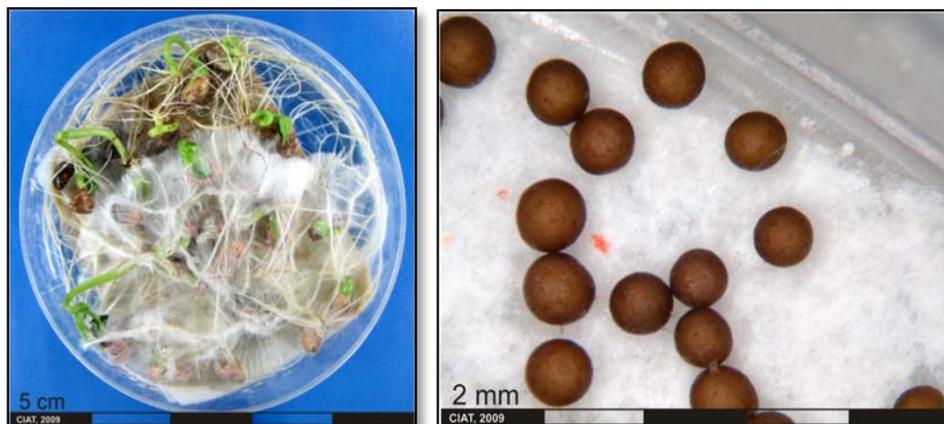


Figura 6. Semillas de frijol infectadas con *Sclerotium rolfsii* (izquierda) y esclerocios producidos después de 8 días de crecimiento micelial (derecha).

4.1.2 Procedimientos generales para el diagnóstico de hongos en semillas de fríjol (*Phaseolus spp.*)

Para el diagnóstico de hongos en las semillas de fríjol se usa la técnica de cámara húmeda (Blotter Test) [Kameswara et al. 2006], la cual se describe a continuación:

Las 100 semillas utilizadas en este diagnóstico se distribuyen en 4 cajas plásticas (25 semillas/plato). A cada caja se le escribe con marcador el número de muestra del LSG asignado inicialmente, teniendo cuidado que el número que está en la bolsa de semillas sea igual al número marcado en cada caja. Las cuatro cajas de una misma accesión son unidas con cinta adhesiva (Fig. 7).



Figura 7. Semillas de fríjol siendo depositadas en cajas de Petri con papel humedecido con agua destilada (técnica de Blotter test).

Colocar las semillas en intervalos uniformes sobre papel secante humedecido con 20 ml de agua estéril dentro de una caja plástica (Fig. 8).



Figura 8. Distribución de las semillas en 5 filas y 5 columnas por caja.

Al finalizar la etapa de ploteo o siembra, los platos debidamente identificados y sellados, se deben trasladar al cuarto de incubación ajustado a una temperatura entre 22 y 28°C, con ciclo de luz/oscuridad de 12 h/12h, cuya fuente lumínica corresponde a tubos fluorescentes de luz blanca fría con buena emisión de longitudes de onda cercanas a ultravioleta, en donde permanecen de 8 a 10 días (Fig. 9).

Después de la incubación se procede a realizar las lecturas correspondientes. Cada lectura es registrada en la tabla de Excel diseñada para el registro de los resultados, teniendo en cuenta el número de muestra del LSG (Anexo 1). En esta tabla se escriben los hongos cuarentenarios y saprofitos que algunas veces se presentan. Si alguna de las semillas se presenta infectada con algún hongo cuarentenario la accesión es rechazada.



Figura 9. Incubación de las semillas bajo condiciones controladas.

Para determinar la presencia de las estructuras características de cada uno de los hongos mencionados en la Tabla 2, primero se observan con lupa y después en el estereoscopio. Si se presenta alguna dificultad en la caracterización de un hongo, se realiza un montaje en portaobjetos, realizando un barrido de éste, lo que permitirá la observación de las estructuras reproductivas y así una mejor identificación (Fig. 10).



Figura 10. Análisis macro y microscópico de las semillas para identificar la presencia y crecimiento de géneros de hongos.

El material ya germinado y evaluado que no presente ningún hongo se aprovecha para la realización de las pruebas de virus (ver 4.3.3).



Advertencia: La manipulación de hongos y bacterias se debe realizar en cámara de flujo laminar, para evitar contaminaciones y riesgos en la salud humana.



Advertencia: Al usar mecheros se debe tener precaución para evitar incendios.

4.1.3 Principales hongos en los cultivos de pastos tropicales y leguminosas forrajeras

Numerosos patógenos de semilla pueden causar la muerte a las plántulas de leguminosas promisorias antes y después de la emergencia de éstas, o pueden reducir su vigor. En gramíneas, la mayoría de los patógenos hallados en su semilla son carbones, falsas royas, cornezuelos, y enfermedades de la inflorescencia. La mayor parte de ellos reducen la viabilidad de la semilla y causan su muerte en la etapa de pre- y pos-emergencia [Lenné & Ordoñez, 1991].

La determinación de la sanidad de las semillas de forrajes tropicales es un poco más compleja por cuanto incluye numerosas especies de leguminosas y gramíneas consideradas como forrajes importantes. La metodología empleada es similar a la utilizada para fríjol, teniendo en cuenta los patógenos y medios de cultivo recomendados. Para el análisis de estas semillas se utiliza el test en medio PDA (Potato Dextrose Agar). Un resumen de los principales hongos que afectan este grupo se muestra en la Tabla 2.

4.1.3.1 Mancha foliar causada por *Alternaria*

La mancha foliar por *Alternaria* se presenta principalmente por los géneros *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, synonym: *Alternaria tenuis* (Nees). Las manchas se forman como anillos concéntricos de tejido oscuro. Los síntomas iniciales aparecen en la punta de las hojas jóvenes como pequeñas manchas claras en los bordes [Lenné & Trutmann, 1994].

Esta especie de *Alternaria* generalmente se caracteriza por las cadenas conidiales largas y conidias marcadamente polimórficas. La característica de este hongo es su crecimiento conidial en fila y con forma cilíndrica, como en forma de botella, de color miel, o verde negruzco. En PDA su crecimiento miceliar es verde oscuro o negruzco (Fig. 11).

El hongo se ha reportado en un amplio rango de huéspedes dentro de los que se encuentran especies de los géneros *Desmodium* y *Stylosanthes* [Lenné & Trutmann, 1994]. En el Laboratorio de Sanidad de Germoplasma (LSG) se ha encontrado en semillas de fríjol, *Brachiaria* spp. y *Centrosema* spp., principalmente.

Su distribución geográfica es cosmopólita. Además su proceso infeccioso se presenta en semilla de manera externa en la cubierta de la semilla y el pericarpo [Neergaard, 1977], aunque se ha encontrado también internamente en embriones.

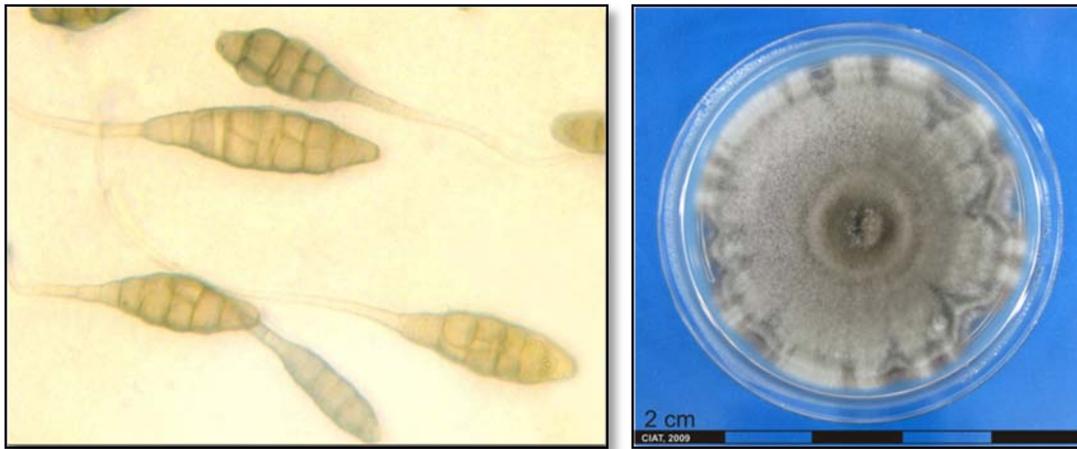


Figura 11. Conidias y crecimiento micelial de *Alternaria alternata*.

4.1.3.2 Mancha foliar causada por *Ascochyta*

Esta enfermedad es causada por hongos del género *Ascochyta* como *Ascochyta graminícola*, *Ascochyta paspali* además del hongo *Phoma exigua* var. *diversispora*. Las lesiones se desarrollan como manchas elongadas de color gris a amarillo-café, que se dispersan desde la punta de la hoja y subsecuentemente afectan las hojas completas [Lenné & Trutmann, 1994]. Este hongo se presenta también en semillas (Fig. 12) y se diferencia de *Phoma* spp. por su picnidio algo papillado (con boquilla más corta que en *Phoma* spp). Este hongo se ha encontrado sobretodo en la testa de las semillas, aunque por estar relacionado con *Phoma* puede transportarse en los tejidos internos.

Sus géneros hospederos en los forrajes tropicales son: *Andropogon* spp., *Macroptilium atropurpureum* y *Paspalum* spp., y su distribución geográfica se extiende por África, Asia, Australia, Nueva Zelanda, el Caribe, Islas del Pacífico y Sur América. Las conidias se dispersan por las gotas de lluvia y el hongo ha sido aislado de las semillas.

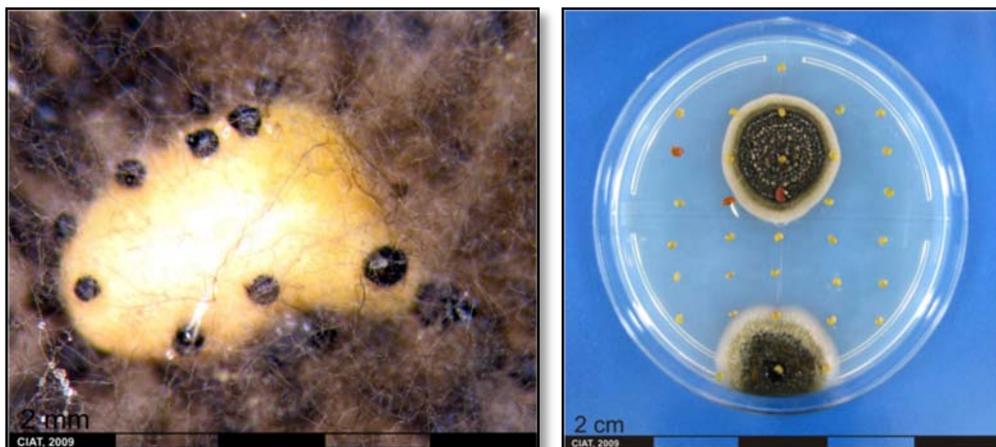


Figura 12. Semilla con presencia de picnidios de *Ascochyta graminícola* y su crecimiento micelial en PDA.

4.1.3.3 Añublo de la inflorescencia y Pudrición del tallo causada por *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea Pers. (teleomorph. *Sclerotinia fuckeliana* (of Bary) Fuckel) es un importante patógeno de muchos cultivos dentro y fuera del invernadero. El hongo produce lesiones húmedas, de color café, las cuales llegan a ser grisáceas secas, que pueden arruinar las inflorescencias y la

parte apical. Lesiones de color café en el tallo se desarrollan en donde la enfermedad se presentó [Lenné & Trutmann, 1994].

Su principal huésped es el género *Stylosanthes*, siendo reportado en las especies *S. guianensis*, *S. hamata*, *S. humilis* y *S. viscosa*, y con una distribución en Colombia y Zimbabue. Las conidias se diseminan de manera aérea y por las gotas de lluvia [Lenné & Trutmann, 1994]. Este hongo es transportado por semilla sobretodo en la cubierta de la semilla (testa), pericarpo y ocasionalmente en el hilum [Neergaard, 1977].

Las colonias son de color gris marrón o grisáceo, con apariencia polvosa. Presenta células conidióforas bifurcadas de 2 mm o más de largo.

4.1.3.4 Manchas foliares causadas por *Cercospora* y géneros relacionados

Las manchas foliares causadas por las especies de *Cercospora* han sido ampliamente reportadas en los forrajes tropicales. Las especies más comunes son *Cercospora canescens* y *Pseudocercospora bradburyae*. Los síntomas en la enfermedad son lesiones foliares, de angulares a circulares, de color negro o café, con halos cloróticos los cuales se expanden, especialmente bajo condiciones húmedas, causando clorosis, necrosis y defoliación prematura [Lenné & Trutmann, 1994]. El hongo afecta principalmente los tallos y ocasionalmente las semillas de las leguminosas, siendo transportado en la cubierta de la semilla; en el caso de *Cercospora kikuchii* en la soya [Neergaard, 1977].

Su distribución geográfica se reporta en Centro y Sur América así como en Australia, Barbados, Malasia, Filipinas, Puerto Rico y Sudán. Sus huéspedes son: *Arachis* spp., *Aeschynomene* spp., *Centrosema* spp., *Desmodium* spp., *Macroptilium atropurpureum*, y *Stylosanthes* spp. [Lenné & Trutmann, 1994].

4.1.3.5 Antracnosis

La Antracnosis es la enfermedad más ampliamente distribuida y perjudicial de varios forrajes a través del trópico. La enfermedad es producida principalmente por los hongos *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., (teleomorph *Gloromella cingulata* (Stonem.) Spauld. & Schrenk y *Colletotrichum truncatum* (Schwein.) Andrus & Moore, causando una reducción en la producción de materia seca con una disminución asociada en su valor nutritivo y pérdida de semilla [Lenné & Trutmann, 1994].

Los síntomas incluyen lesiones de 1-3 mm de diámetro con centros de color crema a gris claro y bordes oscuros en el peciolo y en la hoja, y lesiones oscuras de 2-6 mm de longitud y de color similar a las lesiones en las hojas en el tallo. Las lesiones en las hojas y el peciolo causan defoliación y se desarrollan en chancros [Lenné & Trutmann, 1994]. La infección del hongo en semilla se encuentra dentro de la testa y a veces aún en las células de los cotiledones, o en otros sitios de la semilla [Pastor-Corrales & Tu, 1994].

Ambas especies tienen una amplia variación en características morfológicas y culturales. Es difícil proporcionar una descripción estandarizada. En general, ambas especies crecen bien sobre medios de cultivo artificiales como el PDA. *Colletotrichum gloeosporioides* produce colonias blancas o colonias oscuras grises con cantidades variables de micelio y presencia o ausencia de septas. Las masas de esporas varían de pálido rosado a naranja brillante, sus conidias son simples ovoides u oblongas (Fig. 13). *Colletotrichum truncatum* produce colonias blancas o grises, por lo general abundantes septas y masa de esporas de gris a salmón brillante. *C. truncatum* se diferencia de la anterior por sus conidias en forma filiforme a lunada y su crecimiento micelial se presenta con picnidios con estructuras similares a tricomas (Fig. 14).

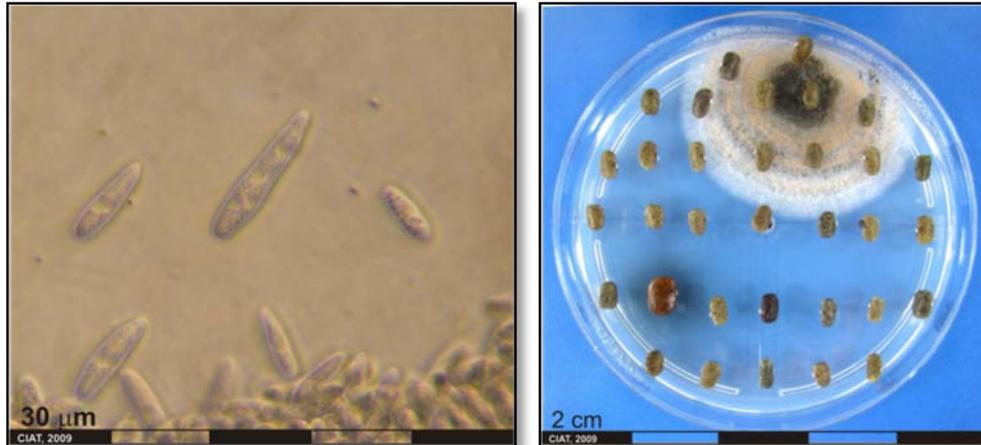


Figura 13. Conidias y crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Sus hospederos incluyen *Arachis* spp., *Aeschynomene* spp., *Calopogonium* spp., *Cassia* spp., *Centrosema* spp., *Desmodium* spp., *Leucaena* spp., *Macroptilium* spp., *Pueraria* spp., y *Stylosanthes* spp., y su distribución es mundial [Lenné & Trutmann, 1994].

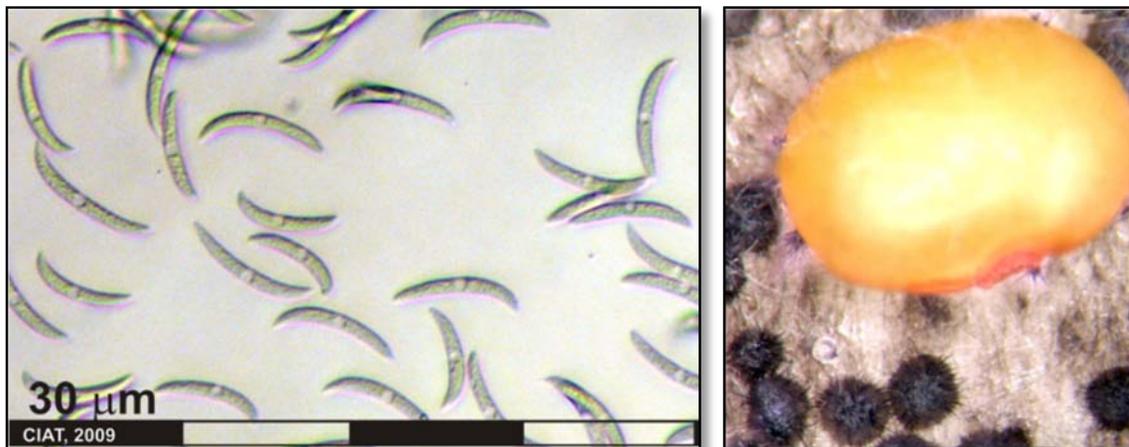


Figura 14. Conidias y crecimiento micelial de *Colletotrichum truncatum*.

4.1.3.6 Mancha foliar y Añublo causado por *Curvularia*

Esta enfermedad causada por *Curvularia lunata* y *Curvularia* sp. ha sido reportada en Australia, Florida, Carolina del Norte, Malaysia, Colombia y Trinidad. La mancha foliar por *Curvularia* es asociada comúnmente con lesiones pequeñas redondeadas de color café, las cuales raramente causan daños serios.

Este hongo se presenta de manera más frecuente en semillas de pastos, dentro de los tejidos de la semilla como el embrión, invadiéndolo de un 25 a un 38% en arroz [Neergaard, 1977]. Como su nombre lo dice, la característica de este género son sus conidias en forma curva, divididas en 3 ó 5 segmentos (Fig. 15).

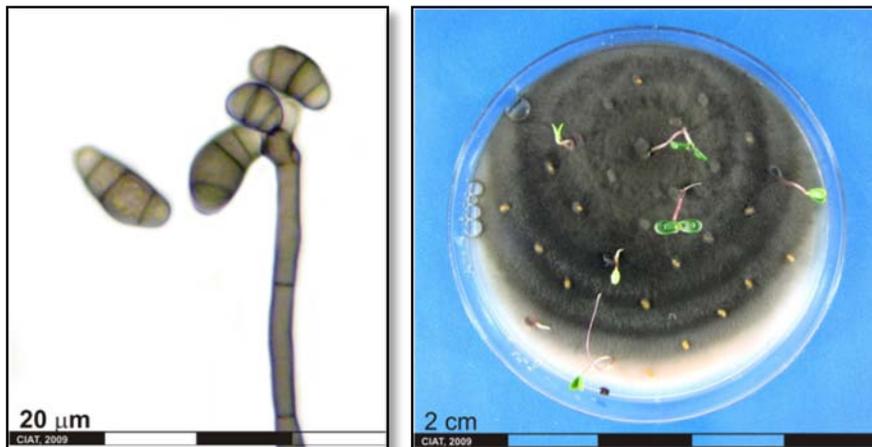


Figura 15. Conidias y crecimiento micelial de *Curvularia*.

Los huéspedes son especies de los géneros *Centrosema*, *Desmodium*, *Stylosanthes*, *Zoysia matrella*, *Z. japonica*, *Sorghum halepense*, *Brachiaria platyphylla*, *Setaria glauca* y *Cynodon dactylon* y arroz.

4.1.3.7 Mancha foliar y Mancha en ojo causadas por *Drechslera*

Varias especies de *Drechslera* como *Drechslera setariae* (S. Ito & Kuribay.) Dastur.; *Drechslera sacchari* (Butler) Subram. & Jain son importantes fitopatógenos y se asocian con síntomas como manchas negras en las hojas y pudrición de la raíz en las plántulas. Sus principales huéspedes son: *Cynodon dactylon*, *Brachiaria* spp., *Pennisetum purpureum* y caña de azúcar [Lenné & Trutmann, 1994].

En PDA su crecimiento micelial es de color grisáceo con manchas blancuzcas (Fig. 16) y en semillas se transportan en tejidos como glumas o pericarpo. Además los síntomas aparecen durante el crecimiento del parásito en el huésped. El punto de inicio de la infección es fuera del embrión. El micelio restante persiste principalmente en la epidermis del pericarpo. A medida que la semilla germina, las hifas penetran a través del coleópilo, coleoriza o raíz y crecen ascendentemente por la plántula [Neergaard, 1977].

Los conidioforos de *D. sacchari* aparecen separadamente o en racimos. Ellos son rectos o flexuosos, de color marrón oscuro a oliváceos, miden 20µm de largo y 5 -8 µm de ancho. Sus conidias son ligeramente encorvadas o de vez en cuando rectas, cilíndricas o un poco elipsoides, pálidas de color marrón oro, lisas, y presentan de cinco a nueve pseudoseptos.

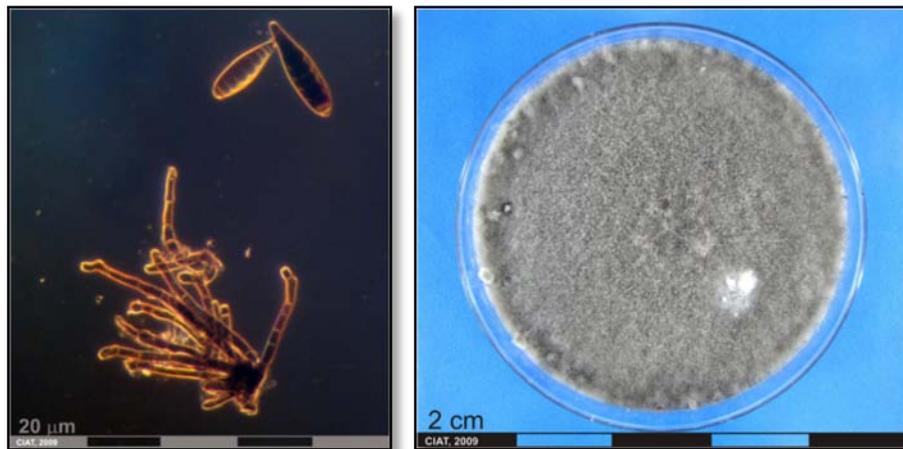


Figura 16. Conidias y crecimiento micelial de *Drechslera setariae*, en donde se aprecia los septos presentes en sus células reproductivas.

Los síntomas en la planta aparecen como lesiones de púrpura a café, de 1-4 mm de longitud en las hojas. Las lesiones tienden a formar manchas concéntricas en forma de ojos. Las hojas severamente afectadas se tornan de color café rojizo, se marchitan y luego mueren. La distribución geográfica es a través de América [Lenné & Trutmann, 1994].

4.1.3.8 Mancha foliar causada por *Helminthosporium* sp.

Las especies de *Helminthosporium* son agentes causales de varias enfermedades que ocurren en un enorme rango de plantas, incluyendo especies silvestres y cultivadas. La enfermedad se caracteriza por la formación de lesiones con forma de ojo, seguidas por su aumento de tamaño y coloración café-rojiza, que se extiende hacia la punta de la hoja [Lenné & Trutmann, 1994]. Este hongo se encuentra cercanamente relacionado con el género *Drechslera*.

Los huéspedes de esta enfermedad incluyen *Axonopus* spp., *Cynodon dactylon*, *Stylosanthes guianensis*, avena, centeno, arroz, caña de azúcar, sorgo, *Brachiaria decumbens* y *Panicum maximum* [Lenné & Trutmann, 1994].

4.1.3.9 Decaimiento por *Fusarium* y pudrición de la raíz causada por *Fusarium oxysporum*

En leguminosas el agente causal es *Fusarium oxysporum* Scheldt., synonyms: *Fusarium lateritium* f. *ciceris*, *Fusarium merismoides* f. *ciceris*, *Fusarium orthoceras* var. *ciceris* y los síntomas incluyen marchitamiento de hojas y brotes, clorosis de las hojas inferiores, defoliación, pudrición interna y muerte. Las plantas adultas son más tolerantes a la enfermedad [Lenné & Trutmann, 1994]. En este hongo se pueden observar conidias fusiformes con numerosos septos, y su crecimiento en PDA es blanco y lanoso profuso (Fig. 17).



Figura 17. Conidias y crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*.

Diferentes especies de *Fusarium* contaminan las cubiertas de las semillas y el pericarpo. Además, se han realizado estudios extensivos del añublo por *Fusarium* en centeno, demostrando que produce la infección más fuerte durante la floración. En este punto, las hifas penetran el hilum y el primordio de los coleópielos. El hilum es bloqueado y el transporte de nutrientes es obstaculizado, llevando a un incompleto llenado del grano. Si la infección tiene lugar después, durante la maduración del grano, éste se afecta en menor grado. Esta vez los tubos germinales de las conidias son capaces de penetrar solamente hasta el pericarpo. En cualquier otro punto entre esas dos fases de desarrollo del grano, la infección conduce a un daño gradual y disminución del peso del grano [Neergaard, 1977].

La enfermedad se ha reportado en: *Cicer arietinum*, *Cajanus cajan*, *Lens culinaris*, *Leucaena leucocephala* y su distribución geográfica es: Algeria, Bangladesh, Chile, Etiopía, India, Irán, Italia, Líbano, Malawi, México, Marruecos, Myanmar (Burma), Pakistán, Perú, España, Sudán, Siria, Tunisia y Estados Unidos [Lenné & Trutmann, 1994].

4.1.3.10 Carbón de la raíz causado por *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid

Esta enfermedad causa clorosis, marchitamiento severo y muerte de la mayoría de las plántulas. Se produce una pudrición de los tallos en desarrollo. La raíz que se encuentra cubierta se torna negra y después se pudre. El tallo también es atacado, el patógeno infecta rápidamente los frutos. Las semillas infectadas son decoloradas, pequeñas, arrugadas y tienen apariencia sucia (Fig. 18) [Lenné & Trutmann, 1994]. Aunque algunas semillas no muestran síntomas externos, la infección puede estar dentro de la semilla en el hipocótilo, en la radícula o en los peciolo de las hojas primarias [Schwartz, 1994].

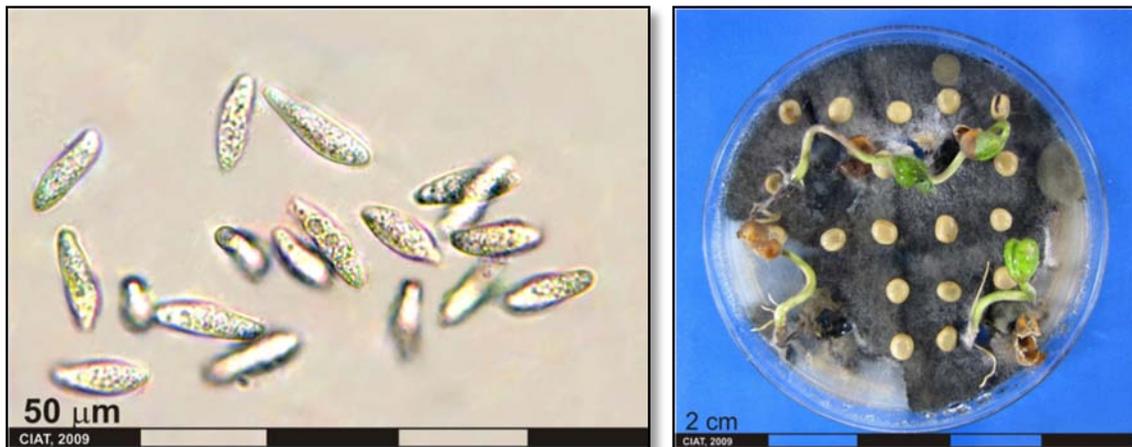


Figura 18. Conidias y crecimiento miceliar de *Macrophomina phaseolina* en PDA inoculado artificialmente en semillas de *Centrosema*.

La enfermedad se encuentra en un gran número de especies cultivadas tales como: *Arachis hypogaea*, *Cicer arietinum*, *Glycine max*, *Stylosanthes guianensis* var. *pauciflora*, *Stylosanthes capitata* y *Stylosanthes humilis*, de distribución mundial en regiones cálidas y templadas [Lenné & Trutmann, 1994].

4.1.3.11 Mancha foliar causada por *Pestalotiopsis* sp.

Los síntomas iniciales en tallos aparecen como manchas dispersas amarillas brillantes de 1 a 2 mm de diámetro que después llegan a levantarse en relieve. A medida que la enfermedad progresa las lesiones se fusionan formando grandes chancros, los cuales resultan en tallos no funcionales [Lenné & Trutmann, 1994]. Este hongo se presenta en semillas de leguminosas y su crecimiento miceliar se caracteriza por la presencia de gotas de color oscuro con conidias que poseen más de 4 divisiones (por lo general 5) y apéndices en uno de sus extremos (Fig. 19).

Sus principales huéspedes son: *Desmodium* spp., *Cassia* spp., *Psidium guajava*, *Vicia faba* y diversas frutas y plantas ornamentales [Lenné & Trutmann, 1994].



Figura 19. Conidias y crecimiento micelial de *Pestalotiopsis* sp.

4.1.3.12 Mancha angular de la hoja causada por *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris

Esta enfermedad produce una defoliación moderada a severa en condiciones frías, por eso la mancha angular de la hoja tiene un considerable efecto en la producción animal. Los síntomas iniciales de esta enfermedad presentan desarrollo de estructuras fúngicas oscuras, verdes grisáceas sobre la superficie inferior de las hojas. La unión de estas estructuras verdes grisáceas está comúnmente asociada con lesiones cloróticas, frecuentemente con lesiones angulares sobre la superficie superior de la hoja [Lenné & Trutmann, 1994]. Las lesiones en las vainas de fríjol no se han reportado en las leguminosas; la semilla contaminada con el hongo está generalmente asociada con el área del hilum de la testa, aunque el hongo puede estar en el hilum o en otras partes de la testa [Correa-Victoria et al. 1994].

Los hospederos de esta enfermedad son: *Desmodium cephalotu*, *Desmodium gangeticum*, *Desmodium pulchellum*, *Dolichos lablab*, *Macroptilium atropurpureum*, *Phaseolus lunatus*, *Phaseolus coccineus*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Vigna unguiculata*. Y se encuentra distribuida en Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, México, Panamá, Perú, Estados Unidos (Florida) y Venezuela [Lenné & Trutmann, 1994].

4.1.3.13 Mancha Foliar causada por *Phoma sorghina*

El agente causal de esta enfermedad es el hongo *Phoma sorghina* (Sacc.) Boerema, Dorenb & van Kest., que causa colapso de plántulas en pre- y pos-emergencia de varias leguminosas. Este patógeno también está comúnmente asociado con lesiones necróticas en las hojas de *Stylosanthes* spp. en la zona tropical de América [Lenné & Trutmann, 1994]. En semillas se caracteriza por la presencia de picnidios negros con puntas, y su crecimiento en PDA por lo general es de color rosado (Fig. 20).

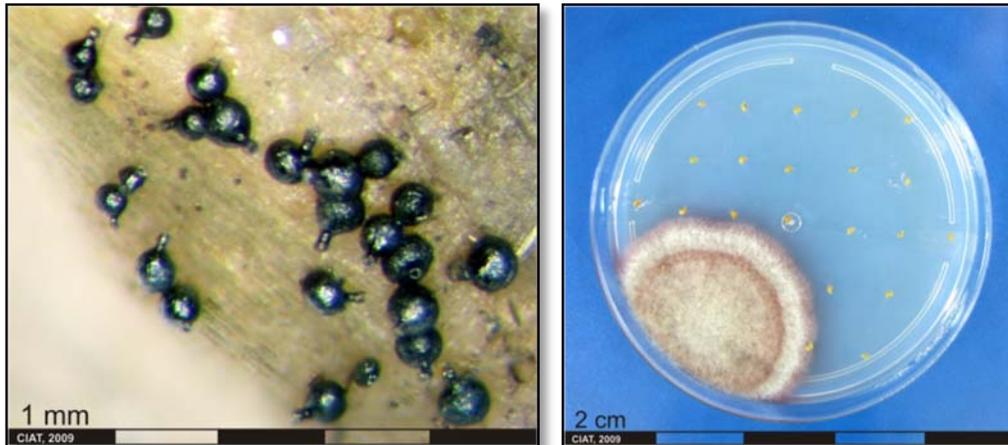


Figura 20. Picnidios en glumas de semillas de *Brachiaria* y crecimiento micelial en PDA.

Sus huéspedes son: *Desmodium* spp., *Brachiaria* spp., *Centrosema* spp., *Macroptilium atropurpureum*, *Stylosanthes* spp. y su distribución geográfica es Nigeria y Sur América [Lenné & Trutmann, 1994]. En semilla este hongo puede transmitirse de manera interna.

4.1.3.14 Mancha foliar causada por *Phomopsis* sp. (Estado asexual: *Diaporthe phaseolorum* (Cooke and Ell.) Sacc.)

El síntoma más notorio de la enfermedad es la presencia de picnidios en el material infectado. Los picnidios son estructuras negras fructificadas, las cuales se observan inicialmente en los peciolos. Otra característica clave es la apariencia de líneas de picnidios los cuales pueden cubrir grandes secciones del tallo o pueden aparecer en agrupaciones cerca de los nudos. A través del estereoscopio se observan picnidios oscuros, inmersos, casi globosos, pero la característica principal es la presencia de dos formas de conidias unas ovoides y otras filiformes [Lenné & Trutmann, 1994].

Su micelio en PDA es blanco y después de 8 días se torna de color amarillento (Fig. 21). Debido a su relación con *Phoma* spp., este hongo tiene la misma forma de transmisión en semilla (internamente en embrión y/o cotiledones). Se ha reportado que *Phomopsis leptostromiformis* permanece viable más de tres años en las semillas de *Lupinus luteus* [Neergaard, 1977].

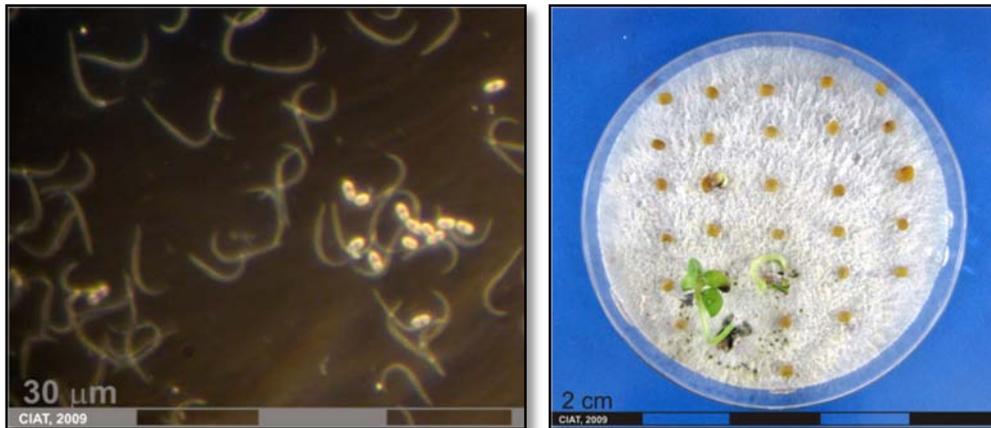


Figura 21. Conidias, picnidios y crecimiento micelial de *Phomopsis* sp.

Su distribución incluye los países de: Brasil, Colombia, África y Pacífico, y sus huéspedes en leguminosas son: *Centrosema* spp., *Desmodium* spp. y *Macroptilium atropurpureum*. La rotación de cultivos con una especie no leguminosa reduce la cantidad de inóculo disponible en la siembra [Lenné & Trutmann, 1994].

4.1.3.15 Mancha foliar causada por *Pyricularia* y Añublo del arroz

Pyricularia orizae es la causa del añublo del arroz y es uno de los patógenos más importantes de este cultivo debido a su distribución y naturaleza destructiva. Además, este hongo puede encontrarse en las semillas de pastos, sobretodo en *Lolium perenne*, *Pennisetum clandestinum* [Lenné & Trutmann, 1994]. El hongo presenta la mayor parte del tiempo conidióforos delgados, simples con conidias de forma obpyriforme a elipsoide, presentando hialinas con 2 ó 3 segmentos (Fig. 22).

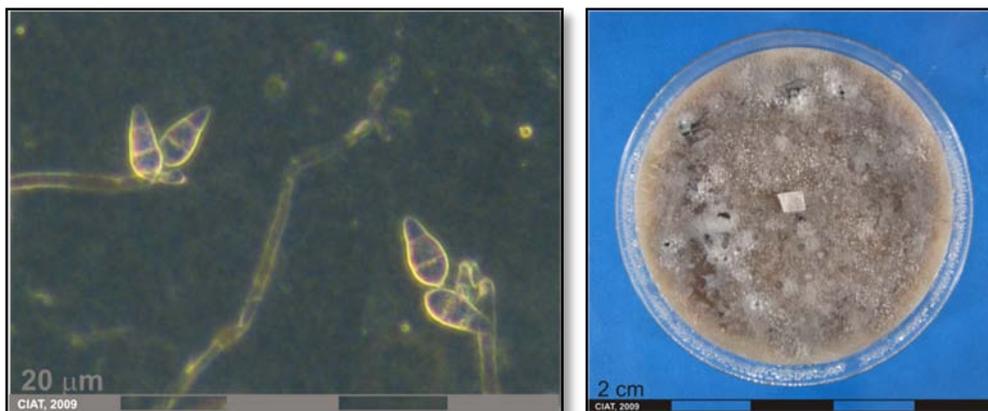


Figura 22. Conidias vistas a través de microscopio con contraste de fase y crecimiento de *Pyricularia orizae* en medio avena.

El hongo produce manchas o lesiones en las hojas de forma alargada, de color marrón uniforme y más tarde con centros grisáceos y bordes de color marrón. También produce daños en los nudos y en las diferentes partes de la panícula y los granos.

La transmisión por semillas de *P. orizae* se reportó por primera vez en Japón y después se diseminó por todo el mundo [Lenné & Trutmann, 1994]. Las investigaciones sugieren transmisión sistémica del hongo de las semillas a las plántulas. Se ha establecido que las conidias de *Pyricularia oryzae* en semillas de arroz almacenado bajo condiciones secas a temperatura ambiente viven más de 1 año,

mientras que el micelio puede sobrevivir por al menos cuatro años [Neergard, 1977]. El hongo es transportado por semilla en tejidos externos e internos.

4.1.3.16 Añublo foliar causado por *Rhizoctonia solani*

Este ataque fúngico causado por *Rhizoctonia solani* Kühn (Teleomorph *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk.) aparece inicialmente como lesiones húmedas en la parte superior del follaje. Bajo prolongadas condiciones de humedad, los parches se pueden extender, causando considerable pudrición y muerte del follaje. Su crecimiento miceliar es similar a una telaraña y afecta toda la semilla y la plántula al germinar [Lenné & Trutmann, 1994]. Sus esclerocios no tienen forma definida, pero su característica clave es que al observarlos a través del microscopio sus septos forman una “T” en su micelio y no hay presencia de conidias ya que éste es estéril (Fig. 23).



Figura 23. Micelio visto a través de microscopio con contraste de fase, que muestra septos formando una “T” y crecimiento miceliar en PDA.

Esta enfermedad se encuentra bien documentada y sus huéspedes son: *Aeschynomene americana*, *A. histrix*, *A. brasiliana*, *Arachis pintoii*, *A. glabrata*, *Brachiaria brizantha*, *B. decumbens*, *B. dictyoneura*, *B. humidicola*, *Calopogonium sp.*, *C. mucunoides*, *Cassia rotundifolia*, *Centrosema acutifolium*, *C. arenarium*, *C. brasilianum*, *C. macrocarpum*, *C. pascuorum*, *C. plumieri*, *C. pubescens*, *C. schiedeanum*, *C. tetragonolobum*, *C. virginianum*, *Desmodium ovalifolium*, *D. uncinatum*, *Desmodium sp.*, *Macroptilium atropurpureum*, *Neonotonia wightii*, *Panicum maximum*, *Pueraria phaseoloides*, *Stylosanthes capitata*, *S. guianensis*, *S. hamata*, *S. humilis* y *S. sundiaca*. La distribución geográfica de esta enfermedad es: Centro y Sur América, Florida, Malasia, Papua Nueva Guinea, Islas Solomón, Zambia y globalmente a través de los trópicos [Lenné & Trutmann, 1994]. El hongo puede infectar las semillas en el endospermo, extremo de la radícula del embrión y en la superficie de la testa [Gálvez et al. 1994].

4.1.3.17 Añublo de la inflorescencia, pudrición de collar y decaimiento causados por *Sclerotium rolfsii* Sacc. (Teleomorph. *Corticium rolfsii* Curzi)

El primer signo de ataque por *S. rolfsii* es usualmente un parcial o completo decaimiento y colapso de plantas aisladas. La parte inferior de las plantas es afectada, especialmente la región del collar y la que se encuentra alrededor del suelo; frecuentemente colonizada por un micelio blanco profuso y con pequeños esclerocios café. La forma de transmisión del hongo es dudosa, sugiriendo una transmisión externa por contacto con inóculos presentes el suelo [Neergard, 1977].

Este hongo es un patógeno no especializado con extensivo rango de huéspedes en leguminosas, tales como: *Stylosanthes spp.*, *Centrosema spp.*, *Desmodium spp.*, *Macroptilium atropurpureum*, *Cassia spp.*

Cajanus cajan. Su distribución geográfica es: Australia, Brasil, Colombia, Florida, Malasia, Panamá, Papua Nueva Guinea, Perú, Tailandia y Venezuela [Lenné & Trutmann, 1994].

4.1.3.18 Ergot o añublo de la inflorescencia causado por el estado conidial de *Claviceps* spp. (*Sphacelia* sp.)

Sphacelia sp., el estado anamórfico de diversas especies de *Claviceps*, es un serio problema en la producción de semillas de diferentes gramíneas como: *Andropogon gayanus*, *A. tectorum*, *Brachiaria* spp., *Cynodon*, *Hyparrhenia*, *Panicum maximum*, *Paspalum dilatatum*, *P. notatum* y *P. plicatulum* identificándose por su recubrimiento blanco (Fig. 24). Su distribución geográfica es: África, Australia, Asia, el Caribe y las Américas [Lenné & Trutmann, 1994].



Figura 24. Conidias, enfermedad en las espigas de *Brachiaria* y crecimiento micelial en PDA. Nótese el recubrimiento blancuzco de la espiga de gramínea.

El ergot aparece primero como un exudado azucarado o estado sphacelial en inflorescencias jóvenes a las pocas semanas después de la emergencia. Este exudado es un líquido pegajoso, azucarado, el cual atrae a insectos y facilita el crecimiento de otros hongos [Lenné & Trutmann, 1994]. Aunque el hongo infecta directamente el ovario, no se ha podido encontrar que se transporte internamente en la semilla ya que después de su desinfección no crece en el PDA. La infección por el hongo del ergot ocurre al inicio de la antesis, aún cuando la flor no está fertilizada. El tubo germinal invade al ovario cerca a la base del ovulo, y el micelio se dispersa intracelularmente en la pared del ovario, y subsecuentemente en el ovulo [Neergaard, 1977].

4.1.3.19 Costra causada por *Sphaceloma arachidis*

La costra es causada por *Sphaceloma arachidis* Bitanc. & Jenk. y es común en hojas, peciolo y tallos. Afecta las plantas aparentemente quemándolas. Pequeñas manchas cloróticas se dispersan uniformemente o en agrupaciones cerca a las venas de ambos lados de las hojas. El máximo tamaño de las manchas es menor a los 2 mm. Los tallos y peciolo presentan una apariencia quemada [Lenné & Trutmann, 1994].

El hongo produce fructificaciones bajo alta humedad [Lenné & Trutmann, 1994]. Este hongo es transportado en semilla de manera externa en la testa, aunque su incidencia es muy baja. Su distribución geográfica abarca a Brasil, Colombia, Argentina y Japón, y está reportada en *Arachis glabrata*, *Arachis pintoi* y en *Zornia* spp. Existe alguna evidencia de la posible transmisión por semilla, pero esas observaciones requieren subsecuentes trabajos de investigación [Lenné & Trutmann, 1994].

4.1.3.20 Carbón causado por *Tilletia aryesii* Berk.

El carbón causa pérdidas sustanciales en la producción de semilla en América tropical. Aunque la producción de semilla se ve reducida, el vigor de la planta parece no afectarse. Las espiguillas de las inflorescencias se llenan de masas de esporas grisáceas, las cuales se liberan en una nube gris, cuando la inflorescencia se mueve. Su huésped es el pasto *Panicum* spp. y su distribución geográfica es a través de África, Asia, el Caribe y América tropical [Lenné & Trutmann, 1994].

Como las esporas son transportadas por el aire, la infección de las flores expuestas ocurre rápidamente. Las plantas silvestres alrededor de las pasturas son la mayor fuente de infección. Las hifas de este hongo causan una infección sistémica en las plántulas, y puede ser transportado por la testa y las glumas de las semillas [Neergaard, 1977].

4.1.4 Procedimientos generales para el diagnóstico de hongos en semillas de leguminosas forrajeras y pastos tropicales

Para analizar las semillas de leguminosas se sigue la metodología de Agar Test [Kameswara et al. 2006], el cual se describe a continuación:

Realizar un lavado de las semillas sumergiéndolas por 10 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 1% y dejar secar sobre papel absorbente, teniendo especial cuidado en evitar confusiones en la numeración respectiva (Fig. 25).



Figura 25. Lavado de las semillas en solución de hipoclorito de sodio al 1% y secado en papel absorbente.

Igualmente como en el diagnóstico en frijol las 100 semillas utilizadas se distribuyen en 4 cajas plásticas (25 semillas/plato), con medio PDA debidamente marcadas (Preparación del medio Anexo 2). A cada caja se le escribe con marcador el número de muestra del LSG asignado inicialmente, las cuatro cajas de una misma accesión son unidas con cinta adhesiva (Fig. 26).



Figura 26. Distribución de las semillas en las cajas con medio PDA.

Al finalizar la etapa de platio o siembra, las cajas identificadas se deben sellar para así almacenarlas en un cuarto de incubación ajustado a una temperatura entre 22 y 28°C, con ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h. La fuente lumínica es suministrada por tubos fluorescentes de luz blanca fría con buena emisión de longitudes de onda cercanas a ultravioleta, en donde las cajas permanecen de 8 a 10 días (Figura 27).

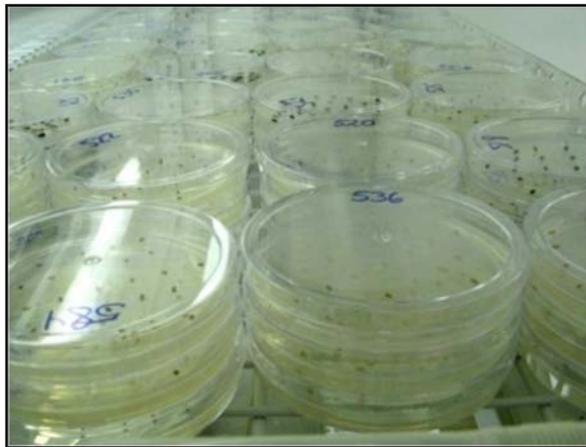


Figura 27. Incubación de las semillas en condiciones controladas.

Por último se realizan las lecturas correspondientes de la misma forma que en frijol. Cada lectura es registrada en la tabla de Excel diseñada para el registro de los resultados, teniendo en cuenta el número de muestra LSG (Anexo 1). En esta tabla se escriben los hongos cuarentenarios y saprofitos que algunas veces se presentan. Si alguna de las semillas se presenta infectada con algún hongo cuarentenario la accesión es rechazada (Fig. 28).



Figura 28. Observación y lectura de la presencia de hongos.

En algunas ocasiones las semillas de leguminosas son difíciles de germinar y es necesario realizar un corte o escarificación para inducir la germinación y poder realizar el diagnóstico de hongos en forma adecuada (Fig. 29).



Figura 29. Proceso de escarificación de las semillas.



Advertencia: En el uso del bisturí para la escarificación de la semilla existe el riesgo de lesiones, se debe mover con precaución la lámina hacia fuera de donde se encuentre la mano o los dedos.



Advertencia: Es muy importante realizar mantenimiento y calibración adecuada al pHmetro para asegurar la calidad en la preparación de medios y soluciones.

4.2 Detección de bacterias

Las bacterias son organismos haploides, unicelulares, móviles, poseen pared y membrana celular, pero carecen de membrana nuclear y se reproducen por fisión binaria. La mayoría de bacterias fitopatógenas tienen forma de bastón (bacilo) y se desplazan en medios líquidos mediante flagelos que pueden estar ubicados en un extremo o alrededor de toda la célula.

La detección de bacterias en semillas se realiza teniendo en cuenta las enfermedades bacterianas que se transmiten por semilla y que son consideradas de interés cuarentenario y afectan los cultivos de fríjol, leguminosas forrajeras y pastos tropicales (Flujograma 4).

Las bacterias fitopatógenas pueden sobrevivir de diferentes maneras bajo condiciones ambientales adversas y en ausencia de plantas hospedantes en el campo. Una de las formas más eficientes de sobrevivencia es a través de la semilla de los cultivos, ya sea infestando (externamente, sobre la semilla) o infectando la semilla (internamente). Se expresan a través de marchitez vascular, tizones o manchas foliares y de frutos o formación de agallas o tumores.

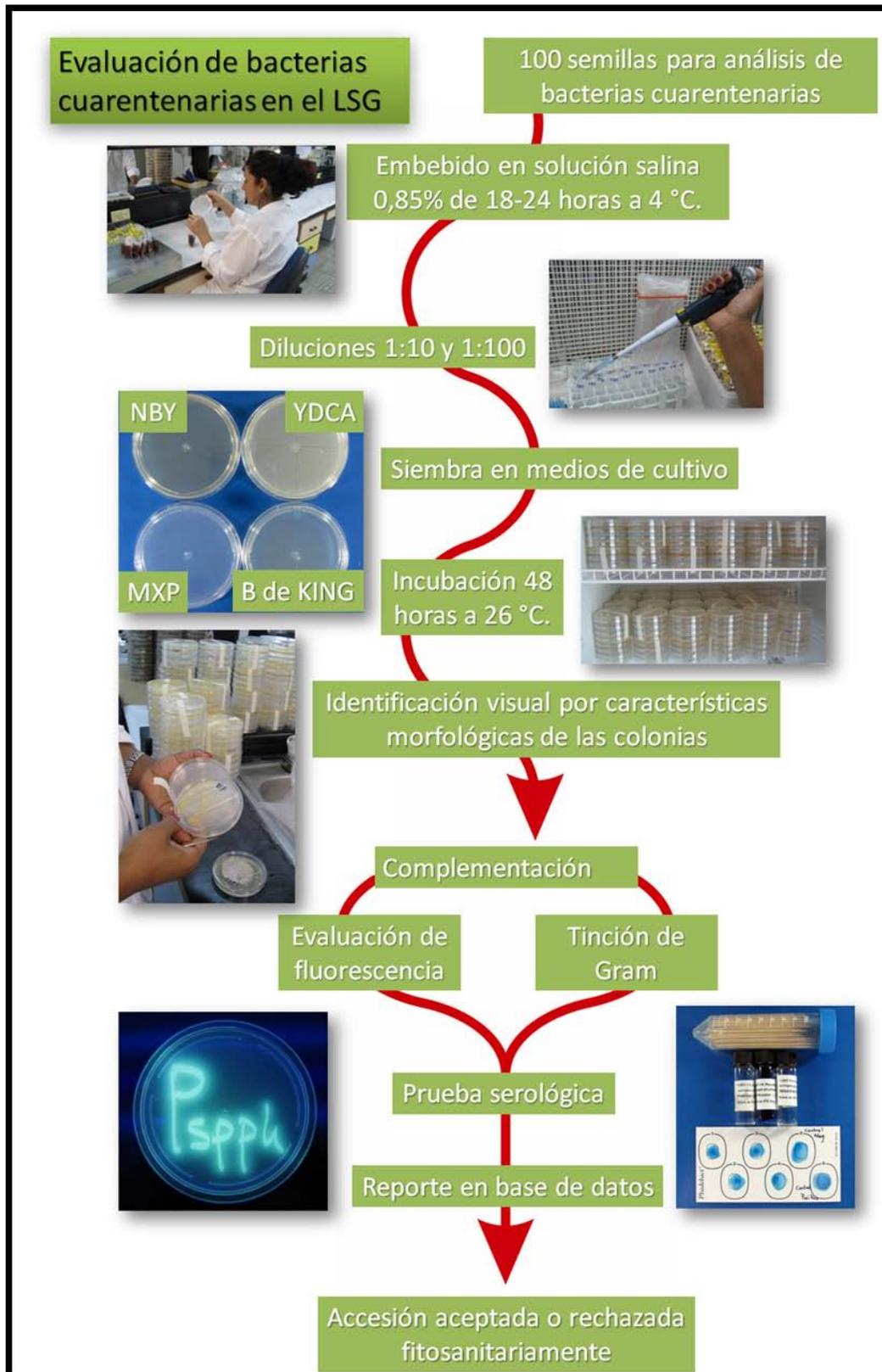
Debido a que las bacterias fitopatógenas son morfológicamente similares, la diferenciación entre especies se basa fundamentalmente en reacciones bioquímicas producidas en medios de cultivo. Todas las bacterias fitopatógenas crecen en medio que contiene como nutriente el agar. Sin embargo, la adición de algunos compuestos o sustancias puede inhibir el desarrollo de un género o especie particular de bacteria. Igualmente algunos géneros de bacterias, al crecer producen pigmentos de colores definidos que los caracterizan con relativa seguridad [Castaño y Mendoza, 1997].

4.2.1 Principales enfermedades bacterianas en el cultivo de fríjol

Existen tres enfermedades bacterianas en fríjol (*Phaseolus* spp) que son consideradas de importancia cuarentenaria y las cuales se describen a continuación:

4.2.1.1 La bacteriosis común del fríjol

Esta es una de las enfermedades de mayor distribución geográfica en el mundo. Tiene gran importancia económica donde el cultivo de fríjol coincide con la época de lluvias, clima cálido y alta humedad relativa. En América Latina es una enfermedad endémica y causa pérdidas en el rendimiento del cultivo como en la calidad del grano. Esta enfermedad es causada por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (E.F.Sm.) Dows. Esta bacteria puede estar presente en y ser transmitida por la semilla interna- o externamente. La transmisión de *X. axonopodis* pv *phaseoli* a través de la semilla se conoce desde 1872. Bacteria viable y virulenta se ha podido recuperar de la semilla de fríjol después de tres, diez y quince años de almacenamiento [Cardona et al. 1995].



Flujograma 4. Diagnóstico de bacterias cuarentenarias en el LSG.

4.2.1.2 El añublo de halo

Es una enfermedad común y seria en regiones con temperaturas frías o moderadas, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Burk) Dows. Esta bacteria produce una toxina llamada phaseolotoxina, la cual es la responsable de uno de los síntomas característicos, los halos cloróticos que rodean las lesiones húmedas. Esta toxina también causa infección sistémica con clorosis extensiva y distorsión en el crecimiento. La bacteria penetra directamente de la vaina a la semilla. *P. syringae* pv. *phaseolicola* sobrevive en semillas infectadas y en residuos vegetales en la superficie del suelo hasta que las condiciones ambientales son propicias para el desarrollo de la infección [Cardona et al. 1995].

4.2.1.3 El marchitamiento bacteriano

Esta enfermedad es causada por la bacteria *Curtobacterium flaccumfaciens* (Hedges) Dows. Zaumeyer y Thomas. Su desarrollo es favorecido por temperaturas mayores a 32 °C y condiciones de sequía. La bacteria es sistémica y el desarrollo de la enfermedad es muy rápido. En Colombia, sólo se conoce un reporte [Lenné et al. 1985; Cardona et al. 1995].

C. flaccumfaciens sobrevive de cinco a 24 años en la semilla infectada, la cual puede presentar decoloraciones amarillas, anaranjadas o azules. La bacteria no sobrevive en el suelo durante los inviernos, pero puede sobrevivir de una época de siembra a otra en los residuos de plantas o en malezas. Las cepas más virulentas están mejor adaptadas para sobrevivir [Cardona et al. 1995].

4.2.2 Principales bacterias en los cultivos de leguminosas forrajeras y pastos tropicales

Existen cuatro enfermedades causadas por bacterias afectando leguminosas y pastos tropicales que son de interés cuarentenario y se describen a continuación:

4.2.2.1 Añublo de la vaina, marchitez y muerte descendente

Esta enfermedad es causada por la bacteria *Pseudomonas fluorescens* biotipo II, causa muerte descendente y marchitez en las plantas jóvenes. Se encuentra reportada en Colombia, Costa Rica, Belice, Brasil, México, Panamá y Guatemala [Lenné, 1981; Lenné et al. 1990; Guevara-Gómez et al. 1983]. Sus hospederos son: *Centrosema* sp. (*C. acutifolium*, *C. pubescens*, *C. brasilianum*, *C. macrocarpum*, *C. schiedeanum* and *C. virginianum*), *Allium*, *Brassica*, *Phaseolus* sp., *Solanum* spp., *Leucaena leucocephala*, *Leucaena esculenta*, *L. pulverulenta*, *L. diversifolia* y *L. shannoni*. Se distinguen de otras *Pseudomonas* fluorescentes porque poseen más de un flagelo polar, no producen pigmentos carotenoides, no crecen a 41° C, e hidrolizan el agar pero no el almidón. La enfermedad se caracteriza por lesiones acuosas en las partes en crecimiento, que progresan hasta causar marchitamiento, pudrición, necrosis, muerte descendente y defoliación de la planta. Esta bacteria es transmitida por la semilla; se han registrado niveles de infección hasta del 32 % en algunos lotes de semillas [Guevara Gómez, 1982].

4.2.2.2 Añublo del halo

Esta enfermedad es ocasionada por la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Los síntomas aparecen como manchas oscuras en las hojas rodeadas de un halo color amarillento. Esta bacteria es transmitida por la semilla. Sus hospederos son: *Cajanus cajan*, *Centrosema pubescens*, *Lablab purpureus*, *Macroptilium* spp., *Phaseolus coccineus*, *P. lunatus*, *P. vulgaris*, *Pueraria* spp., *Vigna*

angularis, *V. radiata*, *Neonotonia wightii*. Se encuentra distribuida a nivel mundial [Lenné & Ordoñez, 1991].

4.2.2.3 Bacteriosis

Esta enfermedad es ocasionada por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. El principal hospedero es *Phaseolus vulgaris*, pero también se presenta en otras especies como son: *Brachiaria* sp., *P. lunatus*, *P. coccineus*, *P. acutifolius*, *Vigna aconitifolia*, *V. radiata*, *Lablab purpureus*, *Mucuna deeringiana*, y *Lupinus polyphyllus*. Desarrolla síntomas en las hojas causando lesiones con halos amarillos, estas pueden crecer causando necrosis total. Los síntomas también se pueden presentar en tallos y vainas. Las semillas infectadas se presentan arrugadas y con algunas decoloraciones. Es una enfermedad que se encuentra distribuida mundialmente.

4.2.2.4 Marchitez bacteriana

Esta enfermedad es ocasionada por *Curtobacterium flaccumfasciens* pv. *flaccumfasciens*. La enfermedad se caracteriza por un marchitamiento de las hojas o parte de éstas durante las horas más calurosas del día y una posterior recuperación a medida que se acerca la noche y las temperaturas descienden. Como resultado de la obturación bacteriana de los vasos, se interrumpe el suministro de agua y las hojas se tornan marrones y caen. Las vainas de plantas infectadas pueden presentarse amarillentas. La bacteria puede ser transmitida dentro y sobre la semilla. Este patógeno ha sido reportado en gran parte del mundo incluyendo Norte y Sur América, Europa y Australia, El primer reporte de esta enfermedad en Colombia fue realizado en 1981 en *Zornia brasiliensis* [Torres et al. 1982]. Entre sus hospederos se encuentran *Lablab purpureus*, *Phaseolus coccineus*, *Phaseolus lunatus*, *Phaseolus vulgaris*, *Vigna angularis*, *Vigna unguiculata*, *Zornia* spp. y posiblemente *Glycine max*.

4.2.3 Procedimientos generales para el diagnóstico de bacterias en semillas de fríjol (*Phaseolus* spp.), leguminosas forrajeras y pastos tropicales

Debido a que las bacterias fitopatógenas son morfológicamente similares, la diferenciación entre especies se basa fundamentalmente en reacciones bioquímicas producidas en medios de cultivo. Todas las bacterias fitopatógenas crecen en medio que contiene como nutriente el agar. Sin embargo, la adición de algunos compuestos o sustancias puede inhibir el desarrollo de un género o especie particular de bacteria. Igualmente algunos géneros de bacterias, al crecer producen pigmentos de colores definidos que los caracterizan con relativa seguridad [Castaño y Mendoza, 1997].

En general la metodología usada para el diagnóstico de bacterias es la misma para fríjol y forrajes tropicales; a continuación se describen los pasos a seguir y se hará énfasis en algunas diferencias específicas para la detección de las diferentes bacterias. Todas las soluciones utilizadas en estos procedimientos se pueden leer en el Anexo 2.

4.2.3.1 Extracción y siembra

El primer paso consiste en suspender 100 semillas por accesión en solución salina fisiológica estéril al 0.85% (preparada con NaCl en agua destilada), en bolsas estériles especiales para muestreo marcadas cuidadosamente con el número de muestra LSG (bolsas de 4 onzas para leguminosas

forrajeras y pastos tropicales y bolsas de 7 onzas para fríjol), durante un periodo de 18 a 24 horas a 4° C. (Fig. 30).

Completado este periodo de extracción se hace una dilución 1/10 por muestra con solución salina a un volumen de 5 ml en tubos de vidrio marcados con el número de muestra LSG. De esta dilución se vierten 100 µl en cada una de las cajas petri con los diferentes medios de cultivo específicos para el diagnóstico bacteriano marcadas con su respectivo número LSG (Medios MXP, King B, YDCA, NBY) (Fig. 31).



Figura 30. Suspensión de las semillas en solución salina al 0.85%.



Figura 31. Preparación de la dilución bacteriana 1/10.

Se incuban 48 horas a 26 °C y se hace la identificación y diferenciación visual a partir de las características morfológicas de las colonias de acuerdo a los diferentes medios utilizados como se describe a continuación (Fig. 32). Posteriormente y de acuerdo a la existencia de colonias sospechosas se realizan pruebas específicas para cada uno de los géneros de bacterias.



Figura 32. Observación e identificación morfológica de las bacterias.

4.2.3.2 Identificación y diferenciación de las colonias bacterianas

4.2.3.2.1 *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

Para la identificación de las bacterias de este género se utilizan los medios específicos MXP [Clafin et al. 1987] y el medio YDC [Wilson et al. 1967]. En el MXP las colonias presentan una apariencia cremosa, redondas, con bordes regulares y transparentes; poseen la capacidad para crecer en presencia de los diferentes antibióticos que tiene este medio (kasugamicina, gentamicina y cefalexina) y también de hidrolizar el almidón de papa causando la presencia de un halo alrededor de las colonias. Cuando se presentan colonias con el halo respectivo se reaíslan en medio YDCA (Extracto de Levadura, Dextrosa y Carbonato de Calcio, Agar), debido a que este género produce un pigmento denominado xanthomonadina, que le confiere un color amarillo a las colonias que crecen en este medio; las colonias se presentan amarillas, brillantes, redondas, y de bordes definidos. Sólo con las colonias que presenten estas características se complementa la identificación usando la técnica serológica de aglutinación con un antisuero comercial específico producido para *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

4.2.3.2.2 *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

Para la identificación de este grupo de bacterias se utiliza el medio B de King [King et al. 1954] que es específico para la detección de bacterias asociadas a este género. Las bacterias típicas de *P. syringae* pv. *phaseolicola* crecen formando colonias transparentes, cremosas, de bordes regulares, las cuales producen un pigmento verdoso que se difunde en el medio y que, cuando es observado bajo la luz ultravioleta, se observa fluorescente. Igualmente la identificación se complementa usando un antisuero comercial específico producido para *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.

4.2.3.2.3 *Pseudomonas fluorescens* biotipo II

Para la identificación de este grupo de bacterias se utiliza igualmente el medio B de King (King et al. 1954). Las bacterias se incuban a 27°C por 2 a 3 días y luego se examinan teniendo en cuenta la morfología de las colonias y la presencia de pigmentos fluorescentes bajo luz negra (Fig. 33).

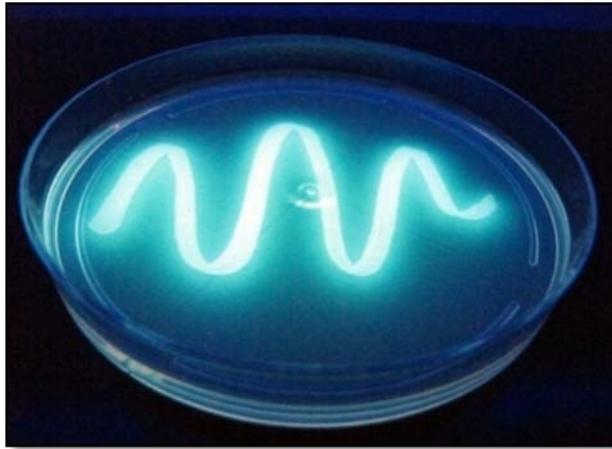


Figura 33. Observación de pigmentos fluorescentes bajo luz negra.

4.2.3.2.4 *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Para la identificación de este grupo de bacterias se utiliza el medio NBY (Nutrient Broth Yeast extract): este medio es utilizado para la detección de bacterias asociadas con el género *Curtobacterium*. Los colores de las colonias típicas de *Curtobacterium flaccumfaciens* varían desde las colonias blancas cremosas, hasta las púrpuras. Las colonias son redondas, pequeñas, de bordes enteros y brillantes. Aquellas colonias que parezcan sospechosas son seleccionadas y se les hace la tinción de Gram (Cristal violeta-1minuto, lugol-1minuto, decolorante- (alcohol-acetona) 30 segundos, safranina-1 minuto). Cualquier colonia de la que se aíslen microorganismos Gram positivos (color morado al terminar la tinción) y que tenga una forma baciliforme se reaíslan nuevamente en NBY a 37° C (temperatura ideal para el crecimiento de esta bacteria), y se procede luego con la caracterización con kit serológico. Para la identificación de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* se utiliza un Kit comercial PTA ELISA.

4.2.3.3 Descripción de la serología usada en la identificación de las bacterias

Se utilizan Kits comerciales para la detección de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* y *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

Para las dos primeras especies de bacterias se utiliza la siguiente metodología:

- Las muestras se preparan removiendo una pequeña cantidad de bacterias de una colonia aislada típica, usando un aplicador especial, que provee el kit.
- Realizar una suspensión con la colonia sospechosa proveniente del medio correspondiente en tubos estériles con 0.5ml de agua destilada estéril.
- Homogenizar esta mezcla en un vortex.
- Homogenizar muy bien cada uno de los reactivos del kit y adicionar una gota del antisuero específico de cada bacteria a detectar en uno de los círculos de la placa que provee el kit.
- Adicionar una gota del control negativo a uno de los círculos de la placa que provee el kit y mezclar con el aplicador.

- Adicionar una gota del control positivo en otro de los círculos, mezclar con el aplicador.
- Adicionar una gota de la dilución de la bacteria con el agua destilada estéril, mezclar con el aplicador.
- Agitar un poco la placa por rotación por 1 minuto.
- Leer la reacción después de 60 segundos, si no se ha obtenido reacción de aglutinación se puede dejar hasta 3 minutos.
- La interpretación de los controles indica lo siguiente (Fig. 34):

En una reacción positiva, se presenta una reacción de aglutinación.
En una reacción negativa, no se presenta reacción de aglutinación.

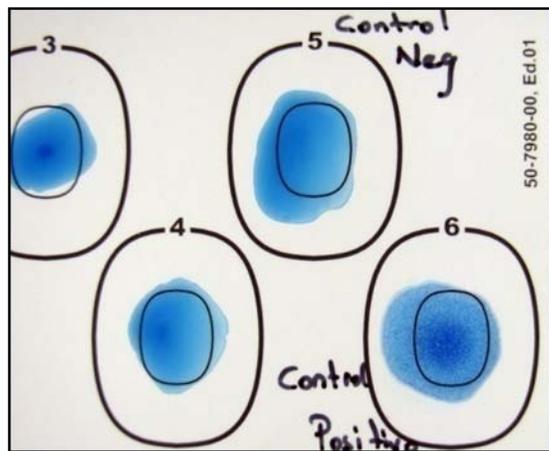


Figura 34. Reacción serológica utilizada para el diagnóstico de *Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli* y *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.

Para el diagnóstico de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* se sigue la siguiente metodología propuesta por la casa comercial del kit de diagnóstico Neogen Europe:

- Adicionar 100 μ l de cada muestra, incluyendo los controles positivos y negativos por duplicado, a los pozos. Cubrir el plato de ELISA o colocarlo en una caja plástica. Incubar toda la noche a 4 $^{\circ}$ C.
- Lavar los pozos de la placa con el buffer de lavado (materiales incluidos en el kit).
- Adicionar el buffer de bloqueo que previamente se ha preparado, e incubar la placa de ELISA al menos 1 hora a 37 $^{\circ}$ C.
- Lavar los pozos como se describió anteriormente.
- Adicionar 100 μ l de la sonda (incluida en el kit) en cada uno de los pozos. Cubrir la placa de ELISA e incubarla a 37 $^{\circ}$ C por 1 hora.
- Adicionar 550 μ l del buffer conjugado (incluido en el kit). Asegurarse que el contenido del vial esté bien mezclado. Colocar la placa a 37 $^{\circ}$ C por 1 hora.

- Lavar nuevamente los pozos como se describió anteriormente.
- Adicionar 100 µl del conjugado en cada pozo, cubrir la placa e incubar nuevamente a 37 °C por 1 hora.
- Lavar nuevamente como se describió arriba.
- Adicionar 100 µl del sustrato (incluido en el kit) en cada uno de los pozos. Tapar la placa de ELISA e incubarla en la oscuridad a temperatura ambiente por 1 hora.
- Leer la absorbancia a 405 nm. Una muestra se considera positiva cuando muestra una absorbancia mayor al control negativo, y se considera una muestra negativa cuando su absorbancia es igual o menor al control negativo.

Después de la realización de todas las pruebas pertinentes para dar un adecuado diagnóstico se procede al registro de los resultados en una tabla de Excel diseñada especialmente para esto, teniendo en cuenta el número de muestra LSG (Anexo 1). En esta tabla se escribe la presencia o ausencia de bacterias, en el caso de que el resultado sea positivo para bacterias se detalla qué bacteria específica se encuentra en determinada muestra.



Advertencia: Todo el material utilizado en las pruebas debe ser desinfectado o esterilizado correctamente, siguiendo procedimientos específicos.



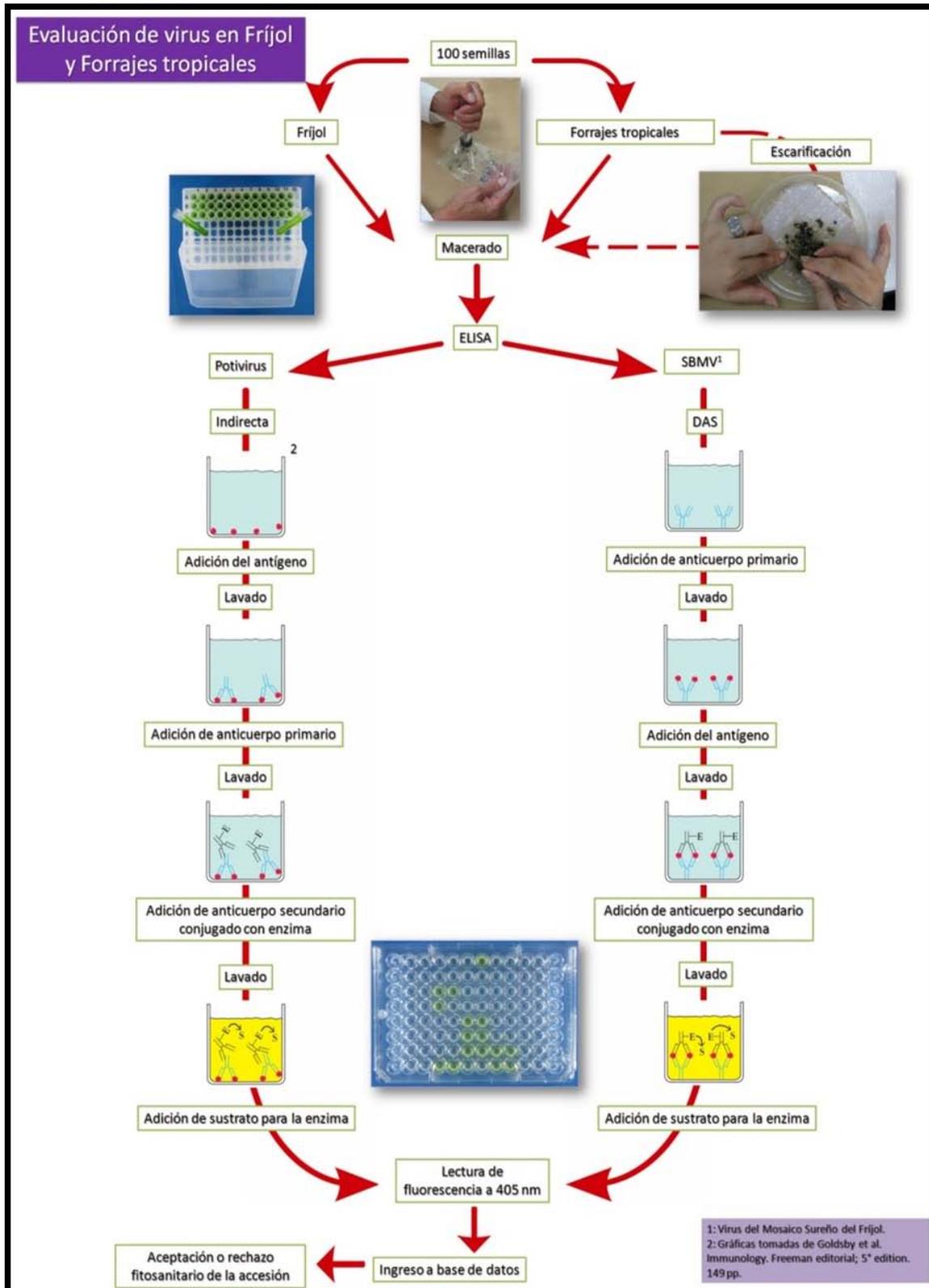
Advertencia: Al analizar bacterias a través de luz ultravioleta se deben usar los elementos de protección necesarios como gafas de seguridad para evitar daños en la salud.

4.3 Detección de virus

Los virus son patógenos ubicuos de pastos y especies leguminosas en todo el mundo. Las leguminosas son particularmente susceptibles a virus ya que 533 virus de plantas causan infección natural en este grupo, mientras que sólo 53 diferentes virus atacan las gramíneas [Morales, 1994].

A través del establecimiento de pasturas, ya sea por semillas o por propagación vegetativa, los virus en pastos y leguminosas sean o no transmitidos por semilla, pueden llegar a distribuirse ampliamente a través del intercambio de germoplasma [Morales, 1994].

En el LSG se realiza el diagnóstico de virus cuarentenarios transmitidos por semilla que afectan los cultivos de frijón, leguminosas forrajeras y pastos tropicales (Flujograma 5).



Flujograma 5. Diagnóstico de virus en el LSG.

4.3.1 Principales virus en el cultivo de fríjol

4.3.1.1 Mosaico común del fríjol

Esta enfermedad es causada por el Virus Común del Mosaico del Fríjol (BCMV) y el Virus del Mosaico y la Necrosis del Fríjol (BCNMV). El mosaico del fríjol es la enfermedad viral más difundida a nivel mundial. Esta enfermedad es causada por dos agrupamientos de cepas virales, las pertenecientes al BCMV y las del BCNMV pertenecientes al género *Potyvirus* familia *Potyviridae* [Morales & Castaño, 2008].

Sus síntomas dependen de la variedad del fríjol, de la cepa del virus y las condiciones ambientales, pero por lo general se ven áreas verdes claras y oscuras en las hojas afectadas, hojas generalmente enrolladas hacia el envés (Fig. 35). Las plantas afectadas por el virus generalmente no alcanzan su tamaño normal. El número de vainas por planta es el componente de rendimiento más afectado [Cardona et al. 1995].



Figura 35. Síntomas foliares del virus BCMV en hojas de fríjol (izquierda: manchas oscuras y claras, derecha: enrollamiento hacia el envés en las hojas de fríjol).

Esta enfermedad viral es la más difundida a nivel mundial, debido a su capacidad de transmitirse por semilla y a su rápida diseminación por áfidos [Morales & Castaño, 2008].

4.3.1.2 Mosaico sureño del fríjol

El Virus del mosaico sureño del fríjol (SBMV) perteneciente al género *Sobemovirus*, es el agente causal de esta enfermedad. Aunque la enfermedad fue reportada inicialmente en el sur de Estados Unidos, actualmente, ésta se ha distribuido por todo el mundo [Morales & Castaño, 2008].

El SBMV se transmite muy fácilmente por semillas contaminadas, siendo muy estable fuera de la planta o de sus vectores naturales. Este virus es de los de más amplia distribución en áreas productoras, debido a que se transmite por semillas producidas por plantas infectadas, por herramientas usadas y por coleópteros de los géneros *Cerotoma*, *Diabrotica* y *Ephilachna* [Cardona et al. 1995].

La sintomatología se limita a cambios ligeros de tonalidad y textura de las hojas sin afectarse con deformaciones o clorosis apreciable (Fig. 36). Por lo general, las hojas infectadas se tornan de color verde grisáceo u oliva y su textura es ligeramente coriácea [Cardona et al. 1995].



Figura 36. Síntomas foliares del SBMV. Tomado de: Unidad de Virología, CIAT, 2009.

4.3.2 Principales virus en los cultivos pastos tropicales y leguminosas forrajeras

4.3.2.1 El moteado del maní

Esta enfermedad causada por el Virus Moteado del Maní (PeMOV) perteneciente al género *Potyvirus*, familia *Potyviridae* se encuentra presente en *Amaranthus retroflexus*, *Arachis hypogaea*, *Arachis pinto*, *Beta vulgaris*, *Brassica rapa*, *Cajanus cajan*, *Chenopodium murale*, *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium album*, *Citrullus lanatus*, *Crotalaria spectabilis*, *Cucumis sativus*, *Cyamopsis tetragonoloba*, *Glycine max*, *Lupinus angustifolius*, *Lupinus albus*, *Macroptilium lathyroides*, *Medicago sativa*, *Melilotus alba*, *Melilotus officinalis*, *Phaseolus acutifolius*, *Phaseolus lunatus*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Senna bicapsularis*, *Senna obtusifolia*, *Senna occidentalis*, *Senna tora*, *Trifolium incarnatum*, *Trifolium pratense*, *Trifolium repens*, *Trifolium subterraneum*, *Trifolium hybridum*, *Vicia villosa*, *Vigna unguiculata* y *Vigna subterranea* [Allen & Lenné, 1998].

Los síntomas característicos inducidos por el PeMOV en *Arachis pinto* como se pueden apreciar en la Figura 37, consisten en lesiones foliares en forma de anillo y con diferentes grados de variegación [Morales, 1994]. El virus es transmitido mecánicamente y por áfidos de manera persistente. Este virus se transmite por semilla, aunque generalmente en porcentajes inferiores al 3% [Morales & Castaño, 2008].



Figura 37. Síntomas foliares del PeMOV en *Arachis pinto* y *Macroptilium lathyroides* que se caracterizan por los diferentes grados de variegación.

4.3.2.2 Mosaico común del fríjol

Esta enfermedad está reportada en: *Arachis hypogaea*, *Bauhinia purpurea*, *Cajanus cajan*, *Centrosema pubescens*, *Chenopodium quinoa*, *Cicer arietinum*, *Clitoria ternatea*, *Crotalaria incana*, *Crotalaria juncea*, *Crotalaria spectabilis*, *Cucumis sativus*, *Cyamopsis tetragonoloba*, *Glycine max*, *Lablab purpureus*, *Lupinus angustifolius*, *Lupinus luteus*, *Lupinus albus*, *Macroptilium atropurpureum*, *Macroptilium lathyroides*, *Medicago sativa*, *Melilotus alba*, *Phaseolus acutifolius*, *Phaseolus lunatus*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Rhynchosia minima*, *Senna sophera*, *Senna tora*, *Sesbania herbacea*, *Trifolium incarnatum*, *Trifolium pratense*, *Trifolium repens*, *Trifolium subterraneum*, *Trifolium hybridum*, *Vicia sativa*, *Vicia villosa*, *Vigna radiata*, *Vigna unguiculata*, *Vigna vexillata*, *Vigna subterranea* [Allen & Lenné, 1998].

La patología es producida por el Virus del Mosaico común de Fríjol (BCMV) el cual se describió anteriormente (principales virus del cultivo del fríjol), que induce mosaicos de color verde claro y oscuro, y malformación en las hojas. El control de la enfermedad es difícil debido a la migración natural de la mayoría de sus vectores áfidos y al poco tiempo que necesitan para transmitir el virus [Morales, 1994].

Las investigaciones de taxonomía molecular han permitido la reclasificación de diversos virus que infectan otras leguminosas como el caupí (*Vigna unguiculata*), *Vigna angularis*, *Cyamopsis tetragonoloba* y *Dendrobium* spp. a la lista de cepas del BCMV aumentando de esta manera su rango de hospederos pero también haciendo más diversos sus síntomas [Morales & Castaño, 2008].

4.3.2.3 Mosaico sureño del fríjol

Esta enfermedad producida por el Virus del Mosaico Sureño del Fríjol (ver principales virus del cultivo del fríjol) se ha reportado en las siguientes leguminosas: *Cassia tora*, *Cicer arietinum*, *Cyamopsis tetragonoloba*, *Glycine max*, *Lupinus albus*, *Melilotus albus*, *Pisum sativum*, *Vigna mungo*, *V. radiata*, *V. subterranea*, *V. unguiculata*, y *V. sesquipedalis* [Allen & Lenné, 1998].

Sus síntomas incluyen mosaico o moteado foliar de color verde claro u oliva, deformidad, disminución en el tamaño y encorvamiento de hojas. El virus puede transmitirse por inoculación mecánica, injertos, semillas, polen y artrópodos del orden Coleóptera familia *Crysmelidae* [Allen & Lenné, 1998].

4.3.2.4 Mosaico del Centrosema

Esta enfermedad causada por un Potyvirus aislado es caracterizada en Colombia como una cepa del virus del mosaico de la soya. Los hospedantes fueron: *Centrosema pubescens*, *Crotalaria anagyroides*, *C. retusa*, *C. goreensis*, *C. mucronata*, *Desmodium distortum*. Es transmitido por áfidos y por semillas en niveles bajos [Lenné et al. 1990; Morales et al. 1990].

Los síntomas de la enfermedad son clorosis, mosaico, deformación de la hoja, retardo del crecimiento y muerte de la planta. El virus causa graves daños en sitios donde se presenta una alta población de áfidos [Lenné et al. 1990].

4.3.3 Procedimientos generales para el diagnóstico de virus en semillas de fríjol, leguminosas y pastos tropicales

En el diagnóstico de virus para fríjol, leguminosas forrajeras y pastos tropicales se utiliza la misma metodología. Para los virus nombrados anteriormente se realiza el diagnóstico mediante la técnica serológica de ELISA.

La prueba de ELISA [Enzyme Linked-Immuno Sorbent Assay, es una prueba inmunoenzimática, que se basa en el reconocimiento de un antígeno (virus) por un anticuerpo y la posterior unión de este complejo con una enzima [Zavala, 1985], con la que se tiene un conjugado que retiene simultáneamente la actividad inmunológica y enzimática de los componentes. Si los anticuerpos específicos se unen con su respectivo antígeno se produce una reacción, que puede ser visible con la presencia de un color amarillo según sea el tipo de enzima usado. Esta prueba tiene variantes, que se usan de acuerdo con el objetivo del análisis, siendo las más conocidas el método indirecto y el método Sándwich de doble anticuerpo. Esta prueba es un método sensitivo, de mucha precisión y rápida detección.

Para SBMV se utiliza el método de ELISA doble sándwich mediante un kit comercial. Para los virus del BCMV, PeMoV, SMV-CE se utiliza la metodología de ELISA Indirecta mediante un Kit comercial que detecta un amplio rango de virus pertenecientes al grupo Potyvirus (Anexo 3).

La semilla germinada, sin problemas sanitarios, utilizada en la detección de hongos se aprovecha para la detección de virus. En la detección en fríjol se utiliza el hipocotilo y las hojas primordiales, en el caso de leguminosas y pastos tropicales se utiliza toda la semilla germinada (Fig. 38).



Figura 38. Extracción de tejido germinado a partir de semillas de fríjol.

Las semillas de fríjol son procesadas en agua con un macerador mecánico por golpeteo (Fig. 39), mientras que las semillas germinadas de leguminosas y pastos tropicales son maceradas en agua manualmente o mecánicamente dependiendo de su tamaño (Fig. 40).



Figura 39 Macerado de semillas de frijol.



Figura 40. Macerado de semillas de leguminosas.

Después de la maceración, las muestras se adicionan a tubos eppendorf de 1.5 ml que contienen el respectivo buffer de muestras, dependiendo del tipo de ELISA a realizar (Anexo 4). Se agitan muy bien con pipetas plásticas desechables (Fig. 41).



Figura 41. Adición de muestras a los tubos.

4.3.3.1 Método ELISA de doble sándwich (DAS-ELISA) realizado para el diagnóstico de SBMV

Antes de realizar la evaluación se debe realizar un esquema en donde se describe la posición exacta de cada accesión a evaluar dentro de la placa de ELISA; de esta manera se ubicará fácilmente el resultado respectivo para cada accesión (Anexo 5). La preparación de soluciones se puede leer en el capítulo de anexos (Anexo 4). Esta metodología se basa en la descrita por Clark y Adams en 1977, la cual se describe a continuación:

1. El anticuerpo de captura o gammaglobulina es proporcionado en una solución concentrada y debe ser diluido en el buffer de cubrimiento antes de usarlo. Diluir la gamma-globulina en dilución 1:1000 con el buffer de cubrimiento. Mezcle la solución preparada de anticuerpo de captura y use inmediatamente. Adicione 100 µl de esta solución en cada pozo. Incubar la placa en cámara húmeda a 37° C durante 3-4 horas.
2. Lavar la placa con el buffer PBS-Tween por 4 veces. En el lavado inicial, enjuagar los pozos y descartar el buffer de inmediato. Este paso se realiza mecánicamente en un aparato lavador de placas en donde se ha programado previamente para realizar 3 lavados por tres minutos cada uno (Fig. 42). Colocar la placa al revés y la sacuda firmemente sobre una toalla de papel doblada para quitar el exceso de líquido.



Figura 42. Máquina lavadora de placas de ELISA (cada ciclo de lavado en esta máquina dura aproximadamente 6 minutos).

3. Adicionar 100 µl de las muestras maceradas (Fig. 43). Incubar la placa en cámara húmeda a 4-6° C durante toda la noche. Incluir muestras de controles conocidos: control negativo, control positivo y blanco. Las muestras se adicionan según el esquema en donde se ubica específicamente cada accesión a evaluar (Anexo 5).

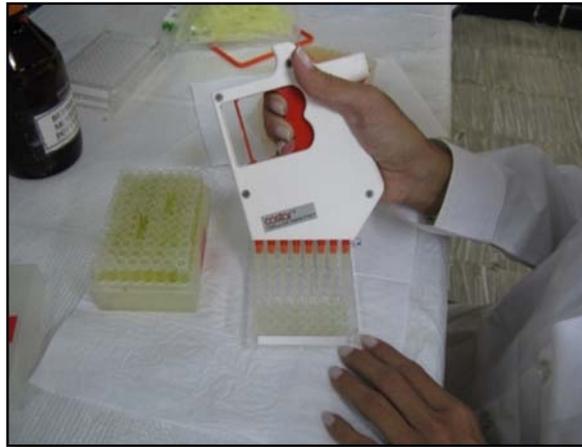


Figura 43. Adición de las muestras.

4. Lavar nuevamente la placa, de igual forma que en el paso 2, teniendo cuidado de remover todo residuo de las muestras.
5. La enzima conjugada es proporcionada en una solución concentrada y debe ser diluida en el buffer de conjugado antes de usarla. Diluir la gamma-globulina marcada con la enzima fosfatasa alcalina (conjugado) con el buffer para el conjugado en dilución 1:1000. Adicione 100 μ l de esta solución a cada uno de los pozos. Incubar la placa en cámara húmeda a 37° C durante 3-4 horas.
6. Lavar nuevamente la placa, de igual forma que en el paso 2.
7. Adicionar 50 μ l de substrato de color (Solución de p-nitrofenil fosfato) en cada pozo. Leer a partir de los 15 minutos de adicionado.
8. La reacción puede pararse después de algún tiempo, adicionando 50 μ l de hidróxido de sodio en concentración 3M. Este paso es adicional.

La lectura de los resultados se puede realizar visualmente observando los pozos que den coloración amarillenta (Fig. 44) o por absorbancia a 405 nm usando un lector de placas (Fig. 45). La prueba es válida sólo si el control positivo muestra un resultado positivo y si el control blanco no muestra ninguna coloración.

Se considera "positivo" todo valor mayor a 2 veces el valor del control sano negativo. Se realizan al menos dos lecturas por placa en diferentes tiempos. Todos los registros de las lecturas se guardan teniendo un archivo físico.

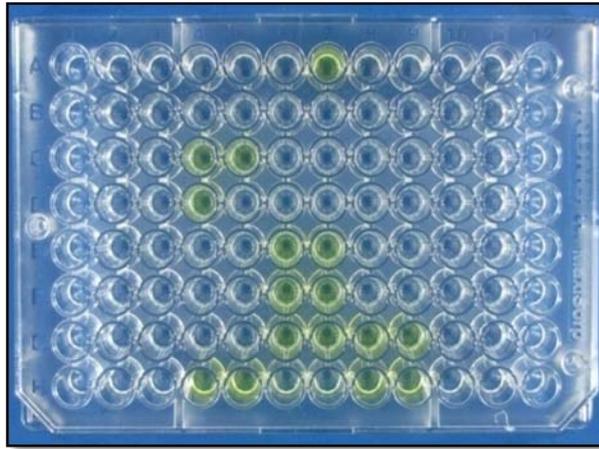


Figura 44. Resultados de la prueba de ELISA.



Figura 45. Lectura de resultados en el lector de placas de ELISA .

4.3.3.2 Método ELISA indirecto realizado para el diagnóstico de virus del género Potyvirus

Como se describió en el punto 4.3.3.1 antes de realizar la evaluación se debe hacer un esquema en donde se describe la posición exacta de cada accesión a evaluar dentro de la placa de ELISA, de esta manera se ubicará fácilmente el resultado respectivo para cada accesión (Anexo 5). La preparación de soluciones se puede leer en el capítulo de anexos (Anexo4). A continuación se describen los pasos a seguir para la realización de esta metodología:

1. Adicionar 100 μ l de las muestras maceradas en el buffer de muestras (Anexo 4). Incubar a temperatura ambiente durante 2 horas. Incluir muestras de controles conocidos: control negativo o sano, control positivo enfermo y control blanco. Las muestras se adicionan según el esquema previamente realizado en donde se ubica específicamente cada accesión a evaluar (Anexo 5).
2. Lavar la placa con el buffer PBS-Tween por 4 veces. En el lavado inicial, enjuagar los pozos y descartar el buffer de inmediato. Este paso se realiza mecánicamente en un aparato lavador de placas en donde se ha programado previamente para realizar 3 lavados por tres minutos cada uno.

3. El anticuerpo de captura o gammaglobulina es proporcionado en una solución concentrada y debe ser diluido en el buffer de cubrimiento antes de usarlo. Diluir la gamma-globulina con el buffer específico de cubrimiento en dilución 1:200. Mezcle la solución preparada de anticuerpo de captura y use inmediatamente. Adicione 100 µl de esta solución a cada uno de los pozos. Incubar a 4-6° C durante toda la noche.
4. Lavar nuevamente la placa, de igual forma que en el paso 2.
5. La enzima conjugada (Anti mouse IgG whole molecule) es proporcionada en una solución concentrada y debe ser diluido en el buffer de conjugado antes de usarla. Preparar la enzima con el buffer para el conjugado en dilución 1:8000. Mezcle el conjugado preparado y use inmediatamente. Adicione 100 µl de la solución a cada pozo de la placa. Incubar la placa en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 1 hora.
6. Lavar nuevamente la placa, de igual forma que en el paso 2.
7. Adicionar 50 µl de substrato de color (Solución de p-nitrofenil fosfato) en cada pozo. Leer a partir de los 15 minutos de adicionado.
8. La reacción puede pararse después de algún tiempo, adicionando 50 µl de hidróxido de sodio en concentración 3M. Es paso es adicional.

La lectura de los resultados se puede realizar visualmente observando los pozos que den coloración amarillenta (Fig. 44) o por absorbancia a 405 nm usando un lector de placas (Fig. 45). La prueba es válida sólo si el control positivo muestra un resultado positivo y si el control blanco no muestra ninguna coloración.

Se considera "positivo" todo valor mayor a 2 veces el valor del control sano negativo. Se realiza al menos dos lecturas por placa en diferentes tiempos. Todos los registros de las lecturas se guardan teniendo un archivo físico.

Después de la realización de estas metodologías y de las lecturas correspondientes se procede a registrar los resultados obtenidos en la tabla de Excel diseñada para el registro de los resultados, teniendo en cuenta el número de muestra LSG (8.1 Anexo 1).



Advertencia: Los maceradores de muestras deben manipularse con cuidado, para evitar accidentes laborales.

5. Documentación de los resultados de sanidad de fríjol y pastos tropicales

Después de tener los datos obtenidos en las diferentes pruebas realizadas se procede a registrarlos en tablas Excel diseñadas para el ingreso de resultados por grupos de acuerdo a los diferentes patógenos evaluados, teniendo en cuenta el número de la accesión y ya no el número de muestra LSG. Una vez se tengan estas tablas de Excel completas se guardan en archivo físico y electrónico (Anexo 6).

En el caso de ingreso de datos de muchas accesiones, los archivos Excel se sincronizan a la base de datos y quedan ingresados. Cuando es el ingreso de datos de una o pocas accesiones se realizan de la siguiente manera:

- Ingresar a la base de datos del PRG introduciendo el Nombre de Usuario y Clave Personal, correspondiente al personal encargado, seleccionar la opción FRÍJOL o FORRAJE dependiendo de la especie evaluada. Después se debe seleccionar el icono SANIDAD para introducir los datos de los resultados de indexación obtenidos en el proceso (Fig. 46).

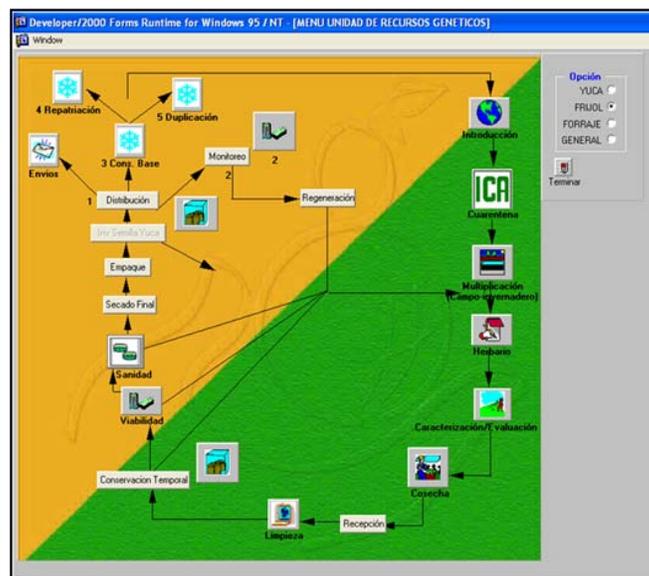


Figura 46. Interface de entrada a la base de datos del PRG.

- Introducir el número de accesión analizada.
- Ingresar cada uno de los datos que están en la aplicación: Nombre de la accesión, procedencia, fecha entrada sanidad, fecha de prueba, resultados para hongos, bacterias y virus, responsable, calidad fitosanitaria, observaciones en donde aparece el nombre del patógeno, en caso que la accesión haya resultado rechazada, y pruebas realizadas. En los resultados para los patógenos se usa A: Aceptado y R: Rechazado, en el caso que de un resultado positivo para alguno de los patógenos la accesión automáticamente es rechazada (Fig. 47).
- Guardar los datos almacenados.
- Enviar una copia de los resultados obtenidos al personal encargado del Banco de Germoplasma del PRG mediante correo electrónico, en donde se notifica que los resultados de sanidad fueron ingresados.

Figura 47. Interface de SANIDAD. Proceso de introducción de resultados en el banco de datos; datos a introducir: 1) Número de accesión, 2) Procedencia, 3) Fecha de ingreso de muestra a Sanidad, 3) Fecha de obtención de resultados, 4) Resultado obtenido (A/R), 5) Responsable de las pruebas, 6) Evaluación Fitosanitaria (Aceptado/Rechazado), 7) Observaciones: en donde se escribe el nombre específico del patógeno, 8) Pruebas realizadas: metodología utilizada y por último 9) Guardar.

6. Normas de seguridad en el laboratorio

En el LSG se tienen reglas que se deben cumplir con el objetivo de prevenir riesgos en la salud de los trabajadores, conservar la seguridad en las instalaciones y de los equipos de laboratorio y asegurar la calidad e integridad de todos los datos obtenidos durante los diferentes procesos que se realizan. Todo el personal que labora en el laboratorio debe conocer y seguir las normas establecidas.

Algunos de los posibles riesgos y sus mecanismos de control se indican a continuación:

- El laboratorio se debe mantener ordenado, limpio y libre de materiales no relacionados con el trabajo.
- Las superficies de trabajo se descontaminan al inicio y al final de cada jornada de trabajo con hipoclorito de sodio al 5%.
- Todo el equipamiento del laboratorio debe estar en perfecto estado de orden y limpieza y se deben realizar mantenimientos preventivos.
- Está prohibido comer, beber o fumar en el laboratorio.
- Todo el personal debe utilizar prendas y equipos apropiados de protección personal como batas, gafas de seguridad y guantes de forma rutinaria. En caso de manipular agentes infecciosos, además, se utilizará equipo de protección respiratoria. Al salir del laboratorio se deben quitar estas prendas.
- Cada individuo debe ser responsable de su higiene personal, lavándose las manos antes y después de su estancia en el laboratorio con abundante agua y jabón antiséptico.
- Al manipular soluciones volátiles y solventes orgánicos, éstos se deben realizar en la cámara de extracción para minimizar la exposición a humos, nieblas y vapores en el laboratorio.
- Está rigurosamente prohibido pipetear con la boca. El pipeteo se llevará a cabo con dispositivos especialmente diseñados al efecto, debiendo entrenarse adecuadamente al personal para su correcto uso.
- Se debe trabajar en condiciones ergonómicas ideales.
- Todos los materiales usados como puntas para pipetas, pipetas y elementos de vidrio deben ser esterilizados antes de ser usados.
- En la preparación de soluciones y medios de cultivo se deben tener ciertas precauciones como son el uso de una balanza analítica para el pesaje de los componentes y la utilización de materiales limpios. La agitación de mezclas debe hacerse con la ayuda de un agitador magnético. Al finalizar la preparación, se debe rotular el recipiente en que se almacena indicando el nombre de la solución, concentración, fecha de preparación y por último, esterilización adecuada.
- Todos los procedimientos en la siembra de hongos y bacterias se deben realizar en cámara de flujo laminar, siguiendo todas las normas de bioseguridad establecidas.

- Todos los materiales, muestras y cultivos contaminados deberán ser descontaminados antes de ser eliminados. El tratamiento en autoclave de vapor constituye el método de elección para todos los procesos de descontaminación. El material destinado a la descontaminación y eliminación debe ser colocados en bolsas plásticas especiales que permitan la esterilización por medio de calor en la autoclave. Todo el material se autoclava durante 20 minutos a 121° C (250° F) y a una presión de 15 libras por pulgada cuadrada. El tiempo se empieza a contar cuando la autoclave alcanza la presión y la temperatura deseadas. Después de que ya se cumple el tiempo necesario, las bolsas se sacan y se descartan sin peligro de contaminación (Fig. 48).



Figura 48. Esterilización del material de desecho.

- Se debe mantener un adecuado ambiente en el laboratorio, el cual es controlado periódicamente realizando monitoreos de presencia de hongos y bacterias que pueden producir contaminaciones a las muestras o afectar el estado de salud de los trabajadores.
- Es muy importante la prevención de incendios conociendo las fuentes de ignición que hay en el área del laboratorio: llamas, fuentes de calor, equipos eléctricos. Igualmente los reactivos inflamables deben comprarse y almacenarse en cantidades lo más pequeñas posibles. Es necesario conocer exactamente el lugar de ubicación de los elementos de seguridad disponibles, como extintores o botiquín de emergencia.
- El extintor del laboratorio debe ser lo suficientemente liviano para que pueda ser usado fácilmente por cualquier persona, en el momento necesario.
- En el momento que ocurra algún accidente laboral se debe informar inmediatamente al responsable del laboratorio y a la Oficina de Salud Ocupacional del CIAT.

7. Bibliografía

- Abawi, G. S. 1994. Pudriciones radicales. In: Pastor Corrales, M. A.; Schwartz, H. F. (eds.). Problemas de producción del fríjol en los trópicos. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p 121-184.
- Alexopoulos, C. J & Mims, C. W. 1979. Introductory mycology. New York. John Wiley and Sons, New York, USA. 632 p.
- Allen, David J; Lenné, Jillian M. (eds.). 1998. The pathology of food and pasture legumes. CAB International, Oxon, UK. 750 p.
- Argawal V. K., Sinclair J. B. 1987. Principles of Seed Pathology. CRC Press Inc, Boca Raton, Florida, USA. 344 p.
- Barnett, H. L., Hunter, B. B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4. ed. Press, St. Paul, Minnesota, USA. 218 p.
- Cardona Mejía, C., Flor Montoya, C. A., Morales, F. J., Pastor Corrales, M. A. 1995. Problemas de campo en los cultivos de fríjol en el trópico. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 220 p.
- Castaño Zapata, J., Del Río Mendoza, L. 1997. Manual para el diagnóstico de hongos, bacterias, virus y nematodos fitopatógenos. Zamorano Academic Press, Manizales, Colombia: Universidad de Caldas, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Zamorano, Honduras. 210 p.
- Claflin, L.E., Vidaver, A.K., Sasser, M. 1987. MXP, a semi-selective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. Phytopathology 77(5):730-734.
- Correa Victoria, F. J., Pastor Corrales, M. A., Saettler, A.W. 1994. Mancha angular de la hoja. In: Pastor Corrales, M. A., Schwartz, H. F. (eds.). Problemas de producción del fríjol en los trópicos. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. P 67-86.
- Ellis, M. B. 1976. More Dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, United Kingdom. 507 p.
- Frison, E.A., Bos, L., Hamilton, R.I., Mathur, S.B., Taylor, J.D. (eds.). 1990. FAO/IBPGR Technical Guidelines for the Safe Movement of Legume Germplasm. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy/International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy. 88 p.
- Gálvez G. E., Mora B., Pastor Corrales, M. A. 1994. Mustia hilachosa. In: Pastor Corrales, M A., Schwartz, H. F. (eds.). Problemas de producción del fríjol en los trópicos. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p. 227-244.
- Gilman, J. C. 1957. A manual of soil fungi. Rev. 2. ed. Iowa State College Press, Ames, Iowa, USA. 450 p.

- Guevara Gómez C. L. 1982. Etiología de la muerte descendente de *Centrosema* spp. y el efecto del patógeno en su rendimiento y calidad durante el tiempo del establecimiento de la leguminosa. Tesis (Ingeniero Agrónomo). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Cali, Colombia.
- Guevara Gómez, C. L., Lenné, J. M., Torres González, C. 1983. Etiology of dieback of *Centrosema* spp. and the effect of pathogen on yield and quality during the period of establishment of the legume [abstract]. *Phytopathology*. USA 73(1):122.
- Hanlin, R. T. 1990. *Illustrated genera of Ascomycetes*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 263 p.
- Hanlin, R. T. 1998. *Combined keys to illustrated genera of Ascomycetes, volumes I & II* APS Press, St. Paul, MN, USA. 113 p.
- Kameswara Rao N., Hanson J., Ehsan Dulloo M., Ghosh K., Nowell D., Larinde M. 2006. *Handbooks for genebanks No. 8 Manual of seed handling in genebanks*. Biodiversity International, Rome, Italy. P 50-82.
- King, E.O., Ward M.K., Raney D.E. 1954. Two simple media for demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44:301-307.
- Lenné, J. M. 1981. Evaluation of diseases of indigenous forage legumes in Central and South America. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. P 51.
- Lenné, J. M., Chavarro, A., López, C. 1985. Effect of *Corynebacterium flaccumfaciens* on yield of *Zornia glabra* and *Phaseolus vulgaris* in Colombia. *Phytopathology (USA)* 75(11):1288.
- Lenné J.M., Sonoda R.M., Lapointe, S.L. 1990. Diseases and pests of *Centrosema* . In: Schultze-Kraft, R., Clements, R.J. (eds.). *Centrosema: Biology, agronomy, and utilization*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p. 175-220.
- Lenné J.M., Ordoñez J.H. 1991. Enfermedades de las pasturas en su establecimiento y posibles estrategias de control. In: Lascano C.E., Spain J.M. (eds.). *Reunión del Comité Asesor Red Internacional de Evaluación de Pastos Tropicales (6, 1988, Veracruz, México)*. Establecimiento y renovación de pasturas: Conceptos, experiencias y enfoque de la investigación. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p. 53-79.
- Lenné, J. M., Trutmann, P. (eds.). 1994. *Diseases of tropical pasture plants*. CAB International; Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT); Natural Resources Institute (NRI), Oxon, United Kingdom. 404 p.
- Morales, F. J. 1994. Viral diseases. In: Lenné, Jillian M.; Trutmann, Peter (eds.). *Diseases of tropical pasture plants*. CAB International; Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT); Natural Resources Institute (NRI), Oxon, United Kingdom. p. 197-225.
- Morales, F. J., Castaño J. M. 2008. *Enfermedades virales del fríjol común en América Latina*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 86 p.
- Morales, F. J., Niessen, A.I., Castaño, M., Calvert, L. 1990. Detection of a strain of soybean mosaic virus affecting tropical forage species of *Centrosema*. *Plant Disease* 74(9):648-651.

- Neergaard, Paul. 1977. Seed pathology. John Wiley, New York, USA. 1187 p.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., Marasas, W. F. O. 1983. Fusarium species: An illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, USA. 193 p.
- Pastor Corrales, M. A., Tu, J. C. 1994. Antracnosis. In: Pastor Corrales, M. A., Schwartz, H. F. (eds.). Problemas de producción del frijol en los trópicos. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p 87-119.
- Schwartz, H. F. 1994. Hongos patógenos adicionales. In: Pastor Corrales, M. A., Schwartz, H. F. (eds.). Problemas de producción del frijol en los trópicos. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p. 269-301.
- Schwartz, H. F., Morales, F. J. 1994. Patología de la semilla. In: Pastor Corrales, M. A. Schwartz, H. F. (eds.). Problemas de producción del frijol en los trópicos. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p. 474-494.
- Schwartz, H. F., Steadman, J. R. 1994. Moho blanco. In: Pastor Corrales, M. A., Schwartz, H. F. (eds.). Problemas de producción del frijol en los trópicos. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p. 245-267.
- Torres C., Lenné, J. M., Victoria, J. I. 1982. Bacterial wilt of *Zornia* spp. caused by *Corynebacterium flaccumfaciens*. In: Lozano J. C., Gwin, P. H. (eds.). International Conference on Plant Pathogenic Bacteria (1982, Cali, Colombia). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT); Agricultural Editor's Office, College of Agriculture, University of Missouri, USA. p. 74-79.
- Wilson, E. E., Zeitoun, F. M., Fredrickson, D.L. 1967. Bacterial phloem canker, a new disease of Persian walnut trees. Phytopathology 57: 618-621.
- Zavala, T.E. 1985. El uso de la técnica ELISA para detectar virus en el Programa Nacional de Papa del INIA. Toluca, México.
- Zillinsky, F. J. 1983. Common diseases of small grain cereals: a guide to identification. International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), Mexico D. F., Mexico. 141 p.

8. Anexos

8.1 Anexo 1

Tabla de ingreso al LSG para sus respectivos análisis.

NLSG	Accesión	Procedencia	Fentrdsanidad	Frealizprueba	Hongos	Xspp.	Psfl.	Curt	Poty	SBMV	Observ.	Pruebas	Género	Especie
151	245	QUI2009A	24/06/2009									PDA, Blotter (Hongos), Elisa (Potyvirus, SBMV), Medios de cultivo, tinción de Gram, serología (Bacterias: Xanthomonas campestris pv phaseolicola, Pseudomonas syringae pv phaseolicola, Bacilos Gram +)	Zornia	sp.
152	252	QUI2009A	24/06/2009									PDA, Blotter (Hongos), Elisa (Potyvirus, SBMV), Medios de cultivo, tinción de Gram, serología (Bacterias: Xanthomonas campestris pv phaseolicola, Pseudomonas syringae pv phaseolicola, Bacilos Gram +)	Zornia	sp.
153	3674	QUI2009A	24/06/2009									PDA, Blotter (Hongos), Elisa (Potyvirus, SBMV), Medios de cultivo, tinción de Gram, serología (Bacterias: Xanthomonas campestris pv phaseolicola, Pseudomonas syringae pv phaseolicola, Bacilos Gram +)	Desmodium	heterocarpon
154	3843	QUI2009A	24/06/2009									PDA, Blotter (Hongos), Elisa (Potyvirus, SBMV), Medios de cultivo, tinción de Gram, serología (Bacterias: Xanthomonas campestris pv phaseolicola, Pseudomonas syringae pv phaseolicola, Bacilos Gram +)	Desmodium	heterocarpon

8.2 Anexo 2

Preparación de medios de cultivo utilizados para el diagnóstico de hongos y bacterias.

Todos los medios se preparan con agua destilada y después se esterilizan.

Medio PDA (Potato Dextrosa Agar)

Agar de patata y dextrosa	39 g
Agar granulado	10 g
Volumen final con agua destilada	1 l

Medio YDC

Extracto de levadura	10 g
Dextrosa	20 g
Carbonato de calcio	20 g
Agar	20 g
Volumen final con agua destilada	1 l

Medio MXP

Fosfato ácido de dipotasio	0.8 g
Fosfato ácido de potasio	0.6 g
Bromuro de potasio	10.0 g
Extracto de levadura	0.7 g
Almidón de papa	8.0 g
Glucosa	1.0 g
Agar	20.0 g
Volumen final con agua destilada	1 l

Medio King B

Proteosa peptona	20.0 g
Fosfato ácido de dipotasio tetrahidratado	1.5 g
Sulfato de magnesio heptahidratado	1.5 g
Agar	20.0 g
Glicerol	10.0 ml
Volumen final con agua destilada	1 l
pH	7.2

Medio NBY

Nutrient broth	8.0 g
Yeast extract	2.0 g
KH ₂ HPO ₄	2.0 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
Glucose	2.5 g
Agar	15.0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g
Volumen final con agua destilada	1 l

8.3 Anexo 3

Listado de virus del género Potyvirus que se detectan con el antisuero comercial para el grupo de Potyvirus.

Grupo de Potyvirus detectados por el test	
Alstroemeria Mosaic Virus	Narcissus Degeneration Virus
Amaranthus Leaf Mottle Virus	Narcissus Yellow Stripe Virus
Araujia Mosaic Virus	Onion Yellow Stripe Virus
Asparagus Virus 1	Ornithogalum Mosaic Virus
Bean Common Mosaic Virus	Papaya Ringspot Virus-P
Bean Yellow Mosaic Virus	Papaya Ringspot Virus-W
Bearded Iris Mosaic Virus	Parsnip Mosaic Virus
Beet Mosaic Virus	Passion Fruit Woodiness Virus
Bidens Mottle Virus	Pea Mosaic Virus
Blackeye Cowpea Mosaic Virus	Pea Seed Borne Mosaic Virus
Cardamon Mosaic Virus	Peanut Mottle Virus
Carnation Vein Mottle Virus	Peanut Stripe Virus
Carrot Thin Leaf Virus	Pepper Mottle Virus
Celery Mosaic Virus	Pepper Severe Mosaic Virus
Centrosema Mosaic Virus	Pepper Veinal Mottle Virus
Clover Yellow Vein Virus	Plum Pox Virus
Cockstoot Streak Virus	Pokeweed Mosaic Virus
Colombian Datura Virus	Potato Virus A
Commelina Mosaic Virus	Potato Virus V
Cowpea Aphid-Borne Mosaic Virus	Potato Virus Y
Daphne Y Virus	Soybean Mosaic Virus
Dasheen Mosaic Virus	Statice Virus Y
Datura Shoestring Virus	Sugarcane Mosaic Virus
Freesia Mosaic Virus	Sweet Potato Feathery Mottle Virus
Garlic Mosaic Virus	Sweet Potato Latent Virus
Gloriosa Stripe Mosaic Virus	Sweet Potato mild mottle virus
Groundnut Eyespot Virus	Tamarillo Mosaic Virus
Guinea Grass Mosaic Virus	Tobacco Vein Mottling Virus
Helenium Y Virus	Tobacco Etch Virus
Henbane Mosaic Virus	Tulip Breaking Virus
Hippeastrum Mosaic Virus	Tulip Chlorotic Blotch Virus
Hyacinth Mosaic Virus	Turnip Mosaic Virus
Iris Fulva Mosaic Virus	Vallota Mosaic Virus
Iris Mild Mosaic Virus	Watermelon Mosaic Virus 1
Iris Severe Mosaic Virus	Watermelon Mosaic Virus 2
Johnsongrass Mosaic virus	White Lupin Mosaic Virus
Leek Yellow Stripe Virus	Wisteria Vein Mosaic Virus
Lettuce Mosaic Virus	Yam Mosaic Virus
Maize Dwarf Mosaic Virus	Zucchini Yellow Fleck Virus
Malva Vein Clearing Virus	Zucchini Yellow Mosaic Virus

8.4 Anexo 4

Preparación de soluciones para la realización de la técnica de ELISA.

Todas las soluciones deben mantenerse a 4-6 °C.

Buffer PBS (pH 7.4)

Cloruro de sodio	8.0 g
Fosfato de potasio monobásico	0.2 g
Fosfato de sodio dibásico 12 hidratado	2.9 g
Cloruro de potasio	0.2 g
Volumen final con agua destilada	1 l

Buffer PBS-Tween

Buffer PBS + 0.5 ml Tween-20 por litro

Buffer de cubrimiento utilizado en la ELISA de doble sándwich (DAS ELISA) pH 9.6

Carbonato de sodio anhidro	0.318 g
Bicarbonato de sodio	0.586 g
Volumen final con agua destilada	200 ml
Preparar fresca cada semana	

Buffer de muestras para DAS ELISA (antígeno)

Polivinil-pirrolidona, PVP 40.000 MW	10 g
Sulfato de Sodio anhidro	0.65 g
Ovoalbumina	1 g
Volumen final con PBS-Tween	500 ml

Buffer de conjugado para DAS ELISA

Seroalbumina bovina	0.5 g
Volumen final con PBS-Tween	250 ml

Buffer de muestras para ELISA INDIRECTA (pH 9.6)

Carbonato de sodio anhidro	0.795 g
Bicarbonato de sodio	1.465 g
Polivinil-pirrolidona, PVP 40.000 MW	10.0 g
Volumen final en agua destilada	500 ml

Buffer de cubrimiento y conjugado ELISA INDIRECTA

Seroalbumina bovina	0.5 g
Polivinil-pirrolidona, PVP 40.000 MW	5.0 g
Volumen final con PBS-Tween	250 ml

8.5 Anexo 5

Esquema utilizado en el LSG para la distribución de muestras en las pruebas de ELISA.

ELISA FECHA _____

Placa No. _____

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D				Control (+)	Blanco	Control (-)						
E												
F							Control (+)	Blanco	Control (-)			
G												
H												

8.6 Anexo 6

Tabla Excel diseñada para el ingreso de resultados de acuerdo a los diferentes patógenos evaluados.

NLSG	Accesión	Procedencia	FEntraSanidad	FRealizPrueba	Hongo	Virus	Bact.	Otros	Evaluación Fitosanitaria	Observ.	Pruebas	Género	Especie
219	G25109	PAL2008A	1/30/2008	3/17/2009	A	A	A		ACEPTADO		PDA, Blotter (Hongos), Elisa (Potyvirus, SBMV), Medios de cultivo, tinción de Gram, serología (Bacterias: Xanthomonas campestris pv phaseolicola, Pseudomonas syringae pv phaseolicola, Bacilos Gram +)	<i>Phaseolus</i>	<i>lunatus</i>
220	G25110	PAL2008A	1/30/2008	3/17/2009	A	A	A		ACEPTADO		PDA, Blotter (Hongos), Elisa (Potyvirus, SBMV), Medios de cultivo, tinción de Gram, serología (Bacterias: Xanthomonas campestris pv phaseolicola, Pseudomonas syringae pv phaseolicola, Bacilos Gram +)	<i>Phaseolus</i>	<i>lunatus</i>
221	G25113B	PAL2008A	1/30/2008	3/17/2009	A	R	A		RECHAZADO	Potyvirus	PDA, Blotter (Hongos), Elisa (Potyvirus, SBMV), Medios de cultivo, tinción de Gram, serología (Bacterias: Xanthomonas campestris pv phaseolicola, Pseudomonas syringae pv phaseolicola, Bacilos Gram +)	<i>Phaseolus</i>	<i>lunatus</i>