



## Estudio preliminar de tratamientos de desinfección de semilla en variedades locales de cebolla de Tenerife

Diciembre 2012

## ESTUDIO PRELIMINAR DE TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN DE SEMILLA EN VARIEDADES LOCALES DE CEBOLLA DE TENERIFE

Hernández Hernández, Julio M. (1); Perera González, Santiago D. (2); Siverio de la Rosa, Felipe (3); Tascón Rodríguez, Catalina (4).

- (1) Departamento de Protección Vegetal del Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA)
- (2) Servicio Técnico de Agricultura y Desarrollo Rural. Cabildo Insular de Tenerife
- (3) Sección de Laboratorio de Sanidad Vegetal. Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Aguas del Gobierno de Canarias
- (4) Centro de Conservación de la Biodiversidad Agrícola de Tenerife (CCBAT)

### 1.- INTRODUCCIÓN

El Centro de Conservación de la Biodiversidad Agrícola de Tenerife (CCBAT) trabaja en la caracterización y selección de las variedades tradicionales de cebolla de Tenerife. Los mayores problemas a los que se enfrenta actualmente este cultivo en la isla son la insuficiente producción de semillas, que no alcanza a cubrir la demanda, y la necesidad de hacer selección para obtener variedades más homogéneas y estables.

Las semillas de estas variedades locales son producidas anualmente por los agricultores tradicionales de cada zona. Su distribución es directa, no utilizándose ningún método de control fitosanitario. Algunos hongos que producen enfermedades importantes del cultivo pueden ser transmitidos por semillas, como *Botrytis allii*, *Alternaria porri*, *Fusarium* spp., etc. (Diekmann, 1997). El-Nagerabi y Abdalla (2004) identificaron en semillas de cebolla de cultivares sudaneses hasta once especies de *Aspergillus*, siendo el más frecuente *A. niger*. A este género le seguía *Penicillium*, *Alternaria*, y en menor medida otros como *Sclerotium*, *Byssochlamys*, *Rhizopus*. Peluffo y González (2008) encontraron en semillas de cebolla producidas en Uruguay los siguientes hongos *Botrytis squamosa*, *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Stemphylium* sp., *Fusarium* sp. y *Penicillium* sp. En diferentes localidades de Maharashtra (India), Swati *et al.* (2011) encontraron doce especies de hongos en una variedad de semilla local. El más frecuente fue *A. niger*. Sin embargo, en Puerto Rico, Velez *et al.* (2004) encontraron que en semillas comerciales de cebolla era predominante la combinación *Aspergillus niger* y *Rhizopus* sp. Hongos mayoritariamente saprófitos como *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. podrían ser el origen de infecciones en semilleros, plantas maduras y bulbos en condiciones cálidas (Lorbeer *et al.*, 2000; El-Nagerabi y Abdalla, 2004). *Aspergillus* sp. puede ser transmitido a las plantas jóvenes a partir de semillas infestadas (García, 2003).

**Tabla 1.- Algunos hongos transmitidos por las semillas de especies de *Allium* (Diekmann, 1997)**

Hongo	Internamente transmitido por semillas	Externamente transmitido por semillas	Contaminación concomitante
<i>Alternaria porri</i>	--	X	--
<i>Botrytis allii</i>	--	X	X
<i>Fusarium</i> spp.	Posiblemente	Posiblemente	X
<i>Sclerotium cepivorum</i>	--		X
<i>Stemphylium vesicarium</i>	X	X	--

En los cultivos de plantas de cebolla de variedades locales de Tenerife son frecuentes las enfermedades producidas por *Botrytis* y *Alternaria*, mientras que las enfermedades más importantes en postcosecha se deben a los hongos *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, en este orden de importancia. Como ya se ha dicho anteriormente, estos hongos pueden ser transmitidos por semilla (García, 2003). En ensayos de postcosecha llevados a cabo por el CCBAT con variedades locales de cebolla de Tenerife (resultados no publicados), se verificó que la presencia de los hongos *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* en los bulbos era superior al 40, 15 y 2%, respectivamente.

*Burkholderia gladioli* pv. *allicola* y *Burkholderia cepacia* son bacterias fitopatógenas que causan específicamente enfermedades en la cebolla, mientras que especies de otros géneros como *Pseudomonas* y *Pectobacterium* afectan a muchos otros cultivos. También se detectan otras especies de bacterias oportunistas o saprofitas en podredumbres de la cebolla en condiciones ambientales desfavorables o en presencia de otros organismos nocivos. Todas estas bacterias sobreviven en los restos vegetales y en el suelo. Sólo hay evidencias científicas de que la bacteria *Pantoea ananatis* que causa podredumbres en el bulbo (*center rot*) puede encontrarse en semilla y transmitir la enfermedad (Walcott *et al.*, 2002), mientras que *Xanthomonas* sp., que causa el tizón bacteriano de la cebolla, ha podido detectarse en semilla, pero no se ha confirmado su transmisión a partir de ellas (Roumagnac, 2000).

En Tenerife se han aislado especies de bacterias como *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Burkholderia* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas* sp., *Pantoea* sp., *Enterobacter cloacae*, *Serratia* sp., etc. a partir de cebollas enfermas en campo o en postcosecha.

Sin embargo, en Tenerife y en Canarias, hasta la fecha, no se han estudiado los microorganismos más frecuentes en las semillas de esta aliácea.

## 2.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Diekmann (1997), en la guía técnica para el movimiento seguro de germoplasma de *Allium*, cree necesario el lavado y desinfección de semilla con hipoclorito sódico o con un pesticida apropiado, para evitar la propagación de enfermedades y la contaminación de nuevos campos de cultivo.

En la producción de semillas de cebollas certificadas es habitual el empleo de fungicidas para el control de enfermedades transmitidas por semilla que puedan afectar al semillero, al cultivo, e incluso, a la conservación. Hasta el momento el fungicida más empleado ha sido tiram, para el control de hongos de nascencia como *Phyrium* y otros muy frecuente en este cultivo como *Alternaria*, *Botrytis* y *Fusarium* (Anónimo, 1992). Sin embargo, aún no se ha contrastado su eficacia sobre los hongos más frecuentemente encontrados en las semillas de cebolla de Tenerife. Asimismo, el hipoclorito sódico ha sido ampliamente utilizado en la desinfección de semillas de numerosas especies vegetales, al tratarse de un producto de amplia distribución y fácil acceso, especialmente cuando no se disponía de otros desinfectantes (Anónimo, 1992).

La termoterapia es una técnica utilizada para la desinfección de semillas, sobre todo de hortalizas, siendo altamente recomendada para tomates y pimientos, y su objetivo principal es la eliminación de los virus transmitidos por semilla. Hasta el momento no se conoce la transmisión de virus a través de semilla en cebolla, aunque es interesante el efecto positivo que esta técnica tiene sobre el control de otros patógenos. Aveling *et al.* (1993) probaron la eficacia de distintos métodos de desinfección de semilla de cebolla, como la termoterapia y los tratamientos con tiram o hipoclorito sódico, señalando que el más efectivo era la termoterapia. Como conclusión recomendaban sumergir las semillas de cebolla durante 20 minutos en agua a 50°C, para controlar *Alternaria porri* y *Stemphylium vesicarium* de forma más eficaz que la aplicación de fungicidas. Sin embargo, este tratamiento térmico redujo la germinación y la emergencia de las semillas comparadas con el control.

**El objetivo de este ensayo fue estudiar: (1) las poblaciones de microorganismos fitopatógenos presentes en las semillas de cebolla de variedades tradicionales de Tenerife (2) la eficacia de la aplicación de productos químicos y de termoterapia en su control y (3) el efecto de éstos sobre la germinación. Todo ello, con el fin de poder disponer de un tratamiento que aplicado a las semillas obtenidas por los agricultores permita su distribución posterior con las mejores garantías fitosanitarias.**

### 3.- MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1.- MATERIAL VEGETAL

##### 3.1.1.- Ensayo de desinfección química

Se emplearon semillas de tres variedades locales de cebollas de Tenerife conservadas en el CCBAT y cuyas características se citan en la tabla 2.

**Tabla 2.- Resumen de las variedades con sus características fundamentales**

Variedad	Código CBT	Color	Forma	Tamaño medio bulbo
<b>Carrizal Alto (CA)</b>	CBT00118	Rosa intenso	Elíptica	Grande
<b>Masca (M)</b>	CBT02513	Rosa asalmonado	Achatada	Mediano
<b>Guayonje (G)</b>	CBT02511	Púrpura oscuro	Mayoritariamente elíptica	Mediano

Las semillas fueron obtenidas en el año 2010 por agricultores productores de semillas en las zonas tradicionales de cultivo.

##### 3.1.2.- Ensayo de termoterapia

Se emplearon semillas de la variedad local de cebolla CA.

#### 3.2.- TRATAMIENTOS

##### 3.2.1.- Ensayo de desinfección química

Se emplearon dos productos químicos y el control:

- **Tiram al 50%** (Tisar semillas, Exclusivas Sarabia) a una dosis de 3 µl/g de semilla, según indicaciones del fabricante.
- **Hipoclorito sódico** al 1% (lejía comercial diluida) por inmersión durante 15 minutos y posterior lavado tres veces en agua destilada estéril.
- **Control** en el que las semillas no se sometieron a ningún proceso de desinfección.

##### 3.2.2.- Ensayo de termoterapia

Se aplicaron dos técnicas de desinfección:

- **Inmersión en agua.** Semillas en tubo de ensayo con agua destilada estéril al baño María con recirculación de agua. Las combinaciones temperatura/tiempo utilizadas fueron: 45°C/30 min, 50°C/20 min y 55°C/20 min.
- **Calor seco.** Semillas en placa de Petri de vidrio en estufa. Las combinaciones temperatura/tiempo utilizadas fueron: 70°C/4 días, 80°C/2 días y 85°C/2 días.

### **3.3.- PARÁMETROS EVALUADOS**

#### **3.3.1.-Viabilidad de las semillas**

Pruebas de germinación en placas de Petri con sustrato de papel absorbente sobre algodón humedecido con agua destilada. Se determinó el porcentaje de germinación a los seis y doce días de acuerdo con las normas de *International Rules for Seed Testing* (ISTA, 2010). Las placas de Petri se introdujeron en una germinadora marca SELECT a 20°C de temperatura y 90% de humedad relativa.

##### **3.3.1.1.- Ensayo de desinfección química**

###### **- Porcentaje de germinación inmediatamente después del tratamiento.**

Se emplearon tres repeticiones de 40 semillas por variedad y tratamiento.

##### **3.3.1.2.- Ensayo de termoterapia**

Se emplearon 50 semillas con dos repeticiones a excepción de uno de los tratamientos con calor seco (85°C/2 días) en el que se utilizaron tres repeticiones de 100 semillas. La viabilidad se evaluó en tres momentos después de la desinfección:

###### **- Porcentaje de germinación inmediatamente después de los tratamientos.**

###### **- Porcentaje de germinación a los dos meses y medio.**

Las semillas se mantuvieron durante este tiempo en tubos de vidrio con gel de sílice a temperaturas próximas a 20°C, siguiendo el proceso habitual para la distribución de semillas a agricultores en el mismo año de producción. En este caso se evaluaron las siguientes combinaciones: inmersión en agua, 55°C/20 min y calor seco, 85°C/2 días.

###### **- Porcentaje a los cuatro meses.**

Las semillas se conservaron del mismo modo que se describe en el apartado anterior. En este caso se evaluaron las siguientes combinaciones: inmersión en agua, 45°C/30 min y 50°C/20 min; y calor seco, 70°C/4 días y 80°C/2 días. En estas semillas también se determinó el porcentaje de germinaciones anormales y sus tipos.

#### **3.3.2.- Determinación y evaluación de los aislados fúngicos por tratamiento**

Las semillas se dejaron secar en cámara de flujo laminar sobre papel de filtro esterilizado y se sembraron en placa de Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar con estreptomicina (PDAS, Panreac Cultimed 413758 con 300 mg/l de estreptomicina). Por cada variedad y tratamiento se prepararon cinco placas con diez semillas en los ensayos de desinfección química y diez placas con diez semillas en los de termoterapia.

Las placas se incubaron a 25°C en oscuridad y, una semana después de la siembra, se tomó nota de las colonias fúngicas y bacterianas presentes en cada semilla. También se anotaron los casos en los que no se observó crecimiento. Los resultados se expresaron como porcentaje de semillas infestadas por cada especie fúngica y por bacterias.

Las determinaciones taxónomicas de las colonias fúngicas se hicieron sólo a nivel de género basadas en observaciones de características culturales (forma y color) y microscópicas (tipo de micelio, conidióforos, conidias y ontogénesis de las mismas) hechas al binocular y al microscopio óptico. En el caso de colonias con características del orden Mucorales, no se hicieron determinaciones del género.

### 3.3.3.- Determinación y evaluación de las bacterias por tratamiento

Se introdujeron cincuenta semillas (aproximadamente 0,15 g) en un tubo de ensayo con tres ml de agua destilada estéril y se trituraron 10 s a 15000 rpm (Polytron PT3100) para cada tratamiento y variedad. El triturado se mantuvo 15 minutos a 5°C, se agitó y se centrifugó diez minutos a 180 g para clarificar la suspensión. Se recogió el sobrenadante y se prepararon dos diluciones (1/10 y 1/100) que se sembraron (50 µl/placa) en medio de cultivo LPGAC (levadura, 5 g/l; batopeptona, 5 g/l; glucosa, 10 g/l; agar, 20 g/l; y cicloheximida, 200 mg/l). Las placas se incubaron a 25°C y se efectuaron lecturas a 3 y 7 días. Se estimaron las unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo de semilla y se aislaron representantes de las diferentes colonias por su abundancia y características morfológicas. Los aislados seleccionados se purificaron y se caracterizaron mediante las siguientes pruebas: potasa de Ryu (Suslow *et al.*, 1982), prueba de la aminopetidasa (BioFix, Macherey-Nagel), fermentación de Hugh-Leifson (Hugh y Leifson, 1953) y oxidasa (Kovacs, 1956); y se identificaron utilizando microplacas BIOLOG GN2 y MicroStation System, MicroLog Version 4.2 y la base de datos GN 6.01 WE, tal y como describe el fabricante. No se efectuaron identificaciones de las bacterias Gram negativas.

### 3.4.- DISEÑO ESTADÍSTICO

#### 3.4.1.- Ensayo de desinfección química

La viabilidad de las semillas se estudió de acuerdo a un diseño factorial con tres variedades y tres tratamientos. Se realizó el análisis de varianza y la prueba de separación de medias de Tukey, empleando el programa informático estadístico Statistix 9.0.

Para estudiar las especies fúngicas presentes se realizó un estudio estadístico descriptivo por variedad y tratamiento del porcentaje de semillas en las que se observó crecimiento fúngico y bacteriano.

#### 3.4.2.- Ensayo de termoterapia

En los estudios de viabilidad de semilla se realizó un diseño completamente al azar en el que se determinó la media aritmética de los porcentajes de germinación.

En la determinación y evaluación de aislados fúngicos se efectuó un estudio estadístico descriptivo del porcentaje de semillas con crecimiento fúngico y bacteriano. También se calculó para cada especie fúngica el porcentaje de reducción frente al control no tratado.

## 4.- RESULTADOS

### 4.1.- Ensayo de desinfección química

#### 4.1.1.- Viabilidad de las semillas

Los porcentajes de germinación de las semillas para los diferentes tratamientos y variedades se exponen en la tabla 3 y 4, respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos, pero sí entre variedades. El análisis de la interacción tratamiento por variedad no detectó diferencias significativas.

Las diferencias que se aprecian en la germinación de estas variedades son debidas probablemente más a cuestiones varietales y de extracción y manipulación de las semillas (son semillas obtenidas por los agricultores utilizando procedimientos tradicionales) que a los tratamientos desinfectantes empleados.

**Tabla 3.- Porcentaje de germinación y ANOVA por tratamientos**

	Porcentaje de germinación	
	Real	Transformado*
Control	78,61	65,17 ± 4,80a
Tiram	77,78	63,63 ± 4,02a
Lejía	71,67	58,75 ± 3,71a
p		0,072ns

\*Datos sometidos a una transformación de  $\arcsen\sqrt{x}$  para su análisis estadístico. Valores medios seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes según la prueba de rango múltiple de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

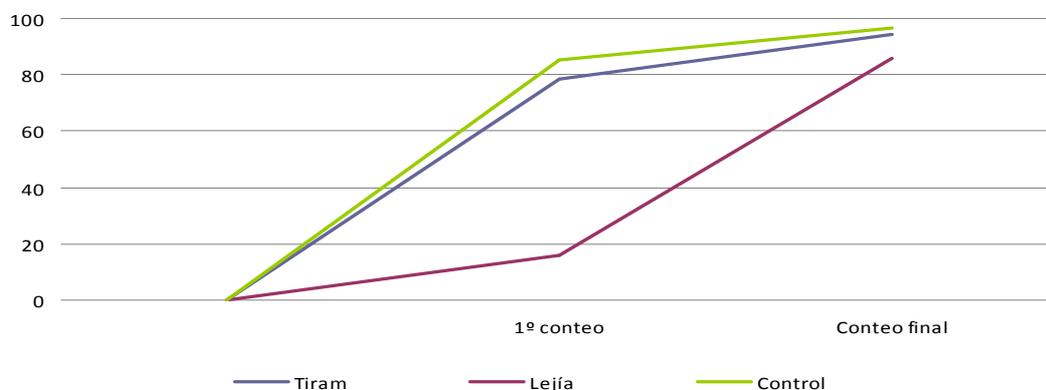
**Tabla 4.- Porcentaje de germinación y ANOVA por variedades**

	Porcentaje de germinación	
	Real	Transformado*
Carrizal Alto (CA)	92,22	75,73 ± 2,81a
Masca (M)	78,33	62,45 ± 1,27b
Guayonje (G)	57,50	49,39 ± 1,70c
p		0,000

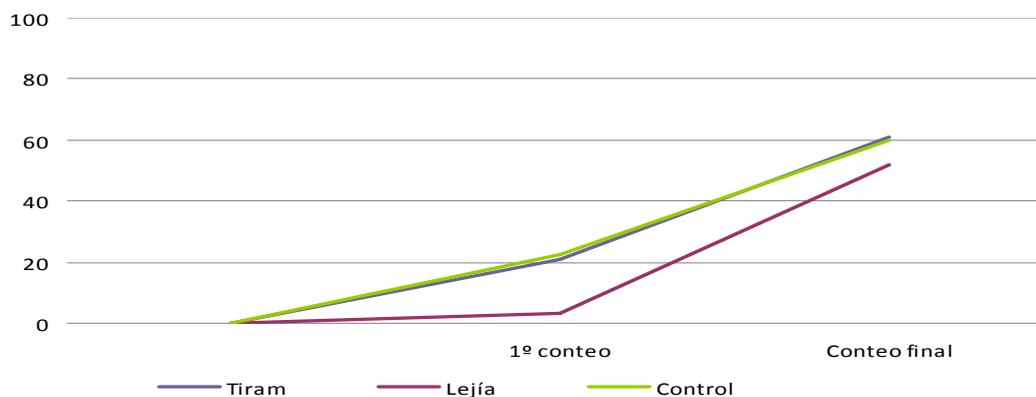
\*Datos sometidos a una transformación de  $\arcsen\sqrt{x}$  para su análisis estadístico. Valores medios seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes según la prueba de rango múltiple de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

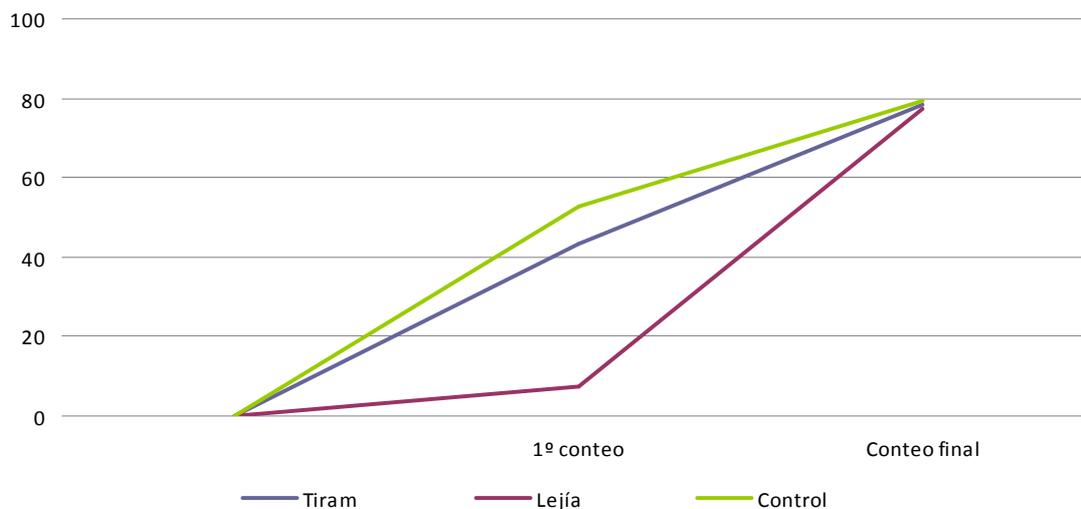
En las gráficas 1, 2 y 3 se presenta la evolución en el tiempo de la germinación para cada variedad y tratamiento. El tratamiento con lejía produjo un retraso en la germinación de la semilla de las tres variedades evaluadas y una ligera reducción en el porcentaje de germinación final en CA y G. Las semillas del control y del tratamiento con tiram mostraron una evolución similar al germinar.

**Gráfica 1.- Evolución de la germinación para cada tratamiento en la variedad Carrizal Alto**



**Gráfica 2.- Evolución de la germinación para cada tratamiento en la variedad Guayonje**



**Gráfica 3.- Evolución de la germinación para cada tratamiento en la variedad Masca**

#### 4.1.2.- Determinación y evaluación de los aislados

En las siembras de las semillas se identificaron los hongos: *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Gliocladium* sp., mucorales, *Penicillium* sp. y *Trichoderma* sp.

Los resultados se presentan en la Tabla 5. La mayoría de las semillas de las tres variedades del tratamiento control estaban infestadas por especies fúngicas. Los controles no tratados, que representarían las poblaciones naturales de las especies fúngicas en las semillas, presentan cierta homogeneidad entre variedades, en particular, para las especies *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., y *Gliocladium* sp. Para algunas especies de hongos, los porcentajes de semillas infestadas en este tratamiento fueron inferiores a los de los tratamientos lejía y tiram, lo que podría explicarse teniendo en cuenta que las semillas de cada uno de los tratamientos y las del control presenten poblaciones fúngicas diversas debido a que éstas se distribuyen de manera aleatoria en las semillas (Walcott, 2003).

Por especies, *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. y *Fusarium* sp., fueron las más abundantes en las semillas no tratadas de la variedad G. En las variedades CA y M, las especies fúngicas con porcentajes más altos de detección correspondieron a *Penicillium* sp, seguido por Mucorales, *Aspergillus* sp. y *Fusarium* sp., lo que coincide, a excepción de los mucorales, con lo descrito en la literatura para semillas de cebolla (Nagerabi y Abdalla, 2004; Peluffo y González, 2008; Swati *et al.*, 2011). Los porcentajes de detección de mucorales citados en estos trabajos suelen ser más bajos y en orden de importancia se sitúan casi siempre después de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp., aunque para Puerto Rico, Velez *et al.* (2004) cita que *Rhizopus niger* junto a *Fusarium* sp. fue la combinación más abundante en semillas comerciales. Los altos porcentajes de semillas en las que se detectaron mucorales podrían explicarse por el método de valoración utilizado, que consideró el 100% de infestación en las placas cubiertas por micelio de estas especies, predominantemente *Rhizopus* sp., y no excluyéndose la presencia de *Mucor* sp. Este método puede sobrestimar la infestación por dichas especies ya que el crecimiento rápido de las mismas invade las placas a los tres o cuatro días después de las siembras impidiendo ver el número real de colonias. Otras especies como *Cladosporium* sp. y *Trichoderma* sp. presentaron porcentajes muy bajos porque posiblemente no son colonizadores importantes de semillas de cebolla (Walcott, 2003). No obstante, para poder detectar poblaciones fúngicas menos numerosas y de distribución más errática, habría sido necesario aumentar el tamaño de la muestra o utilizar medios semiselectivos. Esto habría evitado o reducido la competencia entre los hongos más frecuentemente encontrados en ellas o los de crecimiento invasivo como los mucorales.

**Tabla 5.- Porcentaje de semillas infestadas por especie fúngica y porcentaje medio de infestación por variedad y tratamiento**

	GUAYONJE					CARRIZAL ALTO					MASCA				
	L	T	C	Med	SD	L	T	C	Med	SD	L	T	C	Med	SD
Pen	48	48	76	57,3	13,2	58	76	38	57,3	19	42	82	24	49,3	29,7
Asp	6	14	18	12,7	5	6	12	18	12	6	0	14	16	10	8,7
Fus	8	14	4	8,7	4,1	12	10	4	8,7	4,2	8	4	0	4	4
Cla	4	0	0	1,3	1,9	2	0	0	0,7	1,1	4	0	0	1,3	2,3
Gli	14	0	0	4,6	6,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Muc	0	0	0	0	0	0	0	40	13,3	23,1	0	0	60	20	34,6
Tri	0	0	2	0,7	0,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bac	10	18	0	9,3	7,4	2	2	0	1,3	1,1	0	0	0	0	0
SC	10	6	0	5,3	4,1	20	0	0	6,7	11,5	44	0	0	14,7	25,4
Ind	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0,7	1,1

L=Lejía; T=Tiram; C=Control; Med=Media; SD=Desviación estándar; Pen=*Penicillium* sp.; Asp=*Aspergillus* sp.; Fus=*Fusarium* sp.; Cla=*Cladosporium* sp.; Gli=*Gliocladium* sp.; Muc=Especies del Orden Mucorales; Tri=*Trichoderma* sp.; Bac=Especies de bacterias no determinadas; SC=Semillas sin crecimiento fúngico; Ind=Especie fúngica no determinada.

Los tratamientos control y tiram presentaron los porcentajes más altos de semillas infestadas por especies fúngicas y bacterianas, y el tratamiento lejía, los más bajos (ver tabla 6). En todos los tratamientos y variedades, *Penicillium* sp. mostró los porcentajes de semillas infestadas más altos, seguido de *Aspergillus* sp. y *Fusarium* sp., aunque ésta última especie presentó porcentajes más altos que *Aspergillus* en el tratamiento con lejía.

Los dos tratamientos químicos fueron efectivos para la eliminación de los mucorales en las variedades de semilla que los contenían (CA y M). Los valores obtenidos en el control podrían estar sobrestimados como ya se explicó. En algunos trabajos se citan eficacias menores del tiram y la lejía para el control de especies de *Rhizopus* sp. Sin embargo, en el trabajo de Joshi *et al.* (2007) con tiram se observaron las mayores reducciones en los porcentajes de detección de *Rhizopus* sp. y *Aspergillus* sp.

En nuestro caso, para el resto de las especies fúngicas, la lejía es el producto que consigue mayores reducciones, especialmente en la variedad M, aunque no elimina especies potencialmente fitopatógenas y, por tanto, no resulta un tratamiento adecuado para la desinfección de semillas de cebolla.

La respuesta tan errática de los tratamientos aplicados podría deberse, entre otras causas, a que estas semillas tienen una superficie áspera, irregular y aristada, lo que facilita la formación de burbujas de aire en las hendiduras o rugosidades, impidiendo que el tratamiento llegue a toda la superficie. También podría deberse a las diferencias de crecimiento saprofítico, competencia y antagonismo entre especies fúngicas en medio de cultivo (Walcott, 2003).

Los porcentajes más altos de semillas infestadas con algunas especies fúngicas en los tratamientos lejía y tiram respecto al control, pueden justificarse por la mayor presencia de mucorales en el control que compiten con las otras especies fúngicas y que, además, podrían haber interferido en la lectura de los resultados de crecimiento.

Se observó la presencia de bacterias en los tratamientos lejía y tiram en las semillas de las variedades G y CA y no en el control, a pesar de que el medio contenía estreptomina. Estos resultados pueden indicar que las poblaciones bacterianas aisladas no son sensibles a la estreptomina a la concentración utilizada.

Ninguno de los tratamientos ensayados permitió eliminar totalmente las poblaciones de especies fúngicas presentes por lo que sería necesario probar otras técnicas de desinfección.

**Tabla 6.- Porcentaje de semillas infestadas por especie fúngica, bacterias y de semillas no infestadas en cada uno de los tratamientos**

	Pen	Asp	Fus	Cla	Gli	Muc	Tri	Bac	SC	Ind	Inf
Lejía	49,3	4	9,3	3,3	4,7	0	0	4	24,7	0,7	75,3
Tiram	68,7	13,3	9,3	0	0	0	0	6,7	2	0	98
Control	46	17,3	2,7	0	0	33,3	0,7	0	0	0	100

Pen= *Penicillium* sp.; Asp=*Aspergillus* sp.; Fus=*Fusarium* sp.; Cla=*Cladosporium* sp.; Gli=*Gliocladium* sp.; Muc=Especies del Orden Mucorales; Tri=*Trichoderma* sp.; Bac=Especies de Bacterias no determinadas; SC=Semillas sin crecimiento fúngico; Ind=Especie fúngica no determinada; Inf=porcentaje total de semillas infestadas por especies fúngicas y bacterias

#### 4.1.3.- Determinación y evaluación de las bacterias presentes por tratamiento

Los resultados de los aislamientos de bacterias se recogen en la tabla 7. Los controles muestran una concentración de bacterias de unas  $10^5$ - $10^6$  unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo de semilla. Los tratamientos utilizando lejía y tiram redujeron la concentración de bacterias respecto al control en las semillas de la variedad CA y G, sin que se apreciaran en número absoluto diferencias entre los dos tratamientos en el primer caso y con grandes diferencias en el segundo. El número de tipos de colonias detectados en los tratamientos respecto al control se redujo en el caso de las semillas CA y aumentó en M y G (no se detallan estos resultados). Se seleccionaron 16 aislados bacterianos de los tres lotes de semilla para su caracterización, 11 de ellas Gram negativas, que se muestran en la tabla 8.

**Tabla 7.- Resultados de los tratamientos de las semillas con lejía y tiram sobre el crecimiento bacteriano en medio de cultivo LPGAC**

Semilla <sup>a</sup>	ufc <sup>b</sup> /g semilla	ufc/semilla
CA	3,10E+05	1124
CAL	1,66E+05	653
CAT	1,68E+05	632
M	7,19E+05	1904
ML	8,20E+05	1878
MT	8,26E+05	2253
G	3,23E+06	10235
GL	6,54E+05	2277
GT	7,28E+04	189

<sup>a</sup> Las letras se corresponden con el origen de las semillas: CA, Carrizal Alto; M, Masca; y G, Guayonje; y con el tratamiento: T, tiram; L, lejía; sin letra adicional, control.

<sup>b</sup> ufc, unidades formadoras de colonias bacterianas en el medio de cultivo LPGAC, por gramo de semilla y por cada semilla.

**Tabla 8.- Caracterización de los aislados bacterianos obtenidos<sup>a</sup>**

AISLADOS	KOH	AP	H y L	OX	BIOLOG
CA.1 <sup>b</sup>	+	ND <sup>c</sup>	-	-	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
CA.2	+	ND	-	+	<i>Pseudomonas</i> sp.
CA.3	-	-	-	-	ND
CA.4	+	ND	-	+	<i>Chryseobacterium gleum/indologenes</i>
M.1	+	ND	-	-	<i>Xanthomonas</i> sp.
M.2	+	ND	-	-	<i>Haemophilus parasuis</i>
M.3	-	-	-	-	ND
M.4	+	ND	-	+	<i>Chryseobacterium gleum/indologenes</i>

AISLADOS	KOH	AP	H y L	OX	BIOLOG
M.5	-	-	+	-	ND
M.6	-	-	-	-	ND
M.7	-	-	-	-	<i>Rhizobium radiobacter</i>
G.1	+	ND	-	-	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
G.2	+	ND	-	+	<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotipo G
G.3	+	ND	+	-	Enterobacteria no identificada
G.4	+	ND	-	-	ND
G.5	+	ND	-	-	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

<sup>a</sup> KOH, prueba de la potasa de Ryu (Suslow *et al.*, 1982); AP, Aminopeptidasa (BioFix, Macherey-Nagel); H y L, prueba de fermentación de Hugh y Leifson (Hugh y Leifson, 1953); OX, oxidasa (Kovacs, 1956); y BIOLOG, identificaron utilizando microplacas BIOLOG GN2, junto con el sistema MicroStation System, MicroLog Version 4.2 y las bases de datos GN 6.01 WE, tal y como describe el fabricante.

<sup>b c</sup> ND, no determinada.

Se observó una elevada concentración de bacterias por peso o unidad de semilla y se encontraron diferencias en las especies de bacterias dependiendo de la variedad. Los tratamientos químicos utilizados actuaron sobre la superficie de las semillas en las que pudo reducir la proporción de bacterias. Sin embargo, una parte importante de ellas no se vio afectada por el producto o se encontró localizada fuera de su alcance, en las hendiduras superficiales donde no pudo llegar o en el interior de la semilla. Estos tratamientos, al depender de la susceptibilidad de las especies bacterianas que predominan en la semilla, no parecen adecuados para su uso general como desinfectantes.

Aunque algunas de las especies bacterianas identificadas se encuentran entre los patógenos bacterianos descritos para la cebolla (*Xanthomonas sp.*, *Pseudomonas sp.*) sería necesario verificar su poder patógeno. Otras de las especies aisladas podrían jugar un importante papel como patógenos secundarios o dependientes de las condiciones ambientales.

## 4.2.- Ensayo de termoterapia

### 4.2.1.- Viabilidad de las semillas

Se observaron pocas diferencias entre el control y los tratamientos con 45, 50, 70 y 80°C. A 55°C se redujo un 10% la germinación y a 85°C fue inexistente (se produjo un intento de emisión de la radícula sin completar la germinación). A los cuatro meses del tratamiento la viabilidad de las semillas se mantuvo en porcentajes similares a los obtenidos inmediatamente después del mismo.

Se apreció un aumento de las germinaciones anómalas al incrementar la temperatura. Las anomalías más frecuentes eran debidas principalmente a raíz corta y bucles. Estos datos parecen indicar una relación entre los tratamientos a temperaturas altas y el aumento de germinaciones anormales, aunque habría que confirmarlo con otros ensayos. Las plantas que provienen de semillas con germinación anormal no muestran todo su potencial de crecimiento en condiciones favorables de suelo, humedad, temperatura y luz (ISTA, 2010).

En la tabla 9 se presentan los resultados de los porcentajes de germinación de los diferentes tratamientos, en la gráfica 4, la evolución en el tiempo de la germinación para cada tratamiento y en las fotos 1-6, las diferencias en la germinación en el primer conteo realizado a los seis días.

En el tratamiento con calor seco a 85°C no germinaron las semillas y en los tratamientos con calor seco a 80° e inmersión a 55°C se observó un retraso en la germinación.

**Tabla 9.- Porcentaje de germinación después del tratamiento y a los 4 meses**

	Después del tratamiento	A los 4 meses del tratamiento
Control	90	93
Inmersión en agua:45 °C /30 m	89	92
Inmersión en agua:50° C /20 m	95	89
Inmersión en agua:55 °C /30 m	80	84*
Calor seco: 70 °C/4 días	86	89
Calor seco: 80 °C/2 días	87	87
Calor seco: 85°C/2 días	0	0*

\* A los 2.5 meses después del tratamiento.

**Gráfica 4.- Evolución de la germinación en cada tratamiento de termoterapia**

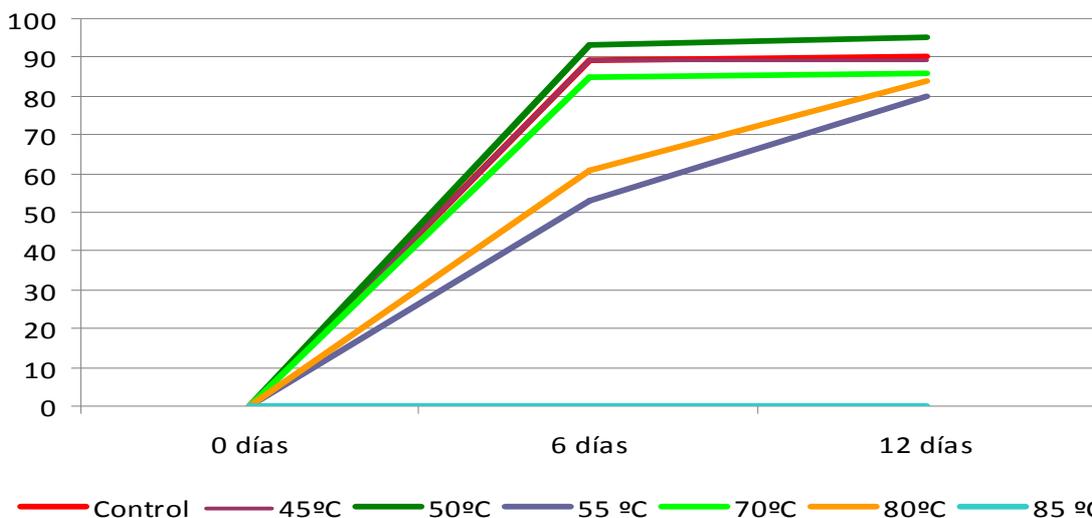


Foto 1.- 45°C, inmersión



Foto 2.- 50°C, inmersión



Foto 3.- 70°C, calor seco



Foto 4.- 80°C, calor seco



Foto 5.- 85°C, calor seco



Foto 6.- Control

**Fotos 1-6.- Diferencias en la germinación en el primer conteo realizado a los seis días.**

**4.2.2.- Determinación y evaluación de los aislados fúngicos por tratamiento**

Los resultados se presentan en la tabla 10. Las especies detectadas con mayor frecuencia en las semillas fueron *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp. mientras que *Stemphylium* sp., mucorales y otras no identificadas presentaron porcentajes muy bajos. Los tratamientos de 55 y 85°C eliminaron las poblaciones de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp. y mucorales presentes en las semillas, mientras que el tratamiento de 45°C redujo *Aspergillus* sp. en un 20,5%. Los tratamientos de 50, 70 y 80°C obtuvieron porcentajes de reducción respecto al control en *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. superiores al 70%. Los tratamientos que presentaron mayores porcentajes de semillas sin crecimiento microbiano fueron 85, 80, 55, 50 y 45°C.

**Tabla 10.- Porcentaje de semillas infestadas y de reducción respecto al control para los distintos tratamientos térmicos**

	Inm/45°C		Inm/50°C		Inm/55°C		CS/70°C		CS/80°C		CS/85°C	
	Porc. Infest.	Porc. Reduc.										
Pen	22	0	4	81,8	0	100	2,22	89,90	2	90,9	0	100
Asp	31	20,5	11	71,79	0	100	6,67	82,89	1	97,43	0	100
Fus	0	100	0	100	0	100	5,56	44,40	3	0	0	100
Muc	11	-	1	-	0	100	0	-	0	-	0	100
Bac	2	71,4	2	71,4	15	-	31,11	-	6	14,3	16	-
Ind	11	-	11	-	6	25	7,78	-	7	-	1	87,5
SC	28	-	72	-	79	-	55,56	-	80	-	83	-17
CRE	77		29		21		54,45		20			

Pen= *Penicillium* sp.; Asp=*Aspergillus* sp.; Fus=*Fusarium* sp.; Muc=Especies del Orden Mucorales; Bac=Especies de Bacterias no determinadas; Ind=Especie fúngica no determinada; SC=Semillas sin crecimiento fúngico; CRE=Crecimiento; Porc. Infest.=porcentaje de infestación; Porc. Reduc.=porcentaje de reducción respecto al control; - = Porcentajes de reducción negativos o imposibles de calcular por ser mayores los valores en los tratamientos que en los controles o porque los controles no estaban infestados.

En dos de las semillas en las que se detectaron bacterias se observó la inhibición del crecimiento fúngico y la formación de un halo que acotaba el crecimiento de los hongos de las semillas adyacentes (Foto 7). Estas bacterias fueron purificadas y, posteriormente, identificadas como *Bacillus subtilis* mediante la secuenciación del fragmento correspondiente a los primeros 500 pares de bases del ADNr 16S amplificado con los iniciadores 005F y 531R (Woo, et al. 2003).

Se efectuaron estudios del efecto inhibitor de suspensiones concentradas de los aislados de *B. subtilis* aplicados a la semilla. Ninguna de las semillas tratadas presentó ningún otro crecimiento microbiano que el de *B. subtilis*. Asimismo se realizaron pruebas de inhibición *in vitro* frente a una colección de seis aislados fúngicos obtenidos de semilla de cebolla. Las bacterias inhibieron el crecimiento fúngico de todos los aislados comprobándose que su efecto fue fungistático (Foto 8). El efecto de *B. subtilis* sobre la pudrición blanca de la cebolla fue descrito por Utkhede y Rahe (1983).



**Foto 7. Crecimiento fúngico en placa de cultivo PDA y colonia bacteriana en crecimiento a partir de una semilla germinada con efecto inhibitor sobre las colonias de hongos contiguas.**

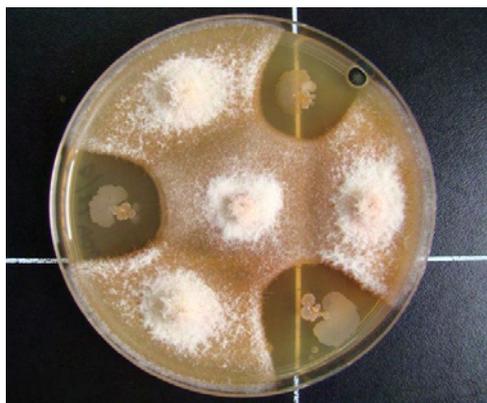


Foto 8. Efecto fungistático de las colonias de *Bacillus subtilis*

#### 4.2.3.- Determinación y evaluación de las bacterias presentes por tratamiento

El efecto de los tratamientos térmicos de la semilla de cebolla en la detección de bacterias se recoge en la tabla 14. Tanto los tratamientos por inmersión como los tratamientos con calor seco redujeron la población de bacterias de la semilla en varias potencias de diez, siendo el tratamiento por inmersión el más efectivo. No se efectuaron observaciones sobre el número de tipos de bacterias ni se realizaron identificaciones. En el tratamiento por calor seco a 85°C/2 días se observa un aumento de la concentración de bacterias detectadas respecto a temperaturas de tratamientos más bajos (80°C/2 días). El tratamiento a 85° se efectuó en una estufa ventilada, mientras que los tratamientos a 70 y 80°C se efectuaron en estufas de convección. Esta circunstancia podría justificar las diferencias encontradas entre estos tratamientos al haber podido modificar el contenido en humedad de la semillas y con ello afectar a su viabilidad.

Tabla 14. Resultados de los tratamientos de las semillas con calor sobre el crecimiento bacteriano en medio de cultivo LPGAC

Tratamiento <sup>a</sup>	ufc <sup>b</sup> /g semilla	ufc/semilla
Control NT	3,59E+07	132000
45°/30 min	4,02E+05	1476
50°/20 min	1,93E+04	71
55°/20 min	2,71E+06	9960
70°/4 días	1,80E+06	6600
80°/2 días	2,55E+05	936
85°/2 días	2,38E+06	8760

<sup>a</sup> Los tratamientos: control no tratado (NT), y tratamientos con tiempos expresados en minutos se efectuaron al baño María, los expresados en días, con calor seco.

<sup>b</sup> ufc, unidades formadoras de colonias bacterianas en el medio de cultivo LPGAC, por gramo de semilla y por cada semilla.

## 5.- CONCLUSIONES

- Las especies fúngicas predominantes en las semillas de las tres variedades locales de cebolla fueron *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.* y *Fusarium sp.*
- El tratamiento con lejía retrasó la germinación en las tres variedades locales de cebolla.
- La variedad Guayonje presentó los menores porcentajes de germinación con independencia del tratamiento.

- **Ninguno de los tratamientos químicos evaluados podría ser útil como tratamiento desinfectante de semillas de cebolla.**
- **En el tratamiento con calor seco a 85°C no germinaron las semillas y en los tratamientos con calor seco a 80° e inmersión a 55°C se observó un retraso en la germinación.**
- **El mejor tratamiento térmico evaluado fue el de 50°C por inmersión en agua durante 20 minutos con el cual se obtuvieron reducciones de las especies fúngicas predominantes superiores al 70% sin afectar a la viabilidad.**
- **Se han obtenido aislados de *Bacillus subtilis* de la semilla de cebolla que han mostrado eficacia *in vitro* contra los aislados fúngicos detectados y que podrían resultar de interés para el tratamiento contra los patógenos de la semilla.**

## 6.- BIBLIOGRAFÍA

Anónimo, 1992. Vegetable seed treatment. Department of Crop Sciences. University of Illinois at Urbana-Champaign. Report on Plant Disease nº 915.

Aveling, TAS, Snyman, HG, Naude SP. 1993. Evaluation of seed treatments for reducing *Alternaria porri* and *Stemphylium vesicarium* on onion seed. Plant Disease, 77(10):1009-1011.

Diekmann M. 1997. FAO/IPGRI. Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm Nº 18. *Allium* spp. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome/International Plant Genetic Resources Institute, Roma.

El-Nagerabi, S. A. F. y Abdalla, R. M. O. 2004. Survey of Seedborne Fungi of Sudanese Cultivars of Onion, with New Records. Phytoparasitica, 32 (4): 413-416.

García Morató, M. 2003. Plagas, enfermedades y fisiopatías del cultivo de la cebolla en la Comunidad Valenciana. Série Divulgació Técnica. Generalitat Valenciana.

Hugh y Leifson, 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. J. Bacteriol. 66: 24-26.

International Rules for Seed Testing. 2010. The International Seed Testing Association (ISTA). Switzerland.

Joshi, A.K., Kumari, C., Pathania, N., Sharma, S.K., Verma, S.C. 2007. Effect of indigenous and modern packaging materials, temperature and dressers on onion (*Allium cepa* L.). Proceeding of the 1<sup>st</sup> international conference on indigenous vegetables and legumes prospectus for fighting poverty, hunger and malnutrition. Acta Horticulturae. I: 752, pp: 553-555.

Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature, 178: 703.

Lorbeer, J. W., Ransom, V. E. y Tuffley J. J. 2000. Nature and Source of Inoculum of *Aspergillus niger* causing the Aspergillus Black Mold Disease of onion in New York. Research Report, New York State Integrated Pest Management Grants Program. Cornell University.

Narayanasamy P. 2006. Postharvest pathogens and disease management. Wiley Interscience.

Roumagnac, P., Gagnevin, L., Pruvost, O. 2000. Detection of *Xanthomonas* sp., the causal agent of onion bacterial blight, in onion seeds using a newly developed semi-selective isolation medium. *European Journal of Plant Pathology* 106: 867-877.

Swati, D., Damayanti, G., Potdukhe, S.R. 2011. Survey of seed borne fungi of onion (*Allium cepa* L.) from various locations of Maharashtra. *Journal of Soils and Crops*. Vol. 21, nº 2, pp. 221-224.

Suslow, T. U., Schroth, M. N., Isaka, M. 1982. Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology* 72: 917-918.

Tascón, C. 2010. Mejora de la producción y valorización de las variedades locales de cebollas de Tenerife. Plan Anual de Trabajo de Extensión Agraria y Desarrollo Rural del Servicio Técnico de Agricultura y Desarrollo Rural del Cabildo de Tenerife.

Utkhede R. S., Rahe J. E. Effect of *Bacillus subtilis* on Growth and Protection of Onion against White Rot. *Journal of Phytopathology*. 1983. 106(3).

Velez, L., Rivera, L.I., Rodríguez, R.D., Cabrera, I. 2004. Fungi associated with onion (*Allium cepa* L.) fields in southern Puerto Rico. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*. V: 88, I: 1-2, pp: 55-72.

Walcott, R. 2003. Detection of seedborne pathogens. *HortTechnology*. 13: 40-47.

Walcott, R.R., Gitaitis, R.D., Castro, A.C., Sanders, F.H., Jr., and Diaz-Perez, J.C. 2002. Natural infestation of onion seed by *Pantoea ananatis*, causal agent of center rot. *Plant Dis*. 86:106-111.

Woo, P. C., Ng, K. H., Lau, S. K., Yip, K. T., Fung, A. M., Leung, K. W., Tam, D. M., Que, T. L. y Yuen, K. Y. 2003. Usefulness of the MicroSeq 500 16S ribosomal DNA-based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. *J. Clin. Microbiol* 41, 1996-2001.