ISSN 0568-3076 agron. 20(1): 26 - 37, 2012

# IDENTIFICACIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS EN GRANOS DE ARVEJA (*Pisum sativum* LINNEO)

***Johana Pabón-Villalobos* y Jairo Castaño-Zapata*****

* Candidata a Magister en Fitopatología. Programa de Maestría en Fitopatología. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Caldas. Correo electrónico: johanapv1125@hotmail.com

** Profesor Titular. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Caldas. Correo electrónico: Jairo.castano_z@caldas.edu.co

Recibido: 15 noviembre; aprobado: 10 diciembre de 2011

## RESUMEN

El movimiento nacional e internacional de semillas se ha incrementado en volúmenes y diversidad de especies, debido al desarrollo de nuevas variedades y la necesidad de intercambiar germoplasma; la producción de semilla no siempre está sujeta a parámetros de calidad y antes de la cosecha o durante las etapas de secado y almacenamiento, puede ser invadida por diferentes microorganismos, hecho que es preocupante porque los granos contaminados pueden causar deterioros en la producción agrícola y en condiciones favorables epidemias. El objetivo de este estudio fue identificar los hongos y bacterias presentes en granos de arveja, variedad Santa Isabel, procedentes de vainas, almacén agrícola y plaza de mercado. Se sembraron cinco granos por caja Petri con agar- agua al 2%. Se empleó un diseño completamente al azar con cinco cajas por réplica y cinco réplicas, para un total 125 granos por fuente. Los granos se incubaron a 20-25°C durante 8 días y se realizaron observaciones cada 24 horas durante 30 días. La arveja procedente de vaina y la certificada, presentaron los porcentajes más altos de germinación e incidencias bajas de microorganismos; la de plaza de mercado fue la que tuvo la germinación más baja y la más alta incidencia de hongos y bacterias; siendo *Aspergillus* el género más común con una incidencia del 56%, seguido de *Rhizopus* sp. 13%, *Penicillium* sp.10%, *Fusarium* sp. 9%, *Bacillus* sp. Gram-positiva 7% y *Pseudomonas* sp. Gram-negativa 2%; lo que sugiere que debe realizarse un mayor control de los granos que se comercializan en dicho lugar.

**Palabras clave:** *Aspergillus*, incubación, incidencia, agar.

## ABSTRACT

### IDENTIFICATION OF FUNGI AND BACTERIA IN PEA GRAINS (*Pisum sativum* LINNEO)

The national and international movement of seeds has increased in volume and diversity of species due to rapid development of new varieties and the need to exchange germplasm; seed production is not always subjected to quality parameters and before the harvest or during the stages of drying and storage, can be invaded by different microorganisms, a fact of concern because the contaminated seeds are likely to cause damage to agricultural production and epidemics under favorable conditions. The objective of this study was to identify the fungi and bacteria present in pea grains, Santa Isabel variety, obtained from pods, agricultural warehouses and marketplaces. Five grains per Petri dish were planted in agar water at 2%. A completely at random design was used with five dishes per replication and five replications, for a total of 125 grains per source. Grains were incubated at 20-25 °C for 8 days and observations were made every 24 h during 30 days. It was observed that grains from pods and from warehouse (certified), had the highest germination percentages and the lowest incidence of microorganisms; on the contrary, the grains obtained from the market place had the lowest germination and the highest incidence of both fungi and bacteria, being *Aspergillus* the most common genus with 56%, followed by *Rhizopus* sp. 13%, *Penicillium* sp.10%, *Fusarium* sp. 9%, *Bacillus* sp. Gram-positive 7% and *Pseudomonas* sp. Gram-negative 2%, which suggests that there should be a greater control of the grains obtained from market places.

**Key words:** *Aspergillus*, incubation, incidence, agar

## INTRODUCCIÓN

En Colombia la arveja después del fríjol, es la leguminosa de mayor importancia; se cultiva en catorce departamentos, aunque su producción se concentra en Cundinamarca, Boyacá, Nariño, Tolima y Huila, que cubren cerca del 90% del área total sembrada (FENALCE, 2010); la arveja no sólo es un factor estabilizador de la economía de los pequeños productores, sino que además contribuye con su seguridad alimentaria, pues es fuente de proteínas, carbohidratos, sacarosa, aminoácidos y vitaminas (Tarr, 2010).

Las semillas de arveja como las de muchos otros cultivos presentan varias limitantes entre las que se destacan la presencia de microorganismos; antes de la cosecha muchos patógenos logran invadirlas y colonizarlas, causando disminuciones en la calidad y el rendimiento; entre los patógenos asociados a las semillas, los hongos ocupan el primer lugar, seguidos por las bacterias, virus y en menor proporción nematodos (Granados, 2003), lo que es preocupante si se considera que la semilla infectada puede convertirse en fuente de inóculo en cultivos nuevos lo que origina epidemias y como consecuencia reducción de la producción (Lindsay, 2004; Álvarez, 2007). Neergaard (1979), reporta cerca de 1.500 microorganismos en lotes de semillas de aproximadamente 600 géneros de plantas, por lo que concluye que la mayoría de los patógenos asociados a estas plantas son transportados a través de la semilla. En general, la transmisión de microorganismos aumenta en la medida en que el inóculo se ubique en el interior de la semilla, donde están protegidos por los tejidos, el embrión o adheridos a su superficie como micelio, esporas o esclerocios (Neergaard, 1979).

Los granos de arveja suelen encontrarse infectados con hongos como *Colletotrichum* sp., o *Ascochyta* spp., los cuales generan lesiones necróticas, que en ocasiones llegan a penetrar el interior de los cotiledones (Neergaard, 1979); hongos como *Alternaria alternata*, logran colonizar la semilla cuando se retarda la cosecha y otros como *Fusarium oxysporum*, las invaden cuando las vainas o ramas tocan el suelo, el hongo penetra en las semillas causando pudrición de éstas y Mal del talluelo (Figura 1) (Osorio-Gutiérrez & Castaño-Zapata, 2012); los microorganismos también pueden desarrollarse sobre la superficie de las semillas cuando los niveles de humedad y temperatura son adecuados, de este modo penetran directamente a través de poros o heridas producidas mediante daños mecánicos (Halloin, 1975; Carrillo, 2003); la presencia de hongos como *Aspergillus* sp., al parecer depende del manejo de la cosecha y el almacenamiento (Cuca, 2008; Sweets, 2009).

La presencia de bacterias fitopatógenas en semillas de leguminosas se ha convertido en un grave problema; en arveja hasta el año 2000 se habían citado dos enfermedades denominadas Tizón bacteriano ocasionado por *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* y Mancha marrón producida por *Pseudomonas syringae* subsp. *syringae;* ambas transmitidas por semilla, ya sea externa o internamente siendo la principal fuente de infección en las etapas de producción (Formento, 2011). En 2004, una nueva especie *P. viridiflava,* causó pérdidas del rendimiento superiores al 25% en España, Nueva Zelanda y Francia; informes recientes citan al Tizón bacteriano en Turquía como un factor limitante en la producción (Formento, 2011).

La semilla es el factor más importante dentro de la productividad agropecuaria, porque lleva todo el potencial genético de un cultivar; una semilla infestada o infectada con algún patógeno puede causar una disminución del 50% de la población de plantas por podredumbre de semilla o Mal del talluelo durante la emergencia, resultando en pérdidas del rendimiento por la reducción del número y disminución de la calidad comercial (Lindsay, 2004; Quiros & Carrillo, 2008).

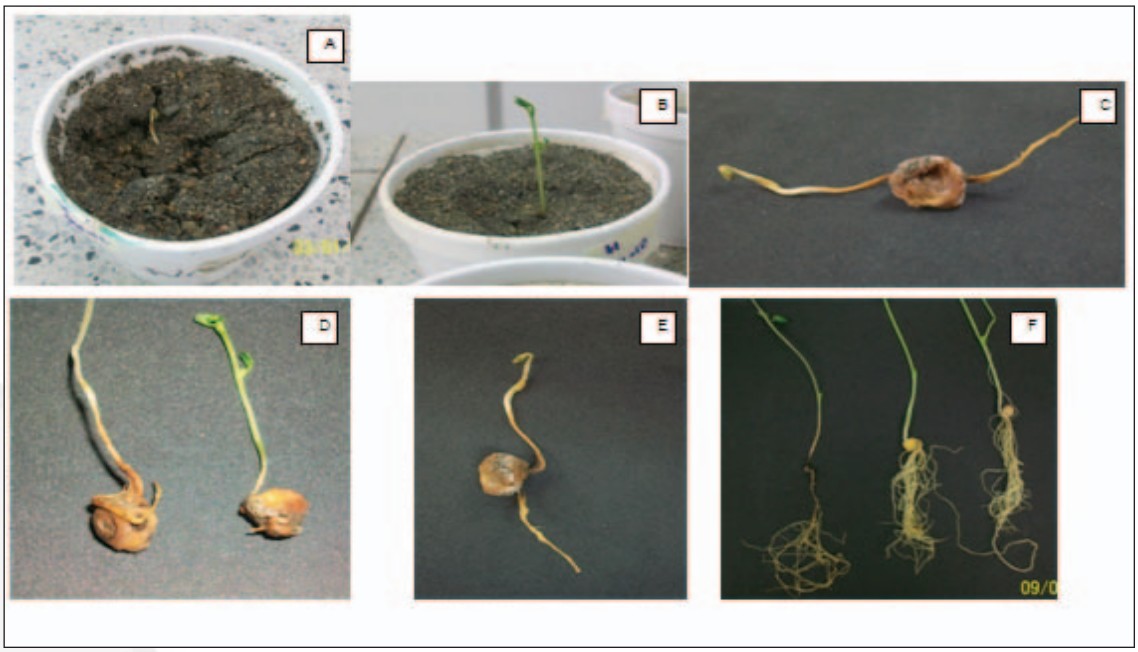


**Figura 1.-**Patogenicidad de *Fusarium oxysporum* en semillas de arveja, **A- B**. Plántulas con síntomas del Mal del talluelo, **C-E**. Semillas con pudrición mostrando crecimiento micelial del hongo y **F**. Comparación entre las raíces de una plántula emergida de semilla inoculada con el hongo (izquierda) y plántulas provenientes de semillas inoculadas con agua destilada estéril (derecha). **Fuente**: Osorio-Gutiérrez y Castaño-Zapata, 2012.

En los últimos años el movimiento de germoplasma en el ámbito nacional e internacional ha aumentado notablemente en volúmenes y diversidad de especies, debido al desarrollo acelerado de nuevas variedades y a la necesidad de intercambiar materiales, como consecuencia ha incrementado el impacto de los patógenos transmitidos a través de ellas; el diagnóstico correcto del agente causal de cualquier enfermedad transmitida por semillas es un prerrequisito para el manejo adecuado de enfermedades y seguridad en el intercambio de germoplasma; mientras más rápido se identifique un microorganismo patogénico, más rápido se implementará el manejo de enfermedades y se tomarán las medidas adecuadas para un almacenamiento óptimo, garantizando la calidad de los granos y asegurando que el nivel de infección de un lote de semillas destinado a los agricultores, sea aceptable en un contexto agrícola dado, con lo que se busca minimizar el riesgo de introducción de problemas fitosanitarios en áreas donde no han sido reportados previamente (Quiros & Carrillo, 2008).

Entre los atributos relacionados con la calidad de la semilla, la sanidad merece una consideración especial (Carmona, 2008), lo que hace necesaria la identificación de los principales microorganismos asociados a leguminosas como la arveja; teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de este trabajo fue identificar los hongos y bacterias presentes en granos de arveja de la variedad Santa Isabel y su efecto sobre la germinación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Localización.** La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Fitopatología, del departamento de Producción Agropecuaria de la Universidad de Caldas.

Para el presente trabajo se emplearon granos de arveja de la variedad Santa Isabel, proveniente de tres fuentes: arveja de vaina, almacén agrícola (semilla certificada) y plaza de mercado.

**Aislamiento.** Para el aislamiento de hongos y bacterias presentes en granos de arveja, se empleó la metodología descrita por Castaño-Zapata (1998), utilizando cajas Petri de 9 cm de diámetro con agar-agua al 2%. Inicialmente los granos se trataron con hipoclorito de sodio al 1% durante 2 min y se sembraron cinco granos por cada caja de tal manera que quedaran bien distribuidos, las cajas se colocaron en una incubadora WTB Binder a 20-25°C entre cuatro y ocho días. Se hicieron observaciones de los granos cada 24 h durante 30 días (Castaño-Zapata, 1998; Montoya & Castaño-Zapata, 2009). Se empleó un diseño completamente al azar con cinco replicaciones y cinco cajas por réplica, evaluando en total 125 granos de cada fuente.

**Identificación de hongos.** Dicha identificación se realizó empleando las claves taxonómicas de Barnett & Hunter (1987), también de Watanabe (2002); para el montaje de las placas se tomó una porción pequeña de material fúngico en una lámina portaobjetos conteniendo azul de lactofenol (20 g de fenol cristalino + 20 $cm^3$ de ácido láctico + 20 $cm^3$ de glicerina + 20 $cm^3$ de agua destilada, y azul de algodón al 5% en agua), posteriormente con la ayuda de un microscopio compuesto marca Boeco se realizó la identificación.

**Identificación de bacterias.** La identificación de éstas se realizó siguiendo el esquema de Schaad (1988), complementado con pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas como:

**Tinción de Gram.** Con un asa redonda se tomó una cantidad pequeña de la colonia bacteriana de 48h de edad, la cual se fijó al calor sobre una lámina portaobjetos, posteriormente se realizó la coloración siguiendo el protocolo estandarizado (Cristal violeta 1min, lugol 1min, alcohol acetona 10s y safranina 30s); finalmente la placa se dejó secar a temperatura ambiente observándose su coloración a través del microscopio, utilizando el objetivo 100X.

**Solubilidad en KOH.** En una lámina portaobjetos, se depositó una gota de Hidróxido de potasio al 3% y sobre ésta se colocó, con la ayuda de un asa, una porción de colonia bacteriana de 48h de edad, se homogenizó de 5-10 min y se observó la presencia o ausencia de filancia.

**Catalasa.** A un portaobjetos se le agregó una gota de Peróxido de hidrógeno al 3%, luego una porción de colonia bacteriana de 48h de edad, se homogenizó y se observó la presencia de burbujas.

**Citocromo oxidasa.** A una tira reactiva de la casa comercial Merck®, se le aplicó una porción de colonia bacteriana de 48h de edad y se observó la reacción.

**Agar triple azúcar-hierro, TSI.** Se utilizó para conocer el tipo de azúcar que la bacteria en estudio era capaz de fermentar (glucosa, lactosa o sacarosa); el procedimiento consistió en inocular por estría el medio con una porción de colonia bacteriana de 48h de edad, posteriormente se incubó a 25°C durante 48h.

**Indol-movilidad-ácido sulfhídrico, SIM.** Con un asa recta se tomó una porción de colonia bacteriana de 48h de edad, con la que se inoculó el medio por picadura, posteriormente se incubó a 25°C durante 48h y se observaron las reacciones de indol, movilidad y ácido sulfhídrico.

**Prueba de Hugh Leifson (Oxidación-Fermentación).** Para esta prueba se inoculó por picadura dos tubos del medio con una porción de colonia bacteriana de 48h de edad, a uno se le cubrió la superficie con parafina estéril creando condiciones de anaerobiosis, el otro se dejó tan sólo con el medio, el cual posteriormente se incubó a 37°C por 14d.

**Agar cetrimide, YDC y *Pseudomonas*.** Tomando una porción de colonia bacteriana de 48h de edad, se realizó una siembra por agotamiento, se incubó durante 48h a 25ºC; finalmente se observó si hubo o no crecimiento de la bacteria.

**Variables evaluadas.**

**Incidencia de microorganismos**. En las tres fuentes, se evaluó cada 24h durante un mes el número de semillas afectadas por hongos y bacterias.

**Porcentaje de geminación.** Se registró el número de semillas germinadas por cada muestra; el porcentaje de germinación se obtuvo mediante la fórmula:

$$\text{Germinación (\%)} = \frac{\text{Semillas germinadas x100}}{\text{Número total de semillas por muestra}}$$

**Análisis estadístico.** Se elaboraron tablas de frecuencia de los microorganismos identificados en los granos de arveja, posteriormente se realizó el análisis de varianza y pruebas de comparación de Tukey al 5% de probabilidad, con ayuda del paquete estadístico SAS (*Statistical Analysis System*), North Carolina, 2009. Versión 9,0; de igual forma se procedió para las variables porcentaje de germinación e incidencia de microorganismos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los análisis de varianza realizados a las tres fuentes de arveja, indicaron diferencias altamente significativas respecto a la germinación e incidencia de hongos (p=0,0001), a excepción de la variable incidencia de bacterias (p= > 0,10).

La prueba de comparación de medias de Tukey al 5% indicó diferencias significativas entre los porcentajes de germinación e incidencia de hongos en las tres fuentes, la mayor germinación se obtuvo en granos procedentes del almacén agrícola (semilla certificada) y arveja de vaina con un 93,97% y 92,26%, respectivamente, el menor porcentaje de geminación se obtuvo en granos de plaza de mercado con 51,46% (Tabla 1), atribuida a la alta incidencia de hongos y bacterias de 40,6% y 24,2%, respectivamente (Tabla 1), resultados que coinciden con los reportados por Begum *et al.* (2004), quienes afirman que la microflora asociada con las semillas de arveja, juega un papel importante en la reducción del potencial germinativo. El porcentaje más bajo de incidencia de hongos fue en granos procedentes de vaina con 13,6% seguido de los procedentes del almacén agrícola con 27,7%. La incidencia de bacterias no mostró diferencias significativas entre las tres fuentes utilizadas, aunque como se indicó previamente, la mayor incidencia se observó en granos procedentes de plaza de mercado (Tabla 1).

**Identificación de hongos.** En este estudio se identificaron cuatro géneros de hongos: *Aspergillus*, *Rhizopus, Penicillum* y *Fusarium*; y dos géneros de bacterias *Bacillus* y *Pseudomonas* (Figura 2).

El análisis de varianza de los microorganismos identificados en las tres fuentes indicó diferencias significativas entre las incidencias de *Aspergillus, Rhizopus y Pseudomonas* (p=0,0001), siendo estos géneros, los que con mayor frecuencia se presentaron en la fuente procedente de plaza de mercado.

**Tabla 1.** Germinación e incidencia de hongos y bacterias en tres fuentes de arveja de la variedad Santa Isabel.

| Procedencia | Variables de respuesta | | |
|---|---|---|---|
| | Germinación (%) | Incidencia (%) | |
| | | Hongos | Bacterias |
| **Vaina** | 92,26 a* | 13,6 c | 18,0 a |
| **Certificada** | 93,97 a | 27,7 b | 18,7 a |
| **Plaza de mercado** | 51,46 b | 40,6 a | 24,2 a |

***** Promedios seguidos por letras diferentes, indican diferencias significativas entre los tratamientos, según la prueba de Tukey al 5%.

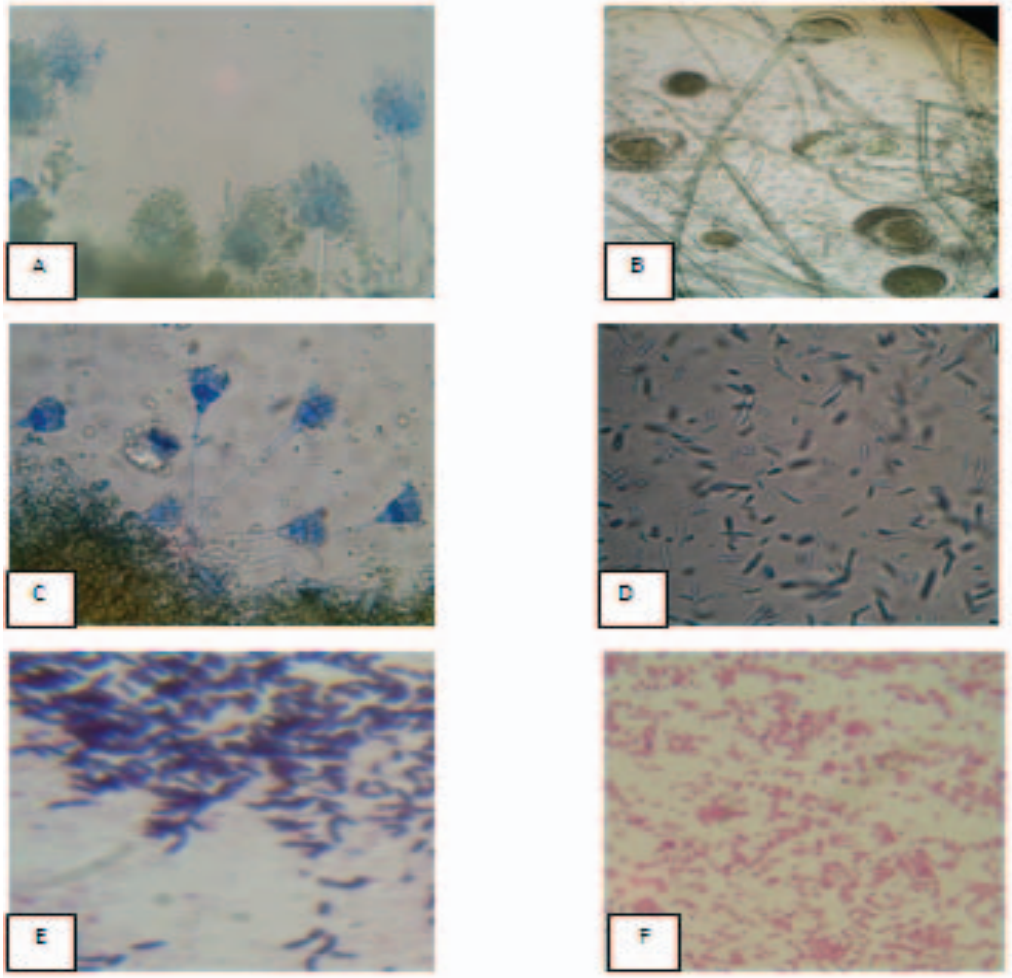


**Figura 2**. Hongos y bacterias identificadas en semilla de arveja. **A**. *Aspergillus* sp.; **B**. *Rhizopus* sp.; **C**. *Penicillium* sp.; **D**. *Fusarium* sp.; **E**. *Bacillus* sp. y **F**. *Pseudomonas* sp.

La prueba de Tukey al 5% mostró diferencias estadísticas entre los microorganismos encontrados en la arveja procedente de vaina (Figura 3A). La tinción de Gram, para *Bacillus* sp. resultó positiva (+) (Figura 2E), lo que indica una bacteria no patogénica hasta ahora en arveja; por otro lado, *Fusarium* sp., es un habitante del suelo, capaz de sobrevivir en residuos vegetales por muchos años bajo condiciones adversas, su presencia en las vainas puede atribuirse al contacto de éstas con el suelo o recipientes de cosecha contaminados por el hongo, el cual encuentra allí las condiciones ambientales adecuadas para reproducirse, infectando inicialmente las vainas y luego los granos (Cuca, 2008; Vieira *et al.,* 2003); *Penicillum* sp., es considerado un hongo de almacenamiento, aunque en muchas ocasiones, puede ser aislado de granos recién cosechados, lo que indica que existen especies que también suelen desarrollarse en condiciones de campo (Martínez, 2003). En general, en esta fuente de granos no se presentaron incidencias altas de microorganismos, debido a que la vaina, puede actuar como una barrera protectora contra el ataque de los microorganismos, además la contaminación inicial ocurre primordialmente durante el período de secado y almacenamiento de los granos (García *et al.,* 2007).

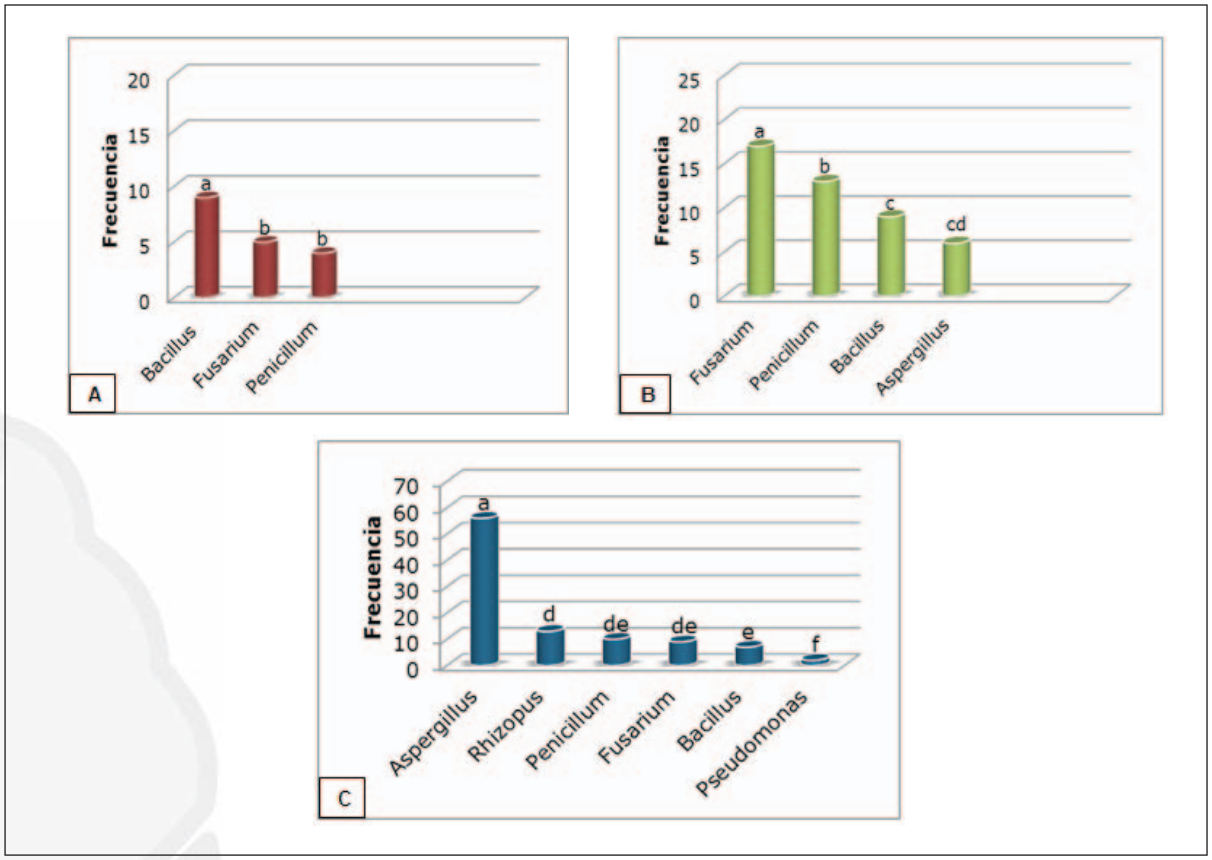


**Figura 3.** Frecuencia de hongos y bacterias presentes en las tres fuentes de arveja evaluadas. **A.** Vaina, **B.** Almacén agrícola (Certificada) y **C**. Plaza de mercado.

La prueba de Tukey al 5% para los granos procedentes de almacén agrícola (semilla certificada) indicó diferencias estadísticas en los microorganismos encontrados, donde la mayor incidencia fue de *Fusarium*, seguido de *Penicillium*, *Bacillus*, y *Aspergillus* (Figura 3B); dichos resultados coinciden con los reportados por Cuca (2008), quien describió los mismos géneros, a excepción de *Penicillium*, en lotes de semilla de arveja china certificada importados a Guatemala; lo anterior indica que, la certificación en Colombia, no está cumpliendo con las normas de control de calidad, lo que es una alerta para que entidades como el ICA implementen programas de certificación más rigurosos, pues no se debe olvidar que la semilla es uno de los de vehículos más importantes para la transmisión de patógenos.

La prueba de Tukey al 5% para los granos obtenidos en plaza de mercado indicó diferencias significativas entre los hongos y bacterias encontrados; la incidencia más alta fue para *Aspergillus*, con un 56% seguido de *Rhizopus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Bacillus*, y *Pseudomonas* (Figura 3C); resultados que concuerdan con los de Begum *et al.* (2004); quienes reportan los mismos géneros de hongos en semillas de arveja; asimismo, Attitalla *et al.* (2010) utilizando diferentes técnicas de aislamiento de microorganismos registraron a *Aspergillus* y *Rhizopus* como los hongos más frecuentes en semillas de esta leguminosa, con incidencias de 65 y 33%, respectivamente. En un estudio reciente, Montoya & Castaño-Zapata (2009) observaron que los granos de fríjol provenientes de plaza de mercado, presentaban una mayor frecuencia de

microorganismos, debido a que en su mayoría éstos son cultivados, conservados y seleccionados por pequeños agricultores que desconocen las prácticas adecuadas de cosecha, empacado, almacenamiento, control de calidad, certificación y finalmente, distribución y comercialización de sus productos (Oliveros, 1991).

Los hongos identificados en esta fuente corresponden en gran medida a hongos de almacenamiento, los cuales generalmente son saprófitos o parásitos facultativos que se desarrollan después de la cosecha en la superficie de los granos, cuando los niveles de humedad superan el 13% y la temperatura alcanza los 32°C (Sweets, 2009), de este modo penetran directamente a través de la cubierta seminal, poros o heridas producidas por daño mecánico (Pacheco, 1989; Halloin, 1975). La proliferación de hongos en granos almacenados, no sólo afecta el aspecto, la calidad y la germinación, sino que entre mayor sea el tiempo post-cosecha, también se alteran los aspectos fisiológicos como la respiración y la permeabilidad selectiva de la semilla (Pérez & Argüello, 1995); ello sin considerar que el 25% de los granos cultivados en el mundo se encuentran contaminados con micotoxinas, que producen este tipo de microorganismos y las cuales resultan tóxicas para los humanos y animales que las consumen (García *et al.,* 2007; Dohlman, 2003). Por ejemplo, *Aspergillus flavus* produce Aflatoxinas, sustancias muy peligrosas, que al ser consumidas por animales domésticos inducen a pérdida de peso, problemas en la reproducción, diarrea, desórdenes respiratorios y hemorragias (Bodine & Mertens, 1983); en regiones cálidas y húmedas como África e India existen evidencias de que tales micotoxinas pueden inducir cáncer en humanos (Moreno *et al*., 2000).

Varias especies de hongos del género *Fusarium* producen toxinas como la Zearalenona, relacionada con cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino y nefropatías, entre otros (Calvo, 2007); el Tricotecenes causa una enfermedad que se caracteriza por la aparición de puntos en la piel, múltiples hemorragias, diarrea, anorexia y agotamiento de la médula ósea (Carrillo, 2003; Calvo, 2007) y micotoxinas como la Fusarina, causa efectos neurotóxicos y abortivos, entre otros (Calvo, 2007).

El género *Penicillium* contiene un gran número de especies toxígenas y su capacidad de producir diferentes micotoxinas, es superior a la existente en cualquier otro género fúngico (Martínez, 2003), las principales micotoxinas producidas por éste son la Patulina, la cual tiene capacidad carcinogénica, la Citrinina, la Ocratoxina y la Toxina PR, que en dosis superiores a las letales causan congestión, edemas y hemorragias. En vacunos ha sido detectado cierto fenómeno abortivo (Terao & Othsubo, 1991).

Finalmente, *Rhizopus* produce la micotoxina Rhizonin A, que induce lesiones en hígado, riñones y necrosis del epitelio tubular renal (Wilson *et al.,* 1984).

Estos resultados muestran la importancia de utilizar granos de buena calidad y aún más, la de identificar a los hongos existentes en éstos, para así tomar medidas tanto correctivas como preventivas que eviten la reducción del rendimiento de los cultivos cuando se emplean para siembra o pongan en riesgo la salud de los animales y humanos cuando se utilizan para consumo.

**Identificación de bacterias.** En las tres fuentes de arveja empleadas se detectó la presencia de bacterias. La mayor incidencia correspondió a una bacteria Gram-positiva del género *Bacillus* (Figuras 2E y 3), que coincide con Tineo *et al.* (1988), quienes reportaron una alta incidencia de dicha bacteria en semillas de arveja rosada. Sólo en los granos procedentes de la plaza de mercado se aisló una bacteria Gram-negativa (Figura 2F). Las pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas permitieron caracterizarla como *Pseudomonas* sp. (Tabla 2, Figura 4), resultados que coinciden con los de Lawyer (1989), quien reporta en semilla de arveja a *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* y *Pseudomonas syringae* subsp. *syringae*.

Los granos infectados son una de las principales fuentes de inóculo primario en la diseminación de enfermedades bacterianas; las bacterias son capaces de sobrevivir dentro o sobre las semillas por largos períodos de tiempo en forma latente (Irwin, 1987); cuando éstas se siembran en épocas favorables para el desarrollo de enfermedades ocasionan una reducción en los rendimientos y como consecuencia pérdidas económicas (Irwin, 1987; Formento, 2011); de ahí la importancia de utilizar siempre semilla de óptima calidad.

**Tabla 2.** Resultados de las pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas para la caracterización de *Pseudomonas,* aislada de granos de arveja, variedad Santa Isabel, proveniente de plaza de mercado.

| Género *Pseudomonas* | Reacción |
|---|---|
| **Gram** | Negativo |
| **Reconfirmación de Gram con KOH al 3%** | Positivo |
| **Catalasa** | Positivo |
| **Oxidasa** | Positivo |
| **Crecimiento en agar cetrimide** | Positivo |
| **Crecimiento en O-F (Hugh-Leifson)** | Metabolismo oxidativo |
| **Crecimiento en YDC** | Positivo |
| **Crecimiento en agar para *Pseudomonas*** | Positivo |
| **Indol** | Negativo |
| **Movilidad** | Positivo |
| **Ácido sulfhídrico** | Negativo |
| **Agar triple azúcar hierro (TSI)** | K/K (alcalino/alcalino) |

## CONCLUSIONES

- La semilla no sólo es el medio a través del cual se lleva todo el potencial genético de un cultivar; es también el vehículo ideal para el transporte de microorganismos, que en condiciones ambientales favorables pueden causar una epidemia.

- La incidencia más baja de microorganismos se observó en granos de arveja provenientes de vaina, lo que indica que la contaminación de los granos ocurre directamente en el campo y posteriormente durante los períodos de secado y almacenamiento.

- La semilla proveniente de plaza de mercado tuvo la mayor incidencia de hongos y bacterias. La presencia de hongos como *Aspergillus* sp., *Penicillium,* sp., *Fusarium* sp. y *Rhizopus* sp., son capaces de producir micotoxinas, sustancias que pueden tener efectos adversos en la salud humana y animal.

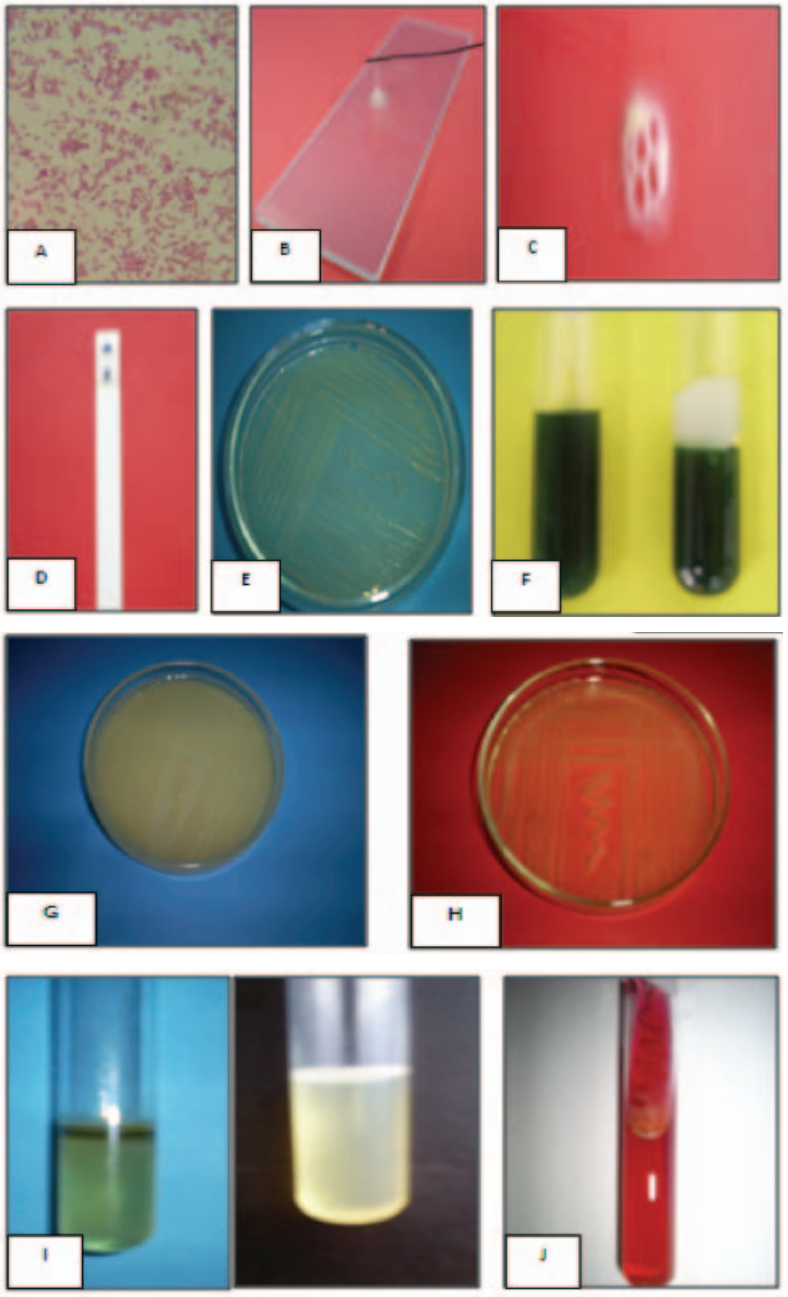


**Figura 4.** (A) Bacilos Gram-negativos, (B) Solubilidad en KOH positiva, (C). Catalasa positiva, (D). Oxidasa positiva, (E). Crecimiento en agar cetrimide, (F). Metabolismo oxidativo, (G). Crecimiento en agar YDC, (H) Crecimiento en agar *Pseudomonas*, (I). Indol positivo, movilidad positiva, (J). No hay fermentación de azucares (K/K).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Álvarez, M. 2007. Producción comercio y certificación de semillas en México (en línea) consulta: junio de 2012. En: www.cedrssa.gob.mx/includes/asp/download.asp?iddocumento;

Attitalla, I.; Al-Ani, L.; Nasib, M.; Balal, I.; Zakaria, M.; El-Maraghy, S. & Rezaul, S. 2010. Screening of fungi associated with commercial grains and animal feeds in Al-

Bayda governorate, Libya. World Applied Sciences Journal, 9 (7): 746-756.

Barnett, I. L. & Hunter, B. B. 1987. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth edition. New York: MacMillan Publishing Company. p. 198

Begum, N.; Alvi, K.; Haque, M.; Usman, M. R. & Chochan, S. 2004. Evaluation of mycoflora associated with pea seeds and some control measures. Plant Pathology Journal, 3 (1): 48-51.

Bodine, A. & Mertens, D. 1983. Toxicology, metabolism and physiological effects of aflatoxin in the bovine. In: Diener, U.; Asquith, L. y Dickens, W. (eds.). Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in Corn. Alabama Agriculture Experimental Station, Auburn University, Alabama. pp. 46-50.

Calvo, M. 2007. Toxinas fúngicas. Consulta: junio de 2012. En: http://milksci.unizar.es/ bioquímica/temas/toxico /micotoxinas.htm.

Carmona, M. 2008. Patógenos transmitidos por la semilla (en línea) consulta: febrero de 2012. http://monitoreodecultivos.com.pdf.

Castaño-Zapata, J. 1998. Detección de microorganismos en semillas y tratamiento químico de semillas. En: Prácticas de Laboratorio de Fitopatología. Segunda edición. Manizales: Universidad de Caldas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Fitotecnia-Escuela Agrícola Panamericana. Departamento de Protección Vegetal. pp. 79-80.

Carrillo, L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes, Mohos y micotoxinas. Editorial Universidad Nacional de Salta, Argentina. p. 128

Cuca, J. 2008. Fortalecimiento de la cadena productiva de arveja china (*Pisum sativum* L.), con énfasis en la sanidad de la semilla, en el altiplano central de Guatemala. Tesis de Magister. Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

Dohlman, E. 2003. Mycotoxin hazards and regulations impacts on food and animal Feed crop trade. En: Buzby, J. (Ed.). International Trade and Food Safety: Economic Theory and Case Studies. USDA, E.E.U.U. Chapter 6: pp. 97-108.

FENALCE, 2010. El cultivo de la arveja, historia e importancia (en línea). Consulta: febrero de 2012. En: http://www.FENALCE.org/arch_public/arveja93.pdf.

Formento, N. 2011. Bacteriosis en arveja. Consulta: febrero de 2012. En: http://www.horizontea. com/blog/investigacion/bacteriosis-en-arveja/;.

García, M.; Aguirre, J.; Sánchez, J.; Baheza, E. & Riviera, J. 2007. Silo hermético para el control de plagas de granos almacenados en Guanajuato, México. Agricultura Técnica en México. 33 (3): 231-239.

Granados, L. 2003. Calidad sanitaria: enfermedades causadas por bacterias (en línea) Consulta: febrero de 2012. En: http: //www.senasa.gob.pe/intranet/capacitacion/cursos/curso_nacional_semilla/semillas/8.pdf.

Halloin, M. J. 1975. Microorganisms and seed deterioration. In: Physiology of Seed Deterioration. Crop Science Society of America, Inc. Wisconsin, USA, 5: 89-99.

Irwin, J. 1987. Recent advances in the detection of seed-borne pathogens. Seed Science and Technology 15: 755-783.

Lawyer A. S. 1989. Diseases caused by bacteria. In: Hagedorn D. (Ed.). Compendium of Pea Diseases. APS Press. pp. 8-11.

Lindsay, J. 2004. Management of diseases in seed crops. En: Encyclopedia of Plant and Crop Science. Washington, USA. pp. 675-677.

Martínez, E. 2003. Estudio de especies micotoxígenas del género *Penicillum: Penicillum verrucosum* Dierckx. Tesis de doctorado. Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Madrid.

Montoya, C. & Castaño-Zapata, J. 2009. Microorganismos asociados con granos de fríjol (*Phaseolus vulgaris* L.), variedad Cargamanto blanco. Agronomía. 17 (2):25-35.

Moreno, M.; Vásquez, M. & Facio, F. 2000. Uso de sales de ácido-propiónico para inhibir la producción de aflatoxinas en granos de maíz. Agrociencia. 34 (4):477-484.
Neergaard, P. 1979. Seed pathology. Vol. I y II. Revised edition. Mac Millan Press Ltda. Great Britain. p. 1025

Oliveros, M. 1991. Importancia de la tecnología de semillas. Consulta: junio de 2012.En:http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd35/texto/importancia.htm.

Osorio-Gutiérrez, L. A. & Castaño-Zapata, J. 2011. Caracterización del agente causante de la Pudrición de raíces de la arveja (*Pisum sativum* Linneo), enfermedad endémica en el municipio de Manizales-Caldas (Colombia). Agronomía, 19 (2): 33-43.

Pacheco, C. 1989. Importancia de la patología de semillas para los programas de semillas. Fitopatología Colombiana. 13 (1): 20-31.

Pérez, M. & Argüello, J. 1995. Deterioration in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seeds under natural and accelerated aging. Seed Science and Technology. 23: 439-444.

Quiros, W. & Carillo, A. 2008. La importancia del insumo de semilla de buena calidad (en línea) Consulta febrero de 2012. En: biblioteca.idict.villaclara.cu/UserFiles/File/CI%20Frijol/23.doc.

Schaad, N.W. 1988. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Second edition.USA: The American Phytopathological Society. p.157

Sweets, L. 2009. Stored grain fungi. Consulta: julio de 2012. En: http://agebb.missouri. edu/storage/disease /sgfungi. Htm.

Tarr, L. 2010. Nutritional values for peas. Consulta: Julio de 2012. En: http://www.livestrong.com/article/85539-nutritional-values-peas.

Terao, K & Ohtsubo, K. 1991. Biological activities of mycotoxins: field and experimental mycotoxicoses. pp. 455-488. En: Smith, J and Henderson, R. (Eds.). Mycotoxins and animal food.CRC Press, London. p. 904

Tineo, G., Losano & Trujillo, E. 1988. Géneros de bacterias fitopatógenas presentes en semillas de leguminosas comestibles. Agronomía Tropical, 38(4): 85-94.

Vieira A.; Moraes T.; Carvalho V.; Freitas S. & Bittencourt A. 2003. Efeito da calagem, da colheita e da secagemna qualidade sanitaria de amendoim da seca. Pesquisa Agropecuaria Brasileira, 8 (5): 567-573.

Watanabe, T. 2002. Seed fungi: morphologies of cultured fungi and keys to species. Secondedition .Eds.CRC. Boca Ratón, Florida, USA. p. 506

Wilson, T.; Rabie, C.; Fincham, J.; Steyn, P & Schippe, M. 1984.Toxicity of rhizonin A, isolated from *Rhizopu*s microspores in laboratory animals. Food and Chemical Toxicology. 22 (4): 275-281.