



GUIA PRÁCTICA PARA IDENTIFICAR LOS HONGOS MÁS FRECUENTES EN SEMILLAS DE SOJA

Ademir Assis Henning

Embrapa

*Empresa Brasileña de Investigación Agropecuaria
Embrapa Soja
Ministerio de Agricultura, Ganadería y Abastecimiento*

GUIA PRÁCTICA

para identificar los hongos más frecuentes en semillas de soja

Ademir Assis Henning

*Embrapa
Brasília, DF
2017*

Los ejemplares de esta publicación se pueden adquirir en:

Embrapa Soja

Rodovia Carlos João Strass, s/n, Distrito da Warta
Caixa Postal 231
CEP 86001-970
Teléfono: (55) 43-3371-6261
Fax: (55) 43 3371-6100
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac/

Unidad responsable del contenido y la edición

Embrapa Soja

Comité de publicaciones de Embrapa Soja

Presidente: Ricardo Vilela Abdelnoor
Secretaria-ejecutiva: Regina Villas Bôas de Campos Leite
Miembros: Alvadi Antonio Balbinot Junior, Claudine Dinali Santos Seixas, Fernando Augusto Henning, José Marcos Gontijo Mandarino, Liliane Márcia Mertz-Henning, Maria Cristina Neves de Oliveira, Norman Neumaier y Osmar Conte

Colaboración: *Agnes Izumi Nagashima*

Supervisión editorial: *Vanessa Fuzinatto Dall' Agnol*

Normalización bibliográfica: *Ademir Benedito Alves de Lima*

Edición electrónica y portada: *Gustavo Iuri de Barros*

Fotos de portada (sentido de las agujas del reloj): *Álvaro Manuel Rodrigues Almeida, Agnes Izumi Nagashima y Ademir Assis Henning.*

1^a Edición

PDF digitalizado (2017)

Todos los derechos reservados.

La reproducción no autorizada de esta publicación, en el todo o en partes, constituye violación de derechos autorales (Lei nº 9.610).

Datos Internacionales de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Soja

Henning, Ademir Assis.

Guía práctica para identificar los hongos más frecuentes en semillas de soja / Ademir Assis Henning. – Brasília, DF : Embrapa, 2017.
33 p. : il. color. ; 14 cm x 21 cm.

ISBN 978-85-7035-734-2

1. Soja-Semente-Fungo. I. Embrapa Soja. II. Título.

CDD 633.3494

AUTOR

ADEMIR ASSIS HENNING

Patólogo de semillas

Ing. Agrónomo, M.Sc., Ph.D.

Investigador de Embrapa Soja

PRESENTACIÓN

Este manual está dirigido a los técnicos que trabajan en los laboratorios de patología de semillas de soja. Las fotografías y dibujos de las estructuras de los principales hongos que atacan semillas de soja son muy ilustrativos y permiten la identificación correcta de los patógenos. Para facilitar la comprensión, los microorganismos (hongos principalmente) se clasificaron en tres grupos: i) patógenos importantes (fitopatógenos); (ii) hongos de almacenamiento y (iii) contaminantes y / o saprófitos.

El análisis sanitario de la semilla, especialmente en el caso de la soja, junto con la prueba de tetrazolio, además de otras pruebas fisiológicas como el test de germinación y vigor (envejecimiento acelerado), puede proporcionar información importante sobre los problemas de mala calidad de las semillas, la identificación de los problemas causales y tomar decisiones para corregir sus causas, tales como: daño mecánico, daño por chinches, deterioro por tiempo o deterioro del almacenamiento

Ricardo Vilela Abdelnoor
Jefe Adjunto de Investigación y Desarrollo
Embrapa Soja

RESUMEN

1. PRUEBA DE BLOTTER (MÉTODO DE FILTRO DE PAPEL)	9
1.1. Materiales necesarios	10
1.2. Metodología de la prueba Blotter	11
 2. PATÓGENOS IMPORTANTES	 12
2.1) <i>Cercospora kikuchii</i>	12
2.2) <i>Colletotrichum truncatum</i>	13
2.3) <i>Fusarium</i> spp.....	15
2.4) <i>Macrophomina phaseolina</i>	16
2.5) <i>Phomopsis</i> sp.....	18
2.6) <i>Rhizoctonia solani</i>	19
2.7) <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	20
2.8) <i>Sclerotium rolfsii</i>	21
 3. HONGOS DE ALMACENAMIENTO	 22
3.1) <i>Aspergillus</i> spp.....	22
3.2) <i>Penicillium</i> sp.	23
 4. CONTAMINANTES O SAPRÓFITOS	 24
4.1) <i>Alternaria</i> spp.....	24
4.2) Bactérias	25
4.3) <i>Botryodiplodia</i> sp.	26
4.4) <i>Chaetomium</i> sp.	27
4.5) <i>Cladosporium</i> spp.....	28
4.6) <i>Rhizopus</i> spp.....	29
4.7) <i>Trichoderma</i> spp.....	31
 REFERENCIAS.....	 32
 ADJUNTO (Ficha para la evaluación del análisis sanitario).....	 33

1. PRUEBA DE BLOTTER (MÉTODO DE FILTRO DE PAPEL)

Fotos: Agnes Izumi Nagashima y Samantha Rigo Segalín

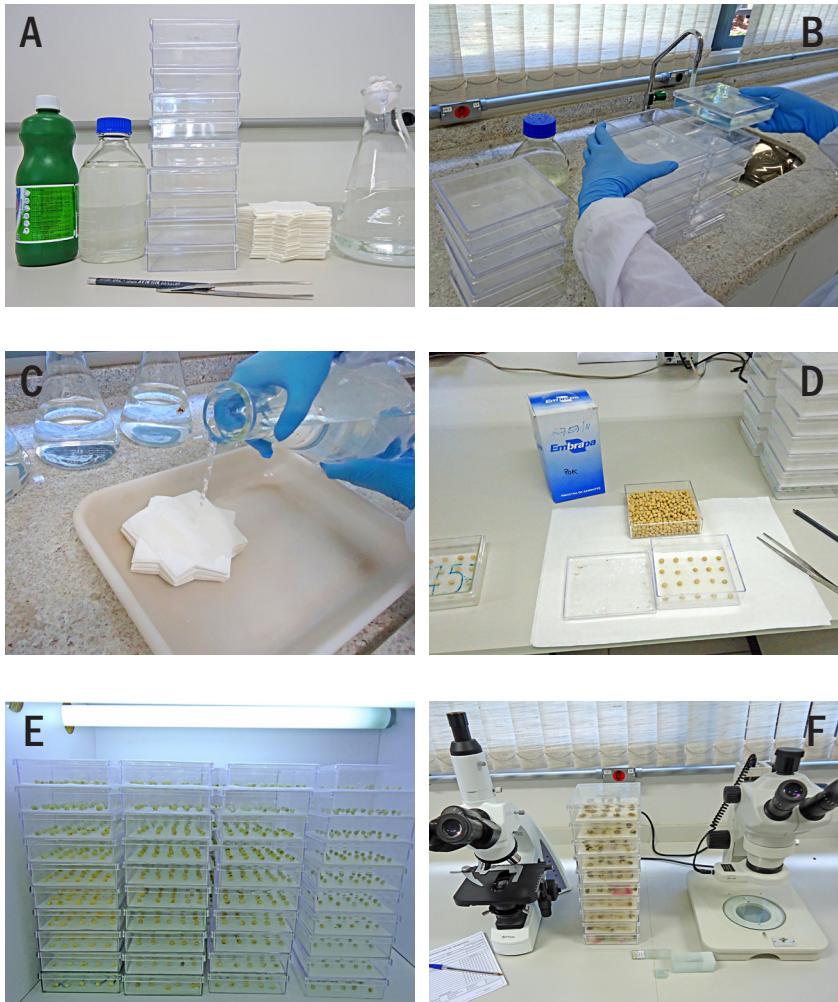


Figura 1. Ensamblaje de la prueba del papel secante. A) Materiales a utilizar; B) cajas tipo gerbox para desinfección con NaOCl al 1,05%; C) agua destilada en autoclave para humedecer el papel de filtro estéril; D) veinte semillas por gerbox; E) muestras en la cámara de incubación a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 7 días; F) evaluación de patógenos y saprófitos.

1.1. MATERIALES NECESARIOS

- Cajas de plástico (gerbox) con dimensiones 11,0 x 11,0 x 3,5 cm (Figura 1A)
- Papel de filtro cualitativo de 80 g / m², cuatro hojas de 10,5 x 10,5 cm esterilizadas en horno a 160 ° C durante 20 min (Figuras 1A y 1C)
- Agua destilada y sometida a autoclave (preferiblemente) o esterilizada en microondas (Figuras 1A y 1C)
- Pinzas rectas, estiletes, gotas de vidrio con agua y con lactofenol con colorante, portaobjetos de vidrio y cubreobjetos, papel tisú (Figuras 1D y 1F)
- Microscopio biológico (compuesto) con aumento mínimo hasta 400x (Figura 1F)
- Microscopio estereoscópico con aumento de al menos hasta 50x (Figura 1F)
- Solución que contiene hipoclorito de sodio al 20% (NaOCl 1,05%) para desinfección de las cajas gerbox (Figuras 1A y 1B)
- Guantes antideslizantes o guantes quirúrgicos (Fig. 1B y 1C)
- Marcadores de agua (Figura 1D)
- Delantal (recogedor) (Figura 1B)
- Cámara de incubación a 20 ° C ± 2 ° C con luz fluorescente blanca (o NUV, próxima al ultravioleta) (Figura 1E).

1.2. METODOLOGÍA

El método principal utilizado en el análisis de semillas de soja es el papel de filtro (Blotter). (HENNING, 2005). En casos específicos, el método puede ser alterado variando la temperatura y el período de incubación para detectar patógenos importantes tales como *Sclerotinia sclerotiorum*.

Para la realización del ensayo, las cajas plásticas (gerbox) pueden reutilizarse por periodos prolongados, si se lavan adecuadamente con detergente, después de cada uso, se enjuagan y se secan. Antes del uso, se debe desinfectar con una solución de hipoclorito de sodio al 1,05% (lejía al 20%). El papel de filtro (80 g / m²) debe ser cortado en hojas de 10,5 cm x 10,5 cm, (para encajar en las cajas gerbox), envasados en bolsas de papel marrón y esterilizados en un horno a 160 ° C durante 20 minutos. Después de este período, esperar a que el horno se enfrie antes de abrirlo. Colocar cuatro hojas de 10,5 cm x 10,5 cm de papel de filtro en cada gerbox desinfectado previamente y se añade agua (preferiblemente esterilizada) para humedecer suficientemente el papel, evitando el exceso de agua que favorece la contaminación por bacterias y *Alternaria* spp. Veinte semillas son recogidas al azar y depositadas en el gerbox, en forma de 5 x 4. totalizando 20 cajas gerbox (400 semillas) por muestra. Las cajas se incuban durante siete días a 20 ± 2 °C, bajo luz fluorescente continua o NUV en períodos alternados de 12h de oscuridad / 12h luz (REGRAS ..., 2009).

La evaluación se hace en cada semilla, siendo anotada en forma apropiada la presencia de los diversos patógenos. *Aspergillus flavus* y *Penicillium* spp., a pesar de ser considerados saprofíticos por algunos autores, estos hongos deben ser contabilizados como hongos de almacenamiento, responsables por el deterioro de la semilla, cuando las condiciones de almacenamiento son inadecuadas (alta humedad y temperatura).

2. PATÓGENOS IMPORTANTES

2.1. *Cercospora kikuchii*

Muy común en las semillas, pero no afecta la calidad fisiológica

Fotos: Agnes Izumi Nagashima

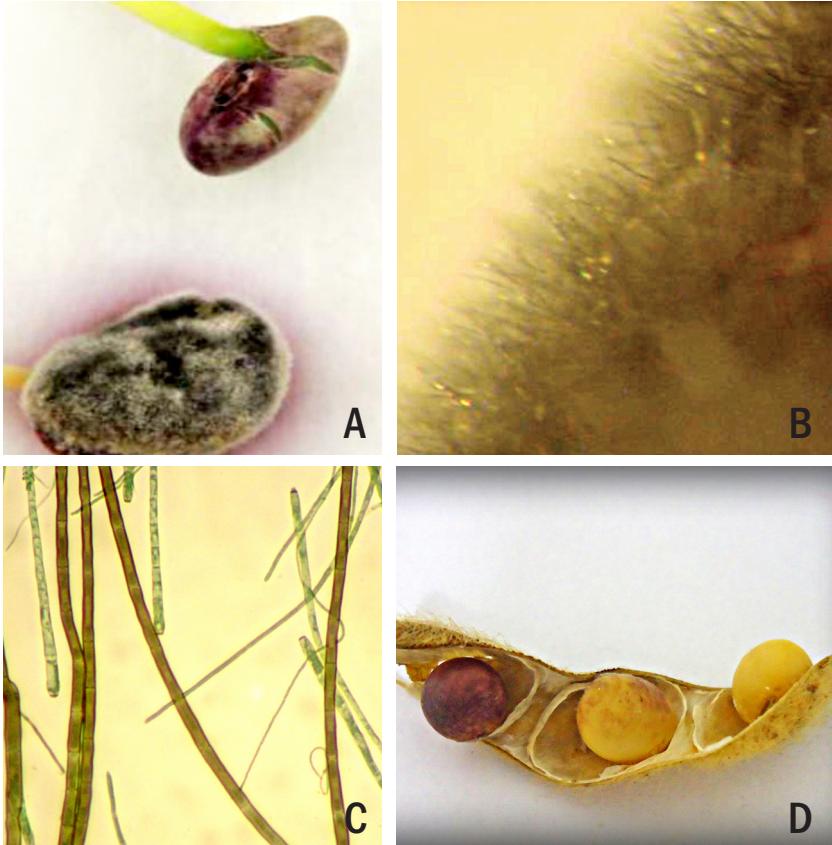


Figura 2. *Cercospora kikuchii*. A) semilla con síntoma de mancha púrpura; B) esporulación fungica (conidióforos y conidios); C) conidios (teñido) y conidióforos (marrón); D) semilla infectada en la vaina.

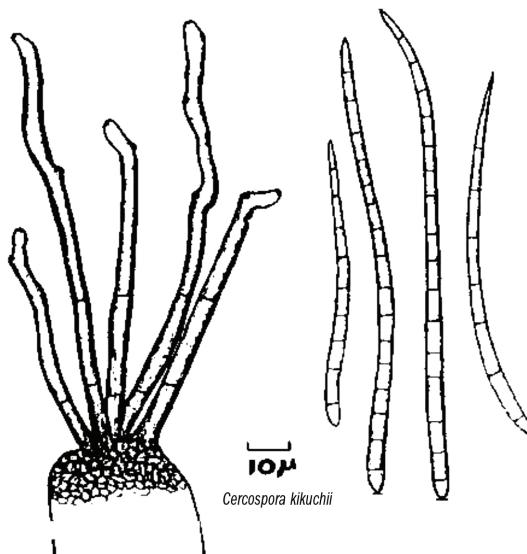


Figura 3. Conidióforos (a la izquierda) y conídios o esporas multi-septadas (a la derecha)

Fonte: Sinclair e Shurtleff (1975).

2.2. *Colletotrichum truncatum*

Agente causal da antracnose.

Fotos: Agnes Izumi Nagashima y Ademir Assis Henning

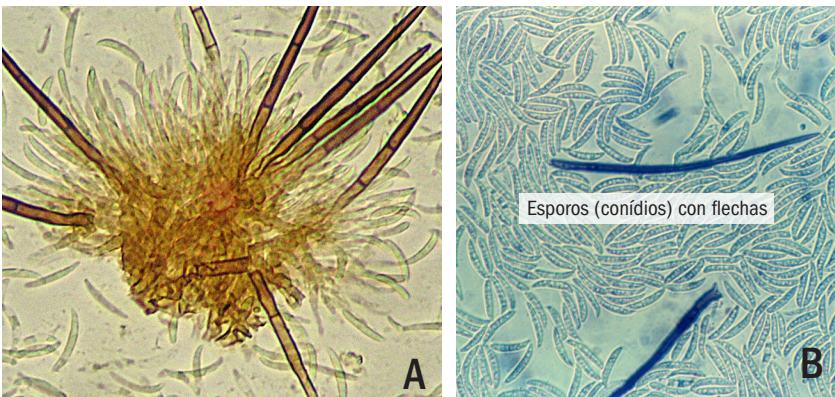


Figura 4. *Colletotrichum truncatum*. A y B) Conídios (esporos) con flechas de *Colletotrichum truncatum*.

Fotos: Agnes Izumi Nagashima (A) y Ademir Assis Henning (B y C)

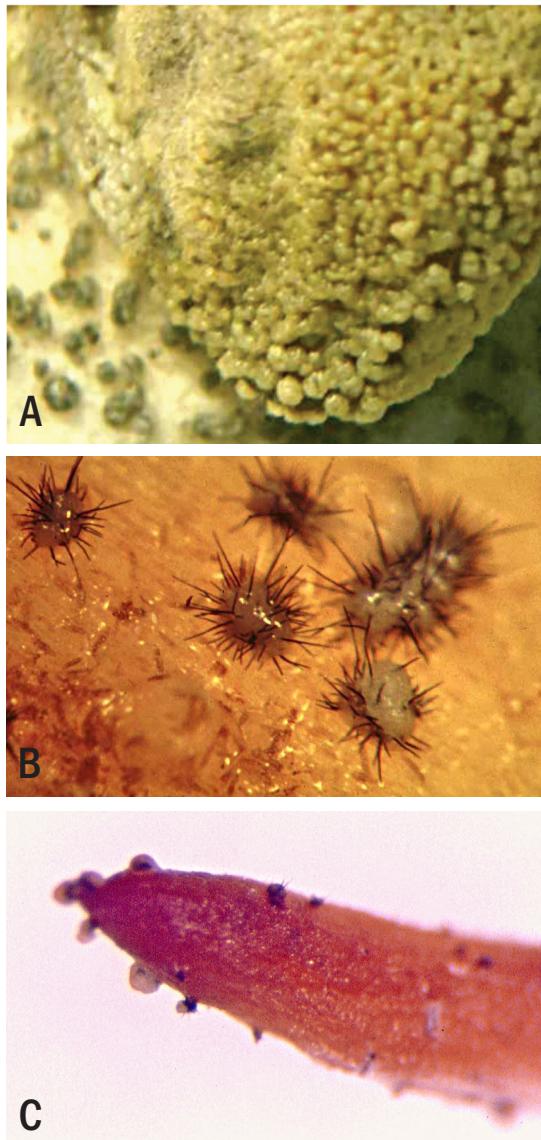


Figura 5. *Colletotrichum truncatum*. A) Acérvulos con flechas y masa de esporos; B) acérvulos con flechas y masa de esporos (color crema) sobre el tegumento de la semilla; C) radícula presenta varios acérvulos con flechas.

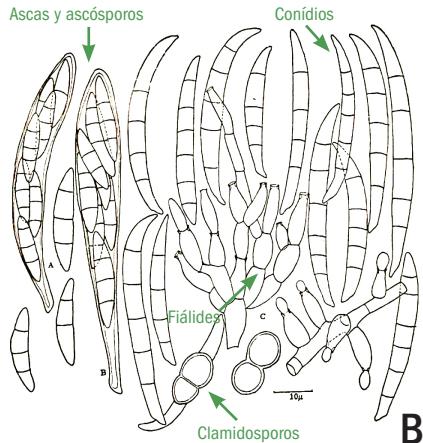
2.3. *Fusarium* spp.

Estas son las dos especies más comunes en las semillas de soja. Pueden perjudicar la germinación en el laboratorio pero no son patógenos de plantas!

Fotos: Agnes Izumi Nagashima



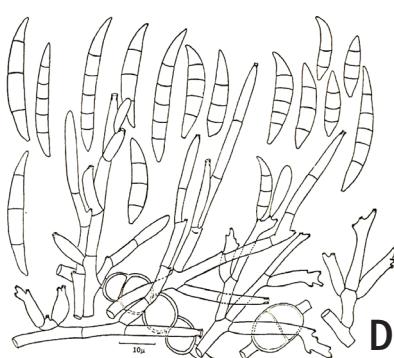
A



B



C



D

Figura 6. *Fusarium* spp. A) *Fusarium graminearum*; B) Conidios, ascas y clamidosporos de *Fusarium graminearum*; C) *Fusarium pallidoroseum*; D) Conidióforos, conidios y clamidosporos de *Fusarium pallidoroseum* (semitectum)

Fonte: Booth (1971).

2.4. *Macrophomina phaseolina*

Hongo del suelo, puede contaminar las semillas!

Foto: Agnes Izumi Nagashima



Figura 7. Conídios (esporos) de *Macrophomina phaseolina*.

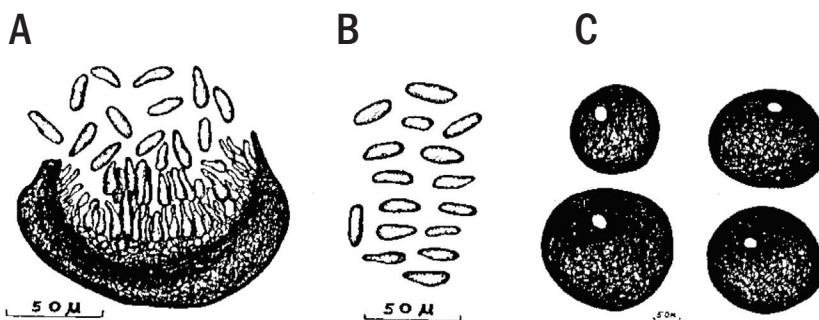
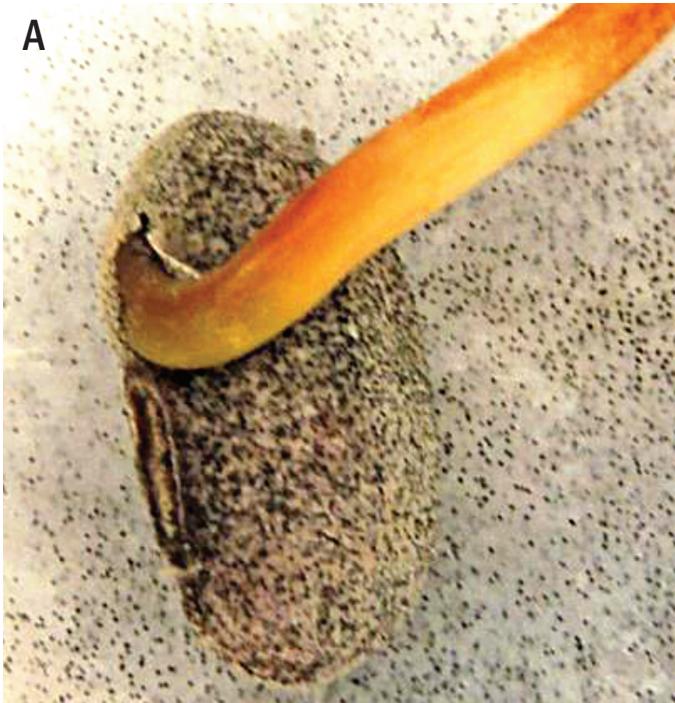


Figura 8. *Macrophomina phaseolina*. A) corte de picnídio con esporas; B) esporas; C) picnídios.

Fonte: Sinclair e Shurtleff (1975).

Fotos: Agnes Izumi Nagashima

A



B



Figura 9. *Macrophomina phaseolina*. A) microesclerocios dispersos sobre el papel de filtro; B) semilla infectada con *Macrophomina phaseolina*.

2.5. *Phomopsis* sp.

Es el principal patógeno de semillas de soja, el cual junto con *Fusarium pallidoroseum* (*semitectum*) afectan la germinación de semillas. Solamente en la prueba del rollo de papel. Estos hongos son frecuentes cuando las fases de maduración y cosecha coinciden con períodos de alta humedad (lluvia).

Fotos: Agnes Izumi Nagashima (A, B, C y E) e Ademir Assis Henning (D)

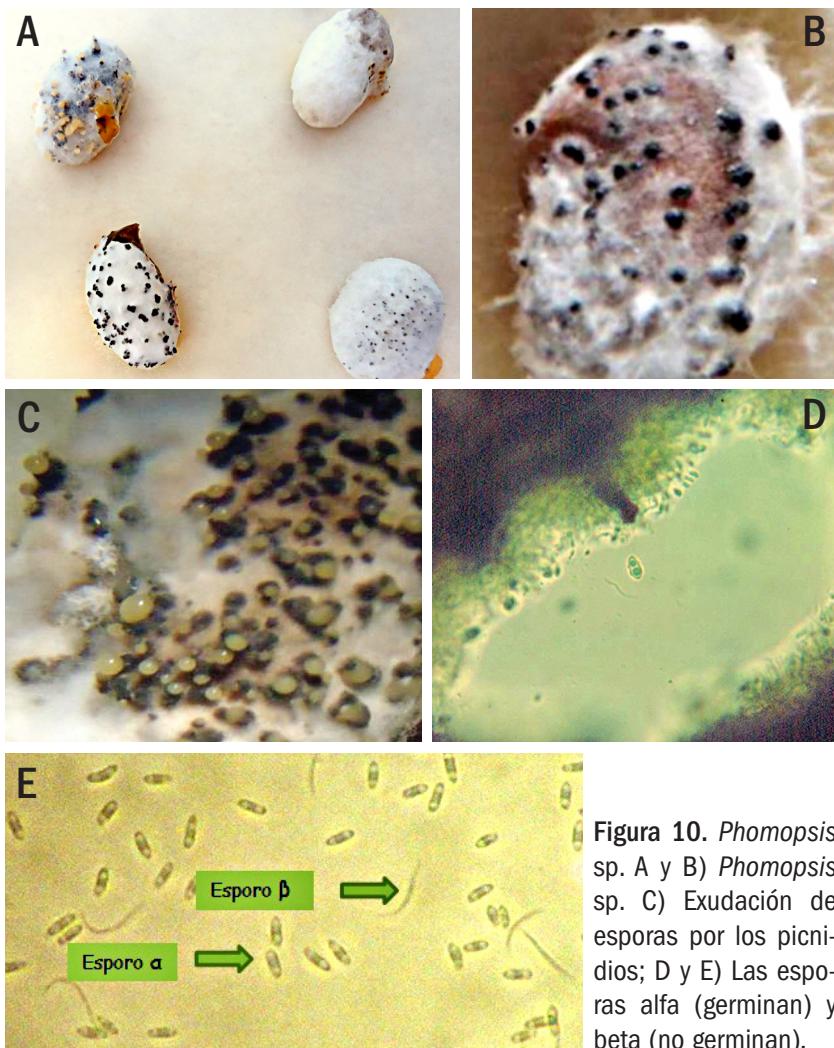


Figura 10. *Phomopsis* sp. A y B) *Phomopsis* sp. C) Exudación de esporas por los picnidios; D y E) Las esporas alfa (germinan) y beta (no germinan).

2.6. *Rhizoctonia solani*

Hongo del “suelo” puede contaminar las semillas. Produce “rizomorfos”

Fotos: Ademir Assis Henning

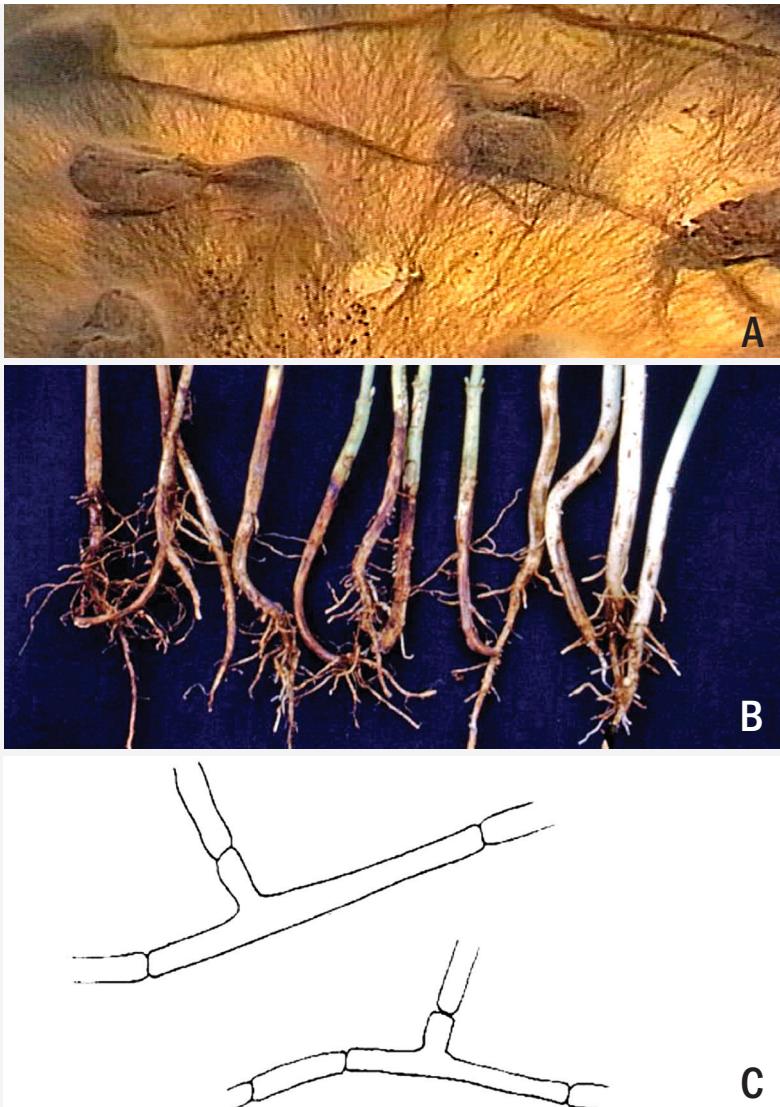


Figura 11. *Rhizoctonia solani*. A) “Rizomorfos” en método de papel de filtro; B) los síntomas en la planta; C) Hifas septadas y ramificadas en 90°.

Fonte: Henning et. al (2002).

2.7. *Sclerotinia sclerotiorum* - Moho blanco

Patógeno muy importante, pero la transmisión por semilla es muy baja (<0,1%). El mayor problema son los esclerocios mezclados con las semillas!

Fotos: Ademir Assis Henning

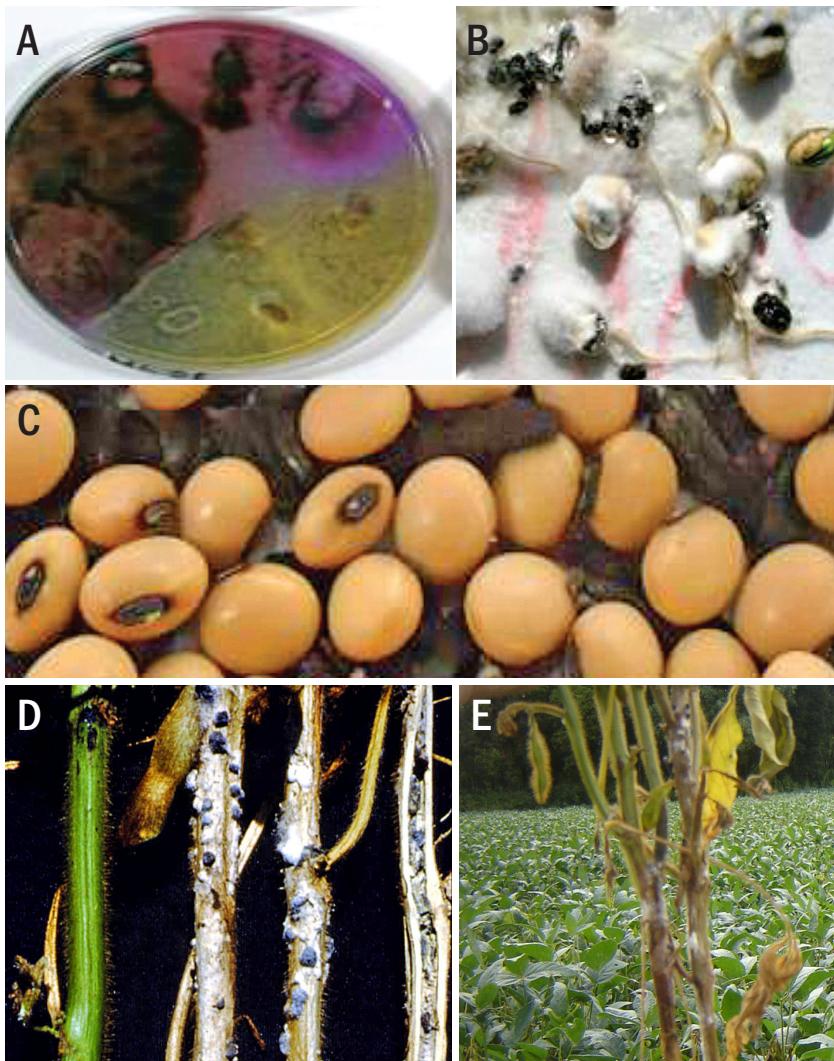


Figura 12. *Sclerotinia sclerotiorum*. A) Placa de Néon; B y C) semillas y esclerocios mezclados; D y E) plantas con síntomas.

2.8. *Sclerotium rolfsii*

Hongo del suelo, esporádicamente puede ser detectado en los lotes de semillas. Produce esclerocitos pequeños, marrones (cuando está madura), parecen semillas de col!

Fotos: Agnes Izumi Nagashima (A y B) y Álvaro Manoel Rodrigues Almeida (C y D)

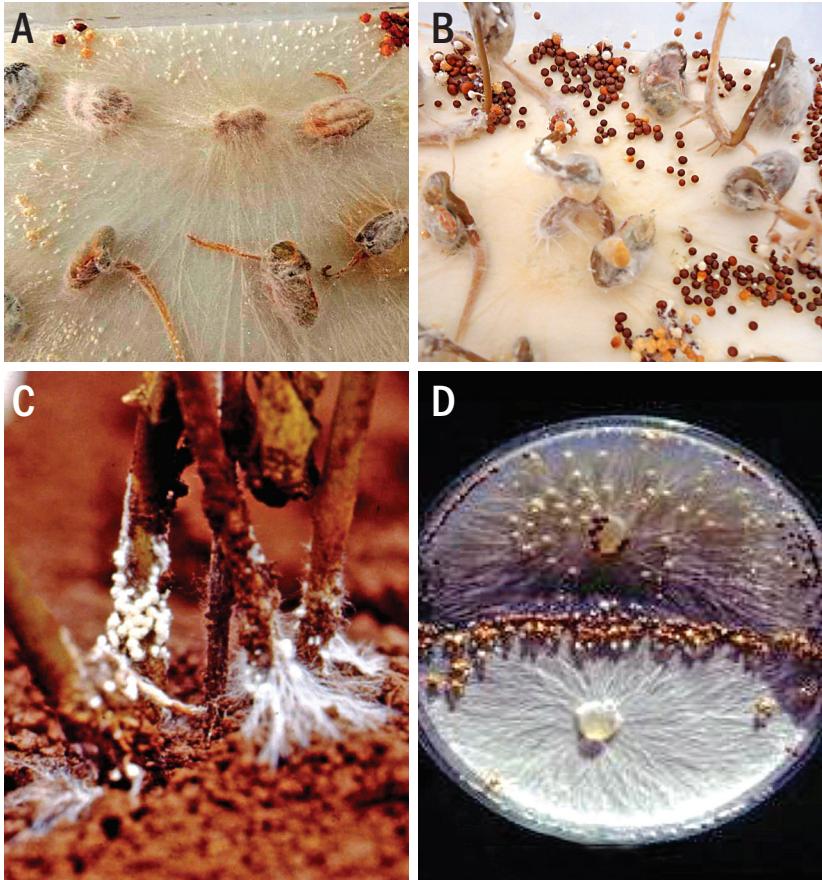


Figura 13. *Sclerotium rolfsii*. A y B) Producción de esclerodos en método de papel de filtro; C) síntomas en plantas de semillero y D) esclerodos en placa con medio.

3. HONGOS DE ALMACENAMIENTO

3.1. *Aspergillus* spp.

Hongos de almacenamiento, la especie más común es *Aspergillus flavus*.

Fotos: Agnes Izumi Nagashima

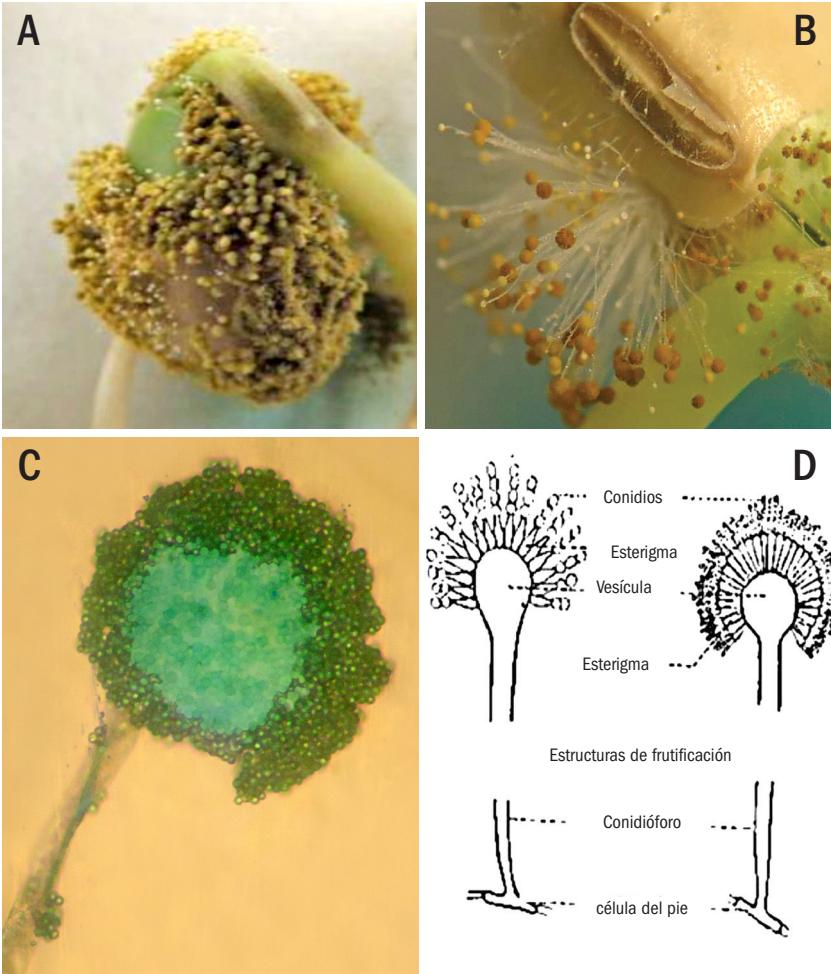


Figura 14. A) *Aspergillus* spp. B) *Aspergillus flavus*; C) estructuras de *Aspergillus flavus* en visualización microscópica (400 x); D) estructuras de frutificación de *Aspergillus flavus*.

Fonte: Silveira (1968).

3.2. *Penicillium* sp.

Esporulación de *Aspergillus* y *Penicillium*, son hongos de almacenamiento pero *Penicillium* es menos común en semillas de soja.

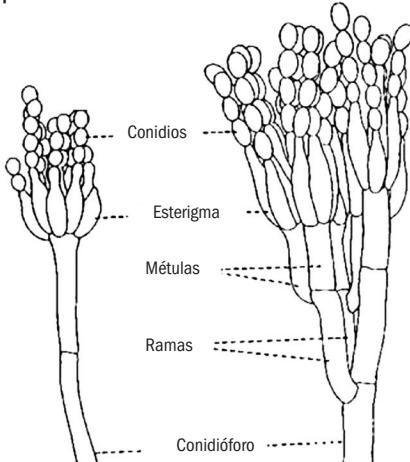


Figura 15. Estructuras del *Penicillium* sp.

Fonte: Silveira (1968).

Fotos: Ademir Assis Henning

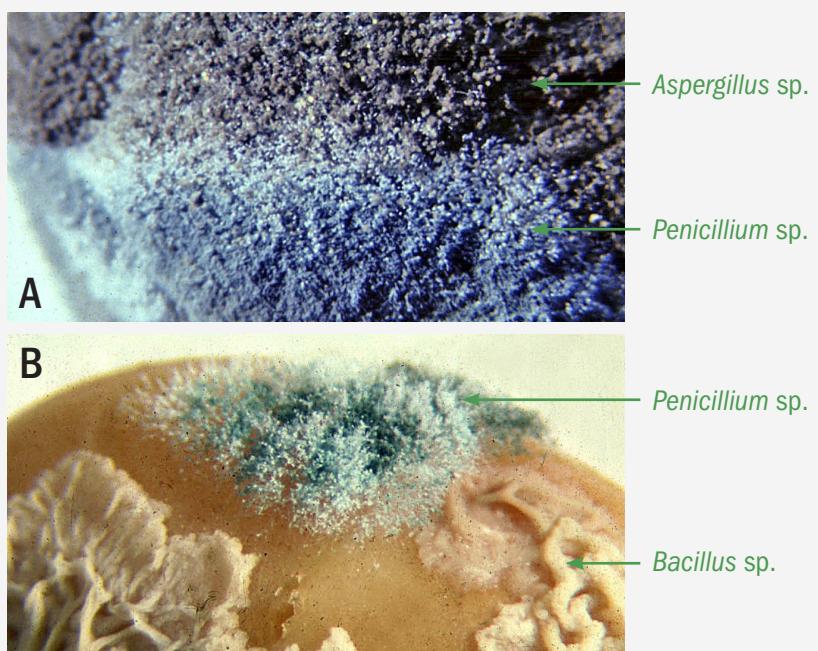


Figura 16. *Penicillium* sp. A) Semilla con *Penicillium* sp.; B) *Penicillium* sp. en semilla con *Bacillus* sp.

4. CONTAMINANTES O SAPRÓFITOS

4.1. *Alternaria* spp.

Hongo saprófito, especialmente *Alternaria tenuis* o *A. alternata*.

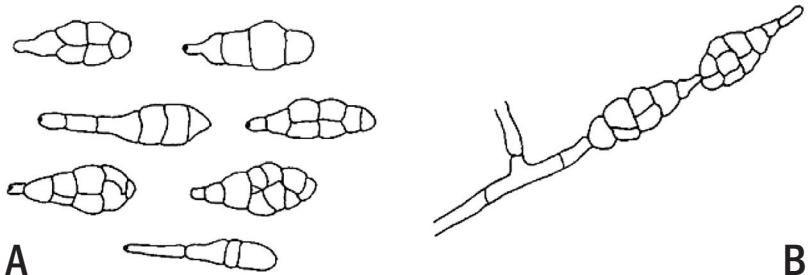


Figura 17. *Alternaria* sp. A) Diferentes formas de conidios (esporas) con septos transversales y longitudinales; B) Esporas en cadena (catenulados).

Fonte: Henning et al. (2002)

Fotos: Agnes Izumi Nagashima

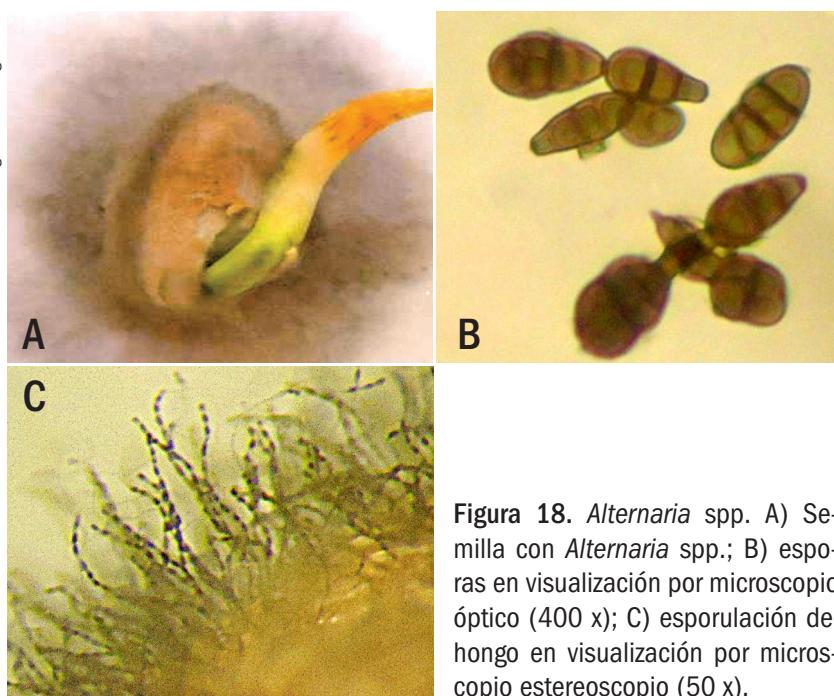


Figura 18. *Alternaria* spp. A) Semilla con *Alternaria* spp.; B) esporas en visualización por microscopio óptico (400 x); C) esporulación del hongo en visualización por microscopio estereoscópico (50 x).

4.2. Bactérias

Saprófitos, algunas especies se utilizan en control biológico!

Fotos: Agnes Izumi Nagashima y Ademir Assis Henning



A

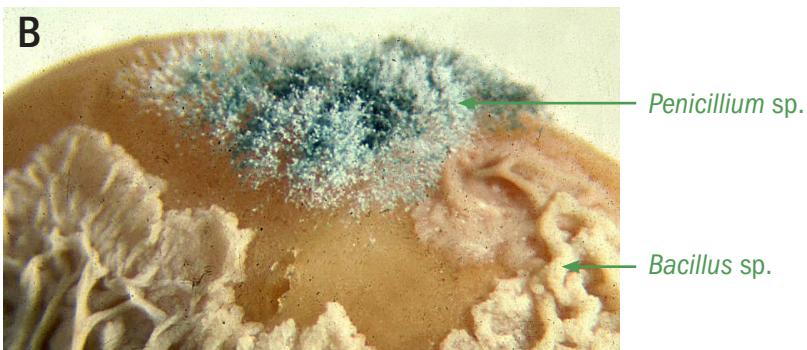


Figura 19. Bactéria. A) Bacterias - por lo general asociadas con las semillas muertas y con daños; B) *Bacillus* sp. saprófita.

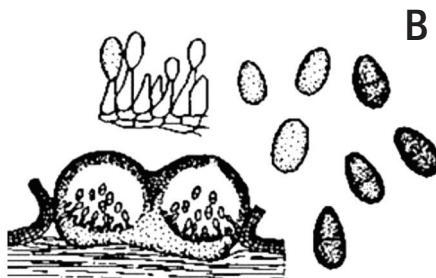
4.3. *Botryodiplodia* sp.

(Contaminante en semillas de soja, no es patógeno).

Foto: Agnes Izumi Nagashima



A

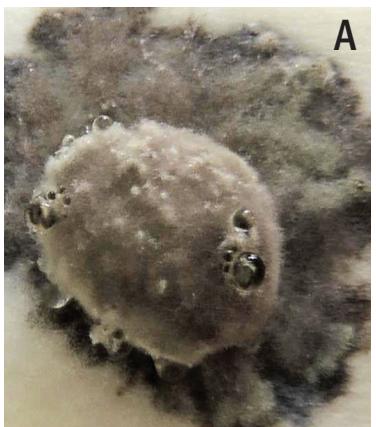


B

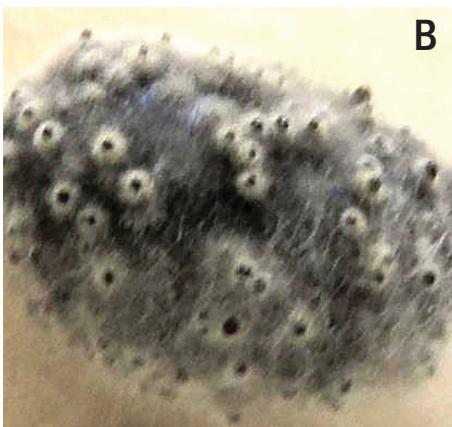
Figura 20. *Botryodiplodia* sp. A) Conidios nuevos (blanco) y conidios maduros (oscuro), con doble pared y el tabique transversal. B) Picnidios y conidios.

Fonte: Barnett e Hunter (1972).

Fotos: Ademir Assis Henning



A



B

Figura 21. *Botryodiplodia* sp. A y B) Semilla con *Botryodiplodia* sp.

4.4. *Chaetomium* sp.

Contaminante - cuidado de no confundir con *Colletotrichum*! Produce peritecios (foto abajo) con pelos que se pueden confundir con las flechas de los acérvulos de *C. truncatum*!

Fotos: Agnes Izumi Nagashima (A, B y D) y Ademir Assis Henning (E)

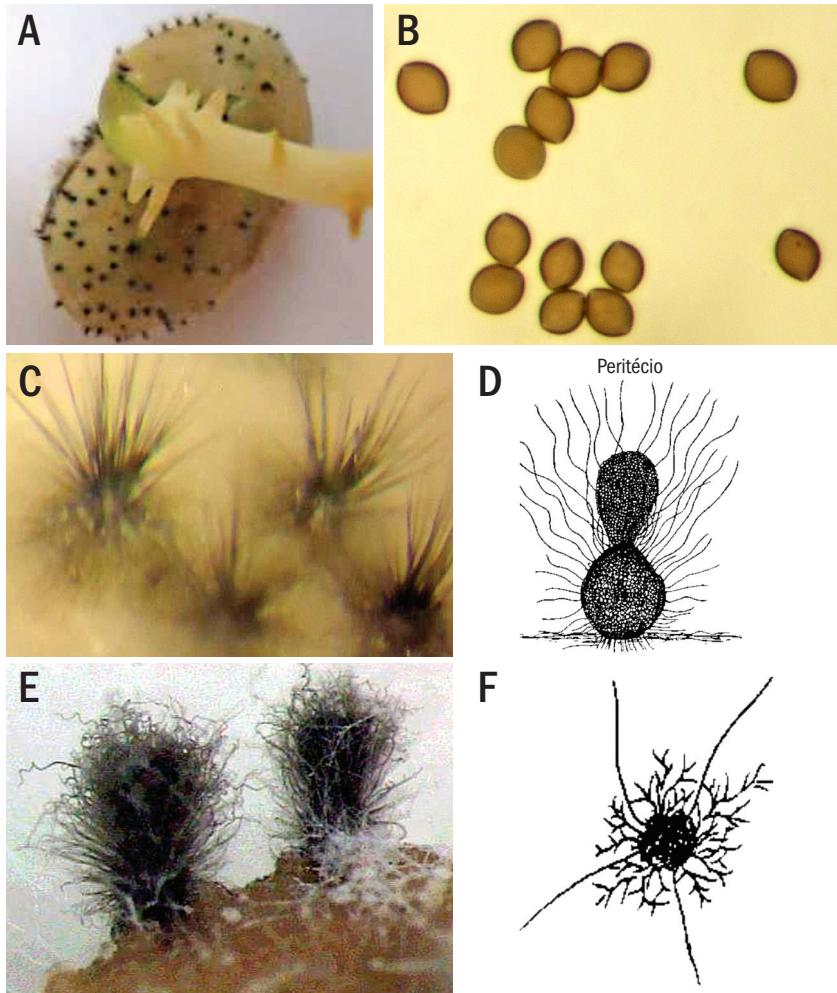


Figura 22. *Chaetomium* sp. A) Semilla con *Chaetomium* sp.; B) Esporas en visualización por microscopio óptico (400 x); C, D, E y F) diferentes tipos de peritoneas y cabelleras.

Fonte: Henning et al. (2002).

4.5. *Cladosporium* spp.

Saprófita, contaminante.

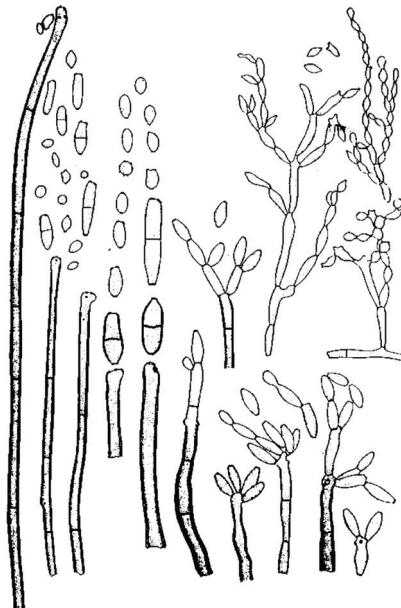


Figura 23. Conidióforos oscuros y conidios de formas irregulares

Fonte: Ellis (1976).

Fotos: Agnes Izumi Nagashima

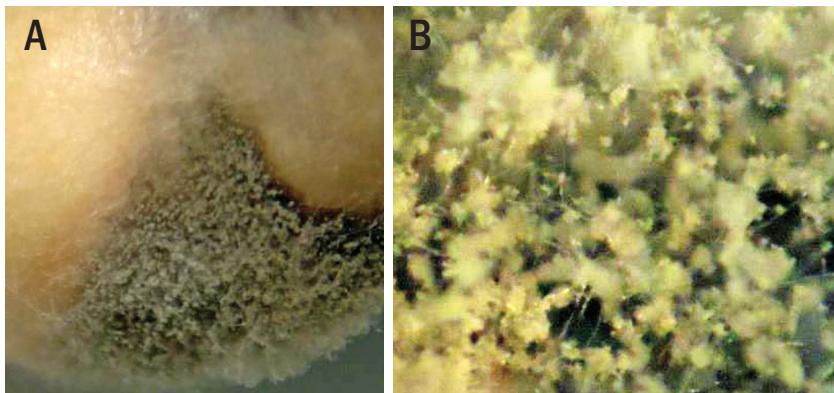


Figura 24. A y B) *Cladosporium* spp.

4.6. *Rhizopus* spp.

Saprófita, contaminante - produce rizoides que lo diferencian de *Mucor* sp.

Fotos: Ademir Assis Henning

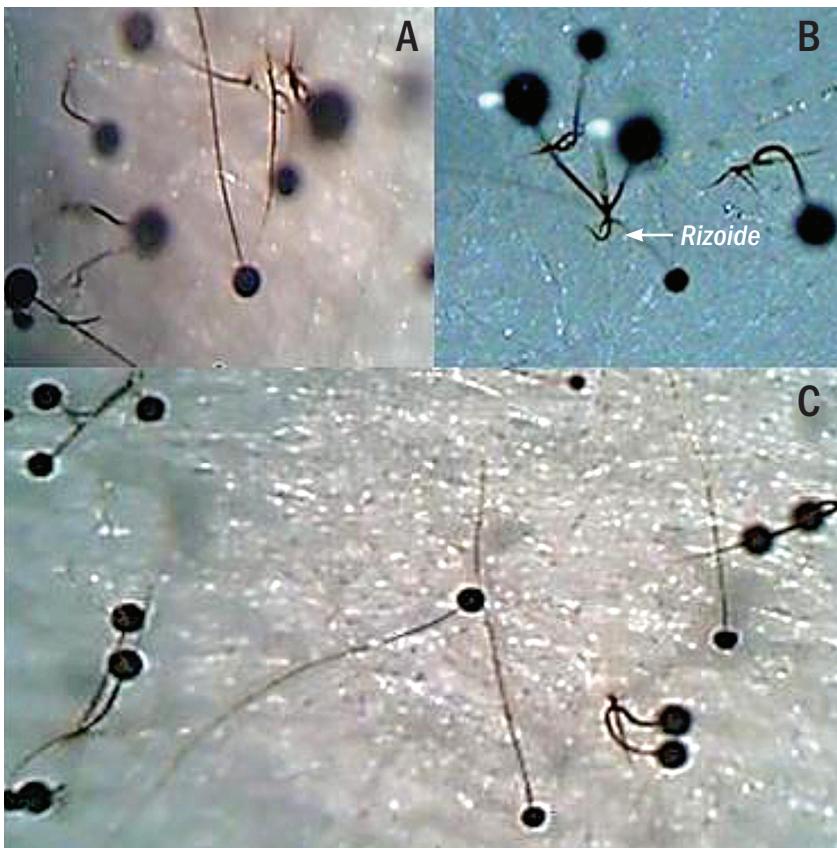


Figura 25. A, B y C) La estructura de *Rhizopus* spp. con rizoides en visualización por microscopio estereoscópico (50x).

Fotos: Agnes Izumi Nagashima

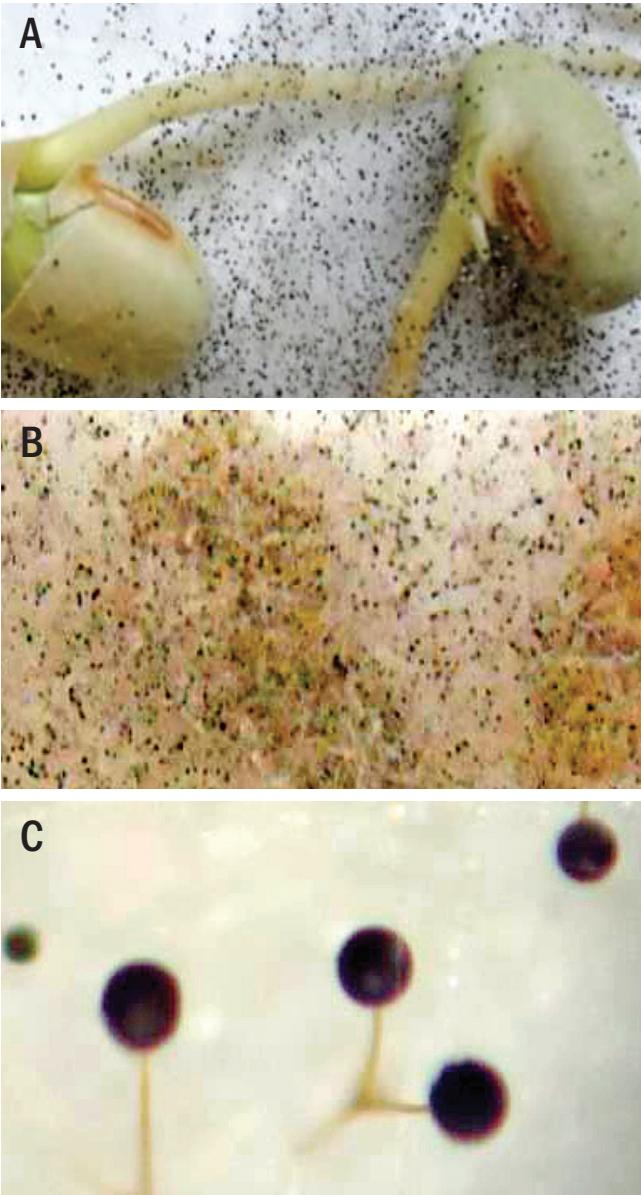


Figura 26. A y B) el hongo contaminante esparcido en las semillas y en el papel de filtro; C - estructura de *Rhizopus spp.* en visualización por microscopio óptico (400 x).

4.7. *Trichoderma* spp.

Contaminante utilizado en control biológico de patógenos importantes.

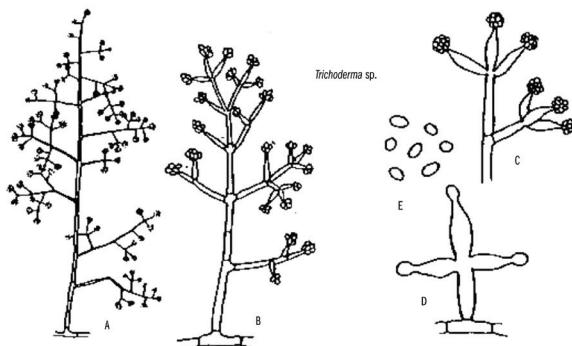


Figura 27. *Trichoderma* spp. A, B, C y D) Conidióforos hialinos muy ramificados; E) conídios pequeños elípticos

Fonte: Barnett e Hunter (1972).

Fotos: Agnes Izumi Nagashima

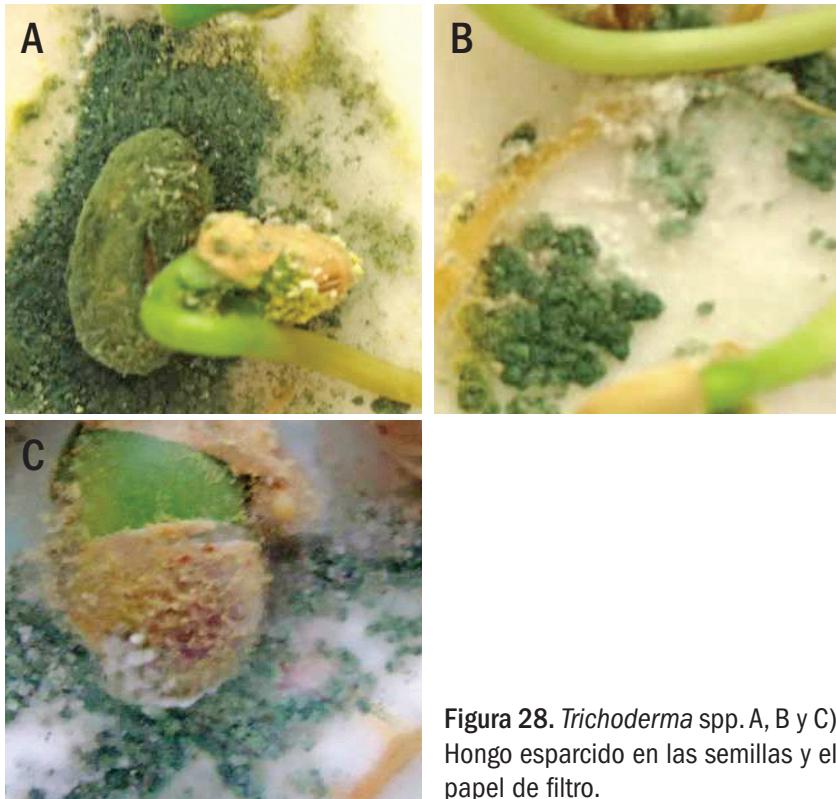


Figura 28. *Trichoderma* spp. A, B y C) Hongo esparcido en las semillas y el papel de filtro.

REFERENCIAS

- BOOTH, C. *The genus Fusarium*. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 237 p.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 3rd ed. Minneapolis: Burgess, 1972. 241 p.
- ELLIS, M. B. *More dematiaceous hyphomycetes*. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1976. 507 p.
- HENNING, A. A. **Patologia e tratamento de sementes:** noções gerais. 2. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2005. 52 p. (Embrapa Soja. Documentos, 264).
- HENNING, A. A.; MELCHIADES, A. R.; MORAES, S. R. **Patologia de sementes:** ilustração das estruturas dos principais fungos em soja. Londrina: Embrapa Soja, 2002. 35 p. (Embrapa Soja. Documentos, 190).
- REGRAS para análise de sementes. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009. 395 p.
- SILVEIRA, V. D. **Lições de micologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: José Olympio, 1968. 301 p.
- SINCLAIR, J. B.; SHURTLEFF, M. C. **Compendium of soybean diseases**. Minnesota: The American Phytopathological Society, 1975. 69 p.

ADJUNTO**FICHA PARA LA EVALUACIÓN DEL ANÁLISIS SANITARIO**

PATOLOGÍA DE SEMILLAS										
REGISTRO N° _____										
MÉTODO:	<input type="checkbox"/> PAPEL DE FILTRO <input type="checkbox"/>		PERÍODO: INICIO _____ TERMO _____		Nº SEM. PROBADAS					
ESPÉCIE VARIEDAD	<input type="checkbox"/> SOJA <input type="checkbox"/>		FECHA DE LA COSECHA							
LOCAL DE LA COSECHA:					FECHA DE RECEPCIÓN					
REMETENTE:										
PATÓGENOS (HONGOS)		REPETICIONES:								%
		1	2	3	4	5	6	7	8	
<i>Aspergillus flavus</i>										
<i>Aspergillus spp</i>										
<i>Cercospora kikuchii</i>										
<i>Colletotrichum trunchatum</i>										
<i>Fusarium pallidorostrum (semitectum)</i>										
<i>Phomopsis sp.</i>										
<i>Macrophomina phaseolina</i>										
BACTERIA										
SEMILLA DURA										
DANO										
GERMINACIÓN										
SAPRÓFITAS:		<input type="checkbox"/> <i>Alternaria</i> sp.	<input type="checkbox"/> <i>Curvularia</i> sp.	<input type="checkbox"/> <i>Nigrospora</i> sp.	<input type="checkbox"/> <i>Trichoderma</i> sp.					
		<input type="checkbox"/> <i>Chaetomium</i> sp.	<input type="checkbox"/> <i>Helminthosporium</i> sp.	<input type="checkbox"/> <i>Penicillium</i> spp.	<input type="checkbox"/>					
		<input type="checkbox"/> <i>Cladosporium</i> sp.	<input type="checkbox"/> <i>Mucor</i> sp.	<input type="checkbox"/> <i>Rhizopus</i> sp.	<input type="checkbox"/>					
OBSERVACIONES:										
FECHA: ___ / ___ / ___					ANALISTA _____					



Soja

Ministerio de
Agricultura, Ganadería
y Abastecimiento



ISBN 978-85-7035-734-2

A standard linear barcode representing the ISBN number 9788570357342.

9788570357342

CGPE 14031