

Incremento de la calidad sanitaria y fisiológica en semilla de chile poblano (*Capsicum annuum* L.)

Rapucel Tonantzin Quetzalli Heinz Castro,¹ José Marín Sánchez² y Omar G. Alvarado Gómez¹

¹ Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León. Francisco Villa s/n. Col. Ex-hacienda El Canadá, C., P. 66050, Escobedo, N., L. México.

² Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Autónoma de San Luis Potosí Km 14.5 Carretera San Luis Potosí, Matehuala, C. P. 78321, Ejido Palma de la Cruz, Soledad de Graciano Sánchez, S. L. P., México

RESUMEN

San Luis Potosí participa con el 45 % de la producción nacional de chile poblano (*Capsicum annuum* L.); no obstante, se tienen rendimientos bajos debido a que el 80 % de la semilla utilizada es criolla, producida por los agricultores, que resulta de mala calidad física, fisiológica, genética y sanitaria, ya que los virus AMV y CMV se transmiten por esta vía, de ahí que se requiera de 1,2 kg de semilla para establecer una hectárea con 30 000 plantas. En el presente trabajo se aplicó termoterapia para inactivar los virus AMV y CMV seguido de osmoacondicionamiento. Posterior a estos tratamientos las semillas se sembraron en invernadero libre de insectos vectores y se realizó la prueba de detección de virus en las plántulas obtenidas. Los resultados indican que aplicar termoterapia a 90 °C durante 120 min más osmoacondicionamiento a -20 atm durante 48 h mostró un mayor porcentaje de germinación (42 %), lo cual indica mayor calidad fisiológica comparada con el testigo absoluto, sin aplicación de KNO₃, cuyo porcentaje de germinación fue del 12 %, demostrando así la mala calidad fisiológica de la semilla cosechada, la que además no cumple con las normas establecidas por el SNICS. En la prueba de detección de virus en plántulas se aplicó termoterapia en la semilla en valores de 50 °C durante 60 min, 90 °C durante 90 min y 90 °C durante 120 min, con lo cual se logró inactivar ambos virus (AMV y CMV), obteniendo así plantas libres de estos fitopatógenos.

Palabras claves: Termoterapia, osmoacondicionamiento, AMV, CMV, porcentaje de germinación

ABSTRACT

San Luis Potosi participates with 45 % of the national production of poblano chile *Capsicum annuum* L.; however they have low yields because 80 % of the seed used is Creole, produced by farmers, resulting from poor physical, physiological, genetic and sanitary quality, as the AMV and CMV viruses are transmitted by this route, hence it requires 1.2 kg of seed to establish an hectare with 30 000 plants. In this paper thermotherapy and priming was applied to inactivate the AMV and CMV virus after these treatments the seeds were sown in the greenhouse free of insect vectors and virus detection test was performed on seedlings. The results indicate that applying thermotherapy to 90 °C for 120 minutes at -20atm for 48 hours, showed a higher germination percentage (42 %), which indicates greater physiological quality compared to the absolute control without application of priming, the germination percentage was 12 %, demonstrating the poor physiological quality of harvested seed, which also does not meet the standards set by the SNICS. In the test for virus in seedlings, thermotherapy was applied in the seed values of 50 °C for 60 min, 90 °C for 90 min and 90 °C for 120 minutes, which we were able to inactivate both viruses AMV and CMV obtaining free plants from these pathogens.

Key words: Thermotherapy, priming, AMV, CMV and percentage of germination

INTRODUCCIÓN

México es considerado como centro de origen, domesticación y diversidad de *Capsicum annuum* L. [Luna, 2010]; la producción de este cultivo ocupa el octavo lugar a nivel nacional y el segundo a nivel mundial [FAO, 2012]. Para 2012 se informaron 136 053,46 ha sembradas en México [SIAP, 2012], el cual se ha visto afectado por la presencia de enfermedades virales, las cuales constituyen uno de los factores de mayor riesgo en la producción, ocasionando fuertes pérdidas

económicas, siendo estas de hasta el 100 % de pérdidas en la producción. En Guanajuato se ha detectado la presencia de CMV [Pérez *et al.*, 2004] y AMV en semillas y plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) [Tun *et al.*, 2007].

La obtención de semilla de alta calidad es de vital importancia para conservar y mejorar las variedades criollas, ya que representan la base fundamental de los recursos genéticos disponibles *in situ* para el mejora-

miento genético de la especie a corto y mediano plazo [Luna, 2010]. Las semillas deben satisfacer ciertas normas, las cuales son vigiladas para su cumplimiento por el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS); estas se evalúan mediante pruebas serológicas, detección de ácidos nucleicos, pruebas de germinación y viabilidad [Marín *et al.*, 2007]. La transmisión por semilla es un punto de partida idóneo para el establecimiento y desarrollo epidémico de una enfermedad viral en campo, ya que constituyen reservorios de virus y focos de dispersión secundaria de la enfermedad, bien sea de manera mecánica o por vectores [Córdoba, 2010]. Los virus transmitidos a través de semilla se pueden presentar de dos formas, como una infección o infestación [Sepúlveda, 2011].

La termoterapia proporciona temperaturas que superan el punto de inactivación térmica de los virus; sin embargo, la calidad fisiológica es afectada al reducirse de manera drástica los porcentajes de germinación, de ahí el inconveniente de utilizar esta alternativa; sin embargo, en la actualidad hay técnicas que logran incrementar la calidad fisiológica de las semillas, como el osmoacondicionamiento. Por lo anterior es necesario producir semilla de chile de alta calidad y libre de virus, siendo su germinación rápida y uniforme bajo diferentes condiciones ambientales; por ello se deben utilizar técnicas que mejoren tales características, como el osmoacondicionamiento y termoterapia. El objetivo del presente trabajo fue producir semilla de calidad sanitaria y fisiológica en semilla de chile poblano (*Capsicum annuum*) mediante la inactivación de los virus AMV y CMV con termoterapia y posteriormente reparar y mejorar su calidad fisiológica mediante osmoacondicionamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología e invernaderos de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Ejido Palma de la Cruz Km 14.5, Soledad de Graciano Sánchez, San Luis Potosí. Esta investigación comprende tres fases; la primera consistió en aplicar termoterapia a las semillas de chile poblano criollo producida por los agricultores de Moctezuma y Villa de Arista, San Luis Potosí con el propósito de inactivar los virus AMV y CMV; en la segunda se aplicó osmoacondicionamiento para regenerar las estructuras que fueron dañadas por las

elevadas temperaturas utilizadas durante la primera fase. Al finalizar estas se procedió a realizar las pruebas de calidad fisiológica y sanitaria para determinar los porcentajes de germinación y detección de virus en plántula, lo cual constituyó la tercera fase.

Primera fase: Termoterapia. Consistió en someter las semillas de chile poblano a tres temperaturas (50 °C, 90 °C y 120 °C) durante tres períodos (60, 90 y 120 min) en un horno de secado para inactivar los virus transmitidos por esta vía y mejorar la calidad sanitaria. En cada tratamiento se emplearon 400 semillas [ISTA, 2004] subdivididas en grupos de 100. Los grupos de semillas fueron colocados en el interior de sobres e introducidos a la estufa para recibir los tratamientos durante los períodos señalados.

Segunda fase: Osmoacondicionamiento. Posterior a la termoterapia, el cual consistió en sumergir las semillas de cada uno de los tratamientos anteriores en soluciones de KNO₃ a 0, -10 y -20 atm de presión durante 48 h, en frascos de 25 mL, empleando una bomba de aire para oxigenar las semillas. Al término del tiempo se lavaron con agua corriente para eliminar los residuos del agente utilizados durante el tratamiento.

Tercera fase: Pruebas de calidad fisiológica y sanitaria. Para realizar las pruebas de calidad fisiológica se emplearon 100 semillas de cada uno de los tratamientos generados de la combinación termoterapia más osmoacondicionamiento, además del testigo absoluto, llevando a cabo el protocolo sugerido por el ISTA (2004). Las variables evaluadas fueron peso seco por plántula y porcentaje de plántulas normales. Paralelo a las pruebas de germinación se sembraron cinco semillas de cada tratamiento, y fueron introducidas en jaulas cubiertas con tela cerrada organza para impedir el acceso de insectos vectores (áfidos) en el invernadero durante 60 días.

Detección de virus: A los 60 días, período en el cual las plantas mostraron síntomas de infección viral como distorsión foliar y amarillamiento, se tomó tejido a cada una de las plántulas para la detección de los virus AMV y CMV, mediante la prueba de ELISA con antisueros comerciales específicos y fosfatasa alcalina. Los valores de absorbancia de cada muestra se registraron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm. La reacción se consideró positiva cuando la lectura fue mayor al promedio de los controles negativos más tres veces la desviación estándar [Sutula *et al.*, 1986].

Diseño experimental

El diseño experimental empleado fue completamente al azar con arreglo factorial; se establecieron cuatro repeticiones de 100 semillas distribuidas en cajas Petri para evaluar la calidad fisiológica de cada tratamiento. En todos los experimentos de termoterapia y osmoacondicionamiento se emplearon tratamientos control. Con los datos obtenidos se realizaron análisis de varianza y posterior comparación de medias mediante Tukey ($\alpha = 0,05$) con el paquete estadístico SAS 2004 (Statistical Analysis System).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados en este trabajo en las prueba de calidad fisiológica, la semilla de chile poblano criollo producida por los agricultores de Moctezuma y Villa de Arista, S.L.P. es de mala calidad fisiológica debido a que el porcentaje de germinación obtenido apenas alcanzó el 12 % (*Tabla 1*), debiendo ser este mayor al 80 % de acuerdo con el SNICS (Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas)–SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación) para este cultivo.

Un factor determinante es la calidad de la semilla, grado y tiempo de maduración después de la cosecha, que generalmente coincide con el inicio de cambio de coloración de los frutos [Carrillo *et al.*, 2009]; por ello se deben cosechar los frutos cuando se tornan de una coloración rojo-café, indicador de haber alcanzado su

madurez fisiológica y la semilla su máxima calidad fisiológica.

Se realizó la prueba de viabilidad con tetrazolio, la cual mostró un porcentaje de latencia del 91 %. Esto es debido a que la calidad disminuye con el tiempo. Otros factores son la humedad, aireación, rango térmico entre 20 y 30 °C [ISTA, 2004], siendo la germinación más rápida a esta última, mientras que a temperaturas de 35 °C o mayores se inhibe la germinación.

Los mayores porcentajes de germinación se obtuvieron en los tratamientos 18, 5, 12, 11, 29 y 28, mientras que los tratamientos 19, 21, 22, 23, 24, 25 y 26 mostraron 0 % de germinación. Esto es debido a que las semillas estuvieron expuestas a una temperatura de 120 °C y las anteriores entre 50 °C y 90 °C a diferentes intervalos de tiempo (*Tabla 1*), mientras que Paylan *et al.* (2014) obtuvieron una disminución del 12 al 27 % en la carga de CMV en semillas de chile y otras hortalizas, al ser expuestas a altas temperaturas; sin embargo, también observaron daños en la semilla, causando un bajo porcentaje de germinación. Ling (2010) empleó tratamientos térmicos a 48 y 80 °C durante 72 h, lo cual resultó efectivo para reducir la infección de virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) sin perjudicar la germinación. En otro estudio se aplicó tanto a semillas como a plántulas una temperatura de 80 °C por 24 h, y 74 °C durante 40 h, logrando con ello eliminar el PepMV en plántulas, pero no en semillas, no afectando el porcentaje de germinación [Córdoba *et al.*, 2007].

Tabla 1. Efecto promedio de los diferentes tratamientos relativos a la calidad fisiológica de la semilla de chile poblano sometida a termoterapia y osmoacondicionamiento

<i>Tratamiento</i>	<i>Germinación (%)</i>	<i>Peso seco</i>
T18: 90 °C 120 min-20 atm	42 a	0,03070 a b
T5: 50 °C 90 min-10 atm	40 a b	0,03250 a
T12: 90 °C 60 min-20 atm	38 a b	0,02910 a b c
T11: 90 °C 60 min-10 atm	36 b c	0,02243 a b c d e f
T29: 0 °C 0 min-20 atm	36 b c	0,02610 a b c d
T28: 0 °C 0 min-10 atm	36 b c	0,00840 d e f g
T17: 90 °C 120 min-10 atm	36 b c	0,03153 a
T9: 50 °C 120 min-20 atm	32 c	0,01096 b c d e f g
T4: 50 °C 90 min 0 atm	24 d	0,00943 c d e f g
T6: 50 °C 90 min-20 atm	22 d e	0,01963 a b c d e f g
T14: 90 °C 90 min-10 atm	22 d e	0,01390 a b c d e f g

T3: 50 °C 60 min-20 atm	20 d e f	0,02403 a b c d e
T2: 50 °C 60 min-10 atm	20 d e f	0,02230 a b c d e f
T8: 50 °C 120 min-10 atm	18 e f	0,01743 a b c d e f g
T10: 90 °C 60 min 0 atm	18 e f	0,00893 c d e f g
T20:120 °C 60 min-10 atm	16 f g	0,00000 g
T16: 90 °C 120 min 0 atm	16 f g	0,02020 a b c d e f
Testigo: 0 min 0 atm	12 g h	0,00276 f g
T7: 50 °C 120 min 0 atm	10 h i	0,01330 a b c d e f g
T15: 90 °C 90 min-20 atm	8 h i j	0,01420 a b c d e f g
T1: 50 °C 60 min 0 atm	8 h i j	0,01120 b c d e f g
T13: 90 °C 90 min 0 atm	6 i j	0,01353 a b c d e f g
T27:120 °C 120 min-20 atm	4 j k	0,00000 g
T26:120 °C 120 min-10 atm	0 k	0,00000 g
T21:120 °C 60 min-20 atm	0 k	0,00000 g
T22:120 °C 90 min 0 atm	0 k	0,00000 g
T25:120 °C 120 min 0 atm	0 k	0,00000 g
T19:120 °C 60 min 0 atm	0 k	0,00000 g
T23:120 °C 90 min-10 atm	0 k	0,00000 g
T24:120 °C 90 min-20 atm	0 k	0,00423 f g
DMS 0,05	4,5575	0,0202

Medias con la misma letra en sentido vertical son iguales estadísticamente (Tukey, $\alpha= 0,05$).
DMS: Diferencia mínima significativa.

El tratamiento 18 logró inactivar los virus AMV y CMV, además de generar el mayor porcentaje de germinación con un 42 % y peso seco (*Tabla 1*), lo que indica que la semilla, a pesar de haber sido dañada por la termoterapia, fue regenerada por el osmoacondicionamiento con KNO_3 a -20 atm. Este tratamiento es promisorio para mejorar la germinación y uniformidad de las semillas debido a que el osmoacondicionamiento es un proceso de hidratación controlada. Asimismo se demostró un aumento en los porcentajes de germinación en semillas sometidas a osmoacondi-

cionamiento, respecto de las semillas control. Estas pruebas fueron necesarias, ya que además de producir semillas libres de virus, se deben obtener semillas de calidad que aumenten la producción en campo, mayor tolerancia a la desecación y movilidad de sustancias de reserva, adicionando la habilidad de programar la fase de germinación en el momento con mejores condiciones ambientales [Ayala, 2012]. De acuerdo con el análisis de varianza realizado, existen diferencias significativas para las variables de presencia de AMV y CMV, así como entre los tratamientos (*Tabla 2*).

Tabla 2. Detección de lo virus AMV y CMV en plántulas de semillas de pimiento sometidas a termoterapia y osmoacondicionamiento

Tratamiento	Detección virus en plántulas (%)		
	AMV	CMV	Libres de virus
50 °C/60 min ^{T3}	0,00 c	0,00 d	100,00 a
50 °C/90 min ^{T6}	56,66 b	58,33 c	56,66 b
50 °C/120 min ^{T9}	0,00 c	50,00 b c	50,00 b
90 °C/60 min ^{T12}	83,33 a	100,00 a	0,00 c
90 °C/90 min ^{T15}	0,00 c	0,00 d	100,00 a

90 °C/120 min ^{T18}	0,00 c	0,00 d	100,00 a
120 °C/60 min ^{T21}	50,00 b	50,00 b c	50,00 b
120 °C/90 min ^{T24}	83,33 a	83,83 a b	16,66 c
120 °C/120 min ^{T27}	0,00 c	43,33 c	56,66 b
Testigo	100,00 a	83,33 a b	0,00 c
DMS 0,05	37,34	38,08	27,44

Medias con la misma letra en sentido vertical son iguales estadísticamente (Tukey, $\alpha = 0,05$).
DMS: Diferencia mínima significativa.

Aplicar termoterapia a semilla de pimiento en valores de 50 °C 60 min, 90 °C 90 min y 90 °C 120 min logró inactivar los virus AMV y CMV. Wang *et al.* (2008) indican que existe una estrecha relación entre la temperatura y el silenciamiento de ARN que parece actuar como un medio para aumentar la degradación de ARN del virus. El osmoacondicionamiento a –20 atm resulta ser de bajo costo y riesgo para la semilla, además de mejorar la uniformidad, calidad fisiológica y tolerancia de las plántulas en ambientes estresantes [Ashraf y Foolad, 2005], siendo de fácil adquisición para los productores, además de aumentar el rendimiento de los cultivos y mejorar la su tolerancia al estrés abiótico [Nawaz *et al.*, 2013].

CONCLUSIONES

- Los resultados muestran que la aplicación de termoterapia y osmoacondicionamiento incrementa la calidad fisiológica y sanitaria de la semilla de pimiento. Tres tratamientos de termoterapia, 50 °C durante 60 min, 90 °C durante 90 min y 90 °C durante 120 min a –20 atm con KNO₃ lograron eliminar de manera simultánea los virus AMV y CMV, además de obtener un 42 % de germinación.

REFERENCIAS

Ayala, V. M. J.: «Análisis del crecimiento y calidad de semillas de tres tipos de chile (*Capsicum annuum* L.)», Tesis de Maestro en Ciencias. Montecillo, Texcoco, Estado de México, México, 2012.

Carrillo, E. P.; C. J. A., Mejía; C. A., Carballo; S. G., García; R. V. H., Aguilar; T. T., Corona: «Calidad de semilla en colectas de chile de agua (*Capsicum annuum* L.) de los Valles centrales de Oaxaca, México», *Agricultura Técnica en México* 35:257-266, México, 2009.

Córdoba S. M. C.: «El virus del mosaico del pepino dulce (Pepino mosaic virus) afectando al cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum*): Caracterización y Epidemiología», tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, España, 2010.

Córdoba S. M. C.; A. R. García; A. A. Fernández; C. J. Gutiérrez: «Seed transmission of pepino mosaic virus and efficacy of tomato seed disinfection treatments», *Plant Disease* 91:1250-1254, EE.UU., 2007.

FAO. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. 2012. Revisado: 10 de marzo de 2015.

ISTA (International Seed Testing Association): *International rules for seed testing*, Bassersdorf, CH-Switzerland. 700 p. 2004.

Ling, K. S.: «Effectiveness of chemo- and thermotherapeutic treatments on pepino mosaic virus in tomato seed», *Plant Disease* 94 (3) 325-328, EE. UU., 2010.

Luna, R. J. J.: *Producción, conservación y evaluación de semilla de chile (Manual para productores)*, Universidad Autónoma de Aguascalientes y Fundación Produce, México, 2010.

Marín, J. M.; C. J. A., Mejía; L. A., Hernández; C. A., Carballo; L. A. Peña: «Acondicionamiento osmótico de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.)», *Agricultura Técnica en México* 33(1): 63:71. México, 2007.

Paylan, I. C.; S., Erkan; N.; Cetinkaya; M., Ergun; S., Pazarlar: «Effects of different treatments on the inactivation of various seedborne viruses in some vegetables», *Ozone: Science & Engineering*, (just-accepted), 2014.

Pérez, M. L.; J. E., Rico; P.J. R., Sánchez; I. J. T., Ascencio; P. R., Díaz; B. R. F Rivera: «Identificación de virus fitopatógenos en cultivos hortícolas de importancia económica en el estado de Guanajuato, México», *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:187-197, México, 2004.

Sepúlveda G.: «Aspectos generales de los virus de las plantas. Virus transmitidos por insectos vectores en tomate en la región de Arica y Paranacota: situación actual de manejo», Ed. Instituto de Investigaciones Agropecuarias del Desierto y Altiplano, México, 2011.

SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera), Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), México. <http://siap.gob.mx>. México, 2012. Revisado: 10 de marzo de 2015.

Sutula, C. L.; J. M., Gillet; S. M., Morrissey; D. C. Ramsdell: «Interpreting ELISA Data and Establishing the Positive-Negative Threshold», *Plant Disease* 70 (8): 722-726, EE. UU., 1986.

Tun, S. J. M.; M. E., Zavaleta; M. D. L., Ochoa; G. P., Sánchez; H. M., Soto; J. C. Alejo: «Incidencia del virus mosaico de la alfalfa en semillas y plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense* jacq.) en Yucatán, México», *Fitosanidad* 11:11-14, México, 2007.

Wang Q.; W. J., Cuéllar; M. L., Rajamaki; Y., Hirata; J. P. Valkonen: «Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips», *Mol. Plant Pathol.* 9(2): 237-250, 2008.

