

“Identificación de malezas hospederas de los virus PVX, PVY, AMV y TiCV, en las zonas productoras de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav) del cantón Antonio Ante, provincia de Imbabura”

“Identification of the virus host weeds PVX, PVY, AMV and TiCV, in areas producing of tree tomato (*Solanum betaceum* Cav) Antonio Ante canton, province of Imbabura”

¹ Verónica Viviana Pérez Hernández, ²Silvia Montes Cruz

Carrera de Ingeniería Agropecuaria-Universidad Técnica del Norte.

Av. 17 de Julio 5-21. Ibarra, Imbabura, Ecuador.

Contactos: vv_vero22viviph@hotmail.es

Resumen

La presente investigación se realizó en las zonas productoras de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav) del cantón Antonio Ante (2200 msnm), provincia de Imbabura, con la finalidad de identificar las malezas hospederas de los virus PVX, PVY, AMV y TiCV. Los objetivos específicos fueron; registrar las malezas más frecuentes, establecer la presencia de los virus en las malezas y determinar el nivel de incidencia de cada uno de los virus, según el tipo de malezas y localidad. Se llevó a cabo un muestreo dirigido a plantas sintomáticas y asintomáticas, se recolectaron 117 muestras de malezas, adicionalmente se tomaron siete muestras de tomate de árbol y una de planta voluntaria. Las muestras se analizaron por el método de hibridación molecular no radioactivo tipo dot-blot (2 µl de ácidos nucleicos en membranas de nylon) utilizando sondas individuales de los virus en estudio. Los resultados indicaron que las malezas más frecuentes fueron *Chenopodium álbum*, *Malva parviflora* y *Galinsoga quadriradiata*. Se estableció la presencia del virus Y de la papa (PVY) en *Solanum nigrum* con una incidencia del 33% en Natabuela y Chaltura y un 66,7% en San Roque; además existe presencia de PVY en *Solanum betaceum* con una incidencia del 100% en San Roque. El virus del mosaico de la alfalfa (AMV) fue identificado en *Medicago sativa* como planta voluntaria con una incidencia del 100% y en *Solanum betaceum* con una incidencia del 33,3% en Natabuela.

Palabras clave: PVX, PVY, AMV, TiCV, *Solanum betaceum*, maleza, virus, Hibridación molecular no radioactiva, sondas individuales.

¹ Tesista. Egresada de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria de la Universidad Técnica del Norte. Ibarra-Ecuador.

² Doctora en Ciencias Agrícolas. Docente de la Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales. Universidad Técnica del Norte. Ibarra-Ecuador.

Abstract

This research was conducted in the producing areas of tree tomato (*Solanum betaceum* Cav) of the canton Antonio Ante (2200 MASL), province of Imbabura, in order to identify the hosting weeds for the viruses PVX, PVY, AMV and TiCV. The specific objectives were: record the most frequent weeds, establish the presence of the viruses in the weeds and determine the level of incidence in each of the viruses, depending on the type of weeds and location; for which a sampling was carried out directed to symptomatic plants and asymptomatic plants. We collected 117 weed samples; in addition, seven samples were taken from tree tomato and one of the voluntary plant. The samples were analyzed by the molecular hybridization method non-radioactive type dot-blot (2 µl of nucleic acids in nylon membranes) using individual probes of the viruses in the study. The results indicated that the most frequent weeds were; *Chenopodium album*, *Malva parviflora* and *Galinsoga quadriradiata*. The presence of potato virus Y was established (PVY) in *Solanum nigrum* with an incidence of 33% in Natabuela and Chaltura and a 66,7% in San Roque; in addition, there was found the presence of PVY in *Solanum betaceum* with an incidence of 100% in San Roque. The alfalfa mosaic virus (AMV) was identified in *Medicago sativa* as a volunteer plant with an incidence of 100% and in *Solanum betaceum* with an incidence of 33,3% in Natabuela.

Keywords: PVX, PVY, AMV, TiCV, *Solanum betaceum*, weeds, viruses, Non-radioactive molecular hybridization, individual probes.

Introducción

En el Ecuador el tomate de árbol es un frutal de notable rentabilidad, con rendimientos que oscilan entre 60 y 80 toneladas por hectárea/año en condiciones óptimas, constituyendo actualmente un cultivo de gran importancia económica, debido a la creciente demanda para consumo en fresco y uso agroindustrial, gracias a sus características físicas, nutritivas y organolépticas (Barriga, 2012; Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias [INIAP], 2010).

La producción de tomate de árbol está confinada a pequeños y medianos productores de la zona Sierra del Ecuador, mismos que han presentado grandes limitantes fitopatológicas para expansión del cultivo como para la exportación de

fruta (Viera et al., 2015), entre las que se destacan los virus. La virosis es una de las causas que limitan la producción, ya que reduce la cantidad, calidad de fruta producida y el período productivo de los árboles (Álvarez, Cotes & Marín, 2011).

Los virus son los responsables de importantes pérdidas económicas en plantaciones de tomate de árbol. En Ecuador se han presentado epidemias virales que han causado pérdidas hasta del 50% en algunos cultivos (Jaramillo, Álvarez & Montoya, 2012).

Las plantaciones de tomate de árbol de la provincia de Imbabura, están siendo afectadas por enfermedades de tipo viral con una incidencia del 69%. En las localidades de San José de Chaltura, San Francisco de Natabuela y San Roque, la

incidencia promedio de virus asciende al 80%, lo que se considera como un serio problema. Los virus que están afectando a este cultivo son; el virus X de la papa (PVX), el virus Y de la papa (PVY), el virus del mosaico de la alfalfa (AMV), y el virus de la clorosis infecciosa del tomate (TiCV) (J. E. Colimba, comunicación personal, 18 de mayo, 2015).

Las malezas actúan como hospederos alternativos de virus, por lo que son un factor clave en la epidemiología al servir de fuente de inóculo primario para su transmisión vía vector biológico a las plantas cultivadas (Fiscal & Vaca, 2012).

Sin embargo no existen estudios documentados que reporten puntualmente cuales son las especies hospederas de dichos virus, ni su incidencia en las distintas poblaciones de malezas, razón por la cual no se ha podido hacer un control en la diseminación de estas enfermedades. Por tales razones se plantea la presente investigación que logrará generar información para establecer la epidemiología de estos patógenos y poder diseñar futuras estrategias de control fitosanitario.

Los principales beneficiarios de esta investigación serán los productores de tomate de árbol del cantón Antonio Ante e Imbabura, ya que contarán con información generada en base a resultados científicos de avance que permitan reducir al máximo las afectaciones producidas por los virus y así, poder obtener frutos cada vez más sanos y de mejor calidad que tengan un alto valor comercial; con el fin de que en un futuro se logre abrir las puertas a nuevas oportunidades de comercialización y se pueda llegar a exportar el producto. De este modo se contribuirá a la transformación de la matriz productiva; impulsando la producción y la productividad de forma sustentable.

El objetivo general de este estudio fue: identificar las malezas hospederas de los virus PVX, PVY, AMV y TiCV en las

zonas productoras de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) del cantón Antonio Ante, provincia de Imbabura; para lo cual se utilizó la técnica de hibridación molecular tipo *dot-blot*, misma que posee una mayor sensibilidad que ELISA.

Materiales y métodos

La investigación se realizó en las zonas productoras de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) de las parroquias de San José de Chaltura, San Francisco de Natabuela y San Roque pertenecientes al cantón Antonio Ante, provincia de Imbabura, a una altitud media de 2200 msnm, 0° 21' 13'' de latitud N y 78° 13' 39'' de longitud O. Una temperatura media anual de 15,5 °C, precipitación media anual de 714,4 mm, y humedad relativa de 75% (Plan de Desarrollo de Ordenamiento Territorial [PDOT], 2011; Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología [INAMHI], 2012).

Delimitación del área de muestreo: se ejecutaron recorridos de campo en un área de 719,847 hectáreas, con la finalidad de identificar lotes de producción con presencia de malezas. Se seleccionaron 41 lotes de cultivo de tomate de árbol, genotipo Amarillo Gigante en diferente estado de desarrollo (1 – 2 años).

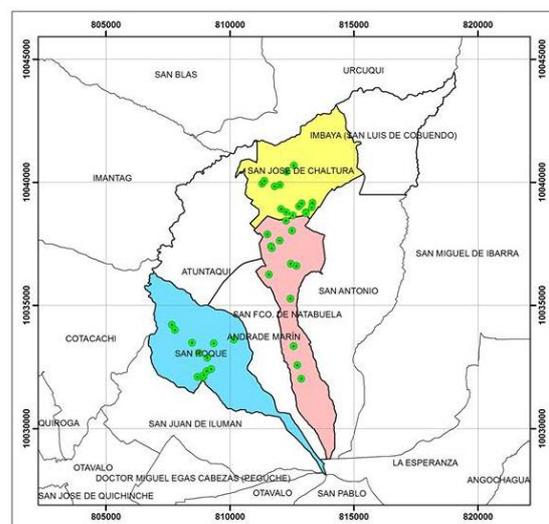


Figura 1. Mapa de ubicación de los puntos de muestreo

Registro de malezas: tomando en cuenta que la distribución de las poblaciones de malezas no era homogénea sino en parches (Heijting, Van Der Werf, Stein & Kropff, 2007), no se tomó en cuenta un número de puntos de evaluación (Tenjo & Alejandro, 2013) y fue conveniente realizar un recorrido en cada uno de los lotes, dirigiéndose a los sitios donde había presencia de malezas. Luego se apreciaron de forma visual, las malezas más predominantes y se registraron en un inventario para el cálculo de porcentaje de frecuencia.

Recolección de muestras en el campo: se realizó un solo muestreo en período húmedo seco. El muestreo fue dirigido (Hernández et al., 2014) a plantas con y sin presuntos síntomas, debido a que pueden existir hospederas sintomáticas y asintomáticas (Ormeño et al., 2003).

Se recolectaron un total de 125 muestras, de las cuales 117 eran de malezas, siete fueron de tomate de árbol y una correspondía a planta cultivada (alfalfa) que crecía como planta voluntaria en los lotes de cultivo de tomate de árbol. Las muestras de tomate de árbol y alfalfa fueron tomadas para corroborar la presencia de virus en la plantación.

Las muestras fueron almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el Laboratorio de Fitodiagnóstico Molecular de la FICAYA de la Universidad Técnica del Norte, hasta su procesamiento. Posteriormente las muestras se procesaron y se analizaron en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas de la Universidad Politécnica de Valencia, España mediante la técnica de Hibridación Molecular no Radioactiva utilizando sondas individuales de los virus en estudio.

Extracción de ácidos nucleicos: para la preparación de los extractos a analizar (extracción de ácidos nucleicos) se utilizó el método descrito por Martínez (2011) con algunas modificaciones como a continuación se describe: las muestras fueron descongeladas a temperatura

ambiente y se lavaron con agua destilada estéril adicionando jabón líquido con una dosis de 1ml/l.

Se pesó 1 g de tejido vegetal (hojas), se trituró en 3 ml de tampón de extracción (5 mM EDTA pH 8,5; 50 mM SSC, 2 μl de 2-mercaptoetanol por cada ml de tampón) en una bolsa sellada. Se cortó la bolsa con el tejido triturado y se transfirió 1,5 ml del homogenizado a un tubo eppendorf de 2ml. Seguidamente se centrifugó por 3 minutos a 10000 rpm.

Inmovilización de ácidos nucleicos en la membrana de nylon: se marcaron cuadros de 0,25 cm² y en el centro se depositaron 1,5 μl de sobrenadante. Cada muestra se aplicó sobre la membrana de nylon (por triplicado) y seguidamente la membrana se dejó secar a temperatura ambiente por el lapso de una hora. Posteriormente las muestras se procesaron y se analizaron en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas de la Universidad Politécnica de Valencia, España mediante la técnica de Hibridación Molecular no Radioactiva utilizando sondas individuales de los virus en estudio.

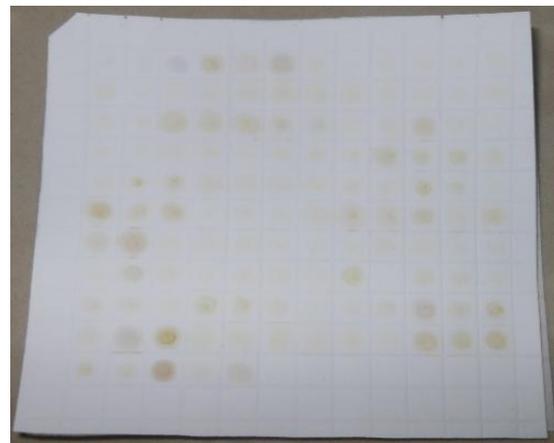


Figura 2. Membrana de nylon impregnada con ácidos nucleicos

Proceso de hibridación: se empleó el protocolo de detección de virus y viroides en plantas mediante el uso de sondas de ARN de hibridación no radiactivas (Pallás et al., 2010), desarrollado en el laboratorio de virología molecular del Instituto de

Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) en Valencia, España.

Las membranas se incubaron con un tampón de hibridación (50% formamida, SSC 5x, 0,1% N-Lauroylsarcosine, 0,02% SDS, Blocking Reagent Solution) a 68°C durante 1 hora. Luego se incubó toda la noche con la sonda diluida en dicho tampón a 68°C. Transcurrido este tiempo la membrana se volvió a lavar dos veces durante 5 minutos en SSC 2X/SDS 0,1% a temperatura ambiente seguido de dos lavados de 15 minutos a 68°C en SSC 0,1X/SDS 0,1%.

Seguidamente la membrana se incubó 5 minutos en tampón de lavado (TL: 0.1 M ácido maleico pH 7,5; 0,15 M cloruro sódico; 0,3% Tween 20), a continuación se bloqueó durante 30 minutos con 0,1 M ácido maleico pH 7,5; 0,15 M cloruro sódico + Blocking 1X.

Finalmente la membrana se incubó con el anticuerpo durante 30 minutos (Anti digoxigenin-AP Fabfragments (1:10000)). Por último, la membrana se lavó con el TL dos veces durante 15 minutos, y 5 minutos con un tampón que estaba compuesto por 0,1 M Tris pH 9.5, 0.1 M NaCl y se incubó con el sustrato disuelto, en este mismo tampón 5 minutos. Al final, la membrana se expuso a una película autorradiográfica durante 25 minutos.

Resultados y discusión

Tipos de malezas encontradas

Se registró un total de 29 malezas más predominantes de las cuales ninguna se presenta con frecuencia alta (superior al 80%); tres de las malezas se presentan con frecuencia media (40 - 80%) como; alpaquinua (*Chenopodium album*), identificada en el 63,4% del total de lotes muestreados, malva (*Malva parviflora*) con 53,7 %, botonsillo (*Galinsoga quadriradiata*) con 41,5% y 26 de las malezas se presentan con baja frecuencia (menor al 40%).

Debido a que son pocos los estudios que coinciden con los resultados encontrados en el presente estudio se deduce las malezas como parte de una vegetación silvestre o cultivada no dependen del tipo de cultivo al cual están asociadas sino que están sujetas a cambios en sentido horizontal de una superficie a otra o en forma vertical por variaciones altitudinales. Los cambios en espacios pueden efectuarse también en formas abruptas o discontinuas y en forma progresiva. Así mismo las alteraciones en el tiempo pueden ser periódicas, anuales o sucesionales (Cerna, 2013).

Presencia de virus en malezas

Detección del virus PVX: a pesar de que las muestras mostraron síntomas similares (clorosis y mosaicos) a los ocasionados por PVX no se detectó la presencia de dicho virus.

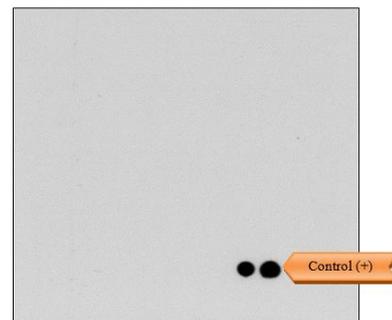


Figura 3. Placa de revelado para la detección de PVX

Al no existir reacción positiva al PVX en ninguna de las muestras recolectadas, se asume que, síntomas similares pueden ser producidos por diferentes virus y otros factores bióticos (Mena, 2010)

Detección del virus PVY: las muestras analizadas resultaron positivas para PVY, en muestras sintomáticas (arrugado de hojas, necrosis e insectos vectores) de malezas (*Solanum nigrum*) como de cultivo (*Solanum betaceum*).

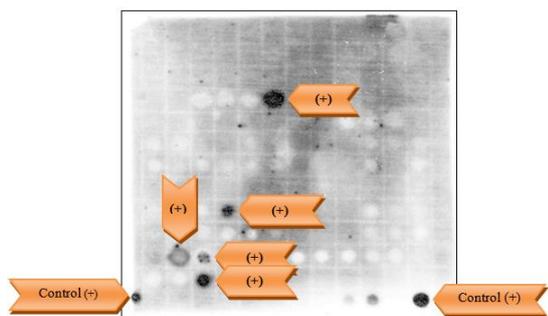


Figura 4. Placa de revelado para la detección de PVY

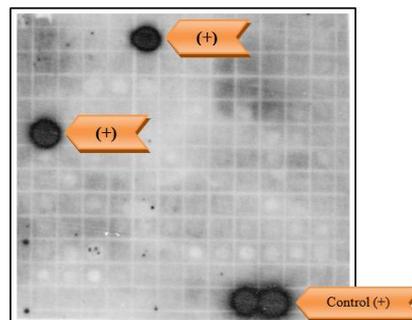


Figura 6. Placa de revelado para la detección de AMV



Figura 5. Muestras con síntomas y resultados positivos al virus PVY. A) *Solanum nigrum* recolectada en Natabuela, B) *Solanum nigrum* recolectada en Chaltura, C) *Solanum nigrum* recolectada en San Roque, D) *Solanum nigrum* recolectada en San Roque, E) *Solanum betaceum* recolectada en cultivo de San Roque

Los resultados obtenidos en el presente estudio, coinciden con los encontrados por Ormeño et al. (2005) quienes en un estudio similar realizado en Chile sobre la presencia de diferentes virus de pimiento (*Capsicum annuum* L.) en especies de malezas asociadas al cultivo determinan presencia de PVY en tomatillo o hierba mora (*Solanum nigrum* L.).

Detección del virus AMV: se detectó la presencia de AMV, en muestras sintomáticas (mosaico en alfalfa, folíolos curvados hacia abajo) de maleza, planta voluntaria (*Medicago sativa*) como de cultivo (*Solanum betaceum*).



Figura 7. Muestras sintomáticas con resultados positivos al virus AMV. A) *Solanum betaceum* recolectada en Natabuela, B) *Medicago sativa* recolectada en Natabuela.

En este punto es importante recalcar la coherencia de los resultados ya que las muestras analizadas resultaron positivas para AMV, en muestras sintomáticas de maleza (planta voluntaria) como de cultivo, lo que otorga un mayor grado de confianza al análisis.

Detección del virus TiCV: pese a que las muestras de alpaquinua (*Chenopodium album*) presentaron síntomas similares (clorosis intervenal en hojas con manchas rojizas) a los ocasionados por TiCV, no hubo reacción positiva a dicho virus.

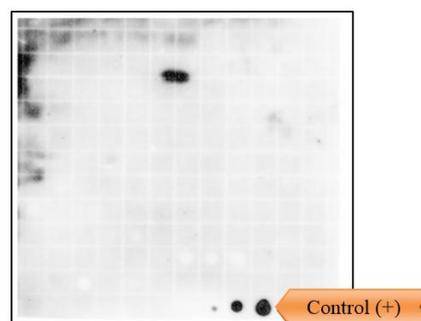


Figura 8. Placa de revelado para la detección de TiCV



Figura 9. Muestra de *Chenopodium álbum* recolectada en el área de estudio con síntomas similares a los ocasionados por TiCV

Pese a que las muestras de alpaquinua (*Chenopodium album*) presentaron síntomas similares (clorosis intervenal en hojas con manchas rojizas) a los ocasionados por TiCV, no hubo reacción positiva a dicho virus.

Nivel de incidencia de cada uno de los virus encontrados, según el tipo de maleza y localidad

Se estableció la presencia del virus Y de la papa (PVY) en hierva mora (*Solanum nigrum*) con una incidencia del 33% en Natabuela y Chaltura y un 66,7% en San Roque; además existe presencia de PVY en tomate de árbol (*Solanum betaceum*) con una incidencia del 100% en San Roque. El virus del mosaico de la alfalfa (AMV) fue identificado en alfalfa (*Medicago sativa*) como planta voluntaria con una incidencia del 100% y en tomate de carbol (*Solanum betaceum*) con una incidencia del 33,3% en Natabuela.

Conclusiones

- De acuerdo al inventario de malezas más frecuentes se concluye que de las 29 malezas más predominantes identificadas en las zonas productoras de tomate de árbol del cantón Antonio Ante, ninguna se presenta con alta frecuencia; tres de las malezas se presentan con frecuencia media como; *Chenopodium album*, identificada en el 63,4% del total de lotes muestreados, *Malva parviflora* con 53,7 %, *Galinsoga quadriradiata* con 41,5% y 26 de las malezas se presentan con baja frecuencia.

- En el Cantón Antonio Ante se ha identificado por primera vez malezas hospederas de virus. Se estableció la presencia del virus Y de la papa (PVY) en *Solanum nigrum* con una incidencia del 33% en Natabuela y Chaltura y un 66,7% en San Roque; además existe presencia de PVY en *Solanum betaceum* con una incidencia del 100% en San Roque. El virus del mosaico de la alfalfa (AMV) fue identificado en *Medicago sativa* como planta voluntaria con una incidencia del 100% y en *Solanum betaceum* con una incidencia del 33,3% en Natabuela.
- Las especies de malezas encontradas con mayor frecuencia no son hospederas de los virus en estudio, sin embargo la hierba mora que se encontró con baja frecuencia resulta demasiado peligrosa ya que bastará la presencia de insectos vectores tan frecuentes como los pulgones para iniciar una epidemia en las plantas cultivadas.
- La técnica empleada en esta investigación denominada hibridación molecular no radioactiva utilizando sondas individuales ha sido empleada por primera vez en el país en la investigación de malezas hospederas de virus en las zonas productoras de tomate de árbol del cantón Antonio Ante, permitiendo identificar los virus en estudio de una forma más sensible, económica y rápida.

Recomendaciones

- Realizar un estudio más profundo de malezas hospederas de los virus PVY y AMV que dieron positivos utilizando técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR); de tal manera que se pueda llegar a caracterizar y luego mediante secuenciación determinar si dichos virus son variantes.
- Una vez establecido la presencia de al menos uno de los cuatro virus en estudio se recomienda efectuar estudios

de insectos vectores de transmisión de estos virus con la finalidad de generar información a los productores de tomate de árbol del cantón Antonio Ante y de esta forma mantener una baja incidencia de los virus.

- Realizar talleres de socialización de los resultados obtenidos en la presente investigación con el fin de que los productores de tomate de árbol tengan conocimiento de las enfermedades que está afectando al cultivo y tomen medidas preventivas, realizando un manejo adecuado de las malezas y plantas de crecimiento voluntario.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a la Universidad Técnica del Norte y de manera muy especial al, MSc. Javier Colimba, MSc. Raúl Castro, Ing. Eddy Falcón, al Sr. Daniel Rivera y al Dr. Gustavo Gómez PhD ya que sin su apoyo, colaboración y enseñanzas no hubiese sido posible realizar este estudio. De igual manera agradecemos al MSc. Fernando Basantes, MSc. Juan Pablo Aragón, MSc. Iván Vaca, asesores; por sus consejos y conocimientos brindados para la culminación de este trabajo de investigación.

Referencias bibliográfica

- Álvarez, J., Miguel Cotes, J., & Marín, M. (2011). Detección molecular de virus en material de siembra de tomate de árbol en Colombia. *Revista de Protección Vegetal*, 26(2), 80-91. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v26n2/rpv03211.pdf>
- Barriga, L. (2012). *Evaluación de la resistencia a Colletotrichum acutatum de poblaciones de tomate de árbol (Solanum betaceum Cav) en estado de plántula. Cutuglahua – Pichincha 2011* (tesis de pregrado).

Universidad Politécnica Salesiana sede Quito, Ecuador. Recuperado de <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/3752/6/UPS-YT00216.pdf>

Cerna, L. A. (2013). Ciencia y Tecnología de malezas. Trujillo, Perú. Recuperado de: http://www.upao.edu.pe/fondoeditorial/pdf/Ciencia_tecnologiamalezas.pdf

Fiscal, D. O., & Vaca-Vaca, J. C. (2012). Búsqueda de hospederos alternativos del virus del mosaico amarillo de la papa, un begomovirus que afecta cultivos de tomate en el Valle del Cauca. *Acta Agronómica*, 61(5), 24. Recuperado de: <http://www.bdigital.unal.edu.co/38541/1/41442-187312-2-PB.pdf>

Heijting, S., Van Der Werf, W., Stein, A., & Kropff, M. J. (2007). Are weed patches stable in location? Application of an explicitly two-dimensional methodology. *Weed Research*, 47(5), 381-395. Recuperado de <http://edepot.wur.nl/121916#page=37>

Hernández Sampieri, Fernández Collado Carlos, Baptista Lucio Pilar. (2014). *Metodología de la Investigación*. Colombia : McGraw-Hill.

Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología. (2012). Anuario meteorológico N° 52 – 2012. Recuperado de <http://www.serviciometeorologico.gob.ec/wp-content/uploads/anuarios/meteorologicos/Am%202012.pdf>

Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. (2010), Quito, Ecuador. Estación Experimental Santa Catalina, Programa Nacional de Fruticultura. Granja Experimental Tumbaco. *Solanaceas silvestres*

- utilizadas como portainjertos de tomate de árbol (Solanum betaceum Cav.) con alto rendimiento, resistencia a enfermedades y mayor longevidad.*
- Jaramillo, M. M., Álvarez, J. A., & Montoya, M. M. (2012). Características de los virus asociados a la virosis del tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en Colombia. *Revista Lasallista De Investigación*, 9(1), 115-127. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-44492012000100012
- Martínez Arias, G. E. (2011). Relación entre el silenciamiento de RNA y la patogénesis inducida por un viroide con replicación nuclear (tesis doctoral). Recuperado de [file:///C:/Users/Usuario/Downloads/tesisUPV3597%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/tesisUPV3597%20(2).pdf)
- Mena, J. D. (Agosto de 2010). *Virus (Virus Fitopatógenos)*. Departamento de protección vegetal rama de fitopatología, Sinaloa. Recuperado de <http://es.slideshare.net/themena1/manual-de-virus-virus-fitopatogenos-5039306>
- Ormeño, J., Sepúlveda, P., & Rebufel, P. (2003). *Malezas: Hospederos alternativos de virus en pimiento*. Tierra Adentro, 52. Recuperado de: <http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR30114.pdf>
- Ormeño, J., y Sepúlveda, P. (2005). Presencia de diferentes virus de pimiento (*Capsicum annuum* L.) en especies de malezas asociadas al cultivo. *Agricultura Técnica*, 65(4), 343-355. Recuperado de: <http://www.bioline.org.br/pdf?at05038>
- Pallás Benet, V., Sánchez-Navarro, J. A., Aparicio Herrero, F., y Herranz Gordo, M. D. C. (2010). Procedimiento para la detección simultánea de secuencias de virus mediante el uso de polisondas. Recuperado de <http://patentados.com/patente/procedimiento-deteccion-simultanea-viroides-mediante-uso-polisondas/>
- Plan de Desarrollo de Ordenamiento Territorial (PDOT, 2011). Actualización Plan de Desarrollo de Ordenamiento Territorial del cantón Antonio Ante 2012 – 2030. Recuperado de http://www.antonioante.gob.ec/AntonioAnte/images/PDF/plan_desarrollo_cantonal_2011.pdf
- Tenjo, J., & Alejandro, D. (2013). *Dinámica espacial y temporal de poblaciones de malezas en cultivos de papa, espinaca y caña de azúcar y su relación con propiedades del suelo en dos localidades de Colombia* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá). Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/45120/1/790691.2013.pdf>
- Viera, W., Mejía, P., Noboa, M., Obando, J., Sotomayor, A., Vásquez, C., & Viteri, D. (2015). Arvenses asociadas a los cultivos de naranjilla y tomate de árbol. Recuperado de <http://www.agrocalidad.gob.ec/revisatacuadorescalidad/index.php/revista/article/view/6/12>