

UNIVERSIDAD TECNICA DEL NORTE

**FACULTAD DE INGENIERIA EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES**

ESCUELA DE INGENIERIA AGROPECUARIA

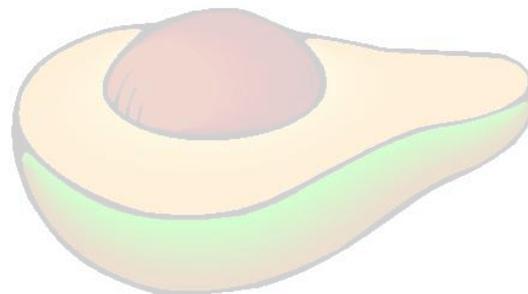




**ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DEL VIROIDE ASBVd
EN EL CULTIVO DE AGUACATE (*Persea americana*
Mill) VAR. FUERTE, EN LA COMUNIDAD SAN
VICENTE DE PUSIR, CANTON BOLIVAR,
PROVINCIA CARCHI.**

AUTOR: EDDY FALCÓN Q.

DIRECTOR: ING. RAÚL CASTRO





CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN





PROBLEMA

- Representa un fuerte riesgo para la producción.
- No existen estudios documentados en el país.
- Los síntomas en los árboles se manifiestan de manera sintomáticos y asintomáticos.





JUSTIFICACION

- Esclarecer la presencia del *Avocado Sunblotch viroid*.
- Permitirá poner en marcha programas de saneamiento y control.
- Identificar plantas sanas donadoras de material vegetal para reproducción.



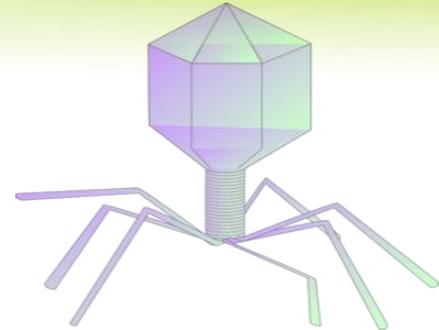


OBJETIVOS



GENERAL:

- Diagnosticar la presencia del viroide ASBVd en el cultivo aguacate (*Persea americana* Mill) Var. Fuerte, Comunidad: San Vicente de Pusir, Cantón: Bolívar, Provincia del Carchi.



ESPECIFICOS:

- Determinar la presencia del viroide en las plantas analizadas.
- Caracterizar al agente patógeno.
- Estimar los niveles de incidencia de la enfermedad en el área de estudio.



CAPÍTULO II

REVISION DE LITERATURA

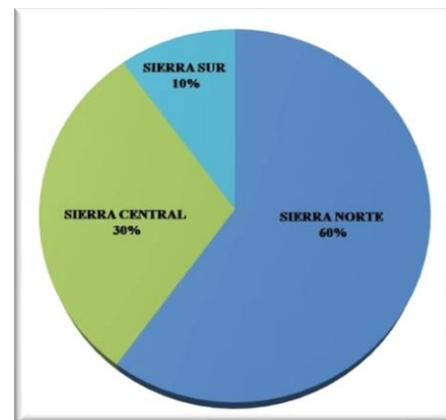




CULTIVO DE AGUACATE

- Producción de aguacate en el país.
- Zonas de producción.
- Exportaciones del sector.
- Plagas y enfermedades.

Zonas de producción



Enfermedad



Enfermedad



Plagas

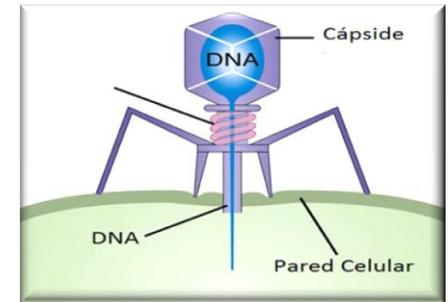




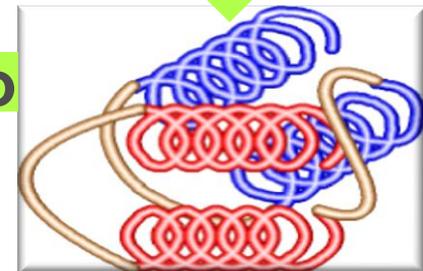
VIROIDE

- Características generales.
- Movimiento.
- Síntomas.

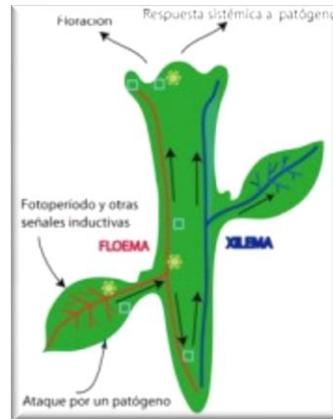
Virus →



↓ **Viroide**



← **Movimiento**



← **Síntomas**



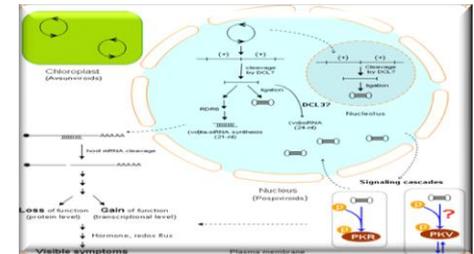


VIROIDE ASBVd

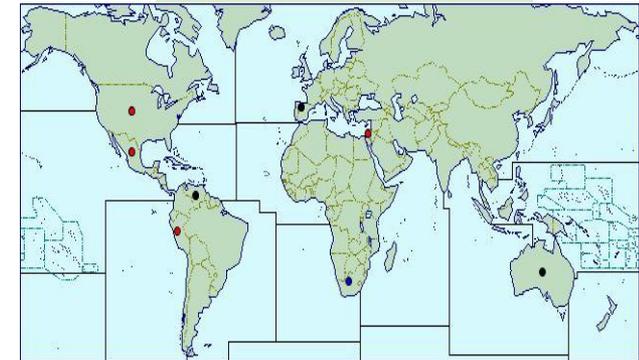
(MANCHA SOLAR)

- Reseña histórica.
- Distribución geográfica.
- Hospederos.
- Variabilidad y síntomas.

Constituido por 247 pb



Distribución ASBVd



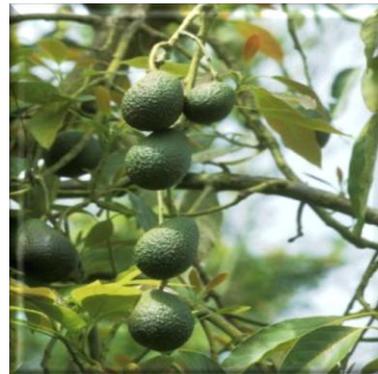
ASBVd -B



ASBVd -V



ASBVd-Sc



Frutos



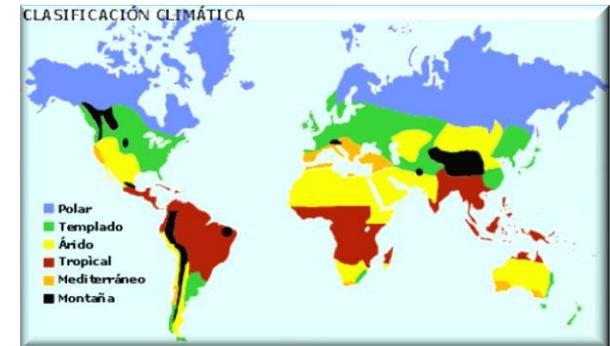


VIROIDE ASBVd

(MANCHA SOLAR)

- Efecto del ambiente.
- Diseminación.
- Control.

Ambiente climático



Injerto



Semilla



Polen



El ASBVd no tiene bio-vectores asociados.



VIROIDE ASBVd

(MANCHA SOLAR)

- Control y erradicación

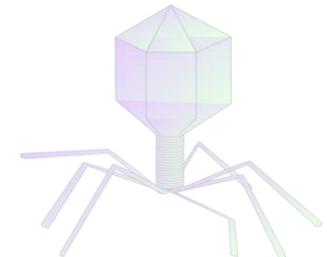
Eliminación de árboles sintomáticos



Incineración de árboles enfermos

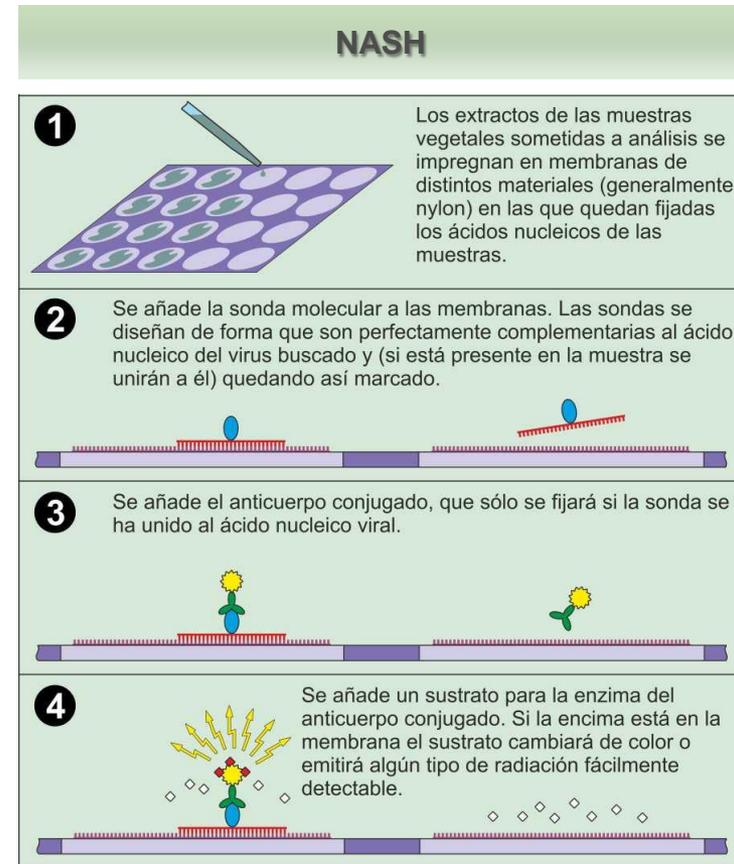


Prevención y Monitoreo



TECNICAS DE DIAGNOSTICOS DE VIROIDES

- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Hibridación de ácidos nucleicos (NASH, siglas en inglés).
- Detección simultánea de secuencias de virus y viroides mediante el uso de polisondas.





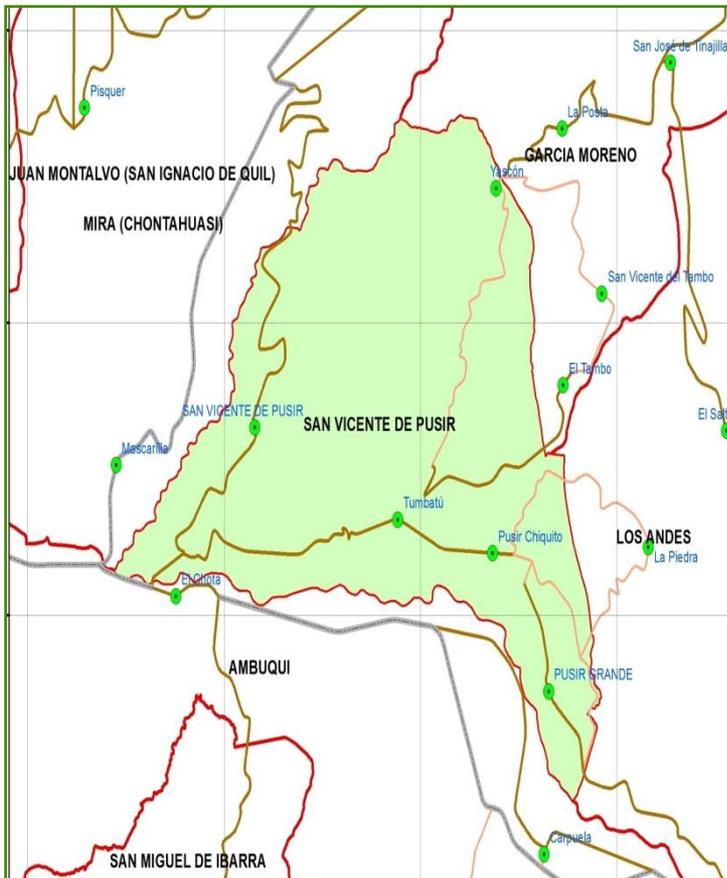
CAPÍTULO III

MATERIALES Y METODOS



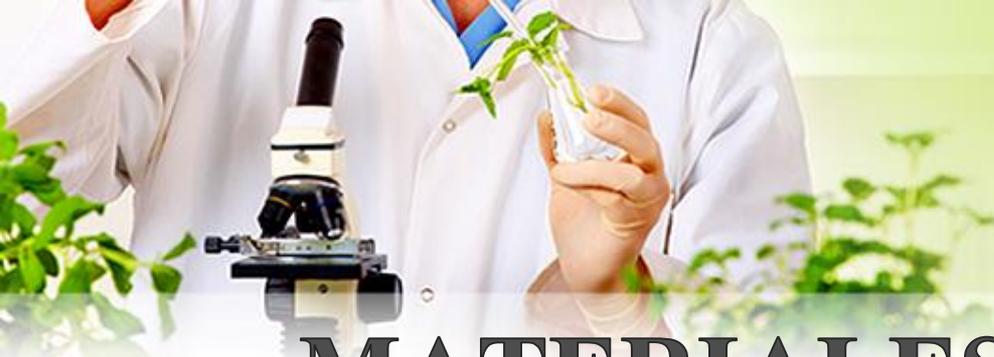


CARACTERIZACION DEL ÁREA DE ESTUDIO



- **Altitud:** 1500 - 2400 m.s.n.m.
- **Temperatura:** 14-22°C.
- **Precipitación anual:** 419,17 mm/año.
- **Suelo:** Franco-Arenoso
- **Humedad relativa:** 70%.

Fuente: GAD San Vicente de Pusir, 2013



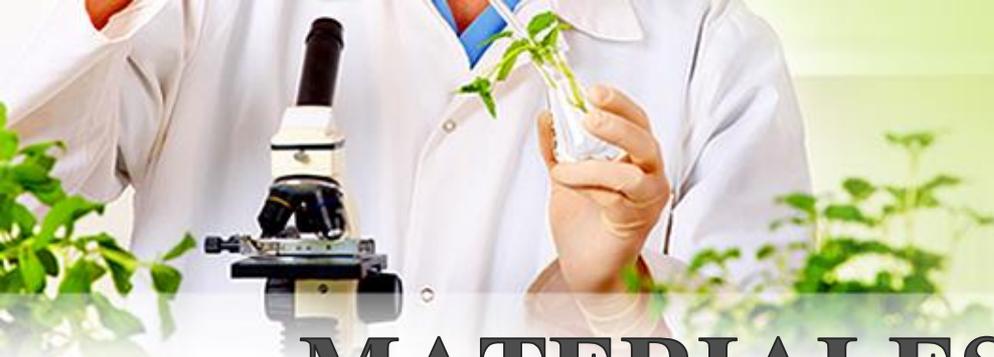
MATERIALES Y EQUIPOS

Materiales de campo

- Cooler para transporte de muestras.
- Gel-Pack
- Navaja de injerto
- Tijeras de podar
- Fundas herméticas
- GPS (Global Positioning System)
- Libro de campo
- Esfero indeleble
- Etiquetas de identificación

Materiales de laboratorio

- Bisturí
- Morteros
- Micro pipetas
- Puntas 10 μ l
- Puntas de 0,1-10 μ l
- Guantes
- Vasos de precipitación 500 cc
- Tubos eppendorf 2 ml
- Membrana de nylon
- Gradillas para tubos eppendorf
- Papel aluminio



MATERIALES Y EQUIPOS

Equipos de laboratorio

- Agitador magnético
- Balanza electrónica
- pH metro
- Centrifuga
- Congelador

Equipos de oficina

- Computadora
- Cámara fotográfica
- Papel bond (Formato A4)
- Impresora
- Lápiz

Insumos de laboratorio

- Agua destilada
- EDTA
- SDS
- Jabón líquido
- Alcohol 98, 5%
- Formamida
- N-Lauroylsarcosine
- Blocking Reagent Solution
- Acido maleico
- Anti-digoxigenin-AP Fab fragments
- Tween 20
- Sonda
- Polisonda

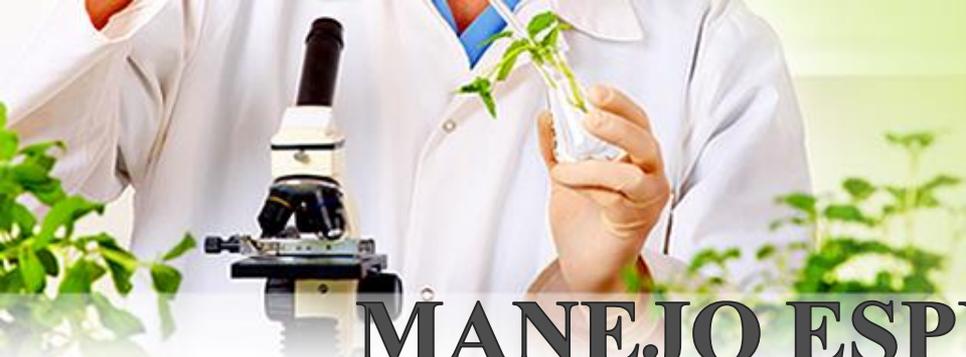


METODOLOGÍA

Tipo de investigación



- La investigación es básica, con enfoque cuantitativo de tipo exploratoria. Se maneja una línea no experimental por lo cual el diseño utilizado fue de tipo transeccional (Hernández et al, 2010).



MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO

Diagnostico del área de estudio.

- Explicación de los peligros y síntomas del ASBVd.
- Verificación a nivel de campo de los posibles síntomas asociados al viroide



Charla a los productores

Recorridos en campo

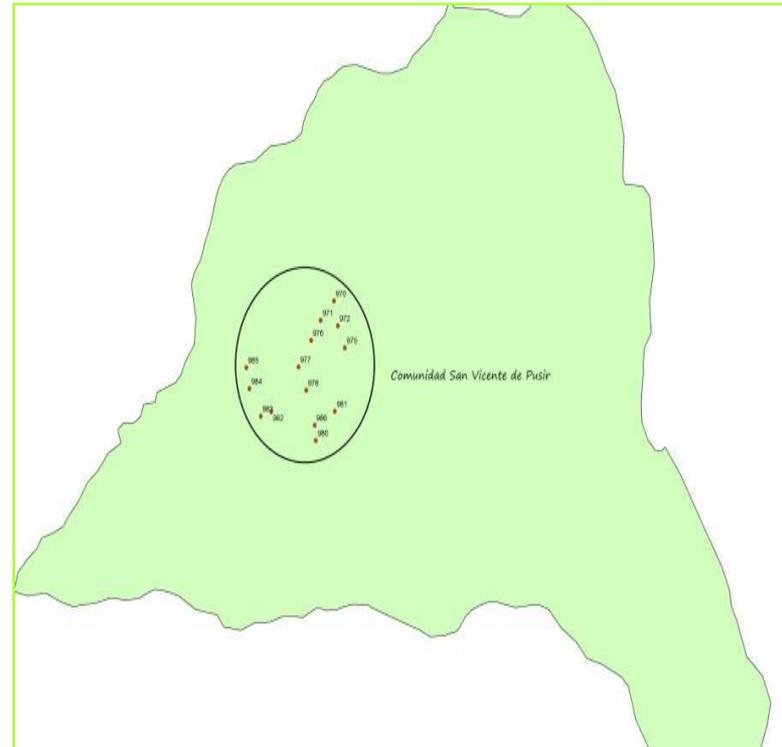


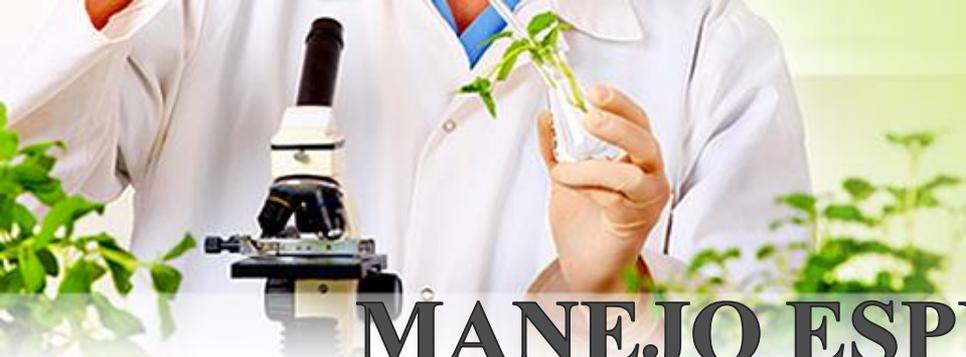


MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO

Delimitación del área de estudio

- Las 120 ha se dividieron en 14 parcelas. Cada una de ellas con una área aproximada de 9 ha

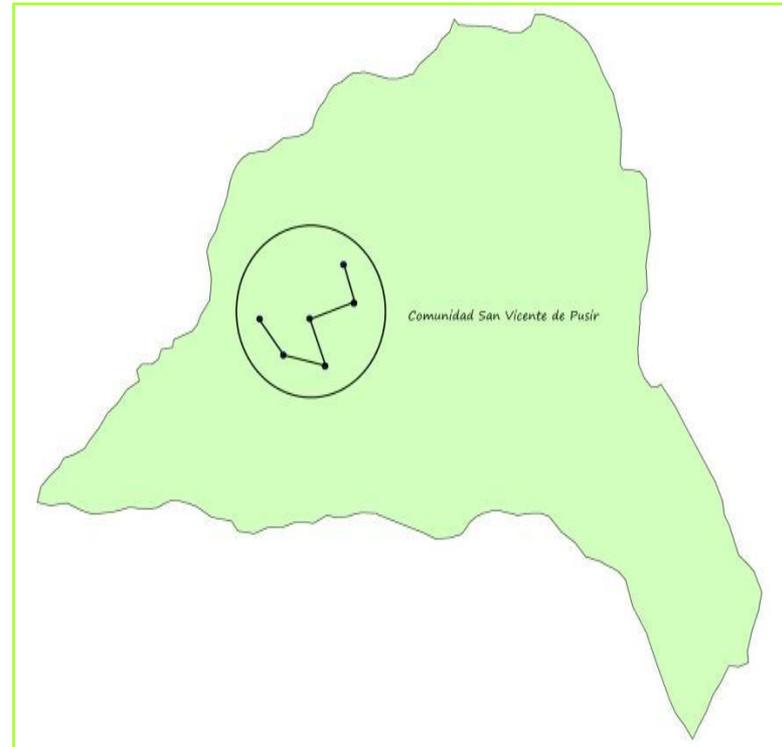


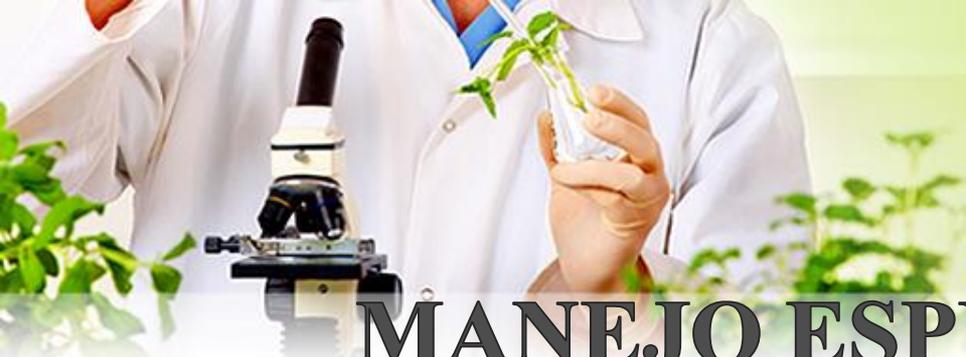


MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO

Delimitación del área de estudio

- Se utilizó la técnica en zigzag con el propósito que las parcelas elegidas cubran la mayor parte del área a muestrear.

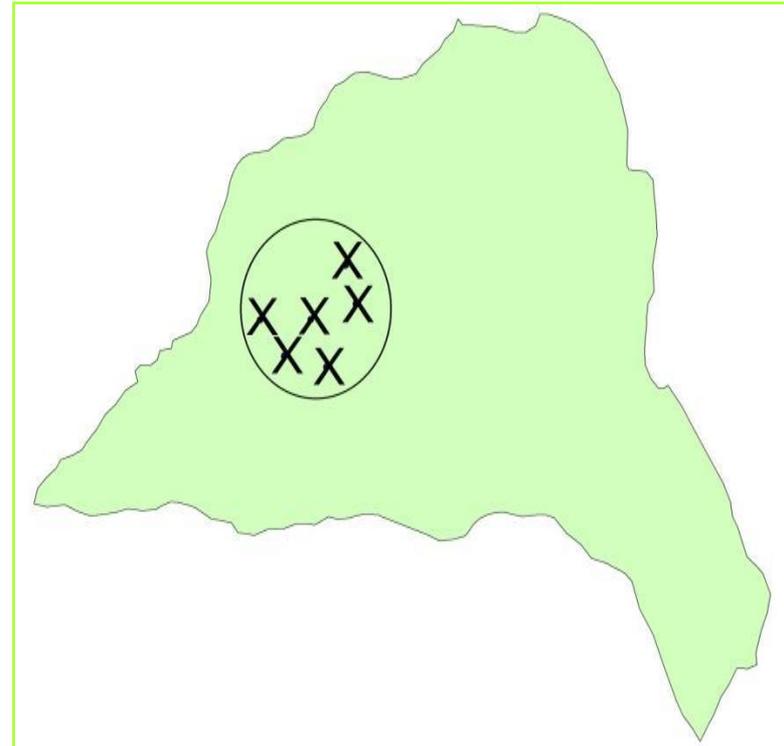


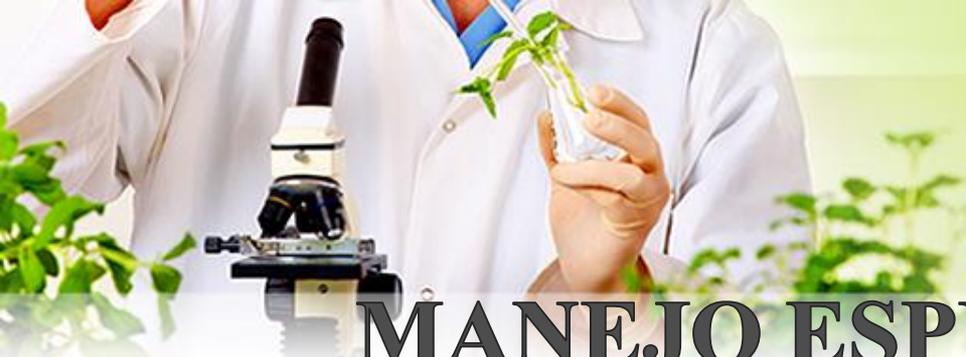


MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO

Delimitación del área de estudio

- Se maneja el método cinco de oro. Se estableció 30 puntos y 5 árboles a muestrear.
Estableciendo 150 individuos a analizar





MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO

Recolección de muestras

- Se seleccionaron árboles que presentaban sintomatología similar a la que ocasiona por el viroide.
- Se tomo el material vegetal de los cuatro puntos cardinales con el fin de obtener una muestra compuesta.



Árboles sintomáticos



Frutos

MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO

Extracción de ácidos nucleicos

Tampón de extracción

5 mM EDTA PH 7.

50 mM Citrato sódico.

Se colocó 3 ml en 1 gramo de tejido y se procedió a macerar.

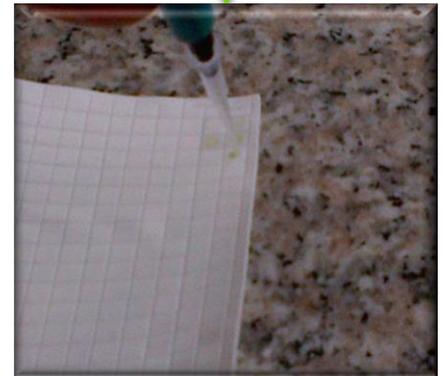
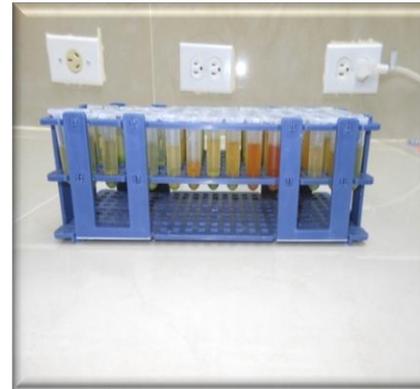


MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO

Extracción de ácidos nucleicos

A 1,5 ml ácidos nucleicos:

Se centrifugo 10 min a 13000 rpm. Posteriormente se implanto 2 μ l de los ácidos nucleicos en la membrana y se dejó secar a temperatura ambiente.

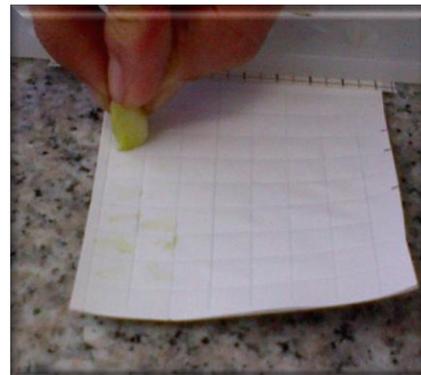


MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO

Impresión de frutos

Se lavaron los frutos con agua corriente y con ayuda de un bisturí desinfectado alcohol 98,5%.

Se aplicó directamente y se dejó secar a temperatura ambiente.



HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE RNA

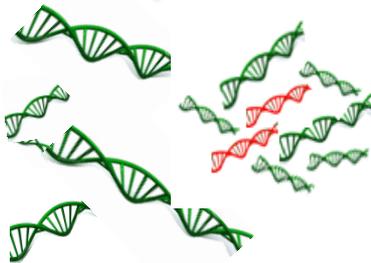
1- Hojas



2- Moler Tampón



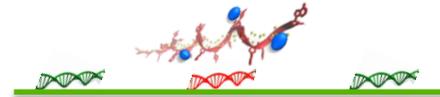
3- Extraer Ácidos nucleicos



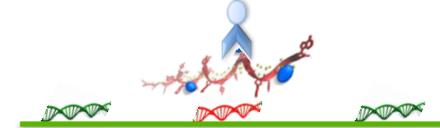
Ac. Nuc. se pegan a la membrana



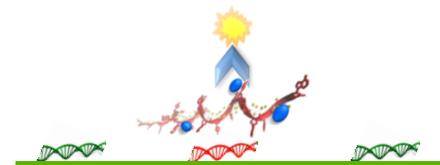
Sonda reconoce Ac. Nuc. patógeno



Anticuerpo reconoce sonda



Complejo fluorescente



4- Aplicar en Membrana de Nylon



5- Incubar con Sonda Especifica



6- Incubar Anticuerpo Anti-marca conjugado



7- Agregar Sustrato



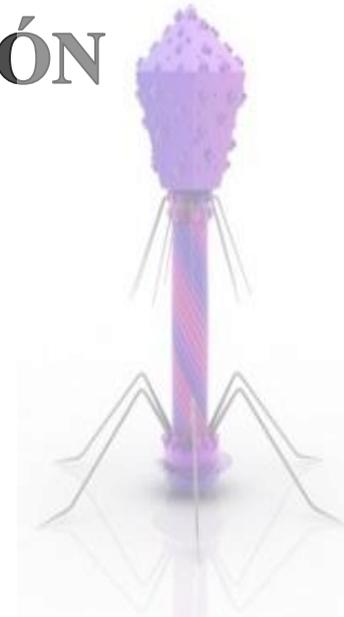
8- Exponer película y revelar

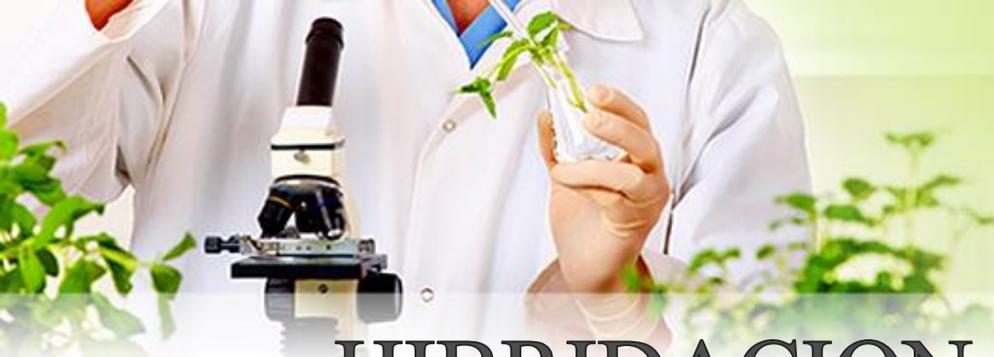




CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

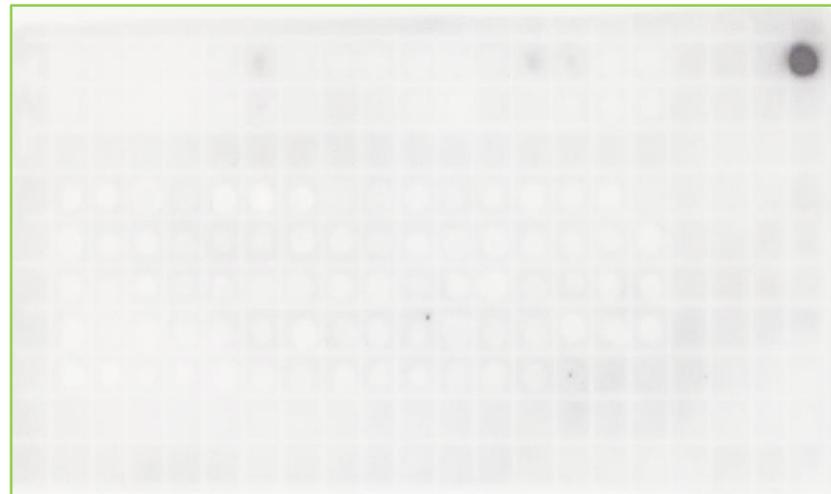




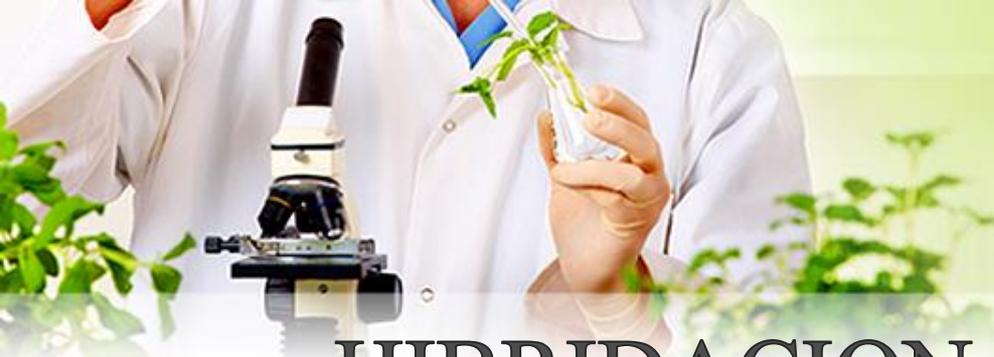
HIBRIDACION MOLECULAR

Resultado de hibridación de los ácidos nucleicos

Todas las muestras resultaron negativas puesto que no todos los puntos son incoloros notándose una clara diferencia del control.



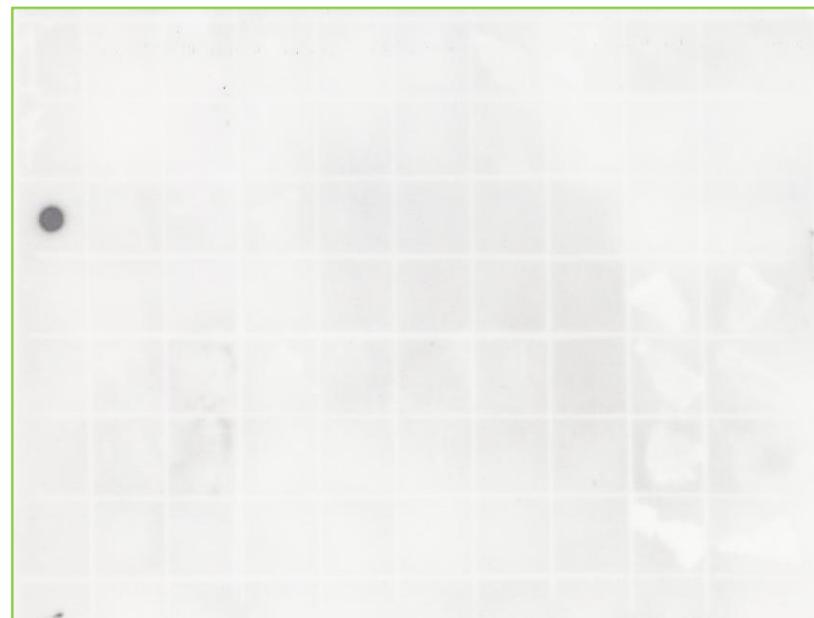
- Membrana obtenida a partir de la hibridación de gota, donde se puede observar que ninguna de las muestras se colorearon



HIBRIDACION MOLECULAR

**Resultado de hibridación
de la impresión de
frutos**

De la misma forma los
resultados arrojados
fueron negativos .

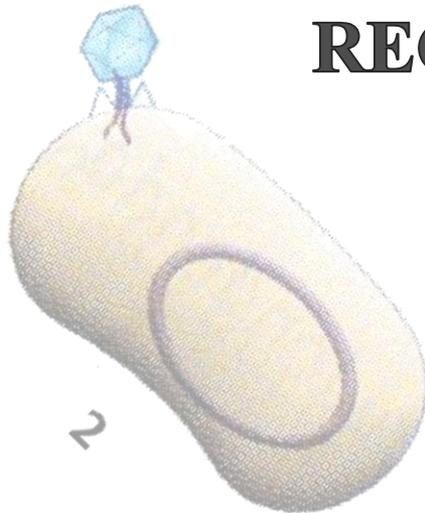


- Es importante destacar la coherencia de los resultados obtenidos, ya que las muestras estudiadas resultaron negativas para el Avocado Sunblotch Viroid, tanto a nivel de tejido foliar como de fruto lo que otorga un mayor grado de confianza a los análisis.



CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES





CONCLUSIONES

- Los síntomas en frutos y hojas de los árboles analizados en esta investigación no están asociados con el Avocado Sunblotch Viroid. El viroide no se encuentra presente en forma sintomática ni asintomática.
- En un estudio anexo a la investigación se descubrió la presencia de entidades virales en el 16 % de las muestras.
- Se ha detectado por primera vez en Ecuador la presencia de agentes virales en aguacate.





RECOMENDACIONES

- Realizar estudios adicionales con la utilización de otra técnica mas sensible con el fin de confirmar la ausencia del viroide.
- Una vez establecido la presencia de al menos uno de los quince virus de la polisonda. Se recomienda hacer investigaciones en las cuales se trate de determinar el tipo de virus que afecta a las plantaciones de aguacate.





RECOMENDACIONES

- Efectuar estudios sobre caracterización, sintomatología, medios de diseminación y malezas del o los agentes virales que afecta el cultivo de aguacate en el área de estudio.
- Extender el diagnóstico de virus a las zonas productoras de aguacate de Imbabura y Carchi con la finalidad de conocer si existe la incidencia de estos patógenos en otras localidades.





GRACIAS...

