

Identificación de enfermedades virales en el cultivo de frejol (*Phaseolus vulgaris* L.) en el cantón Antonio Ante, provincia de Imbabura

Identification of viral diseases in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivation in the Antonio Ante canton, in the province of Imbabura

¹Mario Daniel Rivera Yépez, ²Cristina Echeverría

Carrera de Ingeniería Agropecuaria-Universidad Técnica del Norte.

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

Contactos: rivera-dany@hotmail.com

Resumen

El frejol es un cultivo que posee una gran importancia en el Ecuador, las zonas de producción de esta leguminosa están ubicadas a lo largo del callejón interandino, en la provincia de Imbabura específicamente en el cantón Antonio Ante, el frejol es un cultivo de interés económico, pues se lo puede realizar en cualquier época del año. Uno de los factores limitantes que tiene esta leguminosa, es el ataque de enfermedades de entre las cuales se destaca la virosis. La presente investigación tuvo como objeto verificar la presencia de CMV, BGMV, BGYM, AMV, BDMV, en los cultivares de frejol de esta localidad, para lo cual se utilizó el sistema de diagnóstico de Hibridación Molecular no radioactiva tipo Dot-blot. Para esto se colectaron muestras de plantas sintomáticas, de las principales zonas productoras de frejol del cantón, y se sometieron al análisis respectivo. Los resultados muestran que no existe la presencia de los virus estudiados, en ninguna de las plantaciones que fueron muestreadas. Así mismo se logró determinar mediante análisis foliar, que los síntomas que al parecer correspondían a AMV, eran ocasionados por deficiencias de manganeso y cinc. Finalmente se pudo establecer de manera visual que existe la presencia de síntomas de los virus BCMV y BYMV, por lo que se recomienda estudiar a estos patógenos, utilizando la técnica de diagnóstico empleada en la presente investigación.

Palabras clave: virus, polisonda, hibridación, Dot-blot.

¹ Tesista. Egresado 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

The bean is a crop that has great importance in Ecuador, the production areas of this legume are located along the inter-Andean alley, in the province of Imbabura specifically in the Antonio Ante canton, bean's a crop has economic interest. Since it can be done at any time of the year. One of the limiting factors that this legume has, is the attack of diseases among which the virus is highlighted. The objective of the present investigation was to verify the presence of CMV, BGMV, BGYM, AMV, BDMV, in the beans cultivars of this locality, for which the Dot-blot type non-radioactive Molecular Hybridization diagnostic system was used. For this, samples of symptomatic plants from the main bean producing areas of the canton were collected and submitted to the respective analysis. The results show that there is no presence of the virus studied in any of the plantations that were sampled. It was also possible to determine by foliar analysis that the symptoms that apparently corresponded to AMV were caused by deficiencies of manganese and zinc. Finally, it was possible to establish visually that the presence of BCMV and BYMV viruses is present, and it is therefore recommended to study these pathogens using the diagnostic technique used in the present investigation.

Key words: viruses, probes, hybridization, Dot-blot

Introducción

El frejol o frijol es una de las leguminosas más importantes a nivel mundial, siendo Latinoamérica la zona de mayor producción, mientras que en el África es donde más se lo consume (Morales, 2003). Nutricionalmente el frejol contiene proteína, ácido fólico, tiamina, minerales y fibra (USDA, 2010), constituyéndose así en un alimento básico en la dieta diaria de la humanidad (Castillo y González, 2008).

En el Ecuador, el frejol es la leguminosa que más consume la población; y es cultivada en su mayoría, en las zonas templadas a lo largo de la sierra ecuatoriana. En la provincia de Imbabura las zonas de mayor producción de este grano son el Valle del Chota, Urcuquí,

Intag y Antonio Ante (Peralta, et al., 2010). En este último cantón las zonas de cultivo están ubicadas en Imbaya, Chaltura, Atuntaqui y Natabuela, con una superficie de siembra de 407,85 hectáreas (IEE y MAGAP, 2013), que al año 2014 correspondería al 7,93% del área sembrada en Imbabura (INEC, 2014). De acuerdo a esta misma fuente de información existe una diferencia de un 12% entre el área sembrada y el área cosecha, esto se debe a la influencia de varios factores, de entre los cuales se destaca el ataque de plagas y enfermedades.

Entre las enfermedades más comunes que atacan al cultivo de frejol en la provincia de Imbabura están las siguientes:

Antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*), Roya (*Uromyces appendiculatus*), Mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*), Bacteriosis común (*Xanthomonas campestris pv. phaseoli*), Mustia hilachosa (*Thanatephorus cucumeris*), Mildiú polvoso o cenicilla (*Erysiphe polygoni*), Ascoquita o mancha anillada (*Phoma exigua*), y virosis (Peralta, et al., 2010).

Los virus pueden atacar a la mayoría de cultivos, ocasionando pérdidas de hasta un 75% (Marilyn y Roossinck, 2010; Di Carli, Benvenuto y Donini, 2012). El cultivo de frejol no es la excepción, esta especie puede ser atacada por uno o más virus, ocasionando pérdidas de hasta un 100% (Mena y Ríos, 2010). Los primeros reportes de virus en frejol en el Ecuador, los hizo el INIAP en 1977 y 1978; en 1981 se establece la presencia de virosis en frejol a lo largo de todo el callejón interandino, encontrándose incidencias de hasta un 100% en las provincias de Azuay, Cañar y Loja; catalogándose a esta enfermedad con una importancia mayor que la Antracnosis, Roya y Ascochita (Andrade y Ayala, 1994-1995). En estudios realizados en la serranía ecuatoriana, utilizando la prueba serológica de ELISA, se logró determinar la presencia del Virus del Mosaico Amarillo del Frejol (BYMV) en Imbabura; Virus del Mosaico Común del Frejol (BCMV) en Azuay, Chimborazo, Imbabura y Cañar; y el Virus de Mosaico Sureño en Loja (Andrade y Ayala, 1994-1995).

Teniendo en cuenta la falta de estudios actualizados sobre virosis en frejol en el Ecuador y específicamente en la provincia de Imbabura, mismos que impliquen la

utilización de técnicas más sensibles y precisas, el objetivo de este estudio fue verificar la presencia de los virus: Virus del Mosaico del Pepino (CMV), Virus del Mosaico Dorado del Frejol (BGMV), Virus del Mosaico Dorado Amarillo del Frejol (BGYM), Virus del Mosaico de la Alfalfa (AMV), Virus del Mosaico Enano del Frejol (BDMV), en el cultivo de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) 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

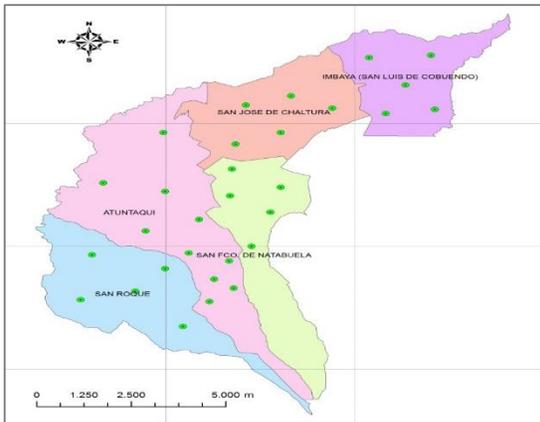
La presente investigación fue realizada en las zonas frejolerías del cantón Antonio Ante, ubicadas en las parroquias de Atuntaqui, Andrade Marín, Imbaya, San Roque, Chaltura y Natabuela. El área de estudio posee una temperatura promedio de 15,7°C; una altitud que va desde los 1880 hasta los 4560 msnm con un promedio de 2360 msnm. Tiene una precipitación media anual de 714 mm y una humedad relativa de 65% a 85% (GAD de Antonio Ante, 2012).

Primer análisis.

Recolección del material vegetal.- La recolección del material vegetal se realizó en las zonas productoras de frejol del cantón Antonio ante. Para la definición de los lugares donde se hizo la toma de muestras, en primer lugar se procedió a establecer cinco estaciones de muestreo en cada parroquia (Fig. 1), para lo cual se utilizó la técnica del “cinco de oro” (Senasica, 2010), dando un total de 30 estaciones en todo el cantón. En cada

estación se recolectaron ocho muestras, recolectándose 240 muestras en total.

Figura 1. Mapa de ubicación de las estaciones para el primer muestreo



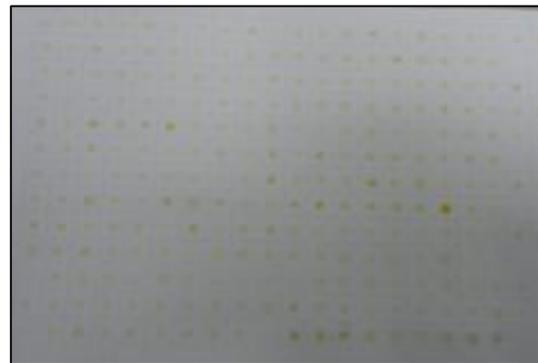
El muestreo se lo realizó en las tres primeras semanas de Abril del 2015, el tejido vegetal fue tomado de la parte media y superior de las plantas, mismas que tenían entre tres semanas de germinadas y tres meses de edad aproximadamente, evitando seleccionar hojas viejas, considerando que tengan síntomas característicos de virus (achaparramiento, rugosidad de las hojas, mosaicos, enanismo y raquitismo). Los lotes donde se realizó el muestreo fueron georeferenciados, asimismo se registró la edad de las plantaciones. Las muestras colectadas en campo fueron llevadas al laboratorio de Fitopatología Molecular de la Universidad Técnica del Norte, donde fueron almacenadas a -20°C para su análisis posterior.

Extracción de ácidos nucleicos.- Para la extracción de los RNAs de la planta existen muchos métodos que utilizan disolventes orgánicos tóxicos como por ejemplo el fenol, lo que resulta un inconveniente para los laboratorios de diagnóstico en los que se procesan un gran número de muestras. En esta investigación

para la preparación de los extractos a analizar se utilizó como base el método descrito por Dellaporta (1983); se homogenizó un gramo de hoja en 3 ml de tampón de extracción (Citrato sódico 50mM; EDTA 5 mM, pH 8,5). Se colocaron 1,5 ml de extracto en tubos Eppendorf y luego se centrifugaron por un tiempo de tres minutos a 10000 revoluciones por minuto.

Aplicación de las muestras sobre membranas de Nylon.- Una vez centrifugadas las muestras, se tomó 2 μl del sobrenadante y se impregnaron en la membrana de nylon cargada positivamente, previamente dividida en cuadrículas de $0,25\text{cm}^2$. Finalizada la impregnación las membranas se dejaron secar a temperatura ambiente por un tiempo de dos horas.

Figura 2. Membrana de nylon impregnada con ácidos nucleicos (primer muestreo)



Proceso de hibridación.- A continuación la membrana se incubó con un tampón de hibridación (50% formamida, SSC 5x, 0,1% N-Laurosylsarcosine, 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 lavó 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%.

A continuación 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) y seguidamente 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 Fab fragments (1:10000)). Finalmente la membrana se lavó con TL dos veces durante 15 minutos, 5 minutos con un tampón que contiene 0,1 M Tris pH 9,5; 0,1 M NaCl y se incubó con el sustrato disuelto en este mismo tampón 5 minutos. Para finalizar la membrana fue expuesta a una película autorradiográfica durante 15-25 minutos. Las muestras positivas para la infección viral aparecieron en la película después de su revelado como manchas negras intensas.

Las muestras fueron analizadas mediante una polisonda que contenía RNA de los siguientes virus: CMV, BGMV, BGYM, AMV, BDMV.

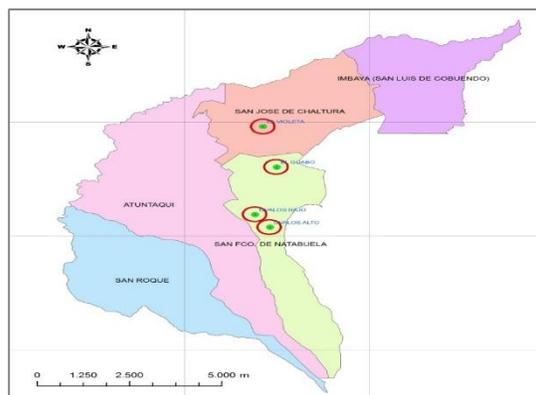
Segundo análisis.

Recolección de material vegetal.- Para la confirmación de los resultados del primer análisis se procedió a recolectar muestras que presentaban síntomas de los virus en estudio, especialmente de AMV y CMV. El muestreo se realizó en las parroquias de Chaltura y Natabuela, pues es en estas localidades en donde se pudo observar plantaciones con sintomatología de estos virus; también se tuvo en cuenta la afirmación de Morales y Castaño (1998) quienes aseguran que el CMV y el AMV, han sido encontrados en plantaciones de

frejol, en muchos países de América del Sur, de la misma forma se tomó en cuenta los estudios hechos por Colimba, et al. (2016) quienes reportaron la presencia de AMV, en un cultivar de pimiento, en la parroquia de Natabuela en una zona cercana al límite con la parroquia de Chaltura.

Se establecieron cuatro puntos de muestreo (Figura 3), y se recolectaron 30 muestras de plantas sintomáticas (AMV y CMV). Las muestras colectadas en campo fueron llevadas al laboratorio de Fitopatología Molecular de la Universidad Técnica del Norte, donde fueron almacenadas a -20°C hasta la realización del respectivo análisis.

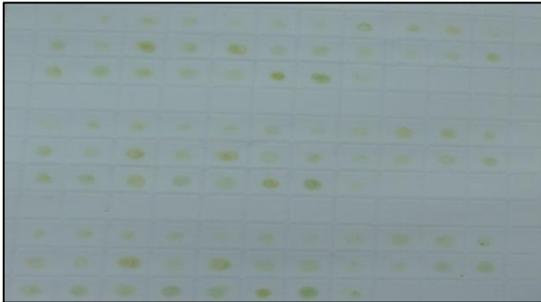
Figura 3. Mapa de ubicación de los puntos para el segundo muestreo



Extracción de ácidos nucleicos.- Se utilizó el mismo protocolo de extracción del primer análisis, con la diferencia que se adicionó 7µl de 2-mercaptoethanol, por cada ml de buffer de extracción.

Impregnación en membrana de Nylon.- De la misma forma, como en el primer análisis, se tomaron 2 µl del sobrenadante y se impregnaron en la membrana de nylon cargada positivamente. Se impregnaron tres repeticiones por cada muestra, dando un total de 90 muestras impregnadas.

Figura 4. Membrana de nylon impregnada con ácidos nucleicos (primer muestreo)

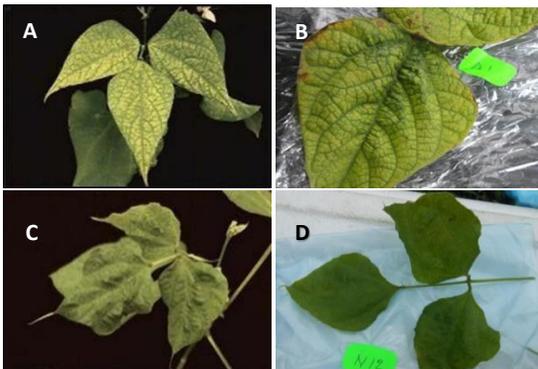


Proceso de hibridación.- Se utilizó el mismo procedimiento que en el primer análisis.

Resultados y discusión

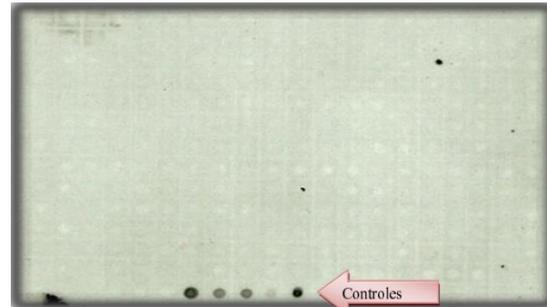
Orientados por el propósito de obtener información valedera y actualizada, sobre la presencia de los virus CMV, BGMV, BGYMV, AMV, BDMV, en los cultivares de frejol del cantón Antonio Ante, se realizaron muestreos en las localidades productoras de esta leguminosa a nivel del cantón. Durante el muestreo se evidenció la existencia de sintomatología típica de virosis, especialmente la relacionada con AMV y CMV (Figura 5).

Figura 5. Síntomas de virosis encontrados en las muestras recolectadas en el área de estudio. **A)** Mosaico, AMV (Morales y Castaño, 1998); **B)** Mosaico AMV, Atuntaqui, **C)** Deformación, CMV (Morales y Castaño, 1998); **D)** Deformación, CMV, Natabuela.



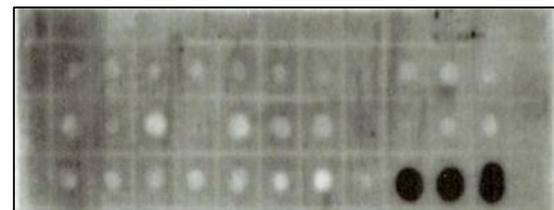
En cuanto a la presencia de los virus en estudio, como se puede observar en la Figura 6, no existió hibridación en ninguna de las muestras en el primer análisis.

Figura 6. Placa de revelado obtenida a partir del primer muestreo



De igual manera en el segundo análisis, ninguna de las muestras dio positiva a la hibridación con la polisonda (Figura 7), pese a que la calidad de los ácidos nucleicos utilizados para este análisis fueron de mejor calidad que en el primero.

Figura 7. Placa de revelado obtenida a partir del segundo muestreo

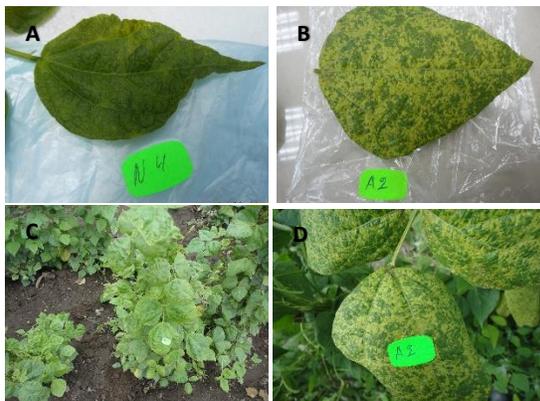


Los resultados obtenidos en el primer y segundo análisis muestran claramente que en las plantaciones de frejol que fueron muestreadas en el cantón Antonio Ante, no existe la presencia de ninguno de los virus en estudio, pese a que las muestras que se recolectaron tanto para el primero como para el segundo análisis, mostraban clara sintomatología de virosis. Prochnow, Morales y Stipp (2009) manifiestan que la clorosis intervenal es un síntoma de deficiencia de Mn y Zn, mismo que también es un síntoma de la presencia del

Virus del Mosaico de la Alfalfa, en frejol (Morales y Castaño, 1998); por esta razón se hizo un análisis foliar de las muestras, en el cual se determinó que efectivamente la mayoría de estas tenían deficiencia de Mn y Zn. Con lo que se pudo establecer que en la mayoría de cultivos muestreados existe una deficiencia de estos microelementos, que están ocasionando síntomas que se confunden con el ataque de AMV.

En cuanto a las otras sintomatologías de virosis que fueron encontradas y evidenciadas en las plantaciones muestreadas (Figura 8), puede decirse que estas corresponden a BCMV y BYMV, mismos que ya fueron reportados anteriormente en la provincia de Imbabura (Andrade y Ayala (1994-1995), y que no fueron parte del presente estudio.

Figura 8. Sintomatología de BCMV y BCMYV encontrada en muestras de frejol en Antonio Ante. **A)** Hojas alargadas y ampolladas **B)** Mosaico amarillo **C)** Planta con hojas ampolladas **D)** Foliolos con mosaico amarillo.



Sobre la efectividad de la técnica utilizada para el diagnóstico viral, cabe indicar que la hibridación de ácidos nucleicos tipo Dot-blot posee una mayor sensibilidad que la PCR (reacción de la cadena de la polimerasa), ya que puede detectar la presencia del agente viral sin la necesidad

de hacer replicaciones (Vaca; Jhon; y López, 2011). Esto es corroborado por Falcón (2015), Colimba, et al. (2016) y Pérez (2017), quienes utilizando esta misma técnica, pudieron detectar la presencia de virus en aguacate, pimiento y malezas, respectivamente.

Conclusiones

Los resultados obtenidos sugieren que en la plantaciones de frejol del cantón Antonio Ante, no existe la presencia de los virus CMV, BGMV, BGYMV, AMV, BDMV; ya que en los dos análisis realizados, las muestras no produjeron hibridación con la polisonda utilizada para el diagnóstico.

En las plantaciones muestreadas se encontraron plantas con síntomas de AMV y CMV, las cuales dieron negativo a la prueba, pudiéndose determinar mediante análisis foliar que estas corresponden a deficiencias nutricionales de micro elementos, especialmente manganeso y cinc.

Se pudo evidenciar la presencia de síntomas de BCMV y BYMV, virus que ya fueron reportados anteriormente en la provincia de Imbabura, y que no fueron motivo de estudio en la presente investigación.

Recomendaciones

Realizar estudios sobre BCMV y BYMV en las mismas localidades, utilizando hibridación Dot-blot, a fin de corroborar los resultados (síntomas) encontrados en la presente investigación.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a la Universidad Técnica del Norte y a la

Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (Senescyt); por el financiamiento de la presente investigación, a través del proyecto PROMETEO-UTN.

Referencias bibliográficas

- Andrade, J. y Ayala, L. (INIAP. 1994-1995). *Estudio de las enfermedades virales del fréjol (Faceolus vulgaris L.) en la sierra ecuatoriana y evaluación de la resistencia varietal en genotipos de fréjol voluble.*
- Castillo, N., & González, C. (2008). Comportamiento poblacional de insectos fitófagos en el unicultivo de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) y en la asociación con maíz (*Zea mays* L.). *Revista de protección vegetal.* 23(3), 154-159.
- Colimba, J., Falcon, E., Castro, E. R., Davila-Aldas, D., Pallás, V., Sanchez-Navarro, J. A., & Gomez, G. (2016). First report of Alfalfa mosaic virus in red pepper plants in Ecuador. *Plant Disease.* The American Phytopathological Society. 100 (5). P. 1026. DOI: [dx.doi.org/10.1094/PDIS-07-15-0820-PDN](https://doi.org/10.1094/PDIS-07-15-0820-PDN)
- Di Carli M, Benvenuto E, Donini M. (2012). Recent insights into plant-virus interactions through proteomic analysis. *J Proteome Res.* 11(10):4765-80. Doi:10.1021/pr300494e.
- Falcón, E. (2015) *Análisis de la presencia del viroide asbvd en el cultivo de aguacate (Persea americana Mill) var. fuerte, en la comunidad San Vicente de Pusir, cantón Bolívar, provincia del Carchi.* (Tesis de grado) Universidad Técnica del Norte Imbabura Ecuador.
- GAD. De Antonio Ante. (2013) *Plan de desarrollo y ordenamiento territorial de Antonio Ante 2012-2030.* Recuperado de <http://sni.gob.ec/planes-de-desarrollo-y-ordenamiento-territorial>
- Instituto Espacial Ecuatoriano (IEE), Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAGAP), 2013. *Generación de geoinformación para la gestión del territorio a nivel nacional escala 1: 25 000.* Componente 4: Sistemas productivos.
- INEC. (2014). Estadísticas agropecuarias. Encuesta de producción agropecuaria continua. Publicaciones. 2014. *Tabla 28 y Tabla 29.* Quito, Ecuador. Recuperado de: <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/encuesta-de-produccion-agropecuaria-continua/>
- Marilyn J. Roossinck, M. (2010) *Lifestyles of plant viruses.* *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 365(1548): 1899–1905. doi: 10.1098/rstb.2010.0057
- Mena, J y Ríos, J. (2010) *Manual de virus (Virus Fitopatógenos).* Recuperado de <http://es.slideshare.net/themenal/manual-de-virus-virus-fitopatgenos-5039306>

- Morales, F. J. (2003). *Common bean. In Virus and virus-like diseases of major crops in developing countries* (pp. 425-445). Springer Netherlands.
- Morales F., Castaño M. (1998). *Enfermedades Virales del Fríjol Común en América Latina*. Colombia: Francisco José Escobar Correa Feriva S.A.
- Peralta, E; Murillo, A; Mazón, N; Monar, C; Pinzón, J; y Rivera, M. (2010). *Manual Agrícola de Fréjol y otras Leguminosas. Cultivos, variedades y costos de producción*.
- Pérez, V. (2017). *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*. (Tesis de grado) Universidad Técnica del Norte. Ibarra, Ecuador.
- Prochnow, L., de Moraes, M. F., & Stipp, S. (2009). Micronutrientes. *In Actas Simposio Fertilidad* (pp. 12-13).
- SENASICA. (2010). *Manual técnico de muestreo de productos agrícolas y fuentes de agua para la determinación de contaminantes microbiológicos*. Recuperado de [http://www.agrolab.com.mx/site/v001/assets/manual_muestreo_plaguicidas_senasica.p df](http://www.agrolab.com.mx/site/v001/assets/manual_muestreo_plaguicidas_senasica.pdf)
- USDA (2010). *Nutritional Value of Dry Beans*. Recuperado el 20 de Octubre del 2015, de <http://www.ars.usda.gov/News/docs.htm?docid=20820>
- Vaca-Vaca, J. C., Jhon Fredy, B., & López-López, K. (2011). Detección, identificación y localización geográfica de Begomovirus que afectan al tomate en Colombia. (Spanish). *Revista Colombiana De Biotecnología*. 13(1), 115-122.