



# **UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

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

## **CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**“IDENTIFICACIÓN DE ENFERMEDADES VIRALES EN EL CULTIVO DE  
FRÉJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) EN EL CANTÓN ANTONIO ANTE, PROVINCIA  
DE IMBABURA”**

**Trabajo de grado previo a la obtención del Título de:**

**Ingeniero Agropecuario**

**AUTOR:**

**Mario Daniel Rivera Yépez**

**DIRECTORA:**

**Dra. Cristina Echeverría**

**Ibarra – Ecuador**

**2017**

# UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS

AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

**IDENTIFICACIÓN DE ENFERMEDADES VIRALES EN EL CULTIVO DE FRÉJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) EN EL CANTÓN ANTONIO ANTE, PROVINCIA DE IMBABURA.**

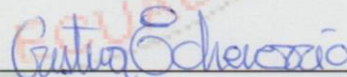
**Revisado por el comité asesor, por lo cual se autoriza su presentación como requisito parcial para obtener el Título de:**

**INGENIERO AGROPECUARIO**

**APROBADA**

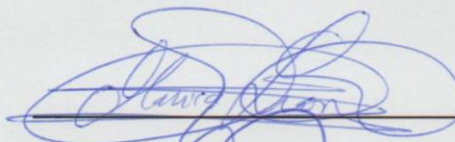
Dra. Cristina Echeverría

Directora de tesis



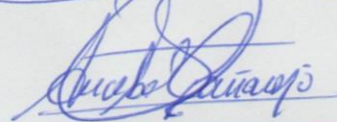
M.Sc. Mónica León

Asesora de Tesis



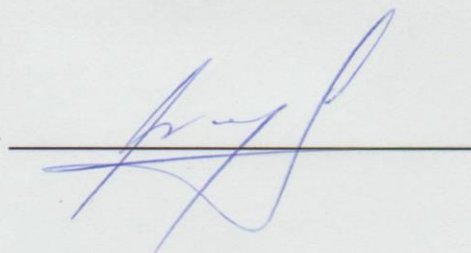
M.Sc. Magali Cañarejo

Asesora de Tesis



M.Sc. Juan Aragón

Asesor de Tesis



Ibarra – Ecuador

2017



# UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

## BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

### AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

#### 1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

La Universidad Técnica del Norte dentro del proyecto repositorio Digital Institucional, determinó la necesidad de disponer de textos completos en formato digital con la finalidad de apoyar los procesos de investigación, docencia y extensión de la universidad.

Por medio del presente documento dejo sentada mi voluntad de participar en este proyecto, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
<b>Cédula de identidad:</b>	100269911-2		
<b>Apellidos y nombres:</b>	Rivera Yépez Mario Daniel		
<b>Dirección:</b>	San Antonio de Ibarra		
<b>Email:</b>	rivera-dany@hotmail.com		
<b>Teléfono fijo:</b>	(02)2932782	<b>Teléfono móvil:</b>	0986114550

Datos de la Obra	
<b>Título:</b>	Identificación de enfermedades virales en el cultivo de fréjol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) en el Cantón Antonio Ante, Provincia de Imbabura.
<b>Autor:</b>	Rivera Yépez Mario Daniel
<b>Fecha:</b>	30 de Enero del 2017
<b>Solo para trabajos de grado</b>	

<b>Programa:</b>	Pregrado
<b>Título por el que opta:</b>	Ingeniero Agropecuario
<b>Directora:</b>	Dra. Cristina Echeverría

## 2. AUTORIZACIÓN DE USO A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD

Yo, Rivera Yépez Mario Daniel, con cédula de ciudadanía Nro. **100269911-2**; en calidad de autor y titular de los derechos patrimoniales de la obra o trabajo de grado descrito anteriormente, hago entrega del ejemplar respectivo en formato digital y autorizo a la Universidad Técnica del Norte, la publicación de la obra en el Repositorio Digital institucional y uso del archivo digital en la Biblioteca de la Universidad con fines académicos, para ampliar la disponibilidad del material y como apoyo a la educación, investigación y extensión; en concordancia con Ley de Educación Superior Artículo 144.

## 3. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto la obra es original y es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra a los 23 días del mes de Junio del 2017

**AUTOR:**

Rivera Yépez Mario Daniel

**C.I.: 100269911-2**

**ACEPTACIÓN:**

Ing. Betty Chávez

**JEFE DE BIBLIOTECA**



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

**CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE GRADO A FAVOR DE  
LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

Yo, **Rivera Yépez Mario Daniel**, con cédula de identidad Nro. 100269911-2; manifiesto la voluntad de ceder a la Universidad Técnica del Norte los derechos patrimoniales consagrados en la Ley de propiedad intelectual del Ecuador, artículos 4, 5 y 6, en calidad de autor de la obra o trabajo de grado denominado **“IDENTIFICACIÓN DE ENFERMEDADES VIRALES EN EL CULTIVO DE FRÉJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) EN EL CANTÓN ANTONIO ANTE, PROVINCIA DE IMBABURA.”**, que ha sido desarrollado para optar por el título de **INGENIERO AGROPECUARIO** en la Universidad Técnica del Norte, quedando la universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente. En condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la biblioteca de la Universidad Técnica del Norte.

Ibarra a los 23 días del mes de Junio del 2017.

Rivera Yépez Mario Daniel

C.I.: 100269911-2

## REGISTRO BIBLIOGRÁFICO

**Guía:** FICAYA-UTN

**Fecha:** 23 de Junio del 2017

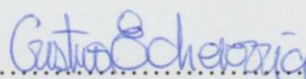
**Rivera Yépez Mario Daniel** “Identificación de enfermedades virales en el cultivo de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) en el Cantón Antonio Ante, Provincia de Imbabura” / TRABAJO DE GRADO. Ingeniero Agropecuario

Universidad Técnica del Norte. Ibarra, 23 de Junio del 2017. 45 páginas y 5 Anexos

**DIRECTORA:** Dra. Cristina Echeverría PhD

El objetivo principal de la presente investigación fue, generar información mediante análisis de muestras recolectadas en campo, para identificar la presencia de enfermedades virales en el cultivo de fréjol del cantón Antonio Ante, con el empleo del método hibridación molecular no radiactivo tipo Dot-Blot, mediante el uso de una polisonda que incluye la secuencia genética de CMV, BGMV, BGYMV, AMV, BDMV cinco virus que afectan al fréjol con el propósito de conocer sobre la existencia de patologías no convencionales (virus) y de esta manera ayudar a los productores a idear y desarrollar programas de control.

Fecha: 23 de Junio del 2017



.....  
Dra. Cristina Echeverría PhD

**Directora de Trabajo de Grado**



.....  
Rivera Yépez Mario Daniel

**Autor**

## **PRESENTACIÓN**

La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, corresponde exclusivamente al autor; y el patrimonio intelectual a la Universidad Técnica del Norte, exclusivamente a la Carrera de Ingeniería Agropecuaria.

El presente trabajo se lo realizó con la finalidad de identificar la presencia de enfermedades virales en el cultivo de frejol en el cantón Antonio Ante y además como material de apoyo a los interesados.

**Mario Daniel Rivera Yépez**

## **AGRADECIMIENTO**

*Primeramente agradezco a mi mamá Eugenia Rivera por haberme dado la vida acompañarme a lo largo de mi existencia en los buenos y malos momentos, a mis abuelitos María Carmen y Luis Enrique por estar pendientes de todos los acontecimientos en mi vida, así también a mis hermanas Yesenia y Mallury por ese apoyo moral y su cariño, a mis tías Fanny, Rossy, Katty y Tere por el apoyo desinteresado, a mis tíos Pancho, Miguel y Patricio por sus consejos y ayuda, que nunca me negaron.*

*Agradezco al Ing. Raúl Castro, Dra. Sílvia Montes y Dra. Cristina Echeverría, quienes me dirigieron en mi trabajo de investigación, de la misma manera expreso mi gratitud a la Ing. Mónica León, Ing. Magali Cañarejo e Ing. Juan Pablo Aragón, miembros del tribunal de grado, que han aportado con su experiencia y conocimiento para culminar de forma exitosa este trabajo de grado.*

*De manera especial agradezco al Dr. Gustavo Gómez por compartir sus conocimientos, ya que sin él, este tipo de trabajos de investigación no habrían sido posibles de realizar, al Ing. Javier Colimba por ser un buen guía en laboratorio a más de ser un gran amigo al que le tengo un gran respeto, a Eddy y Vero por participarme sus experiencias como tesistas y ser buenos compañeros de laboratorio y a todos quienes me han apoyado de una u otra manera en mi vida estudiantil.*

**Mario Daniel Rivera Yépez**



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN .....	iii
CESIÓN DE DERECHOS .....	v
PRESENTACIÓN .....	vii
AGRADECIMIENTO .....	viii
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	ix
ÍNDICE DE CUADROS .....	xi
ÍNDICE DE TABLAS .....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS .....	xiv
ÍNDICE DE FOTOS .....	xv
GLOSARIO .....	xvi
RESUMEN .....	xvii
SUMMARY .....	xviii
CAPITULO I .....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 PROBLEMA .....	1
1.2 JUSTIFICACIÓN .....	2
1.3 OBJETIVOS .....	3
1.4 PREGUNTAS DIRECTRICES .....	3
CAPÍTULO II .....	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
2.1 Generalidades .....	4
2.2 Plagas .....	4
2.3 Enfermedades .....	5
2.4 Virus .....	5
2.5 Enfermedades virales en los sistemas productivos .....	8
2.6 Pruebas más comunes para el diagnóstico de virus .....	10
CAPÍTULO III .....	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	13
3.1 Características del área estudiada .....	13
3.2 Materiales, equipos, reactivos y sustancias .....	14
3.3 Métodos .....	15
3.4 Variables estudiadas .....	16
3.5 Población .....	17
3.6 Muestra .....	17
3.7 Manejo específico del experimento .....	17
CAPITULO IV .....	22
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	22

4.1	Resultados de los análisis de laboratorio .....	22
4.2	Discusión de Resultados.....	23
CAPÍTULO V.....		27
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....		27
CONCLUSIONES.....		27
RECOMENDACIONES .....		28
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....		29
ANEXOS .....		34

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Materiales utilizados en la investigación.....	14
---	----

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Resultados de los análisis foliares (ANEXO 5) .....	25
---	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Plantas de fréjol con infección de virus	9
<b>Figura 2.</b> Mapa del cantón Antonio Ante, Imbabura Ecuador. ....	13
<b>Figura 3.</b> Esquema de muestreo aleatorio sistemático de 5 puntos. ....	17
<b>Figura 4.</b> Mapa de ubicación de las estaciones base de los lugares muestreados. ....	18
<b>Figura 5.</b> Punto de gota de las muestras, ácidos nucleicos impregnados en membrana de nylon con carga positiva. ....	19
<b>Figura 6.</b> Mapa de ubicación de las áreas del segundo muestreo. ....	20
<b>Figura 7.</b> Cultivo de fréjol tutorado en rastrojo de tomate de árbol en la parroquia de Chaltura. ....	21
<b>Figura 8.</b> Ácidos nucleicos del segundo muestreo implantados en la membrana de nylon	21
<b>Figura 9.</b> Placa de revelado obtenida a partir del primer muestreo. ....	22
<b>Figura 10.</b> Placa de revelado obtenida a partir de la hibridación de gota del segundo análisis. ....	23
<b>Figura 11.</b> Sintomatología de virus del mosaico común de la alfalfa AMV. ....	24
<b>Figura 12.</b> Sintomatología del virus AMV, muestra Atuntaqui (A1). ....	24
<b>Figura 13.</b> Sintomatología perteneciente al virus del mosaico común del pepino CMV. ....	25
<b>Figura 14.</b> Sintomatología del virus CMV, muestra Natabuela (N12). ....	25

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Mapa de ubicación de los puntos del primer muestreo.....	35
<b>Anexo 2.</b> Mapa de ubicación del área de estudio. ....	36
<b>Anexo 3.</b> Diagrama del proceso de hibridación .....	37
<b>Anexo 4.</b> Encuesta para determinar los conocimientos sobre enfermedades virales, de los productores de fréjol del cantón Antonio Ante. ....	38
<b>Anexo 5.</b> Análisis foliar realizado para determinar el estado nutricional de 5 muestras con sintomatología viral.....	42

## ÍNDICE DE FOTOS

<b>Foto 1.</b> Fréjol con características virales.....	43
<b>Foto 2.</b> Identificación de la muestra.....	43
<b>Foto 3.</b> Buffer de extracción de RNs.....	43
<b>Foto 4.</b> Extracción de ácidos nucleicos.....	43
<b>Foto 5.</b> Centrifugado de muestras.....	43
<b>Foto 6.</b> Impregnación en membrana de Nylon.....	43
<b>Foto 7.</b> Punto de gota de ácidos nucleicos .....	44
<b>Foto 8.</b> Tampón de hibridación.....	44
<b>Foto 9.</b> Incorporación de la membrana de nylon .....	44
<b>Foto 10.</b> Colocación del tubo en el horno hibridación.....	44
<b>Foto 11.</b> Hibridación de la membrana .....	44
<b>Foto 12.</b> Placa de revelado de las muestras analizadas .....	44

## GLOSARIO

- **AN:** Ácidos Nucleicos
- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- **AMV:** Virus del mosaico común de la alfalfa
- **BUFFER:** Solución tampón que mantiene invariable el pH
- **CMV:** Virus del mosaico común del pepino
- **cDNA:** ADN complementario
- **cRNA:** RNA complementario
- **EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético
- **Hibridación:** Unión de ácidos nucleicos de DNA o RNA
- **Nm:** Nanómetro
- **Nt:** Nucleótidos
- **NaCl:** Cloruro de sodio
- **M:** Concentración molar
- **PCR:** Reacción de la Cadena Polimerasa
- **RNasa:** Ribonucleasa
- **RNA:** Ácido ribonucleico
- **SDS:** Laurilsulfato sódico
- **SSC:** Dodecilsulfato sódico
- **Sonda:** secuencias de DNA o de RNA, complementarias a aquellas que se quieren detectar.
- **Tris-HCL:** Tris-Hydrochloride
- **µg:** Microgramos
- **µl:** Micro litros



**TÍTULO: “IDENTIFICACIÓN DE ENFERMEDADES VIRALES EN EL CULTIVO DE FRÉJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) EN EL CANTÓN ANTONIO ANTE, PROVINCIA DE IMBABURA”**

**Autor:** Rivera Yépez Mario Daniel

**Directora:** Dra. Cristina Echeverría

**Año:** 2017

## **RESUMEN**

El fréjol es un cultivo de gran importancia en el Ecuador, especialmente en la provincia de Imbabura. En el cantón Antonio Ante, esta especie es muy cultivada debido a las excelentes condiciones climáticas. Una de las limitaciones del cultivo, es la afectación por enfermedades que impiden su normal desarrollo, entre las cuales se encuentran las de tipo viral, mismas que pueden ocasionar serias pérdidas económicas al agricultor. La presente investigación tuvo como objetivo, detectar la presencia de los virus CMV, BGMV, BGYMV, AMV, BDMV en las plantaciones de fréjol del cantón Antonio Ante, usando el método de hibridación molecular no radiactivo tipo Dot-Blot, mediante el uso de una polisonda con la secuencia genética de los 5 virus. Para esto se realizó un muestreo dirigido, en los cultivos de esta leguminosa establecidos en este cantón. Los resultados indican que no existe la presencia de ningún virus de los 5 que integran la polisonda en las plantaciones muestreadas, por lo que es necesario realizar trabajos adicionales para determinar la causa de los síntomas encontrados en las plantas analizadas.

**Palabras clave:** fréjol, hibridación, polisonda, virus.

**TITLE: "IDENTIFICATION OF VIRAL DISEASES IN BEAN CROP (*Phaseolus vulgaris L.*) IN THE CANTON ANTONIO ANTE, IMBABURA PROVINCE"**

**Author:** Rivera Yépez Mario Daniel

**Director:** Dra. Cristina Echeverría

**Year: 2017**

## **SUMMARY**

The bean is an important crop in Ecuador, especially in the province of Imbabura. In the canton Antonio Ante, this species is widely cultivated because to the excellent weather conditions which owns the area. One of the limitations of this crop is the affectation of diseases which complicates their normal development, the main diseases that attack the bean, are of type viral, same that can cause serious damages to the crop, and hence, considerable economic losses to the farmer. The present study aimed to detect the presence of CMV, BGMV, BGYMV, AMV, BDMV viruses, in bean plantations in the canton Antonio Ante, for which the was used method of molecular hybridization non-radioactive of type Dot-Blot, using a polisonda of 5 viruses. For this they were have been made two samplings directed, in the main growing areas of this legume in this canton. The results of the two analysis disclosed that there is not presence of none of the 5 viruses that integrated the poli-sonda, in the plantations where the study was conducted. The results obtained suggest be carried out further work for determining the causes of the symptoms found in this study.

**Keywords:** bean, hybridization, polisonda, viruses.

# CAPITULO I

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 PROBLEMA.

Morales (2003) menciona que el fréjol es una de las leguminosas más importantes, cubriendo más de 26 millones de hectáreas de cultivo en todo el mundo, en la que Latinoamérica es su principal zona productora, en donde el consumo per cápita está entre los 10 y 18kg, mientras que en lugares como el África alcanza un consumo de 50 kg/ persona, es un alimento que puede cubrir hasta el 35% de las necesidades proteicas y 340 calorías/100g como aporte a los requerimientos nutricionales diarios a las familias pobres urbanas y rurales. También cultivado y consumido en importantes cantidades en países de Asia, África, Medio Oriente y resto del mundo.

Según el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), (2010) este grano aporta nutricionalmente a la dieta con proteína, ácido fólico, tiamina, potasio, hierro vegetal, fibra y magnesio. Castillo y González (2008) afirman que este grano constituye un alimento básico en la alimentación diaria.

En el Ecuador, el fréjol es la principal leguminosa para consumo humano. Esta planta es cultivada en zonas de clima templado del callejón interandino como es el caso de la provincia de Imbabura. Las principales zonas de producción se localizan en el Valle del Chota, Urcuquí, Intag y Antonio Ante (Peralta et al., 2010).

El cultivo de esta leguminosa ha ganado espacio en la actividad agrícola del cantón Antonio Ante, pero en los últimos años se ha visto afectado por problemas fitopatológicos observándose síntomas asociados a infecciones virales. En algunos casos los agricultores han llegado a tener incidencia de la enfermedad de 100% (Andrade y Ayala, 1995) lo que ocasiona pérdidas del 100% de su producción (Mena y Ríos, 2010).

La no existencia de estudios precedentes sobre la temática antes señalada condujo a esta investigación sobre problemas virales en el cultivo de fréjol de este cantón, razón fundamental por la que no se ha podido diseñar e implementar estrategias de mitigación, que permita reducir las pérdidas ocasionadas por virus. A esto se suma el intento de control por parte de los agricultores, con agroquímicos que resultan inútiles, lo que refleja el desconocimiento que existe sobre patogenicias virales en fréjol, debido a la escasa información

disponible sobre el tema. Opinión fundamentada en una encuesta realizada a los agricultores (ANEXO 4).

## 1.2 JUSTIFICACIÓN

En el cantón Antonio Ante, el cultivo de fréjol es uno de los más importantes, puesto que no es un cultivo limitado a temporada y representa una fuente de ingreso económico para quienes lo practican. Lo antes expresado condujo a estudios sobre las enfermedades que afectan a esta especie en la que se trató de identificar virus diferentes a los reportados en Imbabura por Ayala y Andrade en 1995.

Dentro de este contexto de desconocimiento del estado fitosanitario (respecto a virus) en áreas productoras de fréjol del Cantón Antonio Ante, se consideró prioritario el diagnóstico de este tipo de enfermedad, con el propósito de generar información sobre el estado fitosanitario de este cultivo en los campos de la región, lo que permitiría corregir estos problemas, diseñar a futuro programas de saneamiento mediante estrategias de control en las zonas productoras, minimizar la diseminación evitando la transferencia de agentes virales causantes de enfermedades que afectan a los productores de esta leguminosa, mitigando el impacto de estas patologías en el mediano y largo plazo a niveles agronómicamente tolerantes, que permitan al productor obtener cosechas de calidad, en condiciones sanitarias aceptables y económicamente rentables.

Una de las prioridades fue el empleo de la técnica de hibridación molecular no radiactivo tipo Dot-Blot, mediante el uso de sondas múltiples en este caso se utilizó una de con la secuencia genética de 5 virus que afectan al fréjol. Esta técnica ayuda a maximizar el número de muestras procesadas y economizar el coste de los análisis a medida de lo posible (Rubio-Cabetas et al., 2012), esto es corroborado por Colimba et al., (2016) quienes utilizaron este método en Imbabura para hacer un primer reporte de la presencia del Virus del Mosaico de la alfalfa (AMV) en pimiento dulce en Ecuador. Falcón (2015) afirma que con esta técnica identificó presencia de virus en el cultivo de aguacate en la parroquia San Vicente de Pusir provincia del Carchi.

Por cuanto se siguió la misma línea de investigación utilizando este método para fréjol por primera en Imbabura. Este método de diagnóstico que es lo suficientemente sensible, rápido, económico permite la detección simultánea del mayor número de virus posible y facilita el procesamiento Pallas *et al*, (2010); Sanchez-Navarro (2014) y permite

analizar de manera relativamente sencilla y económica un gran número de muestras (Martinez, et al., 2011).

### **1.3 OBJETIVOS**

#### *Objetivo general*

- Verificar la presencia de los virus CMV, BGMV, BGYMV, AMV, BDMV en el cultivo de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) del Cantón Antonio Ante, Provincia de Imbabura.

#### *Objetivos específicos*

- Establecer la presencia o ausencia de los virus CMV, BGMV, BGYMV, AMV y BDMV, mediante el uso de la técnica: Hibridación molecular en Dot-blot con sondas no radiactivas múltiples, en los cultivos de fréjol del cantón Antonio Ante
- Determinar el tipo de virus presente en los sembríos de fréjol, en caso de detectarse presencia de al menos uno de estos.
- Estimar los niveles de incidencia en caso de detectarse virus.

### **1.4 PREGUNTAS DIRECTRICES**

- ¿Existe la presencia de los virus CMV, BGMV, BGYMV, AMV y BDMV, en los cultivos de fréjol del cantón Antonio Ante?
- ¿Cuál es el tipo de virus presente en los sembríos de fréjol, en caso de detectarse presencia de al menos uno de estos?
- ¿Cuáles son los niveles de incidencia de estos virus, en caso de ser detectados?

## CAPÍTULO II

### 2. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 2.1 GENERALIDADES

Entre los años 9000 y 5000 a. C. en diferentes partes del mundo se domesticaron diversas especies vegetales, entre ellas el fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Los restos fósiles, establecen que el fréjol común se originó en Mesoamérica y posteriormente se domesticó entre los 5000 y 2000 años a. C. en dos sitios: Mesoamérica (México y Centroamérica) y los Andes (Sudamérica). A partir del fréjol silvestre se formaron dos acervos genéticos distintos, Mesoamericano y Andino (Hernández, Vargas, Maruaga, Hernández y Mayek, 2013).

El fréjol en el Ecuador es cultivado en condiciones climáticas que se encuentran en altitudes entre 1200 a 2500 m.s.n.m. (áreas de valle) y de 1000 a 2200 m.s.n.m. (estribaciones), con un requerimiento hídrico entre los 300 a 700 mm de precipitación en el ciclo, la temperatura adecuada está entre los 16°C a 20°C, y los suelos a los que mejor se adapta son los que tienen un pH entre 5,5 a 7,5; su época de siembra es desde febrero hasta abril, utilizando una cantidad de semilla que va desde los 90 a 110 kg/ha, sembrándose a una distancia de 60 a 70 cm entre surcos y 25 a 30 cm entre sitios (Peralta et al., 2010).

Las zonas de producción de fréjol en Ecuador se encuentran distribuidas en todo el callejón interandino, en la provincia de Imbabura es cultivado en el Valle del Chota, Urcuquí, Pimampiro y Antonio Ante, Intag y Salinas. Entre las que se cultiva principalmente las variedades INIAP 418 Je.Ma. II rojo moteado, INIAP 420 Canario del Chota y INIAP Centenario (Peralta et al., 2010).

La superficie total cultivada en el Ecuador es de 67186 ha, de las cuales, la provincia de Imbabura aporta con un 5,16% de la producción nacional, contando con un total de 3467 ha, destinadas al cultivo de esta leguminosa (INEC, 2013).

#### 2.2 PLAGAS

En el fréjol las plagas más comunes son: Lorito verde o mosquilla (*Empoasca kraemeri*), Barrenador de tallo y vainas (*Epinotia aporema*), Arañita roja (*Tetranychus sp.*), Trips (*Thysanoptera: Thripidae*), Gorgojo (*Acanthoscelides obtectus*), Trozadores (*Agrotis sp.*), Mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum*) (Peralta et al., 2010).

## 2.3 ENFERMEDADES

Entre las enfermedades más comunes que afectan los cultivos de fréjol en Imbabura se encuentran 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).

## 2.4 VIRUS

Los virus son parásitos submicroscópicos, intracelulares obligados, su genoma está conformado de uno o más componentes de ácido nucléicos (DNA o RNA), se encuentran dentro de una cubierta o cápside, las características específicas permiten su clasificación taxonómica. Los virus, sólo pueden infectar y multiplicarse en células vivas de hospedantes susceptibles específicos (Mena y Ríos, 2010). Su tamaño oscila entre los 20 a 250 nm que utilizan un mecanismo especial de replicación (Ruchansky, 2011).

### 2.4.1 Clasificación

Martínez (2014), indica que los virus según su naturaleza y material genético se agrupan en: virus RNA, virus DNA y retrovirus. Los virus DNA presentan genomas, un ciclo replicativo y su expresión genética ocurre a través de un RNA mensajero, transcrito similar a los organismos celulares. Los retrovirus poseen fragmentos de DNA y ARN en sus ciclos replicativos, y poseen una gran variedad de tamaños y forma.

Martínez (2014), clasifica los virus de la siguiente manera:

- RNA de simple cadena y polaridad positiva (ssRNA+).
- RNA de simple cadena y polaridad negativa (ssRNA-).
- RNA de doble cadena y (dsRNA).
- DNA de simple cadena (ss DNA).
- DNA de doble cadena (dsDNA).

### 2.4.2 Transmisión

Los virus no son capaces de transmitirse por sí solos de forma automática por las aperturas naturales como lo hacen los hongos y bacterias, los virus entran a los vegetales por las célula a través de inoculación mecánica, por una herida cuando se produce rose directo

entre la planta y planta, de una planta enferma a una planta sana. También pueden ser transmitidos por vectores a los que pertenecen varias especies de insectos, nemátodos, ácaros, bacterias, y hongos del suelo, por propagación vegetativa, como por semillas y polen, hospedantes en donde los virus permanecen latentes de generación en generación (Mena y Ríos, 2010).

### **2.4.3 Patogénesis de virosis en plantas**

Entre las formas de infecciones virales se han descrito virus que reciben el nombre de “latentes” ya que aparentemente no provocan síntomas en sus huéspedes naturales. Por otro lado, virus cuya infección en determinadas especies provoca síntomas muy agresivos, pueden comportarse como infecciones latentes en huéspedes distintos. Estos huéspedes reciben el nombre de “huéspedes tolerantes” y ponen de manifiesto que la patogenicidad no es consecuencia únicamente del virus sino de la asociación virus-huésped (Gómez et al., 2009); la incidencia de los virus depende de la persistencia del vector (Vidal, 2011).

### **2.4.4 Replicación**

Gergerich et al., 2010 afirman que la replicación de los virus está mediada por la información contenida dentro de sus genomas, reproduciéndose en todo organismo vivo que puedan infectar. Mena y Ríos (2010), señalan que la infección de una planta con virus está relacionada directamente con la síntesis del mismo, su replicación es compleja pero se divide en las siguientes etapas:

- Adsorción y penetración.
- Liberación de AN.
- Replicación del AN.
- Síntesis temprana de la proteína.
- Síntesis tardía de la proteína.
- Ensamblaje.

### **2.4.5 Movimiento viral de célula a célula**

Una vez infectadas las primeras células, el virus debe colonizar las células adyacentes antes de llegar a partes distales de la planta. Tanto virus como RNAs endógenos realizan este tipo de movimiento, denominado movimiento célula a célula, a través de los plasmodesmos, que son los orgánulos de interconexión citoplasmática intercelular. La mayor velocidad de avance de los virus respecto a RNAs inmóviles sugiere algún tipo de



mediación dirigida. Es probable que los virus se unan a un huésped para utilizarlo como medio de transporte (Gómez y Pallas, 2004; Gómez et al., 2005).

#### **2.4.6 Movimiento de los virus en el sistema vascular**

La entrada de las moléculas al sistema vascular se encuentra regulada, por los filtros que se encuentran en las células del haz que separan el mesófilo del floema. El paso de RNAs se mantiene limitado, implicando secuencias de factores del huésped (Hamada et al., 2003).

#### **2.4.7 Hospederos de virus**

Todos los tipos de organismos son huéspedes vivos incluyendo animales, plantas, hongos y bacterias son hospedantes de virus, pero la mayoría de los virus infecta solo un tipo de hospedante. Los virus son responsables por pérdidas en el rendimiento y la calidad de los cultivos en todas partes del mundo (Gergerich et al., 2010).

Entre los huéspedes de virus más comunes e importantes que afectan a los cultivos, se encuentran las malezas, en donde utilizando la prueba DAS-ELISA se determinó la presencia de algunos virus que afectan a los cultivos, encontrándose malezas hospederas y portadoras de estos virus tanto sintomáticas como asintomáticas que fueron localizadas tanto dentro de los cultivos como en sus alrededores (Ormeño y Sepúlveda, 2005).

#### **2.4.8 Síntomas**

En general los síntomas característicos asociados a enfermedades virales en plantas se resumen en: mosaicos (zonas verde clara o amarillentas en hojas y frutos), deformaciones y enrollamientos de hojas, raquitismo, flores variegadas (pétalos con zonas decoloradas), enanismo (entrenudos cortos), clorosis, decaimiento generalizado en su rendimiento entre otras (Pallas y García, 2011; Pallas, Martínez y Gómez, 2012).

Es probable que en la asociación virus-huésped, la aparición de síntomas sea una excepción. En este sentido, hay que destacar que las patologías de etiología viral se han identificado en especies cultivadas de interés comercial y por tanto son plantas que han sufrido algún tipo de selección por parte del hombre, normalmente este tipo de selección está dirigida a favorecer caracteres de interés agronómico. En la mayoría de casos esta selección suele comprometer y mermar la eficacia biológica de estas especies “domesticadas” que ya no son competitivas en espacios naturales y su existencia queda

relegada a su cultivo en condiciones favorables creadas artificialmente por el ser humano (Martínez et al., 2011).

#### **2.4.9 Control**

A diferencia de los tratamientos existentes para bacterias y hongos, no existe un tratamiento efectivo para enfermedades de etiología viral, siendo el diagnóstico precoz el principal método de control para estos patógenos (Sánchez-Navarro, 2014). Así se considera de vital importancia el control de los vectores transmisores de virus a las plantas, ya que son el principal foco de infección, junto a malezas u otros cultivos infectados (Ares, Tabasco, y Andueza, 2014).

#### **2.4.10 Propagación de plantas libres de virus**

El cultivo de meristemos apicales es el más común al tener la ventaja de carecer de tejido vascular por donde los virus se transportan para infectar las plantas. Frecuentemente es combinado con quimioterapia o con tratamientos de calor. Con la combinación de estos métodos, las plantas se liberan de los virus, de hongos y otros patógenos, que se lo consigue al utilizarse procedimientos mixtos que combinan termoterapia, microinjerto y formación de tallos adventicios con el cultivo de meristemos (Villalobos & Thorpe, 1991).

### **2.5 ENFERMEDADES VIRALES EN LOS SISTEMAS PRODUCTIVOS**

Las especies cultivadas son susceptibles de sufrir un gran número de enfermedades virales que repercuten en su rendimiento y producción y por tanto ocasionan importantes pérdidas económicas, que en algunos casos pueden superar el 75% de la producción. Se estima que en algunas familias vegetales el nivel de incidencia de enfermedades virales puede sobrepasar el 70% (Marilyn y Roossinck, 2010; Di Carli, Benvenuto y Donini, 2012).

#### **2.5.1 Enfermedades virales que afectan al cultivo del fréjol**

Las enfermedades virales en fréjol son un gran problema debido a que no pueden ser tratadas como las demás enfermedades, en cuanto los agricultores pierden del 30 al 40% del rendimiento inicial de una nueva variedad, a causa del mal manejo en la protección del cultivo y uso de sus propias semillas (Rodríguez et al., 2003), pudiendo llegar a tener pérdidas del 100% (Mena y Ríos, 2010).

## 2.5.2 Virus en fréjol en el Ecuador

En investigaciones realizadas por el INIAP en 1977 se menciona al virus del mosaico común del fréjol como la enfermedad más diseminada en las provincias de Pichincha e Imbabura, la más peligrosa y severa, el INIAP en 1978 reporta a la virosis como la enfermedad más prevalente, en 1981 se estudia la enfermedad encontrándose en todo el callejón interandino, siendo las provincias de Azuay Cañar y Loja en donde se encontró incidencias de hasta el 100%, tomando tal importancia que se la catalogó como la principal enfermedad incluso antes que la antracnosis, roya y ascochita (Andrade y Ayala, 1994-1995).

En un muestreo realizado en las provincias de Imbabura, Chimborazo, Azuay, Cañar y Loja encontraron 60 muestras con virosis mediante el uso la prueba serológica (ELISA), reportándose la presencia del virus del Mosaico Amarillo del fréjol en Imbabura, el Virus del Mosaico común del fréjol en Azuay, Chimborazo, Imbabura y cañar, además el Virus del Mosaico sureño en Loja (Andrade y Ayala, 1994-1995).



**Figura 1.** Plantas de fréjol con infección de virus del 100%.

### 2.5.2.1 Transmisión de virus en fréjol.

Pierce (1934) determinó por medio de la inoculación artificial la susceptibilidad de 24 variedades de fréjol a los virus BCMV, BYMV, AMV, TMV. Así mismo, Peña y Trujillo (2006) indicaron en su investigación que el 22,5 % de los materiales sembrados mostraron síntomas virales que fueron transmitidos por semilla. González (2004) señaló que en fréjol tipo granja Asturiana, el virus que con mayor frecuencia se asoció a semilla fue el Mosaico Común del Frejol y Virus del Mosaico del Pepino.

Usando la variedad susceptible Top Crop de *Phaseolus vulgaris* L., se realizó la transmisión de virosis con éxito, partiendo un adulto por planta de mosca blanca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), pero a partir de los 15 individuos por planta la incidencia no fue significativa; los genotipos evaluados exhibieron diferentes niveles de resistencia, siendo los materiales de fréjol negro los más resistentes (Cuellar, Morales, y Lerma, 2011).

En 49 líneas iraníes de fréjol común, que fueron inoculadas por frotación con el virus de CMV, y luego de ser analizadas en base a sintomatología se determinó una variedad con resistencia moderada seis con tolerancia al CMV y 42 variedades susceptibles a este virus (Azizi y Shams-bakhsh, 2014).

## **2.6 PRUEBAS MÁS COMUNES PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS**

Mena y Ríos (2010) afirman que las técnicas más comunes son las siguientes.

- Observación de síntomas virales en semillas y plantas.
- Pruebas biológicas, como la de crecimiento, usando plantas indicadoras.
- Pruebas bioquímicas, entre las que se encuentran serológicas, técnicas de tinción, microscopia electrónica.

En las pruebas serológicas la más común es la prueba de (ELISA)

ELISA es una técnica que se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Esto da un soporte (inmunoadsorbente), la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada, lo que permitirá mediante la adición de un sustrato específico el revelado, que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro (Batista et al., 2008).

### **2.6.1 Pruebas moleculares**

Las técnicas moleculares son una clara alternativa para diagnosticar enfermedades virales ya que constituyen una forma más práctica y segura de diagnosticar este tipo de patologías en los vegetales (Pallás et al., 2010).

### **2.6.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La invención de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) fue creada por Mullis en 1985 (Somma y Querci, 2011). La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica

in vitro utilizada para amplificar enzimáticamente una región determinada de ADN situada entre las regiones de ADN cuya secuencia se conoce, incluso con un ejemplar de gen puede amplificarse con PCR a un millón de ejemplares en tan solo unas pocas horas (Somma y Querci, 2011).

Pallas, Sánchez-Navarro, Aparicio y Herranz (2010) mencionan que el PCR, utiliza una enzima con capacidad para amplificar en forma exponencial secuencias específicas de DNA, lo cual requiere de un paso previo de retrotranscripción reversa (RT) en los virus RNA, para la obtención de un DNA copia del genoma viral. Mientras que en alimentos este paso no es necesario pues lo que se detecta directamente es el DNA genético presente en la muestra. Se trata de un método extremadamente sensible y que por tanto permite detectar concentraciones extremadamente bajas del patógeno.

### **2.6.3 Técnica de la hibridación molecular**

La hibridación molecular como método de diagnóstico en virología vegetal fue utilizada por primera vez en los años 50 (Owens y Diener, 1981; Maule, Hull y Donson, 1983). Esta técnica se basa en la complementariedad de las dos cadenas constituyentes de un ácidos nucleicos bicatenario y el resultado es la formación de un híbrido entre la secuencia de nucleótidos del virus a detectar y una secuencia complementaria marcada a la que se denomina sonda (Hassan, Gómez, Pallás, Myrta y Rysanek, 2009).

Pallás, et al., (2010); Rubio-Cabetas et al, (2012), afirman que la variante más comúnmente empleada en hibridación molecular es la de "Dot- Blot" en la que la solución de ácidos nucleicos es aplicada directamente sobre un soporte sólido, como por ejemplo una membrana de nylon, y detectada con una sonda específica marcada. Detección simultánea de secuencias de virus mediante el uso de polisondas no radioactivas, tipo Dot-Dlot.

El concepto de polisonda supone la clonación en tándem de varios fragmentos genómicos de distintos virus en un mismo vector plasmídico lo cual permite la síntesis en la misma reacción de transcripción, de una única sonda de RNA o DNA. La invención reúne por un lado, la sensibilidad que confiere la hibridación molecular y por otro, permite disminuir los costos y el tiempo necesarios para la realización de los análisis (Pallás et al., 2010).

### 2.6.3.1 *Elaboración de una polisonda.*

Para obtener una polisonda se amplifica por PCR fragmentos genómicos representativos de la secuencia que se desea detectar. El tamaño mínimo debe ser de 50 pares de bases, aunque para mayor sensibilidad es recomendable fragmentos de alrededor de 200 bases. Para la PCR se usa cebadores específicos de las secuencias a detectar, con los sitios de restricción compatibles con el vector a utilizar para la clonación. Tras realizarse las subclonaciones se obtiene un clon con los fragmentos genómicos en tándem o con secuencias específicas de separación. Una vez obtenido el clon se genera la polisonda. Dependiendo que si se trata de una polisonda de RNA o de DNA se utilizará una enzima u otro sistema de detección basado en marcaje con oligonucleótidos radioactivos, digoxigenina, biotina o cualquier otro método de marcaje estándar escogido por el personal que se dedica a la elaboración de polisondas (Pallás et al., 2010).

## CAPÍTULO III

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 CARACTERÍSTICAS DEL ÁREA DE ESTUDIO

##### 3.1.1 Ubicación geográfica de la localidad

El cantón Antonio Ante se encuentra ubicado al noroeste de la provincia de Imbabura limitando a norte con el cantón Ibarra, al sur con Otavalo, al este con el cerro Imbabura y al oeste con los cantones Cotacachi y Urcuquí. Cuenta con seis parroquias, urbanas: Atuntaqui y Andrade Marín; rurales: San Roque, Chaltura, Natabuela e Imbaya (GAD de Antonio Ante, 2012).



Figura 2. Mapa del cantón Antonio Ante, Imbabura Ecuador.

##### 3.1.2. Características climáticas

El clima de Antonio Ante se caracteriza por ser ecuatorial, mesotérmico, semi húmedo, con 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% Imbaya (GAD de Antonio Ante, 2012).

### 3.2 MATERIALES, EQUIPOS, REACTIVOS Y SUSTANCIAS UTILIZADAS EN LA INVESTIGACIÓN

**Cuadro 1.** Materiales utilizados en la investigación

<b>Materiales de campo</b>	<b>Materiales de laboratorio</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>– Fundas de polietileno</li> <li>– Tijeras de podar</li> <li>– Cooler</li> <li>– Etiquetas</li> <li>– Cámara fotográfica</li> <li>– GPS</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Agua destilada</li> <li>– Agua bidestilada</li> <li>– Vasos de precipitación</li> <li>– Gotero</li> <li>– Guantes</li> <li>– Mascarilla</li> <li>– Bisturí</li> <li>– Micro-pipetas</li> <li>– Puntas para micro-pipetas</li> <li>– Membrana de nylon cargadas positivamente</li> <li>– Películas fotográficas</li> <li>– Tubos eppendorf 1,5 ml</li> <li>– Kit de revelado por inflorescencia</li> <li>– Sondas de RNA marcada con digoxigenina</li> </ul>
<b>Equipos de Laboratorio</b>	<b>Equipos de oficina</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>– pH-metro</li> <li>– Agitador magnético</li> <li>– Micro-pipetas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Computadora</li> <li>– Impresora</li> <li>– Hojas A4</li> </ul>



<ul style="list-style-type: none"> <li>- Horno de hibridación</li> <li>- Sistema de revelado de películas</li> <li>- Mini centrifuga</li> <li>- Fuente de luz ultravioleta</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Archivador</li> </ul>
<b>Reactivos y sustancias</b>	<b>Material experimental usado en la extracción de ácidos nucleicos</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Agua estéril</li> <li>- Citrato de sodio</li> <li>- Cloruro sódico</li> <li>- Ácido maleico</li> <li>- EDTA</li> <li>- 2- Mercaptoenol</li> <li>- Polisonda con la secuencia genética de 5 virus (Universidad Politécnica de Valencia-España)</li> </ul>	<p>El material utilizado fue tejido vegetal (hojas) con sintomatología característica de infecciones virales, en cultivos de fréjol muestreados en las localidades de las parroquias del cantón Antonio Ante.</p>

**Fuente:** Elaboración propia

### 3.3 MÉTODOS

La presente investigación tuvo como prioridad estudiar la presencia de agentes patógenos no comunes (virus), que estén afectando a los cultivos de fréjol del Cantón Antonio Ante de la provincia de Imbabura.

#### 3.3.1 Tipo de Investigación

Esta investigación se la considera de tipo básica con enfoque cuantitativo, porque se trabajó con aspectos variables y medibles a la realidad. Tuvo un alcance exploratorio, ya que se estudió un tema poco conocido (Hernández, Fernández y Baptista, 2010), como son las enfermedades virales en el cultivo de fréjol en el cantón Antonio Ante.

### **3.3.2 Diseño de la Investigación**

En este trabajo se usó un diseño de tipo no experimental, de tipo transversal, porque no hubo manipulación variables y se observó los fenómenos en su ambiente natural en donde se tomó datos por única ocasión (Hernández et al., 2010).

### **3.3.3 Factor estudiado**

Enfermedades virales CMV, BGMV, BGYMV, AMV, BDMV en el cultivo de fréjol en Antonio Ante.

## **3.4 VARIABLES ESTUDIADAS**

- Tipos de virus presentes en la polisonda, en caso de detectarse la presencia de éstos.
- Niveles de incidencia de las enfermedades virales en los cultivos de cada parroquia, en caso de la presencia de los mismos.

### **3.4.1 Tipos de virus presentes en la polisonda, en caso de detectarse presencia de éstos**

Esta variable permitió responder a los dos primeros objetivos específicos, para lo cual, se utilizó el análisis de hibridación molecular no radioactiva tipo Dot- Blot, con una variante, en donde, se usó una polisonda la misma que se encontraba constituida por la secuencia genética de CMV, BGMV, BGYM, AMV, BCMV. Y así determinar la presencia o ausencia de estos agentes patógenos.

### **3.4.2 Niveles de incidencia de las enfermedades virales en los cultivos de cada parroquia, en caso de la presencia de los mismos**

Al no detectarse presencia de virus esta variable no pudo ser calculada, se pretendía utilizar cálculo matemático para obtener el porcentaje de incidencia de las enfermedades virales presentes en las parroquias muestreadas.

Se planteó la siguiente ecuación; donde I = Incidencia.

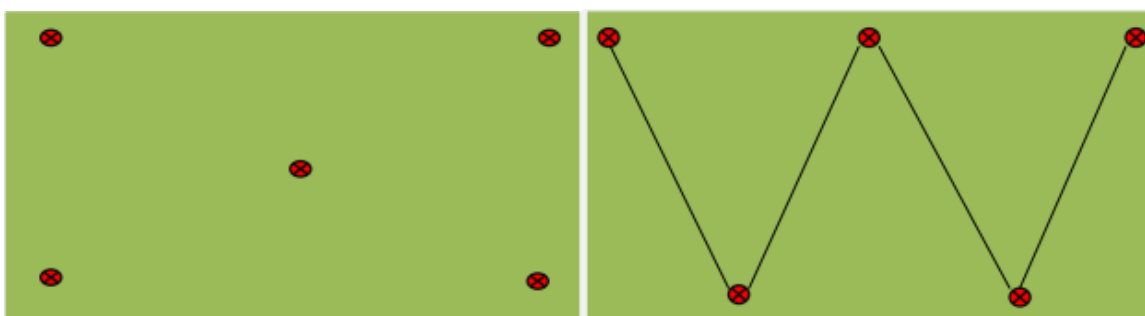
$$I = \frac{\text{Número de plantas enfermas}}{\text{Número de plantas sanas}} \times 100$$

### 3.5 POBLACIÓN

La superficie con respecto al uso actual del suelo que se ocupa para actividades agrícolas en Antonio Ante es de 5058,64 ha (GAD de Antonio Ante, 2012), no existe una información disponible sobre cuantas hectáreas se destinan al cultivo de fréjol en este cantón. Por lo tanto se consideró como población a todos los lotes de cultivo de fréjol, que estaban ubicados en el cantón Antonio Ante, en el momento que se realizó la presente investigación.

### 3.6 MUESTRA

El muestreo se realizó utilizando la técnica del cinco de oro, para la utilización de esta técnica de muestreo se tomó en cuenta las características geográficas y ambientales del área de estudio, por lo tanto, el método más idóneo para este tipo de estudio fue el sistema aleatorio sistemático de cinco puntos, que consiste en fijar cinco puntos, los que permiten hacer una inferencia directa sobre la población independientemente del estado fenológico del cultivo a ser analizado (Senasica, 2010).

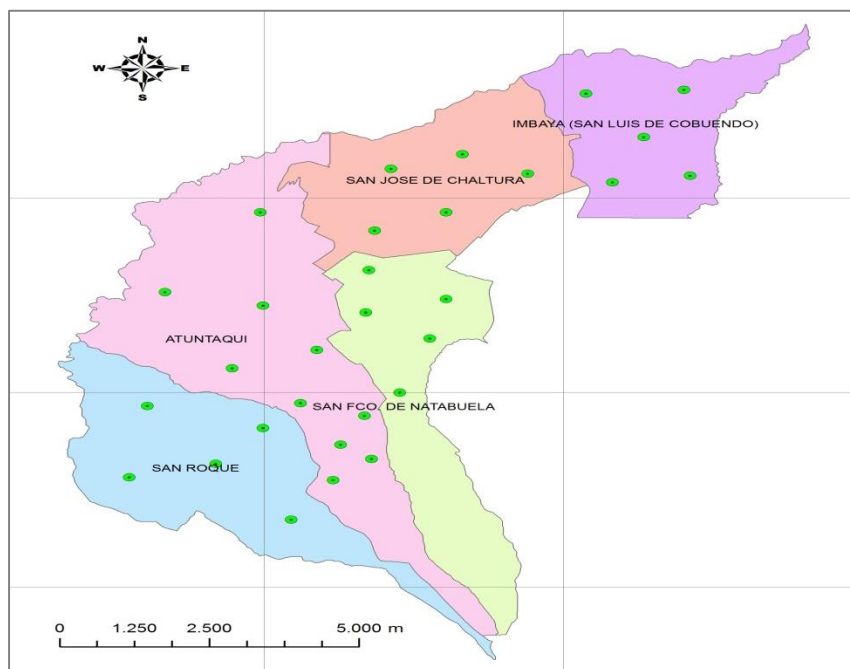


**Figura 3.** Esquema de muestreo aleatorio sistemático de 5 puntos.  
Fuente. (SENASICA, 2010)

### 3.7 MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO

#### 3.7.1 Muestreo

Para la recolección de muestras, primeramente se definió los lugares en los que se procedió a implementar la técnica “cinco de oro” en las seis parroquias a muestreadas, como Imbaya, Chaltura, Natabuela, Andrade Marín, Atuntaqui y San Roque, identificándose 5 estaciones por parroquia, dando un total de 30 estaciones en todo el cantón, recolectándose 8 muestras por cada estación.



**Figura 4.** Mapa de ubicación de las estaciones de muestreo en el cantón Antonio Ante.

El muestreo se lo realizó en las tres primeras semanas de Abril del 2015, a la parte media y superior de plantas, mismas que tenían entre cinco semanas hasta los 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), finalmente se obtuvo un total de 240 muestras de tejido vegetal. Las mismas que fueron empacadas en fundas plásticas, posteriormente identificadas y colocadas en un cooler refrigerado con la finalidad de evitar la deshidratación y oxidación del tejido vegetal. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio de fitodiagnóstico molecular de la FICAYA donde se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

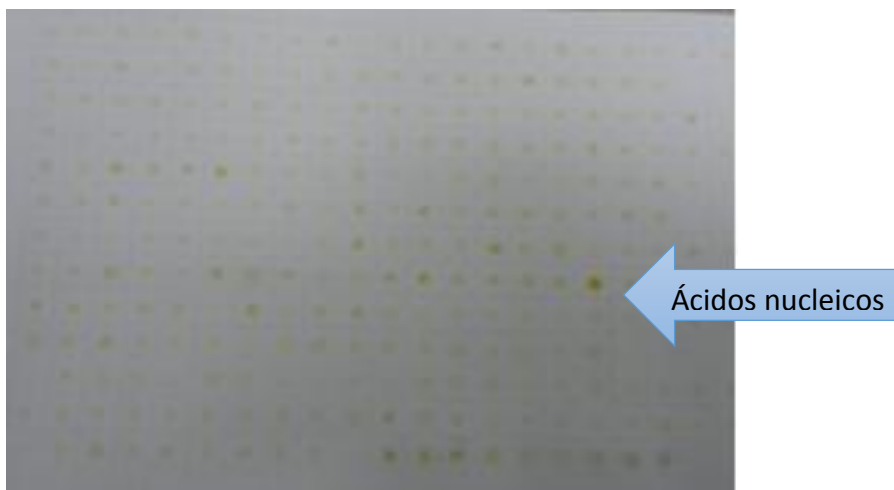
### **3.7.2 Extracción de ácidos nucleicos**

En la extracción de los ácidos nucleicos se utilizó el método descrito por DELLA PORTA, mismo que consistió en homogenizar 1 gramo de tejido vegetal, y se procedió a macerar en 3 ml de tampón de extracción (Citrato sódico 50 mM, pH. 7; EDTA, 5 mM, pH. 8,5) en una funda sellada. Luego se colocó 1,5 ml de extracto a un tubo tipo eppendorf, y seguidamente se centrifugo durante 3 minutos a 10000 rpm.

### **3.7.3 Aplicación de las muestras sobre membranas de Nylon**

Una vez finalizado el proceso de centrifugación se tomó 2  $\mu\text{l}$  del sobrenadante (ácido nucleicos) de cada muestra con la ayuda de una micro pipeta y se impregnó en la membrana

de nylon previamente dividida en cuadros de 0,25 cm<sup>2</sup>; este procedimiento se realizó por duplicado dando un total de 480 impregnaciones.



**Figura 5.** Punto de gota de las muestras, ácidos nucleicos impregnados en membrana de nylon con carga positiva.

#### **3.7.4 Proceso de hibridación**

Para este proceso las muestras se enviaron al Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas de la Universidad Politécnica de Valencia-España.

El proceso de análisis de las membranas inició con la implementación de cuatro controles positivos, los cuales, contenían la secuencia genética de los virus a ser estudiados. Los controles consisten en un método para validar la técnica que se utiliza en esta investigación, ya que si el proceso está mal realizado no se observará señal de hibridación (coloración oscura en los puntos de control), dando a conocer que se falló en los análisis.

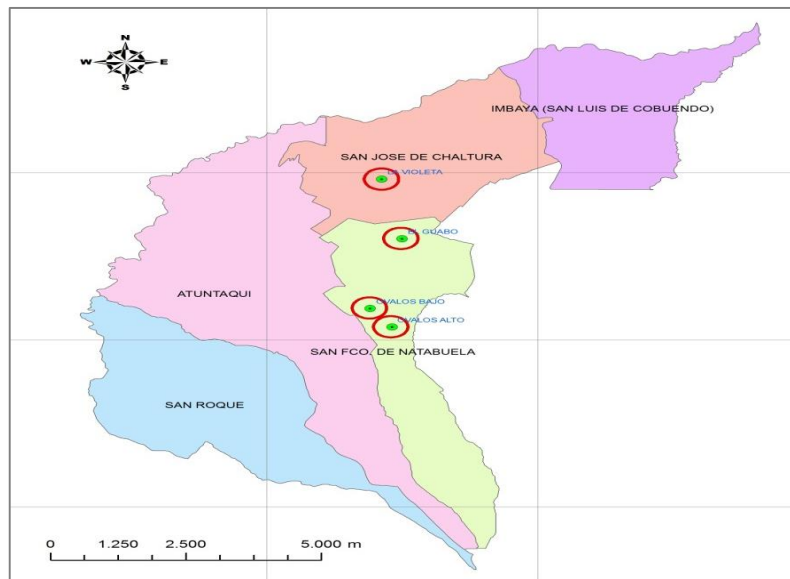
Las membranas se incubaron con un tampón de hibridación (50% formamida, SSC 5x, 0,1% N-Lauroylsarcosine, 0,02% SDS, Blocking reagent solution) a 68°C durante 1 hora. Luego se incubó toda la noche a 55° C con una polisonda diluida en dicho tampón, misma que podía detectar la presencia de 5 virus frecuentes en frejol. Esta polisonda contenía la secuencia de los siguientes virus: CMV, BGMV, BGYMV, AMV, BDMV. 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)). La membrana se lavó con TL dos veces durante 15 minutos, 5 minutos con un tampón que contuvo 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.

### 3.7.5 SEGUNDA PRUEBA

Se muestrea por segunda vez para corroborar los resultados obtenidos del primer muestreo, para esto fue necesario coleccionar hojas de plantas de fréjol, con características de infección viral, entre los que destacan síntomas característicos del Virus del Mosaico de la Alfalfa (AMV) y el Virus del Mosaico del Pepino (CMV) mismos que atacan al cultivo de fréjol y que aún no han sido reportados en el Ecuador.

#### 3.7.5.1 Delimitación del área de estudio para el segundo muestreo



**Figura 6.** Mapa de ubicación de las áreas del segundo muestreo. Sitios donde se recolectó las muestras de tejido foliar.

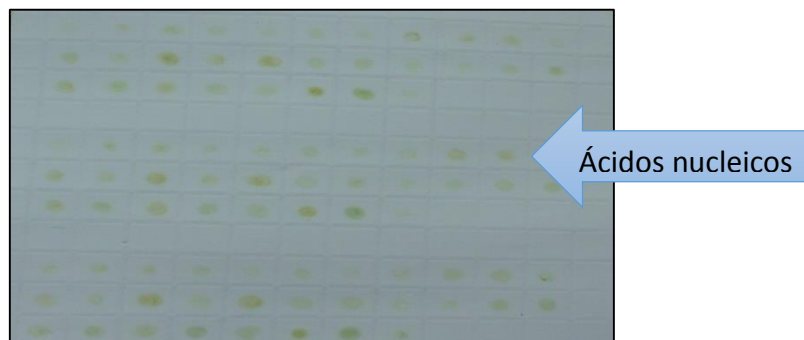
Se recolectaron de forma focalizada 30 muestras de fréjol que mostraban síntomas similares a los producidos por los virus del mosaico del pepino (CMV) y del virus del mosaico de la alfalfa (AMV), sintomatologías observadas en las localidades de Chaltura y Natabuela, tomando en cuenta que estos dos virus se han encontrado en cultivos de fréjol de

distintos países en Sur América (Morales y Castaño, 2008) y que ha sido confirmada la presencia (AMV) en el pimiento dulce cultivado en la parroquia de Chaltura cantón Antonio Ante (Colimba, et al., 2016).



**Figura 7.** Cultivo de fréjol tutorado en rastrojo de tomate de árbol en la parroquia de Chaltura.

Las 30 muestras fueron procesadas con un buffer de extracción diferente al que se utilizó para las primeras muestras, este buffer contenía 7 $\mu$ l de mercaptoetanol por cada ml de buffer, con la finalidad de evitar al máximo la oxidación de las muestras y de esta manera poder obtener un extracto con una mayor cantidad de ácidos nucleicos. Se impregnaron tres repeticiones de cada muestra, dando un total de 90 muestras a analizar en el laboratorio del (IBMCP) Valencia, España.



**Figura 8.** Ácidos nucleicos del segundo muestreo implantados en la membrana de nylon

## CAPITULO IV

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS DE LABORATORIO MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE LA POLISONDA

Los resultados obtenidos de los dos análisis realizados en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas de la Universidad Politécnica de Valencia IBMCP (España), en donde se hicieron las pruebas por el método de hibridación molecular no radioactiva tipo Dot-blot, no detectaron la presencia de ninguno de los virus en estudio. Las muestras no presentaron hibridación, como se puede observar en la figura 9; la no existencia de puntos con coloración oscura, indican una notable diferencia con los controles positivos (parte inferior de la membrana). Estos resultados dan a conocer que los 5 virus analizados no se encuentran infectando al fréjol cultivado dentro del área de estudio.



**Figura 9.** Placa de revelado obtenida a partir del primer muestreo.

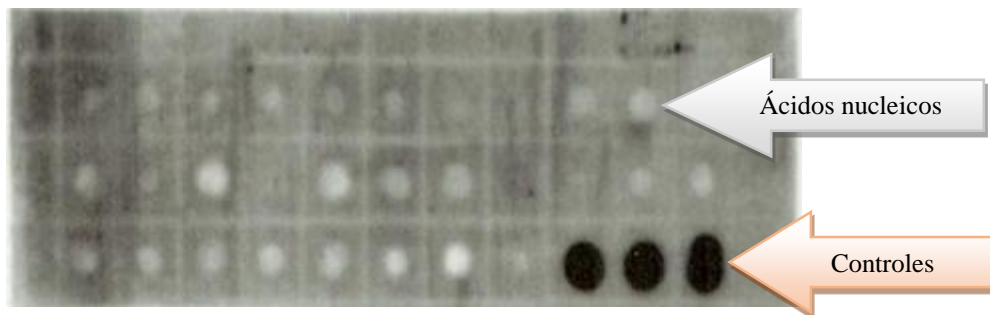
Después de obtener estos resultados se utilizó la fórmula propuesta para calcular la incidencia en donde se determina que los virus analizados en las diferentes localidades de Antonio Ante, presentan una incidencia igual al 0%.

$$I = \frac{\text{Número de plantas enfermas}}{\text{Número de plantas sanas}} \times 100$$

$$I = \frac{0}{240} \times 100 \quad I = 0\%$$



#### 4.1.2. Resultados del segundo análisis



**Figura 10.** Placa de revelado obtenida a partir de la hibridación de gota del segundo análisis.

Al igual que en el primer muestreo presenta una incidencia igual a 0%.

$$I = \frac{\text{Número de plantas enfermas}}{\text{Número de plantas sanas}} \times 100$$

$$I = \frac{0}{30} \times 100 \quad I = 0\%$$

#### 4.2 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este trabajo de investigación se trabajó con el protocolo descrito por DELLA PORTA que ha demostrado ser eficaz en otras investigaciones realizadas en las provincias de Carchi e Imbabura en cultivos de Aguacate (Falcón, 2015) y Pimiento (Colimba et al., 2016), siguiendo la misma línea de trabajo se utilizó el mismo protocolo para la presente investigación con fréjol.

Es importante mencionar que las hojas recolectadas presentaron síntomas virales semejantes a los ocasionados por el AMV y CMV, por lo que era importante confirmar la presencia o ausencia de estos virus en los cultivos de fréjol de este cantón.

Morales y Castaño (2008) manifiestan que los síntomas del virus del mosaico de la alfalfa (AMV) se caracterizan por un amarillamiento notable del área foliar, o un moteado incipiente en variedades moderadamente resistentes.



**Figura 11.** Sintomatología del virus del mosaico común de la alfalfa AMV.  
**Fuente:** Morales y Castaño, 2008



**Figura 12.** Sintomatología del virus AMV, muestra Atuntaqui (A1).

En la Figura 12, se puede observar la sintomatología que presentan las hojas de fréjol encontradas en esta investigación, son similares a las del virus del mosaico común de la alfalfa (Figura 11). Los síntomas que se observó en las hojas fueron, una clorosis intervenal y amarillamiento del área foliar, mismas que describen a la infección causada por el virus del mosaico de la alfalfa.

Todos estos antecedentes y analogías, pueden ser descartados como características de la presencia de AMV en los cultivos de fréjol de Antonio Ante, ya que Prochnow, Morales y Stipp (2009) afirmaron que las deficiencias de Mn y Zn presentan clorosis intervenal muy visibles en el área foliar de las plantas y el Zn en algunas especies manifiesta su deficiencia en manchas cloróticas entre las nervaduras. Conforme avanza la carencia puede llegar a ser confundida con una deficiencia de magnesio Casas y Casas (1999).

Casas y Casas, (1999) nos indican que los niveles normales de Mn, están en un rango superior a 100 mgkg<sup>-1</sup>, para Zinc superior a 35 mgkg<sup>-1</sup>. Indicando también que los niveles deficientes para Manganeso son inferiores a 40 mgkg<sup>-1</sup> y para Zinc menores a 28 mgkg<sup>-1</sup>.

Por este motivo se realizó un análisis foliar (Anexo 5), de las hojas con sintomatología recolectadas en el cantón Antonio Ante, el mismo que reveló que los niveles de Mn y Zn en hojas que presentan estas características no eran los adecuados, estaban por debajo de los requeridos para el cultivo de fréjol, lo antes mencionado justifica las expresiones sintomatológicas observadas en esta investigación. Que en mayor detalle se puede observar en los resultados de los análisis foliares en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Resultados de los análisis foliares (ANEXO 5)

<b>RESULTADOS OBTENIDOS DEL ANALISIS FOLIAR</b>						
<b>Elemento</b>	<b>M1= AM14</b>	<b>M2 = I 36</b>	<b>M3 = A1</b>	<b>M4 = N39</b>	<b>M5 = N 10</b>	<b>Unidad</b>
Mn	42	35	32	37	44	mg.kg <sup>-1</sup>
Zn	23,4	58,9	27,6	89	26	mg.kg <sup>-1</sup>

**Fuente:** Elaboración propia

En lo que respecta a sintomatologías características del virus del mosaico común del pepino (CMV), presenta mosaicos, deformaciones foliares, incluyendo ampollas, de estos síntomas el ahusamiento foliar es el más frecuente, asociado a la presencia de cepas de CMV en el fréjol común (Morales y Castaño, 2008).



**Figura 13.** Sintomatología perteneciente al virus del mosaico común del pepino CMV.

**Fuente:** (Morales y Castaño, 2008)



**Figura 14.** Sintomatología del virus CMV, muestra Natabuela (N12).

En la Figura 14 se puede observar sintomatología similar a la ocasionada por el CMV que ha sido reportados en cultivos de fréjol en países de Sur América como Argentina, Colombia y Chile, capaz de infectar fréjol común y otras 775 especies de plantas (Morales y Castaño, 2008). Sin embargo, en este estudio fue descartada la presencia en el área muestreada, por lo tanto los síntomas con características similares de CMV encontradas, podrían estar ocasionados por otras causas que no fueron objeto de esta investigación.

Andrade y Ayala (1994-1995) usando la prueba serológica ELISA detectaron la presencia en la provincia de Imbabura de los virus mosaico común del fréjol (BCMV) y del virus mosaico amarillo del fréjol (BYMV). Mismos que no se tomaron en cuenta en esta investigación por haber sido detectados anteriormente, de esta manera se justifica por

qué las sintomatologías encontradas el cultivo de fréjol estaban estrechamente asociadas a estos virus.

La técnica que fue utilizada en esta investigación se la conoce como hibridación en Dot blot, misma que posee una mayor sensibilidad que la PCR, ya que puede detectar la presencia del agente viral sin la necesidad de replicarse (Vaca, Betancurt y López, 2011). Además la PCR requiere abundantes copias del gen viral de tal manera que le permita incrementar una fracción del DNA. Estudios de detección de agentes virales han demostrado que la sensibilidad entre las técnicas de hibridación Dot Blot es reducida con la PCR, por lo tanto es recomendada su uso para estudios de diagnósticos virales masivos (Beltrán, 2013 y Hernández et al., 2013).

La hibridación molecular Dot Blot presenta varias ventajas científicas y económicas sobre la PCR, como por ejemplo la factibilidad de manipulación, una reducida contaminación (Iglesia, Arocha, Peralta y Álvarez, 2005), la hibridación molecular es una técnica de diagnóstico confiable para la detección de agentes virales y da un medio más económico y rápido para la detección (Sánchez-Navarro, 2014; Pallas et al., 2010 y Beltrán, 2013).

Al término de esta investigación, se pudo generar información respecto a enfermedades virales que posiblemente estaban presentes en las áreas estudiadas de Antonio Ante en las que se cultiva fréjol, de esta forma se establece la ausencia de los virus analizados, dando un valor positivo a la calidad de producto obtenido en esta zona productora del Ecuador.

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

#### **CONCLUSIONES**

- Se constató la ausencia de los virus CMV, BGMV, BGYMV, AMV y BDMV mediante el uso de la técnica hibridación molecular en Dot-blot con sondas no radiactivas múltiples en fréjol. Por lo que no se identifica presencia alguna de estos virus en los sembríos de frejol en Antonio Ante.
- Se determinó que las sintomatologías que presentaron las plantas evaluadas en este trabajo son causadas por deficiencias nutricionales, y no por virus; sus síntomas son muy semejantes a las que se expresan cuando hay presencia de éstos.

## RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar más estudios de investigación, para conocer sobre el estado fitosanitario de las plantas en lo que respecta a infecciones virales que pudieran estar presentes en los cultivos con importancia económica de la región.
- Antes de realizar trabajos para determinar la presencia de patologías virales se sugiere determinar mediante análisis foliar el estado nutricional de las plantas que presenten sintomatologías similares a las causadas por virus, ya que pueden estar directamente relacionadas a deficiencias nutricionales y no a virus. Esto ahorrará tiempo y recursos en la obtención de resultados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, J. y Ayala, L. (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.*
- Ares, D., Tabasco, A., & Andueza, (2014). *Detección de enfermedades virales en la judía (Phaseolus vulgarisy Ph. coccineus) de El barco de Ávila.* España.
- Azizi, A., & Shams-bakhsh, M. (2014). Impact of cucumber mosaic virus infection on the varietal traits of common bean cultivars in Iran. *VirusDisease*, 25(4), 447-454.
- Batista, L., Peña, I., López, D., Pérez, J., & Llauger, R. (2008). Técnicas de diagnóstico de enfermedades que afectan a los cítricos. *Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical.* La Habana, Cuba.
- Beltrán Peña, H. (2013). *El viroide de la mancha de sol del aguacate en Michoacán: detección y manejo.* (Tesis doctoral). Colegio de Postgraduados. Montecillo-México.
- Casas, A., & Casas, E. (1999). *Análisis de suelo-agua-planta y su aplicación en la nutrición de los cultivos hortícolas en la zona del sureste peninsular.* Caja Rural de Almería.
- 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*, 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)
- Cuéllar, M., Morales, F., & Lerma, J. (2011). Resistencia genética al Virus del Arrugamiento Foliar del Fréjol transmitido por Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 37(1), 8-15.

- 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. Ibarra, Ecuador.
- GAD de Antonio Ante. (2012) *Plan de desarrollo y ordenamiento territorial de Antonio Ante 2012- 2030.* Recuperado de <http://sni.gob.ec/planes-de-desarrollo-y-ordenamiento-territorial>
- Gergerich, R. y Dolja, V. (2006). Traducido por Giammaría, S. (2010) *Introducción a los virus vegetales, el enemigo invisible.* Recuperado de <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/PathogenGroups/Pages/PlantVirusesEspañol.a.spx>
- González, A. (2004). Virus fitopatógenos transmisibles por semilla en judía tipo" granja asturiana. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 30, 595-603.
- Gómez, G., & Pallás, V. (2004). A long-distance translocatable phloem protein from cucumber forms a ribonucleoprotein complex in vivo with Hop stunt viroid RNA. *Journal of virology*, 78(18), 10104-10110.
- Gómez, G., Martínez, G., & Pallás, V. (2009). Interplay between viroid-induced pathogenesis and RNA silencing pathways. *Trends in plants ciencia*, 14(5), 264-269.
- Gomez, G., Torres, H., & Pallas, V. (2005). Identification of translocatable RNA-binding phloem proteins from melon, potential components of the long-distance RNA transport system. *The Plant Journal*, 41(1), 107-116.
- Hamada, S., Ishiyama, K., Sakulsingharo, C., Choi, S., Wu, Y., Hwang, C., Singh, S., Kawai, N., Messing, J., and Okita, T.W. (2003). Dual regulated RNA transport pathways to the cortical region in developing rice endosperm. *Plant Cell*, 15, 2265– 2272.



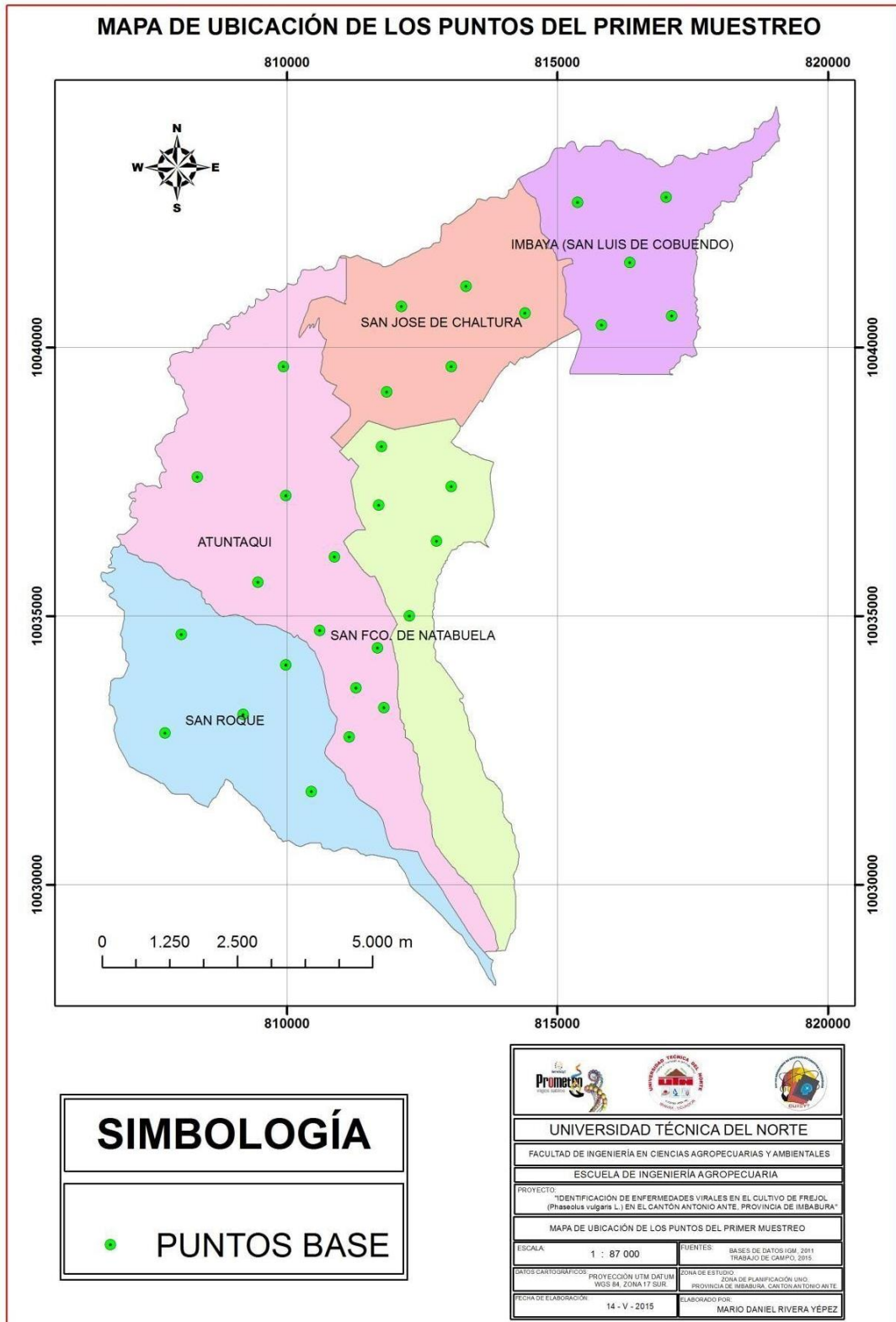
- Hassan M, Gómez G, Pallás V, Myrta A and P. Rysanek (2009) Simultaneous detection and genetic variability of Stone fruit viroids in Czech Rep. *Eur. J. of Plant Pathology*, 124, 363-368.
- Hernández, R, Fernández, C. y Baptista, M. (Quinta Edición). (2010). *Metodología de la investigación*. Ciudad de México, México: McGRAW-HILL /31INTERAMERICANA EDITORES, S.A. DE C.V.
- Hernández, V., Vargas, M., Maruaga, J., Delgado, S. y Pérez, N. (2013). Origen, Domesticación y Diversificación del Frijol Común Avances y Perspectivas. *Fitotec. Mex*, Vol. (36) p.02. Recuperado de <http://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/36-2/1a.pdf>
- Iglesia, A., Arocha, Y., Peralta, E. L., & Alvarez, E. (2005). Detección de Leifsonia xyli subsp. Xyli mediante hibridación de ácidos nucleicos no radiactiva. (Spanish). *Revista de Proteccion Vegetal*, 20(3), 156-160
- INEC. (2013). *estadísticas agropecuarias* Recuperado de: <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-agropecuarias-2/>.
- 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
- Martínez, F. (2014). *Análisis de la dinámica de replicación de virus de RNA y de plantas y de uso de RNAs artificiales como estrategia antiviral* p. 25-26
- Martínez, G., Forment, J., Llave, C., Pallás, V., & Gómez, G. (2011). High-throughput sequencing, characterization and detection of new and conserved cucumber microRNAs. *PLoSOne*, 6(5), e19523.
- Maule, A., Hull, R. & Donson, J. (1983). The application of spot hybridization to the detection of DNA and RNA viruses in plant tissues. *J. Virol. Methods*, 6, 215-24.
- Mena, J. y Ríos, J. (2010) *Manual de virus (Virus Fitopatógenos)*. Recuperado: de <http://es.slideshare.net/themena1/manual-de-virus-virus-fitopatgenos-5039306>
- Morales, F. (2003). *Common bean*. In *Virus and virus-like diseases of major crops in developing countries* (pp. 425-445). Springer Netherlands.
- Morales F. y Castaño M. (2008). *Enfermedades Virales del Frijol Común en América Latina*. Colombia: Francisco José Escobar Correa Feriva S.A.

- Ormeño, J. & 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 en 25 de Agosto de 2015, de [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0365-28072005000400001&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-28072005000400001&lng=es&tlng=es). 10.4067/S0365-28072005000400001
- Owens, R.A. and Diener, T.O. (1981) Sensitive and rapid diagnosis of Potato spindle tuber viroid disease by nucleic acid hybridization. *Science*, 213, 670-672
- Pallas V, García JA. (2011). How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *J Gen Virol*, 92 :2691-705. doi: 10.1099/vir.0.034603-0.
- Pallas V, Martínez G, Gomez G. (2012) The interaction between plant viroid-induced symptoms and RNA silencing. *Methods Mol Biol*, 2012;894:323-43. doi: 10.1007/978-1-61779-882-5\_22
- Pallas, V., Sanchez-Navarro, J., Aparicio, F., Herranz, MC., (2010). Sistema de Diagnostico multiple para virus y Viroides. *Clasificación Internacional de Patentes: C12Q1/68M10, C12Q1/70B*.
- Peña, Z., & Trujillo, G. (2006). Metodologías para la extracción de virus provenientes (L.) y frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Revista de la Facultad de Agronomía*, 23(4).
- 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*.
- Pierce, W. (1934). *Viroses of the bean*. *Phytopathology*, 24, 87-115. Recuperado de <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=catalco.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=052946>.
- Prochnow, L., de Moraes, M. F., & Stipp, S. (2009). Micronutrientes. *Actas Simposio Fertilidad*, (pp. 12-13).
- Rubio-Cabetas, M., Montañés, M., Alonso, J., Pallás, V., Martínez, G. and Gómez, G. (2012). Incidence of peach latent mosaic viroid (plmvd) in a prunus persica bastch germplasm collection in Spain. *Acta Hort*, 940:687-692

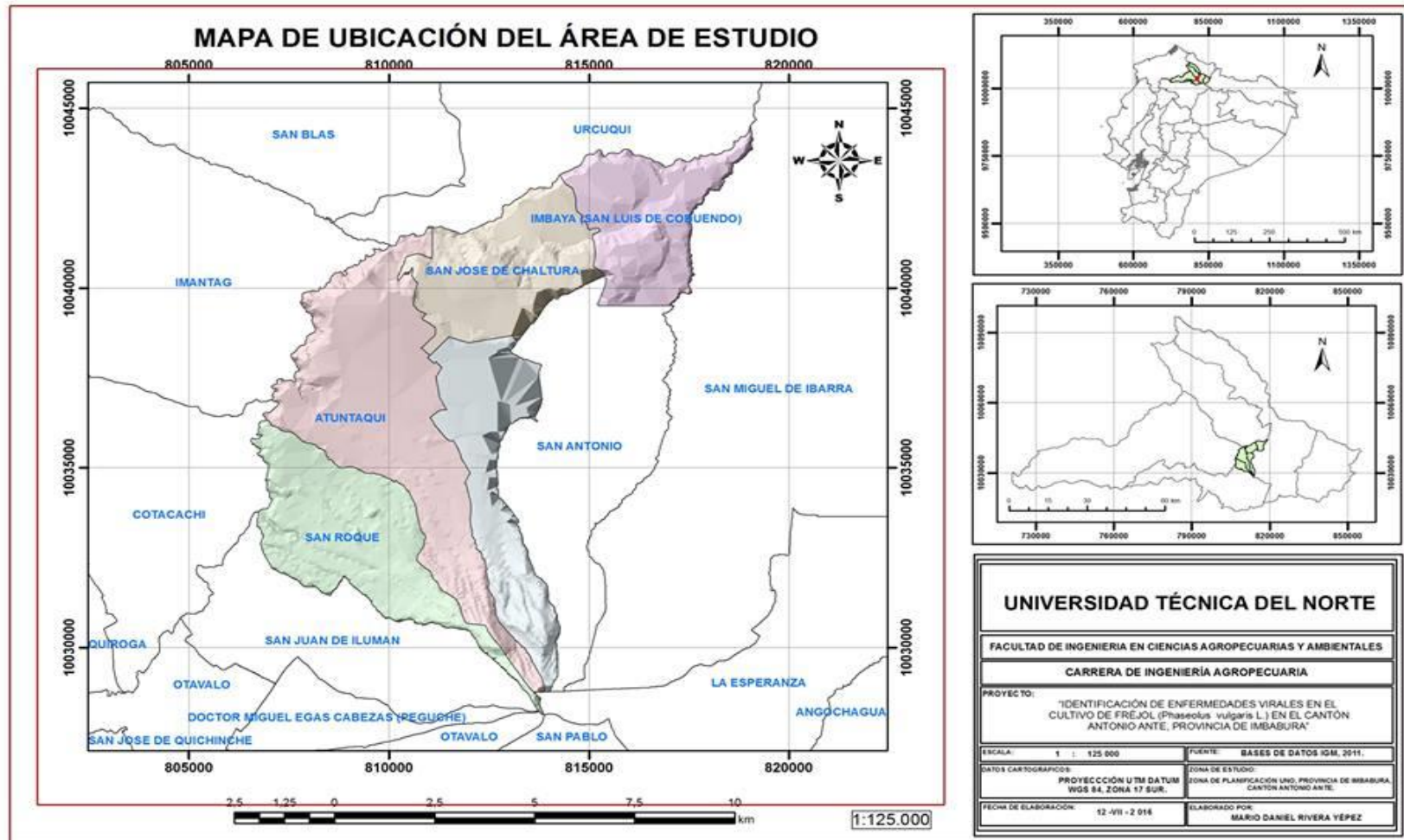
- Rodríguez Pardina, P., Truol, G., Arneodo, J., & Laguna, I. G. (2003). *Enfermedades virales en cultivos de poroto en el noroeste argentino*. *IDIA*, 21, 125-129.
- Ruchansky, D. (2011). *Introducción a la virología*. Recuperado de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/bacto/introvir2011.pdf>
- Sánchez-Navarro, J. (2014). Nuevas tendencias en la detección de virus de plantas: detección de todos los patógenos de un cultivo por hibridación molecular. *Revista Mexicana de Fitopatología*, Vol.32. Recuperado de <http://infit>.
- 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/sitev001/assets/manual\\_muestreo\\_plaguicidas\\_senasica.pdf](http://www.agrolab.com.mx/sitev001/assets/manual_muestreo_plaguicidas_senasica.pdf)
- Somma, M., & Querci, M. (2011). Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos. *Sesión n°4. Extracción y purificación de ADN*.
- 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, J., Betancurt, J. & 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.
- Vidal, I. (2011). *Epidemiología de Plum pox virus y Citrus tristeza virus en bloques de plantas de vivero. Métodos de control* (Doctoral dissertation).
- Villalobos, V. M., & Thorpe, T. A. (1991). *Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones prácticas*. CIAT, 127-142.

## **ANEXOS**

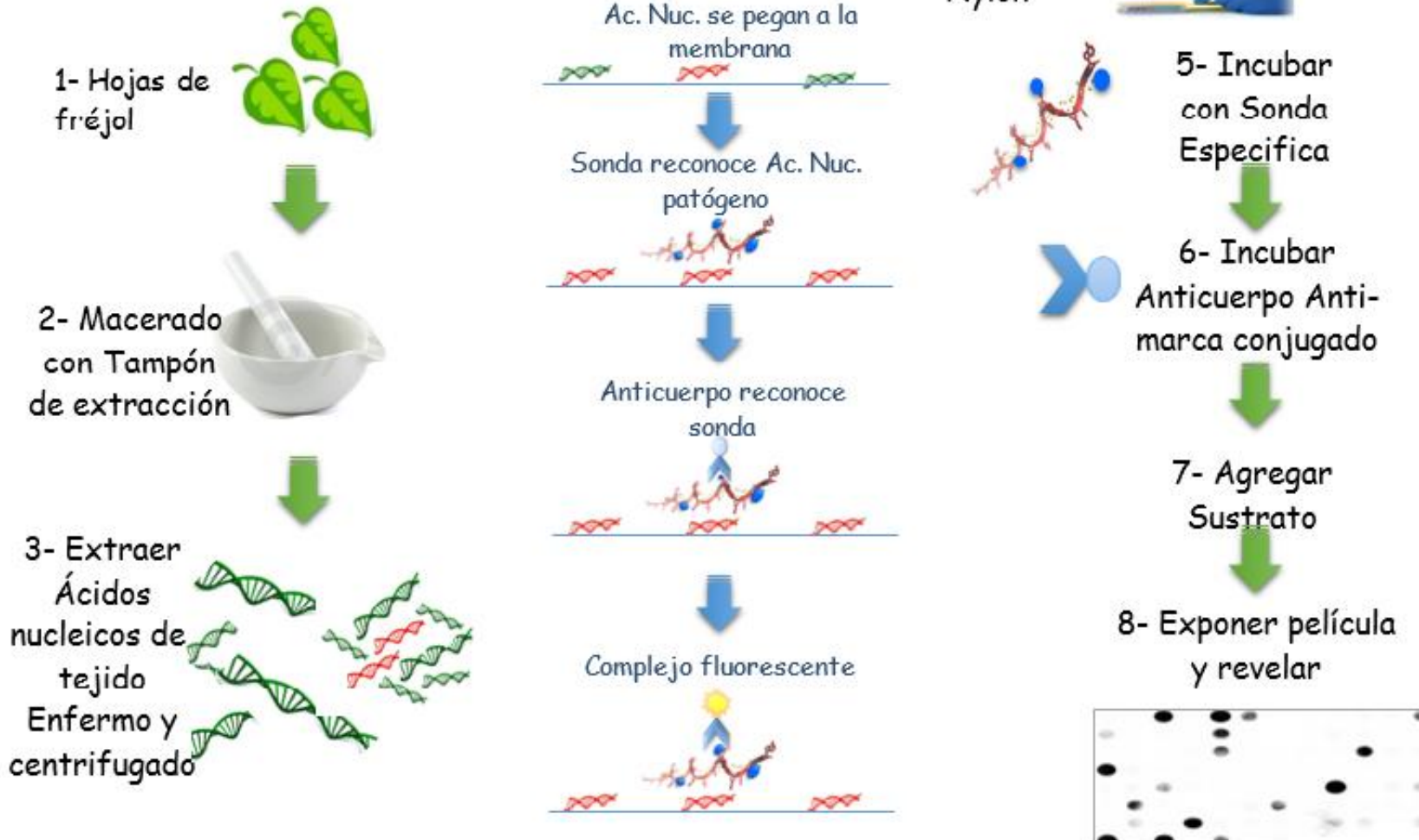
Anexo 1. Mapa de ubicación de los puntos del primer muestreo.



Anexo 2. Mapa de ubicación del área de estudio.

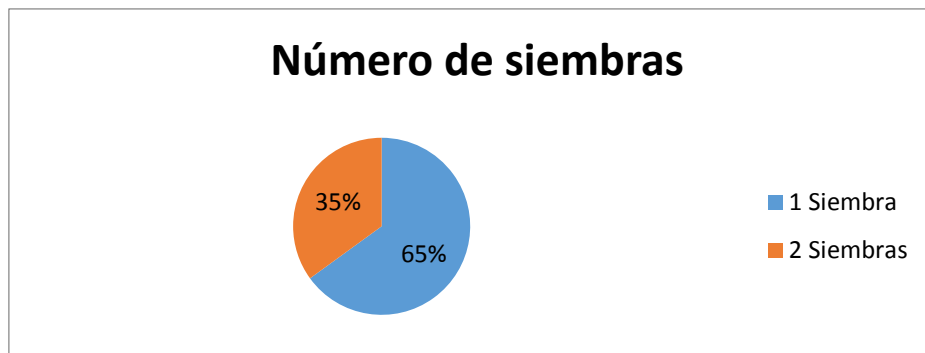


## Hibridación con sondas de RNA

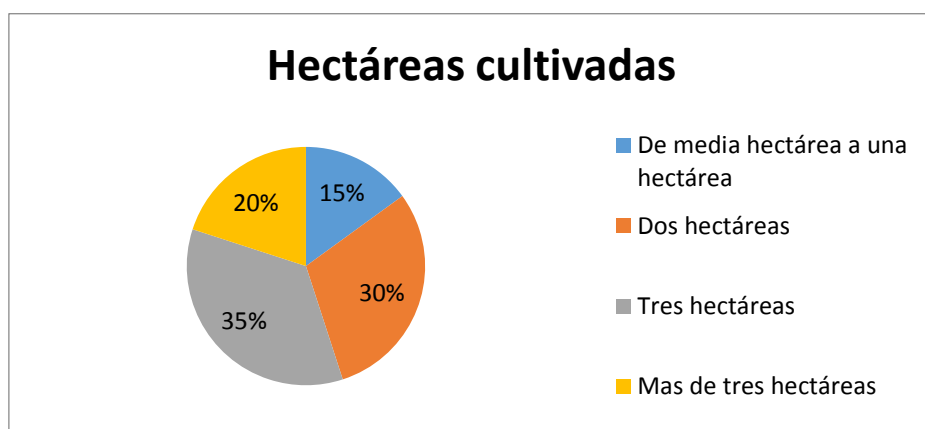


**Anexo 4.** Encuesta para determinar los conocimientos sobre enfermedades virales, realizadas a los productores de fréjol del cantón Antonio Ante.

1) ¿Cuántas siembras de fréjol realiza al año?

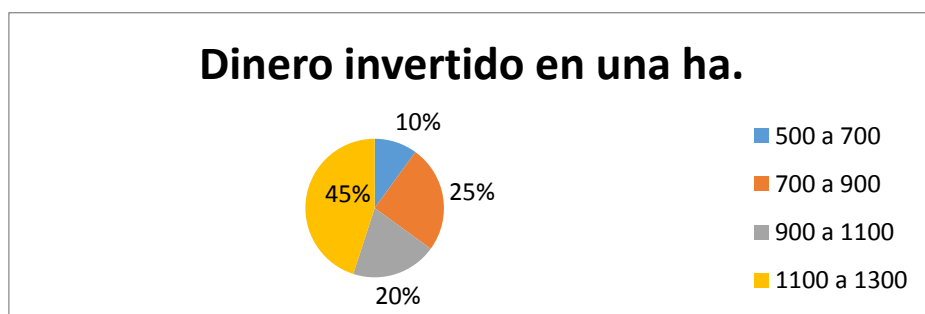


2) ¿Qué superficie de terreno destina a este tipo de cultivo?



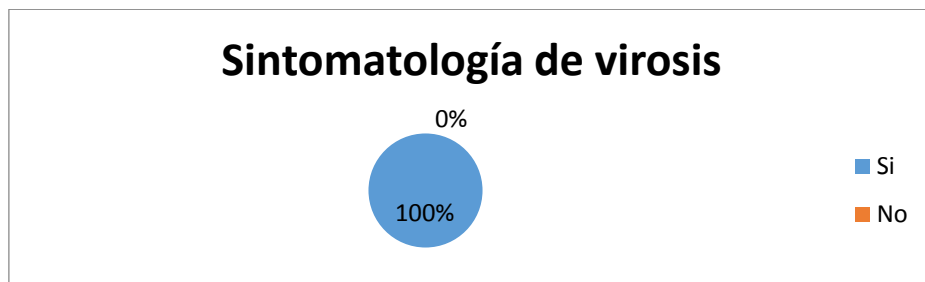
3) ¿Cuánto invierte en dinero usted, en una hectárea de terreno?

500 a 700, 700 a 900, 900 a 1100, 1100 a 1300

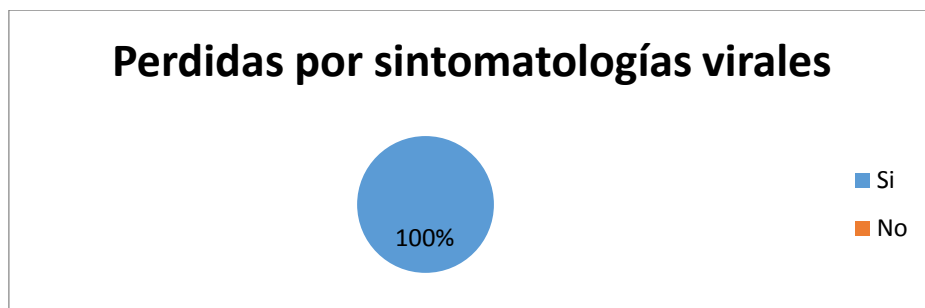




- 4) ¿Ha observado en sus cultivos achaparramiento de las platas acompañado de deformaciones y mosaicos (partes amarillas) en las hojas? (Si...), (No...).

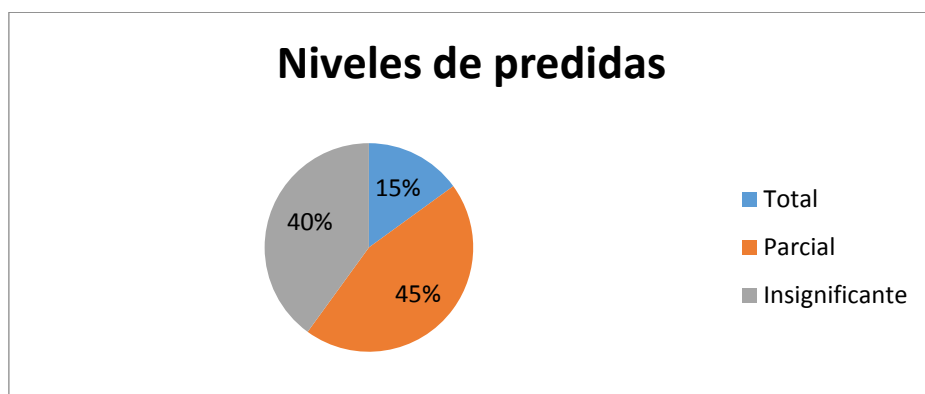


- 5) ¿Ha perdido alguna vez su cultivo por causa de los síntomas antes mencionados? (Si...), (No...).



- 6) ¿La pérdida por estas afectaciones ha sido?

Total\_\_\_\_\_ Parcial\_\_\_\_\_ Insignificante\_\_\_\_\_



- 7) ¿En qué etapa del cultivo ha visto usted que se presentan estos síntomas?

Al inicio\_\_\_\_\_ A mediados\_\_\_\_\_ Al Final\_\_\_\_\_

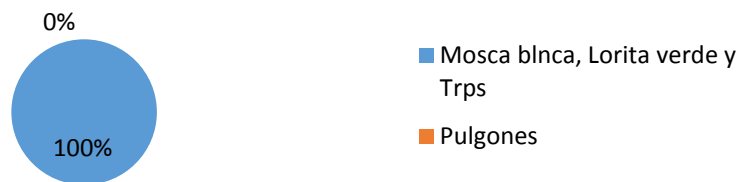
### Manifiesto de síntomas



8) ¿Ha observado en su cultivo la presencia de insectos cómo?

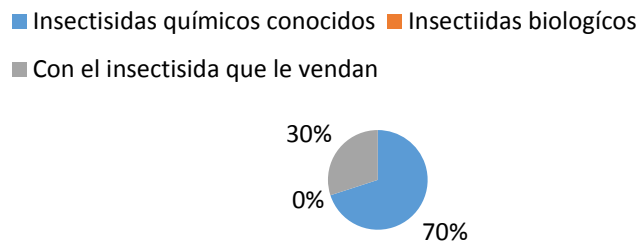
Mosca blanca\_\_\_\_ Loritos\_\_\_\_ Trips\_\_\_\_ Pulgones\_\_\_\_

### Insectos vectores de virus



9) ¿Con que controla usted estos insectos?

### Ventas



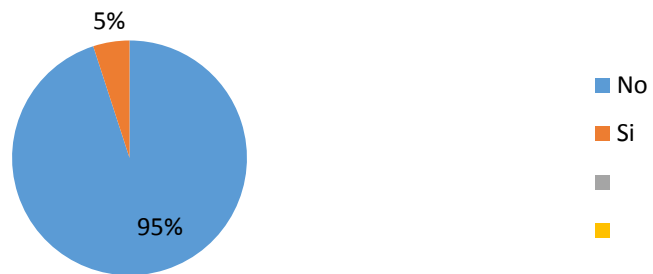
10) ¿Cuántos controles químicos realiza usted en el ciclo de cultivo?

### Controles químicos



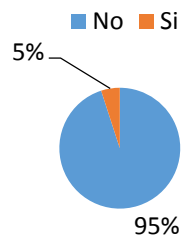
11) ¿Conoce usted algo sobre las enfermedades virales en fréjol?

### Productores encuestados




12) ¿Sabía que el achaparramiento y los mosaicos en el frejol son causados por virus?  
(Si...), (No...).

### Productores encuestados



**Anexo 5.** Análisis foliar para determinar el estado nutricional de 5 muestras con sintomatología viral.



## UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

UNIVERSIDAD ACREDITADA RESOLUCIÓN 002 – CONEA – 2010 – 129 – DC.  
Resolución No. 001 – 073 – CEAACES – 2013 – 13

### FICAYA

*Laboratorio de Análisis Físicos, Químicos y Microbiológicos*

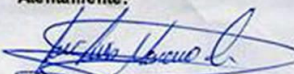
Informe N°:	127 - 2015
Análisis solicitado por:	Sr. Daniel Rivera
Empresa:	No aplica
Muestreado:	No aplica
Fecha de recepción:	14 de diciembre de 2015
Fecha de entrega informe:	18 de diciembre de 2015
Ciudad:	Ibarra
Provincia:	Imbabura
Muestra:	Hojas de fréjol
No. de Lote	No aplica


Parámetro Analizado	Unidad	Resultado					Metodo de ensayo
		M1	M2	M3	M4	M5	
Manganeso (Mn)	ppm	0,42	0,35	0,32	0,37	0,44	Espectrofotometría de Absorción Atómica (llama)
Zinc (Zn)	ppm	0,234	0,589	0,276	0,89	0,26	

**Los resultados obtenidos pertenecen exclusivamente para las muestras analizadas**

Atentamente:



Bloq. José Luis Moreno  
Técnico de Laboratorio



**Visión Institucional**  
La Universidad Técnica del Norte en el año 2020, será un referente en ciencia, tecnología e innovación en el país, con estándares de excelencia institucionales.

Av. 17 de Julio S-21 y José María  
Córdova. Barrio El Olivo  
Teléfono: (06)2997800  
Fax: Ext. 7711  
Email: utn@utn.edu.ec  
www.utn.edu.ec  
Ibarra - Ecuador

# FOTOGRAFÍAS

## RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS



**Foto 1.** Fréjol con características virales



**Foto 2.** Identificación de la muestra



**Foto 3.** Buffer de extracción de RNAs



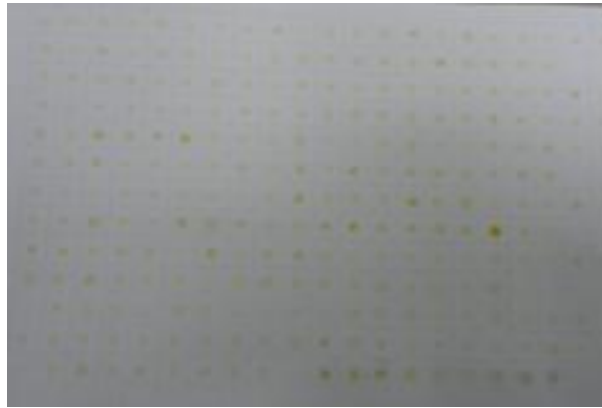
**Foto 4.** Extracción de ácidos nucleicos



**Foto 5.** Centrifugado de muestras



**Foto 6.** Impregnación en membrana de Nylon

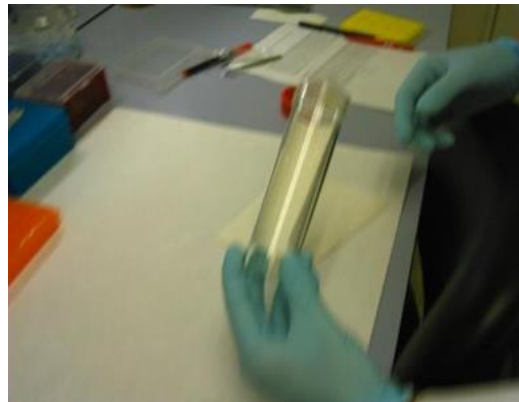


**Foto 6.** Punto de gota de ácidos nucleicos

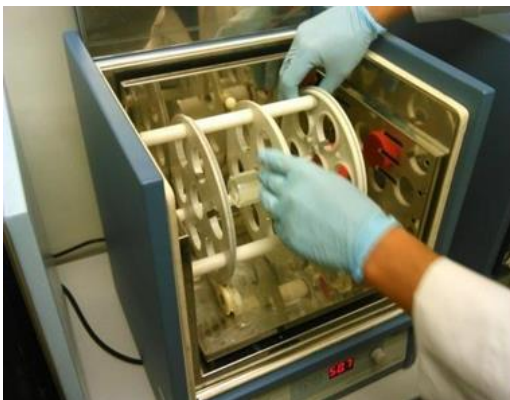
## PROCESO DE HIBRIDACIÓN



**Foto 7.** Tampón de hibridación



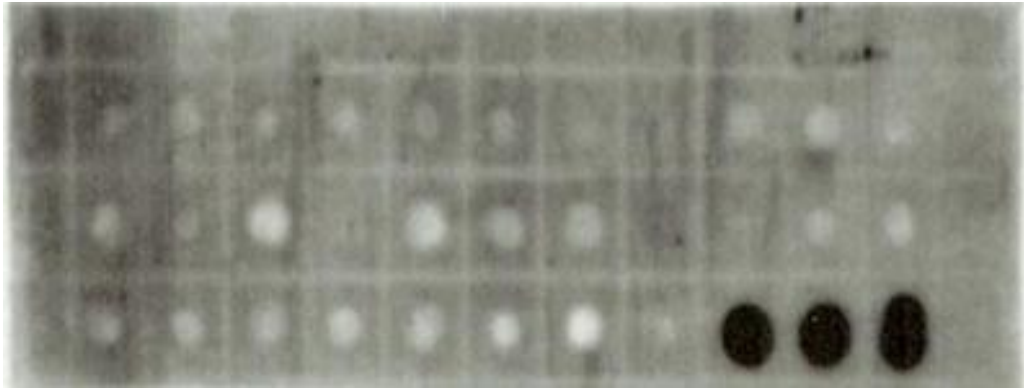
**Foto 8.** Incorporación de la membrana de nylon



**Foto 9.** Colocación del tubo en el horno hibridación



**Foto 10.** Hibridación de la membrana



**Foto 11.** Placa de revelado de las muestras analizadas