

Nº. 6 Febrero 1996

INIAP

REVISTA INFORMATIVA DEL INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO
DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS

- **Híbridos de arroz**
- **Biotecnología**
- **Leguminosas forrajeras**
- **Monitoreo de mosca en soya**
- **Nuevas variedades de papa**

ECUADOR

ESTUDIO DE LAS ENFERMEDADES VIRALES DEL FREJOL (*Phaseolus vulgaris* L) EN LA SIERRA ECUATORIANA Y EVALUACION DE LA RESISTENCIA VARIETAL EN GENOTIPOS DE FREJOL VOLUBLE

Jorge Andrade Piedra y Ligia Ayala*

Estación Experimental Santa Catalina, INIAP, Bean/Cowpea Collaborative Research Support Program (CRSP)

INTRODUCCION

El fréjol constituye la principal leguminosa comestible en el Ecuador. Se la cultiva principalmente en la región interandina en monocultivo o en asociación con maíz. Entre 1200 y 2200 m.s.n.m. se siembran variedades de tipo arbustivo sin asociación, en tanto que entre 2000 y 28000 m.s.n.m. se siembran variedades volubles en asociación con maíz (IICA-BID-PROCIANDINO, 1987).

Las enfermedades virales de este cultivo pueden llegar a ser devastadoras (Silbernagel, 1991) como lo demuestran las epifitias del Virus del Mosaico Dorado en América Central, Argentina y Brasil y la provocada por el Virus del Mosaico Enano en Argentina (Beebe y Pastor Corrales, 1991), o pueden coexistir con el cultivo ocasionándole daños que varían de moderados a severos como es el caso del Virus del Mosaico Común del fréjol (BCMV), Bean Common Mosaic Virus que se halla presente en todo el mundo (Drijfhout, 1978).

*En el Ecuador desde 1977 (INIAP, 1977) se menciona al Mosaico Común del fréjol como una de las enfermedades más diseminadas en Pichincha e Imbabura, así como la más peligrosa por su severidad. En 1978 (INIAP, 1978) en San José de Imbayas y Santa Catalina se reporta a la virosis como la enfermedad más prevalente. En 1981 (INIAP, 1981) se estudió su distribución hallándose la enfermedad en todo el Callejón Interandino. En las provincias de Azuay, Cañar y Loja este problema es de singular importancia encontrándose incidencias hasta de 100% (Ayala, 1993). Se ha observado como la principal enfermedad del cultivo antes de antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*), roya (*Uromyces phaseoli*) y *Ascochyta* (*Ascochyta phaseolorum*) (Gálvez et al, 1989).*

Adicionalmente se ha reportado en el país el Mosaico Rugoso (INIAP, 1984 ; Orellana y Padilla, 1985), el Mosaico Enano antes conocido como Moteado Clorótico (INIAP, 1981) y el Mosaico Amarillo del fréjol (INIAP, 1978). Sin embargo, todas estas identificaciones fueron realizadas únicamente en base a sin-



Micrografía electrónica del virus que causa los síntomas del mosaico común.

tomatología y no se las ha confirmado mediante técnicas más confiables.

Los métodos de control de estos patógenos están directamente relacionados al tipo de virus, características de infectividad, rango de hospederos, formas de transmisión, etc., por lo tanto es indispensable conocer la identidad del virus para definir las estrategias de control. En el caso específico del Mosaico Común del fréjol el método de control más efectivo es el uso de variedades resistentes. El tipo de resistencia a utilizar depende de la cepa del virus que se quiera combatir ya que este patógeno ha desarrollado una amplia variabilidad genética expresada en 10 cepas (Drijfhout, 1978).

En base a lo expuesto y con el apoyo del proyecto Bean/Cowpea CRSP se realizó esta investigación con los objetivos de identificar los virus existentes en el fréjol en la región interandina; identificar las cepas de BCMV y determinar resistencia o susceptibilidad de 31 genotipos de fréjol voluble a las cepas identificadas de BCMV en condiciones de invernadero.

** Técnicos del Departamento de Protección Vegetal, EESC, INIAP. Apartado 340, Quito, Ecuador*

IDENTIFICACION DE LOS VIRUS DE FREJOL EN LA REGION INTERANDINA

Se realizó un muestreo en las provincias de Imbabura, Chimborazo, Azuay, Cañar y Loja obteniéndose 60 muestras con virosis aparente, de las cuales se seleccionaron cinco aislamientos para ser identificados. La caracterización se realizó mediante sintomatología, tamaño y forma de la partícula viral, rango de hospederos, métodos de transmisión, persistencia de la infectividad de la savia y serología (ELISA indirecta).

El aislamiento Imbabura 1 presentó en fréjol un mosaico amarillo. Su partícula viral correspondió al grupo de los potyvirus (789 x 15 nm). Fue transmitida de una manera no persistente por el áfido *Myzus persicae* pero no mediante semilla. Su punto de inactivación térmica (PIT) fue de 55°C, longevidad *in vitro* (LIV) de 2 días y punto de dilución final (PDF) de 10³. Al ser inoculado en *Chenopodium quinoa* se observó lesiones cloróticas locales; en *Vicia faba* produjo amarillamiento de venas; en *Pisum sativum* presentó amarillamiento de venas y necrosis en el tallo y en *Nicotiana clevelandii* se evidenció amarillamiento de venas y un ligero enrollamiento de las hojas. Pruebas serológicas utilizando antisuero policlonal concluyeron que el aislamiento Imbabura 1 se halló infectado por el Virus del Mosaico Amarillo del fréjol (BYMV, Bean Yellow Mosaic Virus).

Las muestras Imbabura 2, Azuay y Chimborazo presentaron en el fréjol síntomas característicos de Mosaico Común. Sus partículas virales correspondieron al grupo de los potyvirus (750-773 x 14 - 15 nm). Fueron transmitidas por *Myzus persicae* en forma no persistente y también a través de semilla. Sus PIT variaron entre 55 y 60°C, LIV de 8 días y PDF entre



10³ y 10⁴. *C. quinoa* produjo lesiones locales, *V. faba* y *N. clevelandii* produjeron infecciones sistémicas asintomáticas y *P. sativum* fue inmune. Para las pruebas serológicas se emplearon dos antisueros monoclonales: el primero que reconoció el serogrupo A del BCMV y el segundo los serogrupos A y B de este virus. La muestra Imbabura 2 reaccionó frente a ambos antisueros, en tanto que las muestras Azuay y Chimborazo lo hicieron solo al antisuero del Serogrupo A y B. Estos resultados confirmaron que las tres muestras se hallaron infectadas por el BCMV; Imbabura 2 perteneció al serogrupo A y Azuay y Chimborazo al serogrupo B.

La muestra Loja presentó en fréjol un amarillamiento de venas muy pronunciado y ahusamiento de folíolos. Su partícula viral fue isométrica (28 nm). Fue transmitida por semilla y por el crisomélido *Ceratomyza sp.* pero no por *Myzus persicae*. Su PIT fue de 90°C, LIV de 32 días y PDF de 10⁶. *C. quinoa*, *V. faba*, *P. sativum* y *N. clevelandii* fueron inmunes infectándose únicamente tres variedades de fréjol. Al ser probada frente a antisuero policlonal del Virus del Mosaico Sureño del fréjol (BSMV, Bean Southern Mosaic Virus) confirmó la presencia de este virus.

Los virus de fréjol identificados y caracterizados en este estudio, BCMV serogrupo A y B, BYMV y BSMV, aparentemente se hallan ampliamente distribuidos en las zonas frejoleras del país, por lo tanto, es necesario realizar estudios sobre su distribución, incidencia y daños económicos que ocasionan al cultivo. Adicionalmente se sospecha la presencia de otros virus de distribución más restringida, como el Virus del Mosaico de las cucurbitáceas (CMV, Cucumber Mosaic Virus) en la provincia de Loja, que deberán también ser estudiados.

IDENTIFICACION DE CEPAS DE BCMV

En las muestras que se identificó BCMV se determinó la cepa de este patógeno mediante un Rango de Variedades Diferenciales de fréjol basado en el Espectro de Patogenicidad que es la "secuencia de reacciones positivas o negativas que una cepa de un virus produce en un rango estándar de variedades diferenciales, indicando si puede infectar sistémicamente a cada una de ellas" (Drijfhof, 1978).

El aislamiento Imbabura 2 fue reconocido como la cepa NL-3 (Cuadro 1). Esta cepa se caracteriza porque produce el síntoma de necrosis sistémica en todos aque-

Cuadro 1. Cepas y virus de fréjol identificados en cinco provincias del callejón interandino ecuatoriano, EESC, INIAP, 1994 - 1995.

PROVINCIA	VIRUS	CEPA
Imbabura	Virus del Mosaico amarillo del fréjol	
	Virus del Mosaico Común del fréjol serogrupo A	NL - 3
Chimborazo	Virus del Mosaico Común del fréjol, serogrupo B	TIPO
Azuay, Cañar	Virus del Mosaico Común del fréjol, serogrupo B	NL - 6
Loja	Virus del Mosaico Sureño del fréjol	

Los genotipos de fréjol que poseen el gene I de resistencia independientemente de la temperatura ambiental. Azuay estuvo infectada por la cepa NL-6 que produce necrosis sistémica en los anteriores genotipos pero únicamente a temperaturas constantes sobre 26°C. El aislamiento Chimborazo fue identificado como la cepa Tipo del BCMV cuya característica es no producir necrosis sistémica. Las tres cepas inducen síntomas de mosaico sistémico en los genotipos que no poseen el gene I.

La importancia de identificar las cepas de BCMV radica en el distinto tipo de resistencia que se utiliza para controlar cada cepa. Si en el área de estudio se encuentran cepas no necróticas, como la cepa Tipo, el uso del gene I o resistencia monogénica dominante puede ser la solución ya que se previene totalmente la infección sistémica, la transmisión del virus a través de semilla y la transmisión mediante vectores. Esta resistencia será superada por cepas necróticas, especialmente aquellas independientes de temperatura como la NL-3, que pueden ser introducidas al área en la semilla infectada de materiales sin este tipo de resistencia. Sin embargo, en países con este tipo de cepas, el uso mayoritario de variedades con el gene I restringe mucho el daño del virus ya que se limita las fuentes primarias de infección y la diseminación secundaria del patógeno. Si en el área se hallan cepas necróticas se debe proteger al gene I con el gene bc-2², obteniendo así una

resistencia múltiple. Para prevenir una posible mutación del virus que pueda destruir esta resistencia se puede incorporar además el gene bc-3 obteniendo una resistencia duradera a todas las cepas de BCMV. Evidentemente esto exige un considerable esfuerzo de mejoramiento. (Drijfhout, 1978).

Se recomienda evitar el traslado de material genético desde Imbabura hacia otras zonas productoras de fréjol en el país ya que existe el peligro de diseminar la cepa NL-3 que es altamente agresiva. Sin embargo, esta cepa podría ser utilizada por el Programa de mejoramiento, mediante pruebas de necrosis, para seleccionar materiales con resistencia monogénica dominante, con el consiguiente ahorro de tiempo y esfuerzo en el desarrollo de nuevas variedades.

RESISTENCIA VARIETAL FRENTE A CEPAS DE BCMV

Con cada una de las cepas de BCMV identificadas se realizaron inoculaciones mecánicas en invernadero en los 31 genotipos de fréjol. Se consideró un material resistente cuando no presentó síntomas y, mediante una Prueba de infectividad, se comprobó que el virus no se halló asintómicamente en la planta. Una línea fue considerada susceptible sensible cuando presentó infección sistémica evidente (mosaico, malformación de hojas, enanismo, clorosis de venas) o cuando todas las plantas probadas presentaron necrosis

sistémica. Por medio de una Prueba de Necrosis fue posible distinguir entre materiales con resistencia debida al gene I (prueba de necrosis positiva) y materiales con otro tipo de resistencia (prueba de infectividad negativa).

Luego de las inoculaciones se distinguieron tres grupos de genotipos (Cuadro 2). El primero formado por los genotipos que presentaron una reacción de sensibilidad frente a las tres cepas ya que manifestaron síntomas tipo mosaico sistémico. Esto demostró que no poseen el gene I y gracias a la reacción frente a la cepa Tipo se pudo asegurar que no poseen ningún gene de resistencia para BCMV. Dentro de este grupo se hallaron once líneas promisorias, cuatro variedades mejoradas, dos variedades locales de la zona austral y cuatro variedades de fréjol reventón. El tipo de infección que desarrollan estos genotipos permite una mayor diseminación de la enfermedad, ya que en plantas infectadas con mosaico el virus puede ser transmitido por la semilla y por áfidos (Drijfhout, 1978).

El segundo grupo estuvo formado por la línea promisorio CAB 19 que no presentó infección sistémica con ninguna de las tres cepas y adicionalmente su resultado en la prueba de necrosis fue negativo, es decir que su resistencia no fue debida al gene I.

El tercer grupo estuvo formado por nueve líneas promisorias que poseen el gene I: su resultado fue positivo en la prueba de necrosis, fueron resistentes a la cepa Tipo y NL-6 y presentaron necrosis sistémica en porcentajes variables frente a NL-3.

En base a los resultados obtenidos en este estudio se recomienda que para la zona de Azuay y Cañar, donde el BCMV es un limitante

Cuadro 2. Reacción de 31 genotipos de fréjol voluble frente a tres cepas del Virus del Mosaico Común del fréjol. EESC, INIAP, Ecuador. 1994 - 1995.

GENOTIPOS DE FREJOL	TIPO	CEPAS DE BCMV		RESISTENCIA MONOGENICA DOMINANTE
		NL-6	NL - 3	
GRUPO 1				
VARIETADES MEJORADAS				
INIAP 400	+	+	+	no
INIAP 403	+	+	+	no
INIAP 412	+	+	+	no
INIAP 416	+	+	+	no
VARIETADES LOCALES				
BOLA OJO NEGRO	+	+	+	no
BOLA OJO AMARILLO	+	+	+	no
VAR. FREJOL REVENTON				
NUÑA CONEJA	+	+	+	no
NUÑA NEGRO CHICO	+	+	+	no
NUÑA PAVA	+	+	+	no
NUÑA PLOMA	+	+	+	no
LINEAS PROMISORIAS				
AND 477	+	+	+	no
CAR 9	+	+	+	no
G 11820	+	+	+	no
G 12724	+	+	+	no
LAS 298	+	+	+	no
OBN 104	+	+	+	no
OBN 114	+	+	+	no
OBN 130	+	+	+	no
TIB 30-42 - 1 (ROJO)	+	+	+	no
V 8001 417	+	+	+	no
V 8001 443	+	+	+	no
GRUPO 2				
* CAB 19	-	-	-	no
GRUPO 3				
AFR 466	-	-	+n	si
AND 844	-	-	+n	si
AND 845	-	-	+n	si
* AND 951	-	-	+n	si
* AND 957	-	-	+n	si
AND 959	-	-	+n	si
ASC 39	-	-	+n	si
*ASC 56	-	-	+n	si
MCR 2003	-	-	+n	si

+: Genotipo susceptible sensible (mosaico sistémico), +n: genotipo susceptible (necrosis sistémica), -: genotipo resistente (ausencia de síntomas y prueba de infectividad negativa), +n: genotipo resistente o susceptible; necrosis sistémica en porcentajes variables y prueba de infectividad negativa en las plantas sin síntomas. *: genotipo segregante o mezclado.

para el cultivo, se utilicen las líneas promisorias de fréjol voluble AFR 466, AND 844, AND 845, AND 951, AND 957, AND 959, ASC 39, ASC 56, MCR 2003 (líneas con resistencia monogénica dominante o del gene I) o CAB 19 (línea con otro tipo de resistencia). Sin embargo, previamente se debe eliminar individuos segregantes en las líneas AND 951, AND 957, ASC 56 y CAB 19, y realizar ensayos en campo sometiendo los materiales a infección natural. Además, estos genotipos podrían

ser utilizados en el Programa de Mejoramiento como fuentes de resistencia a BCMV. El uso de resistencia monogénica dominante en una zona donde existe una cepa necrótica dependiente de temperatura (NL-6) es posible ya que en esta región no se alcanzan las temperaturas que inducen en la planta la reacción de hipersensibilidad.

Los autores desean dejar constancia de su agradecimiento a las siguientes personas: Dr. B.

Lockhart (Universidad de Minnesota), Dr. G. Mink (Universidad de Washington), Dr. F. Morales y Dra. J. Komegay (Centro Internacional de Agricultura Tropical) que proporcionaron fotografías electrónicas, antisueros, semilla de variedades diferenciales y sugerencias para el desarrollo de esta investigación.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- AYALA, L. Informe: visita a cultivos de fréjol voluble en la Estación Experimental Chuquipata y campos de agricultores. Quito, INIAP, Est. Exp. Santa Catalina, 1993. 2p.
- BEEBE, S. y PASTOR-CORRALES, M. Breeding for disease resistance. Ing. Schoonhoven, a Van y Voyses, O. eds. Common Beans: Research for Crop Improvement. C.A.B. International y Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991. 980 p.
- DRIJFHOUT, E. Genetic Interaction between *Phaseolus vulgaris* and bean common virus with implications for strain identification and breeding for resistance. Agricultural Research Report 872. Centre for Agricultural Publishing and Documentation. Wageningen, 1978. 98 p.
- ECUADOR, INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS. Informe Anual de actividades. Departamento de Fitopatología. Est. Exp. Santa Catalina, Quito, 1977. pp 3-4.
-Informe Anual de actividades. Departamento de Fitopatología. Est. Exp. Santa Catalina, Quito, 1978. pp 9-10.
-Informe Anual de actividades. Departamento de Fitopatología. Est. Exp. Santa Catalina, Quito, 1981. 12 p.
-Informe Anual de actividades. Departamento de Fitopatología. Est. Exp. Santa Catalina, Quito, 1984. pp 22 - 25.
- GALVEZ, G.; KORNEGAY, J. y VOYSEST, O. Informe. Azogues, INIAP, Est. Exp. Chuquipata, 1989. 2p.
- IICA-BID-PROCIANDINO. diagnóstico de la Producción e Investigación de Leguminosas, Maíz, Papa y Oleaginosas en la Subregión Andina. Editado por B. Ramakrishna y G. Hernández Quito, PROCIANDINO, 1987. 316 p.
- ORELLANA, H y PADILLA, F. principales enfermedades del fréjol en la Sierra Ecuatoriana Quito, INIAP, 1985. 32 p.
- SILBERNAGEL, M. Diseases caused by viruses (Introduction). In Hall, R. ed. Compendium of Bean Diseases. Minnesota, The American Phytopathological society, 1991. 73 p.