

IDENTIFICACION DE LAS ENFERMEDADES  
VIRALES DEL FREJOL  
(*Phaseolus vulgaris* L.) Y EVALUACION  
DE LA RESISTENCIA VARIETAL

JORGE LUIS ANDRADE PIEDRA NARANJO

TESIS DE GRADO PREVIA A LA OBTENCION DEL TITULO DE  
INGENIERO AGRONOMO

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRICOLAS

QUITO

1997

## VII. RESUMEN

En las provincias ecuatorianas de Azuay y Cañar el "Virus del Mosaico Común del fréjol" (BCMV, Bean Common Mosaic Virus) ha llegado a constituir un limitante para la producción del fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.). Además, en el resto del país no se disponía de diagnósticos confiables de virus de esta leguminosa. Esto condujo a realizar la presente investigación en los laboratorios e invernaderos de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP<sup>4</sup>, con los objetivos de identificar los virus de fréjol en ciertas zonas de la región interandina del Ecuador, identificar las cepas de BCMV y evaluar 31 genotipos de fréjol frente a estas cepas.

Para la identificación de virus se realizó un recorrido por 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. De acuerdo a la provincia donde fueron colectados se los denominó Imbabura 1, Imbabura 2, Azuay, Loja y Chimborazo. Como hospedero de propagación y diagnóstico se utilizaron las variedades de fréjol INIAP-404 (aislamientos Imbabura 2, Azuay, Loja y Chimborazo) e INIAP-413 (aislamiento Imbabura 1). Para la caracterización se tomaron en cuenta propiedades biológicas del patógeno (sintomatología en fréjol, transmisibilidad, persistencia de la infectividad de la savia y rango de hospederos), propiedades físicas (tamaño y forma de la partícula viral) y propiedades de la proteína viral (especificidad serológica).

---

<sup>4</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias.

La identificación de las cepas de BCMV se lo realizó inoculándolas en el rango de variedades diferenciales de fréjol propuesto por Drijfhout (1978) y mediante serología con antisueros monoclonales que diferenciaron el serogrupo A y B del BCMV.

La evaluación de materiales de fréjol frente a las cepas de BCMV se lo realizó bajo condiciones de invernadero, inoculando 10 plantas de cada genotipo con la respectiva cepa. Se consideraron sensibles todos aquellos materiales que mostraron síntomas sistémicos claros de la enfermedad, en tanto que se diferenció entre resistencia y tolerancia mediante una “prueba de infectividad” (retroinoculación en un hospedero sensible que mostró síntomas aún con bajas concentraciones del virus). Además, se pudo determinar si la resistencia es del tipo monogénico dominante (gene I necrótico) mediante una “prueba de necrosis” (inoculación con la cepa necrótica NL-3 de BCMV e incubación por cinco días a 30°C y 12 horas diarias de luz).

El aislamiento Imbabura 1 presentó en fréjol un mosaico amarillo. Su partícula viral correspondió al grupo de los potyvirus. Fue transmitida mecánicamente y 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 dilución final (PDF) de  $10^{-3}$ . Al ser inoculada en *Chenopodium quinoa* se observaron 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. En las pruebas

serológicas reaccionó únicamente frente a antisuero del "Virus del Mosaico Amarillo del fréjol" (BYMV, bean yellow mosaic virus).

Las muestras Imbabura 2, Azuay y Chimborazo presentaron en fréjol síntomas característicos de Mosaico Común. Sus partículas virales correspondieron al grupo de los potyvirus. Fueron transmitidas mecánicamente; por el áfido *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  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ . Al ser inoculadas en *C. quinoa* produjeron lesiones cloróticas locales, *V. faba* y *N.clevelandii* presentaron infecciones sistémicas asintomáticas y *P. sativum* fue inmune. En las pruebas serológicas reaccionaron frente a los antisueros del BCMV.

El aislamiento Loja presentó en fréjol un amarillamiento de venas muy pronunciado y ahusamiento de folíolos. Su partícula viral fue isométrica (28 nm). Fue transmitida mecánicamente, por semilla y por el crisomélido *Cerotoma* sp. pero no por *Myzus persicae*. Su PIT fue de 90°C, LIV de 32 días y PDF de  $10^{-6}$ . *C. quinoa*, *V. faba*, *P. sativum* y *N.clevelandii* fueron inmunes, infectándose únicamente las variedades de fréjol Dubbele Witte, Stringless Green Refugee y Monroe. Reaccionó frente al antisuero del "Virus del Mosaico Sureño del fréjol" (BSMV, bean southern mosaic virus).

Mediante el rango de variedades diferenciales de fréjol para BCMV se determinó que el aislamiento Imbabura 2 correspondió a la cepa necrótica independiente de temperatura NL-3; la muestra Azuay estuvo infectada por la cepa necrótica dependiente de temperatura NL-6, en tanto que el aislamiento

Chimborazo fue identificado como la cepa no necrótica NL-1 o Tipo. Gracias al uso de antisueros fue posible diferenciar serológicamente las cepas de BCMV: el aislamiento Imbabura 2 correspondió al serogrupo A del BCMV y, por lo tanto, se lo puede considerar como la cepa NL-3 del BCMV o como el "Virus del Mosaico Necrótico del fréjol" (BNMV, bean necrosis mosaic virus) (Mckern *et al*, 1992). Los aislamientos Azuay y Chimborazo correspondieron al serogrupo B del BCMV.

En la evaluación de genotipos de fréjol frente a las tres cepas de BCMV se distinguieron tres grupos: el primero formado por los materiales que presentaron una reacción de sensibilidad frente a las tres cepas. 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 segundo grupo estuvo formado por la línea promisoría CAB 19 que fue resistente a las tres cepas y adicionalmente su resultado en la prueba de necrosis fue negativo, es decir que su resistencia no fue monogénica dominante. El tercer grupo estuvo formado por nueve líneas promisorias (AFR 466, AND 844, AND 845, AND 951, AND 957, AND 959, ASC 39, ASC 56 y MCR 2003) que poseen el gene necrótico 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 que variaron del 15 al 100% frente a NL-3.

Como conclusiones a la investigación se tiene que en la provincia de Imbabura se identificaron el "Virus del Mosaico Amarillo del fréjol" y la cepa NL-3 del "Virus del Mosaico Común del fréjol" o "Virus del Mosaico Necrótico del fréjol". En Chimborazo se identificó la cepa Tipo del "Virus del Mosaico Común del

fréjol"; en Azuay la cepa NL-6 del mismo virus y en Loja el "Virus del Mosaico Sureño del fréjol".

Además, se dispone de diez genotipos de fréjol que pueden ser utilizados en la zona donde se halla la cepa NL-6 de BCMV (Azuay y Cañar), previo la realización de ensayos en campo sometiendo los materiales a infección natural.

Se recomienda realizar estudios de incidencia, distribución y daños de los virus de fréjol reportados en las zonas productoras de importancia del Ecuador y, debido a la alta agresividad de la cepa NL-3, es conveniente evitar el traslado de material genético desde Imbabura hacia otras zonas productoras de fréjol.

## SUMMARY

Bean common mosaic virus (BCMV) is one of the main restrictions in the production of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Ecuadorian provinces of Azuay and Cañar. Moreover, there were not reliable diagnostics of viruses of this legume in the rest of the country. The present research was done at Santa Catalina Experimental Station of the National Institute of Agricultural Research (INIAP). The objectives of this study were (1) to identify the bean viruses in certain zones of the Andean region; (2) to identify the strains of BCMV and (3) to evaluate the reaction of 31 bean genotypes against the strains previously identified.

- For virus identification it was collected 60 samples with possible virosis in the provinces of Imbabura, Chimborazo, Azuay, Cañar and Loja. Five samples were selected and identified. The samples were named as: Imbabura 1, Imbabura 2, Azuay, Loja and Chimborazo. The local improved bean variety INIAP-404 was used as propagation and diagnostic host for Imbabura 2, Azuay, Loja and Chimborazo samples and INIAP-401 for Imbabura 1 sample. For characterization, it was considered biological properties of the pathogen such as bean symptomatology, transmissibility, stability in sap and host range; physical properties such as size and shape of viral particle and viral protein properties determined by serology tests.

Strains of BCMV were identified using a differential host range of bean varieties (Drijfhout, 1978) and serology tests using monoclonal antisera for A and B serogroup of BCMV.

The evaluation of 31 bean genotypes was done under greenhouse conditions, 10 plants of every line were inoculated. A line was considered sensitive when it showed typical systemic symptoms. It was possible to distinguish between tolerance and resistance using an "infectivity test". In addition, it was possible to determine if the resistance was due to the I necrotic en (monogenic dominant resistance) using a "necrosis test".

Imbabura 1 sample produced a yellow mosaic in bean. The viral particle belonged to the potyvirus group. It was transmitted mechanically, in a non-persistent manner by the aphid *Myzus persicae* but not by seed. Its thermal inactivation point (TIP) was 55°C, longevity *in vitro* (LIV) 2 days and dilution end-point (DEP)  $10^{-3}$ . When it was inoculated in *Chenopodium quinoa* produced local chlorotic lesions; in *Vicia faba* vein chlorosis; in *Pisum sativum* stem necrosis and vein chlorosis; *Nicotiana clevelandii* presented vein chlorosis and a slight leaf rolling. Finally, this sample reacted only with the bean yellow mosaic virus antiserum.

Imbabura 2, Azuay and Chimborazo samples produced typical symptoms of BCMV in bean. The viral particles also belonged to the potyvirus group. They were transmitted mechanically, in a non-persistent manner by the aphid *Myzus persicae* and also by seed. Their TIP ranged from 55 to 60°C, LIV of 8 days and DEP from  $10^{-3}$  to  $10^{-4}$ . When they were inoculated in *C. quinoa* produced local chlorotic lesions; *V. faba* and *N. clevelandii* presented asymptomatic systemic infections; *P. sativum* was immune. In the serologic tests, they reacted only with BCMV antiserum.



Loja sample produced an intense vein chlorosis and leaf distortion in bean. The viral particle was isometric (28 nm). It was transmitted mechanically, by seed and by the beetle *Cerotoma* sp. Its TIP was 90°C, LIV of 32°C and DEP of 10<sup>-6</sup>. This sample could infect only bean; *C. quinoa*, *V. faba*, *P. sativum* and *N. clevelandii* presented immunity. It reacted only with bean southern mosaic virus antiserum.

Using the differential host range of bean varieties for BCMV strains it was determined that the sample Imbabura 2 was NL-3 strain (temperature-independent necrosis-inducing strain); Azuay was NL-6 strain (temperature-dependent necrosis-inducing strain) and Chimborazo was NL-1 or type strain (non-necrosis inducing strain). Using antisera it was possible to determine that the sample Imbabura 2 belonged to the A serogroup of BCMV and, therefore, this sample could be considered also as the bean necrosis mosaic virus (BNMV). Azuay and Chimborazo samples belonged to the B serogroup of BCMV.

In the evaluation of bean genotypes it was possible to distinguish 3 groups: in the first one there were 21 sensitive genotypes (11 promissory lines, 4 local improved varieties, 2 native varieties and 4 "bursting bean" varieties). In the second group, there was the promissory line CAB 19 that was resistant to the three BCMV strains but this reaction was not due to I necrosis gene. In the last group there were 9 promissory lines (AFR 466, AND 844, AND 845, AND 951, AND 957, AND 959, ASC 39, ASC 56 y MCR 2003). They had the I necrosis gene and therefore they were resistant to type and NL-6 strain and showed systemic necrosis (15-100%) when they were inoculated with NL-3 strain.

In conclusion, the bean yellow mosaic virus and NL-3 strain of BCMV or bean necrosis mosaic virus; type strain of BCMV; NL-6 strain of BCMV; and bean southern mosaic virus are present in the provinces of Imbabura, Chimborazo, Azuay and Loja, respectively.

In addition, 10 resistant promissory lines were identified which could be used in the area where NL-6 strain is present (Azuay and Cañar provinces). Previously, it is necessary to probe these lines under field conditions.

It is recommended to study the incidence, distribution and losses of bean viruses reported in this paper and due to the high aggressiveness of NL-3 strain of BCMV, it would be very useful to avoid movements of seed from the Imbabura province to another bean production areas.