UNIVERSIDAD TECNICA DE MANABI

FACULTAD DE INGENIERIA AGRONOMICA

CARRERA DE AGRONOMIA

TRABAJO DE TITULACION

Previo a la obtención del Título de:

INGENIERO AGRONOMO

TEMA:

"Caracterización biológica y serológica de 20 aislamientos virales que afectan el cultivo de pimiento (*Capsicum annuum* L.) en el Valle del Río Portoviejo".

AUTORES.

Richard Andrés Mendoza Zambrano.

Génesis Yessenia Sánchez Vélez.

TUTOR.

Ing. Milton Antonio Pinoargote Chérrez Mg. ED.

Santa Ana-Manabí-Ecuador

2016.

UNIVERSIDAD TECNICA DE MANABI

FACULTAD DE INGENIERIA AGRONOMICA

Título: "Caracterización biológica y serológica de 20 aislamientos virales que afectan el cultivo de pimiento (*Capsicum annuum* L.) en el Valle del Río Portoviejo".

TESIS DE GRADO

Sometida a consideración del Tribunal de Defensa del Trabajo de Titulación y legalizada por el Honorable Consejo Directivo como requisito previo a la obtención del título:

INGENIERO AGRONOMO

APROBADO POR:

_____

Ing. Julio Mero Muñoz
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

_____

Dr. Ricardo Fundora Piñeyro Ph. D.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

_____

Ing. Edisson Cuenca Cuenca Mg. Sc.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

CERTIFICACION

Por medio de la presente certifico que los señores: Richard Andrés Mendoza Zambrano y Génesis Yessenia Sánchez Vélez, egresados de la facultad, han concluido su trabajo de titulación "CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y SEROLÓGICA DE 20 AISLAMIENTOS VIRALES QUE AFECTAN EL CULTIVO DE PIMIENTO (*Capsicum annuum* L.) EN EL VALLE DEL RÍO PORTOVIEJO".

Certificación que otorgo dando cumplimiento a lo estipulado en el Art. 8 Literal 5. Del REGLAMENTO DE LA UNIDAD DE TITULACIÓN ESPECIAL DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ.

Atentamente,

Ing. Milton Antonio Pinoargote Chérrez Mg. EDS.
TUTOR DEL TRABAJO DE TITULACION.

CERTIFICACION

Yo, Leonardo Solís Bowen, por medio de la presente tengo a bien CERTIFICAR:

Que he revisado la redacción, estilo y ortografía del trabajo de titulación "CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y SEROLÓGICA DE 20 AISLAMIENTOS VIRALES QUE AFECTAN EL CULTIVO DE PIMIENTO (*Capsicum annuum* L.) EN EL VALLE DEL RÍO PORTOVIEJO", elaborado por Richard Andrés Mendoza Zambrano y Génesis Yessenia Sánchez Vélez, el presente trabajo de investigación ha sido escrito de acuerdo a las normas ortográficas y sintaxis vigentes en el REGLAMENTO DE LA UNIDAD DE TITULACIÓN ESPECIAL DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ.

Atentamente,

_____

Ing. Leonardo Solís Bowen Mg.Sc.
REVISOR DEL TRABAJO DE TITULACION.

La responsabilidad de la investigación resultados y conclusiones, corresponden exclusivamente a los autores.

Richard Andrés Mendoza Zambrano.

Génesis Yessenia Sánchez Vélez.

DEDICATORIA.

A Dios y a mis padres, Sr. Yovanny Sánchez Veliz y Sra. Annabel Vélez Intriago, por el apoyo incondicional que me dan día a día, lo que hoy me ha permitido alcanzar una meta más.

GENESIS SANCHEZ.

A Dios y a mis padres biológicos, Ing. Cristóbal Mendoza Mecías y la Sra. Carmen Zambrano Castillo; y mis padres de corazón, el Sr. Ángel Mendoza Macías y Sra. Nelly Cuenca Sornoza, quienes han apoyado incondicionalmente mis estudios superiores.

RICHARD MENDOZA.

AGRADECIMIENTO.

A Dios, antes de todos por su bendición que nos permite seguir por los caminos correctos de la vida, haciendo todo para superar los obstáculos de la misma.

Al Ingeniero Bertín Vélez Olmedo por el asesoramiento, orientación y proposición de esta investigación y además por la buena amistad y camarería compartida desde las aulas hasta la presente.

Al Ingeniero Milton Pinoargote Chérrez, por sus gestos de amistad, prestancia para resolver nuestras inquietudes dentro y fuera del aula y por la colaboración como tutor de la presente investigación de titulación.

Al Ingeniero Leonardo Solís Bowen, por colaboración como revisor en esta investigación además de su amistad compartida en clases.

Al Ingeniero Roger Torres Aliaga, por su colaboración en la prueba de serológica y por la amistad compartida en esta investigación.

A nuestra facultad de Ingeniería Agronómica por la formación técnica social y humana que nos ha dado en estos seis años de estudio y así mismo a la Universidad Técnica de Manabí.

Al Doctor José Garzón Tiznado investigador de Tiempo Completo Titular “C”. Facultad de Ciencias Químico Biológicas Universidad Autónoma de Sinaloa-México, por su colaboración como revisor y asesor externo de la presente investigación.

A la Ingeniera Fátima Macías Ponce, por la colaboración incondicional brindada para desarrollar ciertas actividades de la investigación.

A la Ing. Susana García Álava encargada del laboratorio de fitopatología.

A los profesores de pre-grado en especial a los, Ing. S. Muñoz, Ing. T. Carbajal, Ing. L. Solís, Ing. F. Sánchez quienes con sus conocimientos aportaron a mi formación profesional y en valores que desconocía.

A nuestros compañeros: Alexander Moreira y Mariela Intriago, por los momentos compartidos durante esta investigación.

A nuestros compañeros: Winter Mendoza, José Moreira, por los conocimientos, habilidades y momentos gratos compartidos en todo el trayecto de formación universitaria.

ÍNDICE GENERAL.

Página.

I. ANTECEDENTES. 3
II. INTRODUCCIÓN. 4
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA. 6
IV. JUSTIFICACION. 7
V. OBJETIVOS. 8
5.1. GENERAL. 8
5.2. ESPECIFICOS. 8
VI. MARCO REFERENCIAL. 9
6.1. Importancia del cultivo de pimiento. 9
6.2. Importancia de cultivo de pimiento en Ecuador. 9
6.3. Características de los virus fitopatógenos. 10
6.4. Sintomatología de las enfermedades virales en las plantas. 10
6.5. De la importancia de los virus que afectan a las plantas. 11
6.6. Virus y el mecanismo natural de resistencia de las plantas. 12
6.7. Diagnóstico de virus de plantas. 12
6.8. Virosis que afectan especies del género Capsicum annuum. 13
6.8.5.1. Especies de diagnóstico. 17
VII. DISEÑO METODOLOGICO. 20
7.1. Ubicación. 20
7.2. Producción de plantas indicadoras. 20
7.3. Recolección de muestras y obtención del inóculo. 20
7.4. Caracterización biológica. 22
7.5. Inoculación en el híbrido comercial. 23
7.6. Análisis serológico. 23
VIII. RESULTADOS. 25
8.1. Obtención de aislamientos. 25
8.2. Caracterización biológica. 25
8.3. Caracterización serológica. 33

8.4. Validación de resistencia del híbrido comercial. 33
IX. DISCUSION. 37
X. CONCLUSIONES. 39
XI. RECOMENDACIONES. 40
XII. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES. 41
XIII. PRESUPUESTO. 42
XIV. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS. 43
XV. ANEXO. 47

INDICE DE CUADROS.

Página.

Cuadro 1. Muestras de capsicum annuum, colectadas en las zonas productoras del valle del rio portoviejo. 21

Cuadro 2. Síntomas mostrados en plantas indicadoras inoculadas con los 20 aislamientos. 28

Cuadro 3. Caracterización serológica de 20 aislamientos. 33

Cuadro 4. Cronograma de actividades para el desarrollo del proyecto (noviembre 2015-julio 2016). 41

Cuadro 5. Presupuesto para el desarrollo de proyecto (noviembre 2015-julio 2016). ... 42

INDICE DE FIGURAS.

Página.

Figura 1. *Capsicum annuum* cv. California wonder: A) moteado variegado inducido por el aislamiento Co:2.4. B) mosaico suave, ampolladuras, angostamiento y deformación de hoja inducido por el aislamiento Co:2.5. C) franjeado de nervaduras y mosaico severo inducido por el aislamiento Ce:1.2; *Capsicum frutescens* cv. Tabasco: D) ampolladuras de hojas y mosaico severo inducido por los aislamientos Co:1.1, Co:2.4 y Co:2.5. E) ampolladuras en hojas, enanismo y mosaico severo inducidos por el aislamiento Co:1.3. F) ampolladuras en hojas, franjeado de nervaduras y mosaico inducidos por el aislamiento Co:1.2. 29

Figura 2. *N. Glutinosa*: A) mosaico, franjeado de nervaduras, deformación y ondulación en el borde de la hoja inducidos por el aislamiento Co:1.3. B) mosaico severo y franjeado de nervaduras inducidos por el aislamiento Co:2.1; *N. rustica:* C) manchas cloróticas irregulares inducidas por el aislamiento Co:1.1. D) ampolladuras en hojas, enanismo, mosaico amarillo, y reducción de la lámina foliar inducidos por los aislamientos Co:1.3 y Co:2.1 E) ampolladuras de hojas y mosaico inducidos por el aislamiento Co: 1.2. 30

Figura 3. *N occidentalis:* A) deformación de hojas, enanismo, ligera necrosis sistémica y mosaico suave inducidos por los aislamientos Co:1.1, y Co:1.3. B) anillos concéntricos pajizos con borde marrón acompañado de lesiones necróticas pequeñas y grandes inducidos por los aislamientos Co:1.4, Ba: 1.3, Rr:1.1, Rr:1.5. C) anillos cloróticos y mosaico suave en el aislamiento Co:2.2. D) enanismo acompañado de mosaico severo inducidos por los aislamientos Co:2.1, Ba:1.4, Rr: 1.2, Cr:1.4. E) ampolladuras en las hojas acompañado de moteado suave inducido por los aislamientos Co:2.5, y Ce:1.2. 31

Figura 4. *N. tabacum* cv. Samsum: A) mosaico suave inducido por los aislamiento Co:1.1, Co:1.3 y Co:2.1. B) anillos y arcos cloróticos inducidos por el aislamiento Rr:1.6. C) aclaramiento de nervaduras, anillos cloróticos pequeños y mosaico

suave inducidos por el aislamiento Co:2.3. D) mosaico moderado inducido por el aislamiento Co:2.4; *N. tabacum* cv. White Burley: E) y F) mosaico moderado a mosaico severo inducido por el aislamiento Co:1.2. 32

Figura 5. *Capsicum annuum* cv. Quetzal: A) los aislamientos Co1.1, Co: 1:2, Rr:1.1 y Rr:1.5 indujeron mosaico. B) ampolladuras y deformación de hojas acompañado de mosaico suave inducidos por los aislamientos Co: 1.3 y Cr:1.2. C) moteado moderado en los aislamientos Co:1.4 y Co:2.1. D) mosaico severo inducido por el aislamiento Co:2.2. E) ampolladuras mas deformación de la punta de hoja y mosaico inducido por el aislamiento Co:2.3 F) anillos cloróticos escasos inducidos por el aislamiento Ba:1.4. G) deformación y puntos necróticos blanquecinos en hojas inducidos por el aislamiento Rr:1.2.H) arcos y manchas cloróticas irregulares inducidos por el aislamiento Rr.1.6. I) deformación de hojas, franjeado de nervadura y clorosis inducidos por el aislamiento Cr:1.4..... 35, 36

INDICE ANEXOS.

Página.

Anexo 1. Construcción del lugar de aislamiento. 47
Anexo 2. Preparación del sustrato de transplante. 48
Anexo 3. Recolección de muestras. 49
Anexo 4. Inoculación y obtención del inoculo. 50
Anexo 5. Prueba serológica. 51
Anexo 6. Acondicionamiento del laboratorio de fitopatología. 52
Anexo 7. Dotación de equipos y materiales al laboratorio de fitopatología. 53
Anexo 8. Mapa de muestreo sobre el valle del rio portoviejo. 54

RESUMEN.

La presente investigación se realizó en una casa de vegetación a prueba de insectos y en los laboratorios de Fitopatología, Biotecnología y Biología Molecular, los dos primeros en la Facultad de Ingeniería Agronómica en Lodana – Santa Ana y el último en la Universidad Técnica de Manabí en Portoviejo. Con el objetivo de caracterizar biológica y serológicamente los virus que afectan el cultivo de pimiento y validar la resistencia del híbrido comercial Quetzal, usando 20 aislamientos obtenidos a partir de 32 muestras procedentes de ocho campos de producción, ubicados en la parroquia Colón (Co) y Crucita (Cr) en el cantón Portoviejo, sitio Buenos aires (Ba), recinto Ceibal (Ce) y la recta de Rocafuerte (Rr) en el Cantón Rocafuerte, parroquia Charapotó (Ch) en el cantón Sucre y la parroquia Lodana (Lo) en el cantón Santa Ana, lugares situados en la zona de influencia del Río Portoviejo.

Los aislamientos obtenidos fueron inoculados sobre ocho especies indicadoras, las cuales fueron utilizadas para realizar la caracterización biológica inoculando tres plantas por cada especie. Para la caracterización serológica, se utilizó la técnica de conjugados enzimático-s [Double antibody sándwich enzyme-linked immuno-sorbent assay (DAS-ELISA)] de Clark y Adams (1977), con los antisueros de *Pepino mosaic virus* (PepMV), *Potato virus X* (PVX), *Tobacco etch virus* (TEV), *Peru tomato virus* (PTV), *Potato virus Y* (PVY), *Tobacco ringspot virus* (TRSV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Alfalfa mosaic virus (AMV)*. Por último se validó la resistencia y/o susceptibilidad del híbrido comercial Quetzal.

Los resultados de la caracterización biológica, muestran que los aislamientos Co:2.2, Co:2.3, Co:2.4 y Rr:1.6 coinciden con lo reportado para *Tobacco ringspot virus* (TRSV), serológicamente los mismos aislamientos dieron reacción positiva contra las IgG del antisuero del virus antes mencionado. Biológicamente los demás aislamientos indujeron síntomas distintos a los virus conocidos y serológicamente reaccionaron en forma negativa contra las IgG de todos los antisueros utilizados. En la validación de la resistencia del híbrido Quetzal, solo los aislamientos Co:1.1, Co:1.2, Co:1.3, Co:1.4, Co:2.1, Co:2.2, Co:2.3, Ba:1.4, Cr:1.2, Cr:1.4, Rr:1.1, Rr:1.2, Rr:1.5 y Rr:1.6 infectaron

al híbrido, mientras que los aislamientos Co:2.4, Co:2.5, Ba:1.1, Ba:1.2, Ba:1.3 y Ce:1.2, no infectaron.

SUMMARY.

This research was conducted in a house of vegetation´s house to insect proof in the Plant Pathology, Biotechnology and Molecular Biology laboratories, the first two at the Faculty of Agricultural Engineering and the last at the Universidad Técnica de Manabí (Portoviejo). In order to characterize biological and serologically virus affecting pepper crop and validate the resistance of commercial hybrid Quetzal, using 20 isolates obtained from 32 samples from eight producing fields, located in Colón (Co) and Crucita (Cr) parish belong to the Portoviejo canton, Buenos aires (Ba), the Ceibal (Ce) and la recta of Rocafuerte (Rr) belong to Rocafuerte canton, Charapotó (Ch) belong to Sucre canton and Lodana (Lo) belong to the Santa Ana canton, in the valley of Portoviejo´s river.

The isolates obtained were inoculated on eight indicators species, which were used to the biological characterization inoculating three plants of each species. The conjugated enzyme-s technique was used for serological characterization [Double antibody sandwich enzyme-linked immuno-sorbent assay (DAS-ELISA)] Clark and Adams (1977), with antisera to *Cucumber mosaic virus* (PepMV) *Potato virus X* (PVX), *Tobacco etch virus* (TEV), *Peru tomato virus* (PTV), *Potato virus Y* (PVY), *Tobacco ringspot virus* (TRSV), Cucumber mosaic virus (CMV) and *Alfalfa mosaic virus* (AMV), finally the resistance and / or susceptibility of commercial hybrid Quetzal was validated.

The results of the biological characterization showed that isolates Co: 2.2, Co: 2.3, Co: 2.4 and Rr: 1.6 coincide are the same to with those reported for *Tobacco ringspot virus* (TRSV) and serologically the same isolates reacted in positive form against TRSV-IgG. Biologically other isolates induced differen symptoms than to other known virus and serologically reacted negatively against all IgG antisera used. In resistance validation the Quetzal hybrid, only isolates Co: 1.1, Co: 1.2, Co: 1.3, Co: 1.4, Co: 2.1, Co: 2.2, Co: 2.3, Ba: 1.4, Cr: 1.2, Cr : 1.4, Rr: 1.1, Rr: 1.2, Rr: 1.5, and Rr: 1.6 overcome the hybrid resistance, whereas the same hybrid isolates Co: 2.4, Co: 2.5, Ba 1.1, Ba: 1.2, Ba: 1.3 and Ce: 1.2 , they not infected.

I. ANTECEDENTES.

En el Ecuador, el primer reporte de virus afectando pimiento fue realizado por Chala (1978) a partir de aislamientos colectados en Guayas (Boliche), Manabí (Valle del Río Portoviejo) y Santa Elena, evaluando la resistencia de algunos materiales con los aislamientos encontrados. En este estudio, mediante inoculación en plantas indicadoras y serología (Doble difusión en gel de agarosa) se determinó la presencia de los virus: *Potato virus Y* (PVY), *Tobacco etch virus* (TEV) ambos Potyvirus y *Tobacco mosaic virus* (TMV) Tobamovirus.

Janzac *et al*., (2008) realizaron la caracterización de un "nuevo" Potyvirus que infecta cultivos de rocoto en el Ecuador, al que denominaron *Ecuadorian rocoto virus* (ERV), especie que hasta la presente no ha sido aceptada como un nuevo miembro del genero Potyvirus (ICTV, 2014).

Colimba *et al*., (2015) publicó el primer reporte de *Alfalfa mosaic virus* (AMV) infectando plantas de pimiento rojo en el cantón Antonio Ante provincia de Imbabura-Ecuador.

Sivaprasad *et al*., (2015) reportó por primera vez a *"Potato yellowing virus"* (PYV) infectando pimiento en Puembo-Pichincha-Ecuador, especie que no ha sido aceptada aún como miembro del género Ilarvirus (ICTV, 2014).

Más recientemente Dávila (2016), reportó la presencia de *Potato virus X* (PVX-Potexvirus) y *Potato virus Y* (PVY-Potyvirus) en muestras colectadas en la parroquia Natabuela del cantón Antonio Ante provincia de Imbabura-Ecuador.

II. INTRODUCCIÓN.

A nivel mundial se produjeron alrededor 31.167.000 toneladas métricas de pimiento en el año 2013, de las cuales el 51% aproximadamente fueron producidos en China alcanzando esta producción en 707.000 ha. El segundo lugar está ocupado por México con 7,63% con una superficie de siembra de 136.132 ha, apareciendo Turquía en tercera posición con 6,65% sobre una superficie de 96.000 ha (Hortoinfo, 2016).

En Ecuador la producción de pimiento en el 2013 fue estimada en 5.704 toneladas producidas en 1.796 ha (FAOSTAT, 2016). A pesar de que el 90% de la producción total es destinada al consumo interno, actualmente está bajo consideración permitir la exportación de pimiento fresco a los Estados Unidos desde Ecuador (Ferguson, 2015).

En Ecuador por lo general se cultiva pimiento a campo abierto y Manabí no es la excepción, debido a que los productores son pequeños y medianos agricultores que no cuentan con los recursos económicos para implantar medios tecnológicos, así como invernaderos que permitan explotar el potencial máximo de los cultivares comerciales, por ello la producción se ve afectada por las condiciones del medio que son influenciadas por plagas-enfermedades, y que según los agricultores en la actualidad este problema se torna en una limitante para producir esta hortaliza de forma rentable.

El pimiento es una de las plantas hortícolas que ha sufrido implacablemente la incidencia de enfermedades, entre las cuales los virus se están tornando muy importantes, puesto que los cultivares presentan amplia susceptibilidad a estas infecciones, pudiéndose encontrar tanto de forma simple-individual o como infecciones mixtas (entre dos o más virus), causando una sintomatología variable dentro de la plantación. A nivel mundial se conocen más de 66 virus capaces de afectar al cultivo del pimiento y la incidencia de estos varía dependiendo de diversos factores, entre los cuales cabe señalar las condiciones ambientales (Murphy y Warren, 2003).

La presente investigación nació luego de realizar prácticas de reconocimiento de enfermedades en el cultivo de *Capsicum annuum* L. en visitas realizadas a

plantaciones en el Valle del Río Portoviejo, en las que despertó el interés de estudiar estos agentes causantes de gran cantidad de síntomas, como mosaicos, ampolladuras, deformaciones, enanismo; entre otros, que afectan el potencial de producción del cultivo.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La presencia de síntomas asociados a agentes virales en las zonas productoras del Valle del Río Portoviejo, mismos que inducen alteraciones en el normal crecimiento y desarrollo del cultivo. Actualmente, constituye un problema emergente del cual se conoce poco y no está siendo atendido como se debe, por parte de todos quienes estamos involucrados en la producción de pimiento en la provincia de Manabí.

IV. JUSTIFICACION.

De los muchos problemas fitosanitarios en el campo entre ellos, tenemos a los ocasionados por virus que afectan al cultivo de pimiento, lo que incide en los bajos rendimientos que provocan pérdidas económicas para los agricultores, razones por las que consideramos importante realizar estudios sobre esta problemática que tiene como objetivo aportar información al respecto, debido a que en la actualidad es poco lo que se conoce sobre enfermedades virales que afectan al cultivo de pimiento en la provincia y en el país.

V. OBJETIVOS.

5.1. GENERAL.

5.1.2. Caracterizar biológica y serológicamente 20 aislamientos virales que afectan pimiento (*Capsicum annuum* L.) en el Valle del Río Portoviejo.

5.2. ESPECIFICOS.

5.2.1. Estudiar los síntomas en las plantas indicadoras inducidos por los aislamientos de virus que infectan *Capsicum annuum* L.

5.2.2. Conocer el comportamiento serológico de los aislamientos, mediante el uso de DAS-ELISA.

5.2.3. Validar la resistencia del híbrido comercial Quetzal.

5.2.4. Dotar de materiales, reactivos y mejora del laboratorio de Fitopatología.

VI. MARCO REFERENCIAL.

6.1. Importancia del cultivo de pimiento.

El pimiento es miembro de la familia *Solanaceae.* Es diploide y esta cercanamente relacionado con el cultivo de papa, tomate, berenjena, tabaco y petunia. Muchos miembros de la familia Solanácea si bien tiene el mismo número de cromosomas (n =12), difieren drásticamente en el tamaño del genoma (Kim *et al*., 2014).

El pimiento es uno de los cultivos más viejos domesticados en el Hemisferio Occidental (Aguilar *et al*., 2009). Es una de las especies más cultivada en el mundo y considerado como ingrediente principal culinario. El pimiento tiene una amplia variedad de usos incluyendo la industria farmacéutica, agentes colorantes naturales y cosméticos, también como planta ornamental y como ingrediente activo en la mayoría de repelentes. Provee muchas vitaminas esenciales, minerales y nutrientes esenciales requeridos en la dieta básica humana (Marín *et al*., 2004). El cultivo de pimiento se considera como una fuente de ingresos para los pequeños productores en muchos países en desarrollo (Green y Kim, 1991).

Hasta el 2013 en Américas y la Unión Europea la producción de pimiento se incrementó cerca de 6 millones de toneladas y la superficie cultivada en aproximadamente 290.000 ha (FAOSTAT, 2016). En la última década la producción mundial de pimiento se incrementó en un 40% (Kim *et al*., 2014).

6.2. Importancia de cultivo de pimiento en Ecuador.

En Ecuador el pimiento tiene gran demanda en el mercado nacional. Generalmente se cultiva en campo abierto, la variación de los factores de producción es muy alta, pues el cultivo es susceptible a plagas y enfermedades lo que ha causado como efecto colateral el uso de agroquímicos, elevando los costos de producción. En Ecuador la producción de pimiento en el 2013 fue estimada en 5.704 toneladas producidas en 1.796 ha (FAOSTAT, 2016). A pesar de que el 90% de la producción total es destinada al consumo interno, actualmente está bajo consideración permitir la exportación de pimiento fresco a los Estados Unidos desde Ecuador (Ferguson, 2015).

6.3. Características de los virus fitopatógenos.

Los virus de las plantas son nucleoproteínas que difieren ampliamente de todos los demás fitopatógenos no solo en tamaño y forma, sino también en la sencillez de su constitución química y estructura física, método de infección, propagación, translocación dentro del hospedero, diseminación y los síntomas que producen sobre el hospedero. Debido a su tamaño pequeño y a la transparencia de su partícula, los virus no pueden observarse ni detectarse mediante los métodos utilizados para otros patógenos. Los virus no son células ni constan de ellas (Agrios, 2005).

6.4. Sintomatología de las enfermedades virales en las plantas.

El término síntoma se define como la variación macroscópica y/o microscópica (forma, color, tamaño; entre otros.) que manifiesta en la planta como consecuencia de acciones patogénicas, deficiencia de nutrientes, condiciones ambientales adversas, etc. El estudio de la sintomatología causada por enfermedades virales requiere de observaciones cuidadosas y periódicas de las plantas infectadas (plantas indicadoras), a fin de determinar con precisión el tipo, la intensidad y la prevalencia de cualquier anormalidad. Los síntomas más evidentes son aquellos que se manifiestan en las hojas, aunque algunos virus pueden causar síntomas en tallos, frutos, raíces u otras partes de la planta. El síntoma más común de las enfermedades causadas por virus es la reducción de la tasa de desarrollo, manifestada a través de grados de achaparramiento o enanismo en la planta. Por otro lado, casi todas las enfermedades virosas causan reducciones en los rendimientos totales, estos efectos pueden ser severos y fácilmente perceptibles o pueden ser insignificantes (Jayasinghe y Salazar, 1993).

En casi todas las enfermedades virales que ocurren en el campo, el virus está presente en toda la planta (infección sistémica) y los síntomas producidos son llamados “sistémicos”. En plantas inoculadas artificialmente, ciertos virus causan pequeñas lesiones generalmente necróticas, en el punto de entrada (infección local) y los síntomas son llamados “lesiones locales” (Jayasinghe y Salazar, 1993).

Muchos virus pueden infectar ciertos hospederos sin causar el desarrollo de síntomas evidentes; tales virus son llamados comúnmente “virus latentes” y los hospederos, “asintomáticos”. En ambos casos las plantas que comúnmente desarrollan síntomas al ser infectadas con un determinado virus, pueden permanecer temporalmente

asintomáticas bajo ciertas condiciones medio ambientales, por ejemplo, alta o baja temperatura. A esto se le denomina “enmascaramiento” (Jayasinghe y Salazar, 1993).

Los síntomas producidos en plantas por infección viral de acuerdo a Jayasinghe y Salazar (1993) se pueden dividir en:

a) Síntomas locales: Generalmente se producen en las hojas inoculadas de la planta. Son lesiones isométricas discretas, es decir, que se pueden contar, normalmente no tienen importancia económica, pero son muy útiles para la diagnosis. Dentro de los síntomas locales tenemos: Manchas cloróticas, puntos cloróticos, anillos cloróticos, manchas necróticas, puntos necróticos, anillos necróticos

b) Síntomas sistémicos: Se producen en las hojas de las plantas que no han sido inoculadas. Son los más importantes porque pueden afectar cualquier parte de la planta. Dentro de los síntomas sistémicos tenemos: Mosaico, amarillamiento, necrosis.

c) Anormalidades de crecimiento: Pueden presentarse en cualquiera de las partes de la planta, y podemos citar: Encarrujamiento de hojas, epinastía, proliferación de brotes, rugosidad, encrespamiento, hojas coriáceas, enanismo.

6.5. De la importancia de los virus que afectan a las plantas.

Los virus que afectan plantas son un importante grupo de organismos patógenos. En conjunto, los problemas asociados a virosis, dada su capacidad de afectar a cultivos de interés agrícola y las serias dificultades que plantea su control, son uno de los principales retos a los que se enfrenta la agricultura actual. De forma general, se pueden distinguir dos fases en el ciclo viral de un virus de plantas (López y López, 2000).

1. El virus penetra en las células de los tejidos vegetales de una planta huésped, utiliza los sistemas de dichas células para poder multiplicarse. De este modo se establece el proceso de replicación en su interior, pudiendo en ocasiones extenderse a las células adyacentes, produciéndose una propagación de la infección dentro de la planta.

2. Debido a su condición de parásitos obligados, el virus necesita transmitirse de una planta infectada a otra, invadiendo un nuevo organismo donde se desarrolla una nueva infección.

6.6. Virus y el mecanismo natural de resistencia de las plantas.

Las enfermedades de plantas causadas por virus existen en todo el planeta y afectan tanto a especies cultivadas como a plantas nativas. Los virus de plantas son dependientes de un hospedero y/o un vector para sobrevivir. La eficiencia y la extensión de la propagación de la infección dependen de una planta como un factor importante para permitir que el virus sea accesible a su respectivo vector(es), los cuales a su vez permitirán su dispersión hacia nuevas plantas y cultivos (Murphy, 2006).

Los virus de plantas son genética y estructuralmente simples agentes infecciosos, pero su relación obligatoria e íntima con la planta hospedera es bastante compleja. La disponibilidad de variedades resistentes es la mejor aproximación para lograr la protección de los cultivos, pero existe la posibilidad de que otros virus o cepas virales sean capaces de superar este tipo de resistencia. Otra estrategia ha sido alterar los tiempos de cultivo para evitar la migración de los vectores, disuadir a los vectores usando coberturas y también el uso de cultivos trampa. Siendo la premisa básica detrás de estas aproximaciones retrasar la introducción del virus en los cultivos permitiendo así que las plantas maduren y lleguen a un estadio de desarrollo que le permita esencialmente tolerar la infección, lo que generalmente resulta en una reducción en los niveles de acumulación del virus y de las pérdidas en la producción (Murphy, 2006).

6.7. Diagnóstico de virus de plantas.

Hay tres situaciones básicas en las que las técnicas para el reconocimiento y la identificación de un virus son necesarias:

1. Diagnóstico en campo para determinar el origen de una patología.

2. Para la detección de un virus determinado, usualmente en una situación de cuarentena o epidemiologia.

3. Para un virus conocido; cuando lo manipulamos y purificamos. Se debe considerar que las plantas enfermas en campo pueden estar infectadas por más de un virus. Por ello un paso previo en el diagnóstico para una enfermedad desconocida debe ser determinar si más de un virus está involucrado (Dávila, 2016).

6.8. Virosis que afectan especies del género Capsicum annuum.

Las enfermedades virales son un factor limitante en la producción de ajíes y pimientos en varias regiones del mundo. De manera documentada (Murphy y Warren, 2003), se conoce que alrededor de 67 virus infectan al género *Capsicum sp.*
A continuación se mencionan los virus hasta la fecha reportados en Ecuador.

6.8.1. Potato virus Y (PVY).

Según Kerlan (2006), este virus fue descrito por Smith en 1931, pertenece a la Familia Potyviridae y al Género Potyvirus; se reconoció por primera vez en papa, distribuido en todo el mundo en las áreas de este cultivo, en las zonas donde se cultiva tabaco y en cultivos al aire libre de tomate y pimiento en los países cálidos. Es un potyvirus inusual en tener numerosas especies de áfidos vector se transmite de una manera no persistente que significa breves períodos de adquisición e inoculación. La retención del virus en los áfidos en la mayoría de los casos tiene una duración de no más de una o dos horas. Sin embargo, se informaron los períodos de retención más largos, con diferencias significativas según la cepa viral y las especies de áfidos vector (Kerlan, 2006).

6.8.1.1 Especies de diagnóstico.

Según Kerlan (2006) las especies de plantas que se utilizan son:

- *Capsicum frutescens* cv. Tabasco: Moteado leve a severo.
- *Nicotiana glutinosa:* Moteado leve a severo dependiendo de la cepa.
- *N. tabacum:* La mayoría de las cepas producen descompensación de la vena seguido de moteado.
- *Solanum tuberosum* cv. Saco: Algunas cepas producen lesiones necróticas locales.

6.8.2. Tobacco etch virus (TEV).

Es miembro de la Familia Potyviridae y del Género Potyvirus fue descrito por Blakeslee 1921 y Johnson 1930 según Purcifull y Hiebert (1982). Se transmite mecánicamente por varias especies de áfidos de una manera no persistente. Infecta una

amplia gama de huéspedes experimentales y causa enfermedades de varios cultivos de solanáceas en América del Norte y del Sur. La gravedad de los síntomas en plantas cultivadas depende en gran medida de la especie huésped, cultivar y de la cepa del virus. Los síntomas en pimiento incluyen moteado, mosaico, retraso en el crecimiento, distorsión de las hojas y frutos (Purcifull y Hiebert, 1982).

6.8.2.1. Especies de diagnóstico.

Según Purcifull y Hiebert (1982) las especies de plantas que se utilizan son:

- *Nicotiana tabacum:* Hojas inoculadas por lo general desarrollan manchas cloróticas indefinidas, anillos o arcos necróticos. Los síntomas sistémicos son descompensación de la vena y el grabado necrótico.
- *Datura stramonium:* sistémicamente se produce moteado, distorsión de las hojas y franjeado de las venas. Algunas cepas reducen las hojas a las correas de tejido, las espinas de las cápsulas pueden ser reducidas o ausentes.
- *Capsicum annuum:* moteado sistémico, mosaico de color verde oscuro y la distorsión de la hoja.
- *C. frutescens:* La mayoría de las cepas inducen necrosis radical, marchitez y muerte.
- *Cassia obtusifolia:* Lesiones locales necróticas, distorsión, clorosis, necrosis y retraso en el crecimiento de las hojas sistémicamente infectadas.

6.8.3. Tobacco mosaic virus (TMV).

Miembro de la Familia Virgaviridae y del Género Tobamovirus, fue descrito por primera vez por Mayer en 1886 según Zaitlin (2000), se encuentra distribuido en todo el mundo infecta al menos 199 especies de 30 familias de plantas. El virus se conoce donde se cultiva tabaco, y se considera que es uno de los virus de tabaco más importantes económicamente, es transmitido principalmente por inoculación mecánica no tiene vectores verdaderos, aunque ha habido casos de transmisión por insectos masticadores incidental, muy probablemente por medios mecánicos, partículas o

fragmentos de tejido infectado por virus transmitidos por el suelo pueden servir como fuentes de infección a través de las raíces (Zaitlin, 2000).

6.8.3.1. Especies de diagnóstico.

Según Zaitlin (2000) las especies de plantas que se utilizan son:

- *Nicotiana tabacum* cvs. Turkish, Samsum, White Burley y Xanthi: Muestran un aclareo de nervaduras en las hojas invadidas sistémicamente 3 a 4 días después de la inoculación, seguida de un mosaico verde oscuro o verde claro, que a menudo son acompañados por deformación de hojas y formación de ampollas.
- *N. glutinosa, N. tabacum* cvs. Samsum NN y Xanthi-nc, *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto y *Chenopodium amaranticolor*: Reaccionan con lesiones necróticas locales.

6.8.4. Alfalfa mosaic virus (AMV).

Según Jaspars y Bos (1980), este virus Pertenece a la Familia Bromoviridae y es miembro del Género Alfamovirus, fue descrito por Weimer 1931-1934, Bancroft y Kaesberg 1958-1960. Posee una distribución geográfica en todo el mundo, se produce de forma natural y con frecuencia asintomática en muchas herbáceas, leñosas y algunos hospederos. Es transmisible a más de 430 especies de 51 familias dicotiledóneas. El virus es fácilmente transmitido por la savia, y la semilla en algunos hospederos, se transmite en la forma no persistente por pulgones a una gama muy amplia de plantas huésped. Los síntomas dependen en gran medida de la cepa del virus, la variedad de acogida y la etapa de crecimiento, y las condiciones ambientales. La infección puede estar latente o enmascarada y la recuperación ocurre a menudo, en muchas especies el moteado y el mosaico es de color amarillo brillante (percal); también se puede producir necrosis local y sistémica (Jaspars y Bos, 1980).

6.8.4.1. Especies de diagnóstico.

Según Jaspars y Bos (1980) las especies de plantas que se utilizan son:

- *Chenopodium amaranticolor y C.quinoa:* Lesiones locales cloróticas o necróticas.

- *Nicotiana tabacum:* Lesiones locales necróticas o cloróticas; algunas cepas no dan ninguna reacción local. Los síntomas sistémicos son por lo general el moteado suave, manchas anulares de coalescencia y raramente hay deformación y enanismo inducido por algunas cepas.
- *Ocimum basilicum:* Mosaico amarillo.
- *Phaseolus vulgaris:* Muchas cepas del virus dan lesiones necróticas locales otras cepas producen lesiones locales cloróticas o ninguno en absoluto, sino da moteado leve sistémico, necrosis de la vena y distorsión de la hoja.
- *Pisum sativum:* En la mayoría de los cultivares induce lesiones locales y / o marchitamiento de las hojas inoculadas, necrosis del tallo y muerte de la planta.
- *Vicia faba:* La mayoría de las cepas dan lesiones locales necróticas, a veces seguido de un moteado leve, pero más a menudo necrosis del tallo y muerte de la planta.
- *Vigna unguiculata:* Las cepas más comunes producen lesiones locales necróticas y no infectan por vía sistémica; otros no inducen lesiones locales pero producen diversos síntomas sistémicos.

6.8.5. Potato virus X (PVX).

Es un miembro de la Familia Alphaflexiviridae y pertenece al Género Potexvirus, descrito por Smith en 1931, se encuentra distribuido en las zonas productoras de papa en todo el mundo (Renate y Lesemann, 1989). El virus es altamente contagioso y se propaga por contacto mecánico, especialmente en equipos para agricultura y horticultura. En los cultivos de papa, el medio más eficaz de protección es el uso de la resistencia conferida por genes mayores. En la papa el virus causa un mosaico leve; pérdidas en el rendimiento de 10 a 20%. En el tabaco que causa un moteado o manchado necrótico, en el tomate causa mosaico ligero y retraso en el crecimiento. En los tres anfitriones la gravedad de los síntomas aumenta en gran medida en las infecciones mixtas con otros virus, por ejemplo, el *Virus Y de la patata* (Renate y Lesemann, 1989).

6.8.5.1. Especies de diagnóstico.

Según Renate y Lesemann (1989) las especies de plantas que se utilizan son:

- *Nicotiana tabacum* y otras especies de *Nicotiana*: Las primeras hojas infectadas a menudo desarrollan manchas anulares necróticas; después muestran moteado clorótico o necrótico, mosaico o clorosis venal.
- *Datura stramonium:* Pequeños anillos cloróticos seguidos por el moteado, clorosis o necrosis

6.8.6. Tobacco ringspot virus (TRSV).

Miembro de la Familia Secoviridae perteneciente al Género Nepovirus, descrito por Fromme *et al*., en 1927 según Stace (1985). Este virus se transmite fácilmente por inoculación de savia y tiene una amplia gama de huéspedes, incluyendo tanto plantas leñosas y herbáceas, pero el vector natural es el nematodo *Xiphinema americanum*. Los informes de la dispersión natural se limitan esencialmente a América del Norte, pero el virus se ha diseminado a muchos países en el material de plantación infectado (Stace, 1985).

El virus se encuentra en la naturaleza, afectando tanto a cultivos anuales y perennes, se puede difundir en las semillas o material de plantación a las zonas donde *Xiphinema spp.* están ausentes o sus poblaciones son bajas, siendo en estos casos insignificante el problema de la enfermedad. El virus está muy extendido en las zonas de cultivo de tabaco de América del Norte, causando patrones de anillos y líneas sobre el follaje, enanismo de la planta, y hojas pequeñas de baja calidad (Stace, 1985).

El virus es endémico del centro y del Este de América del Norte, que se extiende desde el Sur de Ontario en Canadá hasta el Valle del Río Grande en Texas. Se ha aislado en varias especies de plantas en diferentes lugares del mundo, gladiolo en Japón y Australia, el iris en los Países Bajos, petunia, pimiento, berenjena y soja en la India, papaya en Nigeria, tabaco en Yugoslavia y en cucurbitáceas en Irán. (Stace, 1985).

6.8.6.1. Especies de diagnóstico.

Según Stace (1985) las especies de plantas que se utilizan son:

- *Chenopodium amaranticolor* y *C. quinoa:* Lesiones locales necróticas, por lo general no hay infección sistémica.
- *Cucumis sativus:* Lesiones locales cloróticas o necróticas, moteado, y una distorsión apical con enanismo.
- *Nicotiana tabacum y N. clevelandii:* Lesiones locales necróticas que con frecuencia se convierten en anillos o manchas anulares; hojas infectadas sistémicamente pueden mostrar patrones de anillos o de línea, hojas producidas después son asintomáticas, pero contienen el virus.
- *Phaseolus vulgaris:* Manchas necróticas en las hojas inoculadas, las hojas infectadas sistémicamente pueden mostrar manchas y anillos; y la punta de crecimiento se vuelve necrótica.
- *Solanum lycopersicum:* Difícil de infectar mediante la inoculación de savia; plantas que están infectadas desarrollan pequeñas manchas necróticas en las hojas inoculadas, sistémicamente produce necrosis de la vena y epinastía.
- *Vigna unguiculata:* Lesiones necróticas, necrosis sistémica primaria, necrosis apical y marchitamiento, cultivares de frejol se pueden utilizar para distinguir cepas.

El virus de la mancha anular del tabaco puede ser confundido con otros virus cuando la identificación se basa en la respuesta de los síntomas en una variedad de plantas indicadoras herbáceas. De los diversos nepovirus, el virus de la mancha anular del tomate es el que tiene más probabilidades de ser confundido con la mancha anular del tabaco, ya que estos dos virus infectan a la misma especie y se producen en la misma región geográfica. A pesar de la posibilidad de distinguir estos virus sobre la base de reacciones del huésped, las pruebas serológicas son esenciales para la identificación positiva (Stace, 1985).

6.8.7. Peru tomato virus (PTV).

Según Fribourg y Fernández (1982), este virus pertenece a la Familia Potyviridae y miembro del Género Potyvirus y fue descrito por Raymer *et al*., 1972. Es un virus de fácil transmisión por medio de la savia y tiene un estrecho rango de huéspedes, distribuido ampliamente en Perú a lo largo de las áreas costeras de regadío, se transmite

de forma no persistente por Myzus persicae. En tomate el virus causa mosaico, epinastía, torsión, arrugas, manchas necróticas en las hojas, y mosaico en frutos; también induce mosaico en las bandas de las venas en pimiento (*Capsicum annuum, C. chinense, C. péndulo* y en *Physalis peruviana)* causando una severa reducción en el rendimiento (Fribourg y Fernández, 1982).

6.8.7.1. Especies de diagnóstico

Según Fribourg y Fernández (1982) las especies de plantas que se utilizan son:

- *Lycopersicon pimpinellifolium:* Epinastía en la hoja, retraso del crecimiento y la necrosis apical sistémica. Algunas cepas inducen moteado en lugar de necrosis
- *Nicotiana debneyi:* Manchas y anillos cloróticos sistémicos.
- *Nicotiana occidentalis:* Manchas cloróticas irregulares, mosaico y deformación de hojas.
- *Nicotiana tabacum* cv Burley y *N. occidentalis* son huéspedes adecuados para mantener el virus, plántulas de *N. occidentalis* jóvenes son adecuados para las pruebas de transmisión de áfidos.

6.9. Influencia de la temperatura sobre los virus.

Todos los virus tienen un óptimo de temperatura bajo el cual inducen los síntomas más fuertes, por ejemplo, 14-16°C para el Virus X o el Virus latente de la papa andina, y 28°C para el mosaico del tabaco. Cuando las temperaturas sobrepasan el óptimo, los síntomas comienzan a disminuir pudiendo llegar a ser tan suaves que las plantas infectadas lucen normales. La disponibilidad de los elementos nutricionales mayores, que dan lugar a un máximo crecimiento de la planta, permite también la máxima multiplicación viral y el desarrollo de síntomas más severos; por el contrario, plantas con deficiencia de nutrientes muestran pocos síntomas. En general la intensidad de los síntomas está directamente relacionada con la concentración de virus en los tejidos. La infección en plantas jóvenes en crecimiento activo induce la manifestación de síntomas dependiendo del virus y las condiciones ambientales, pero rara vez induce síntomas en plantas adultas de la misma especie o cultivar (Fribourg, 2007).

VII. DISEÑO METODOLOGICO.

7.1. Ubicación.

La investigación se realizó en la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica de Manabí, ubicada en la parroquia Lodana del cantón Santa Ana, provincia de Manabí; localizada geográficamente a 01° 09’51” de latitud Sur y 80°23´ 24 W de longitud Oeste con una altitud de 60 msnm (INHAMI 2014).

7.2. Producción de plantas indicadoras.

Las plantas utilizadas en la presente investigación correspondieron a tres géneros y 14 especies de la familia Solanaceae: *Nicotiana glutinosa, N. occidentalis, N. rustica, N. tabacum* cv. Samsum, *N. tabacum* cv. White Burley, *N. benthamiana, N. bigelovii, N. debneyii*, *Capsicum frutescens* cv. Tabasco, *C. chinense* PI 15225, *C. annuum* cv. California Wonder, *C. annuum* cv. Yolo Wonder, *C. annuum* 'Avelar', *Datura stramonium*; un género y una especie de la familia Amaranthaceae: *Chenopodium quinoa*; y un género y una especie de la familia Fabáceae : *Vigna unguiculata* Black.

Los almácigos se los realizó en macetas plásticas de medio kilo que contenían turba. Una vez que las plántulas alcanzaban un tamaño adecuado en los almácigos se las trasplantaban a las macetas también de medio kilo, pero con un sustrato estéril 1:1:1 (arena, suelo y compost), (Anexo 2). Las plantas se mantuvieron en una cubierta plástica transparente que dio paso a la luz solar y además protegida por malla anti áfidos, en la cual la temperatura oscilaba entre 18-38°C.

7.3. Recolección de muestras y obtención del inóculo.

Se tomó como muestra hojas y frutos de plantas enfermas que mostraban enanismo, mosaicos, distorsión, ampolladuras, malformación y anillos cloróticos; entre los principales síntomas. Estas muestras se colocaron en bolsas plásticas que a la vez irían dentro de una funda de papel, de esta manera se las traslado al lugar de inoculación donde se realizó la recepción de las muestras (Anexo 2), las mismas que se colectaron en las zonas de Buenos aires, Ceibal, Colón, Crucita, Charapotó, Lodana y en la recta de Rocafuerte, Completando un total de 32 muestras (Cuadro 1, Imagen 1).

Cuadro 1. Muestras de Capsicum annuum, colectadas en las zonas productoras del Valle del Rio Portoviejo.

Muestra	**Procedencia**	**Hospedante**	**Variedad**
Ba:1.1	Buenos aires(Rocafuerte)	*C. annuum*	Desconocida
Ba:1.2	Buenos aires(Rocafuerte)	*C. annuum*	Desconocida
Ba:1.3	Buenos aires(Rocafuerte)	*C. annuum*	Desconocida
Ba:1.4	Buenos aires(Rocafuerte)	*C. annuum*	Desconocida
Ce:1.1	Ceibal(Rocafuerte)	*C. annuum*	Salvador F1
Ce:1.2	Ceibal(Rocafuerte)	*C. annuum*	Quetzal F1
Ce:1.3	Ceibal(Rocafuerte)	*C. annuum*	Quetzal F1
Ce:1.4	Ceibal(Rocafuerte)	*C. annuum*	Quetzal F1
Co:1.1	Colón (Portoviejo)	*C. annuum*	Salvador F2
Co:1.2	Colón (Portoviejo)	*C. annuum*	Salvador F2
Co:1.3	Colón (Portoviejo)	*C. annuum*	Salvador F2
Co:1.4	Colón (Portoviejo)	*C. annuum*	Salvador F2
Co:2.1	Colón (Portoviejo)	*C. annuum*	Salvador F1
Co:2.2	Colón (Portoviejo)	*C. annuum*	Salvador F1
Co:2.3	Colón (Portoviejo)	*C. annuum*	Salvador F1
Co:2.4	Colón (Portoviejo)	*C. annuum*	Salvador F1
Co:2.5	Colón (Portoviejo)	*C. annuum*	Salvador F1
Ch:1.1	Charapotó(Sucre)	*C. annuum*	Salvador F2
Ch:1.2	Charapotó(Sucre)	*C. annuum*	Salvador F2
Cr:1.1	Crucita(Portoviejo)	*C. annuum*	Salvador F1
Cr:1.2	Crucita(Portoviejo)	*C. annuum*	Salvador F1
Cr:1.3	Crucita(Portoviejo)	*C. annuum*	Salvador F1
Cr:1.4	Crucita(Portoviejo)	*C. annuum*	Salvador F1
Lo:1.1	Lodana(Santa Ana)	*C. annuum*	Desconocida
Lo:1.2	Lodana(Santa Ana)	*C. annuum*	Desconocida
Lo:1.3	Lodana(Santa Ana)	*C. annuum*	Desconocida
Rr:1.1	Recta de Rocafuerte(Rocafuerte)	*C. annuum*	Salvador F2
Rr:1.2	Recta de Rocafuerte(Rocafuerte)	*C. annuum*	Salvador F2
Rr:1.3	Recta de Rocafuerte(Rocafuerte)	*C. annuum*	Salvador F2
Rr:1.4	Recta de Rocafuerte(Rocafuerte)	*C. annuum*	Salvador F2
Rr:1.5	Recta de Rocafuerte(Rocafuerte)	*C. annuum*	Salvador F2
Rr:1.6	Recta de Rocafuerte(Rocafuerte)	*C. annuum*	Salvador F2

El procedimiento de inoculación consistió en espolvorear Carborundum malla 600 como abrasivo en cada una de las hojas de las plantas indicadoras, para permitir la apertura de las células sin que se dé la rotura celular que mate o dañe el tejido de las hojas, abriéndole paso así a la solución inoculante. Cada muestra fue macerada utilizando mortero y pilón conteniendo una pequeña cantidad de agua destilada, así se obtuvo el extracto del material vegetal para luego mojar la yema del dedo y frotar suavemente desde el peciolo hasta el ápice en las hojas verdaderas de cada indicadora (Jayasinghe y Salazar, 1993). (Anexo 4). 21 días después se seleccionaron los aislamientos que reaccionaron en las especies indicadoras inoculadas, los mismos que fueron el objeto de estudio de allí en adelante.

Un total de 20 aislamientos fueron obtenidos en ocho especies de plantas indicadoras, usándose las plantas de *N. occidentalis* y *N. tabacum* cv. Samsum como plantas fuentes; por ser las que presentaron con mayor frecuencia sintomatología viral a las muestras colectadas.

7.4. Caracterización biológica.

Los 20 aislamientos obtenidos fueron inoculados en plantas: *Nicotiana glutinosa, N. occidentalis, N. rustica, N. tabacum* cv. Samsum, *N. tabacum* cv. White Burley, *Capsicum frutescens* cv. tabasco, *C. chinense* PI 15225, *C.annuum* cv. California Wonder, utilizando tres plantas por cada indicadora, para cada aislamiento.

La caracterización de síntomas de los aislamientos seleccionados, se realizó inoculando las hojas verdaderas de plantas en activo crecimiento de las especies antes mencionadas, con un extracto obtenido de *N. occidentalis* o *N. tabacum cv. Samsum* según sea el caso de cada aislamiento que fue estudiado. Para la detección de infecciones sistémicas asintomáticas en las plantas indicadoras inoculadas, se llevó a cabo retroinoculaciones partiendo de la maceración de hojas no inoculadas de cada indicador (back test) 21 días después de la inoculación. El back test fue realizado en plantas de *N. occidentalis*.

Los síntomas producidos en las plantas inoculadas, fueron evaluados y registrados considerándose forma, tamaño, aspecto y color de las lesiones y otras particularidades observables.

7.5. Inoculación en el híbrido comercial.

Para validar la resistencia del híbrido comercial Quetzal, se utilizó el mismo procedimiento de inoculación empleado en las plantas indicadoras.

7.6. Análisis serológico.

7.6.1. Purificación, conjugación y titulación de las Inmunoglobulinas.

La técnica utilizada para la reacción serológica fue la prueba de conjugados enzimáticos de Clark y Adams (1977), [Double antibody sándwich enzyme-linked immuno-sorbent assay (DAS-ELISA)]. Para esto se purificaron las inmunoglobulinas (IgG) de los antisueros a utilizarse: (*PepMV, PVX, TEV, PTV, PVY, TRSV, CMV, AMV)* mediante precipitación con sulfato de amonio, según la metodología de Ball *et al*., (1990): Se realizó una dilución 1/10 de antisuero crudo con agua destilada, en agitación contínua y se agregó 10 ml de sulfato de amonio saturado al 75%. Después de incubar esta mezcla durante 45 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 10.000 rpm por 10 minutos en la microcentríga Eppendorf modelo 5415D. El precipitado se resuspendió en buffer fosfato salino (PBS ½ X) pH 7,4 y se dializó cuatro veces contra la misma solución buffer por 16 horas a 4°C. La concentración de las IgG, previamente diluidas 1/100 en agua destilada, se calculó en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-Visible Recording spectrophotometer) a una absorbancia de 280 nm. La IgG purificada fue estandarizada a una concentración de 1 mg/ml (densidad óptica A280 nm = 1.4) y se agregó 0,01% de azida de sodio antes de almacenarla en un frasco de vidrio a 4 °C.

La preparación del conjugado de la IgG con la enzima fosfatasa alcalina se llevó acabo siguiendo la metodología de Mackenzie (1990) modificada en el Centro internacional de la Papa: Después de mezclar un ml de la IgG purificada (1mg/ml) con 1250 unidades de fosfatasa alcalina (Sigma Diagnostic Inc.) y 2.6 µl de glutaraldehido al 25%, se dejó incubar a medio ambiente por 3 horas, agitando cada 15 minutos. La mezcla se dializó a 4°C contra el buffer PBS 1X, pH 7.4 por 4 horas cambiando el buffer cada 1 hora, pasado este periodo la preparación fue colocada en un tubo siliconizado. Antes de almacenar el conjugado a 4°C, se agregó 5 mg de albúmina de suero bovino (BSA) por ml de conjugado + 0.02% de azida de sodio.

Las titulaciones de las IgG, la IgG-conjugada y del antígeno se hicieron en una placa de microprecipitación de poliestireno de fondo plano (Dynatech Laboratories Inc.) marcada con tinta indeleble. Se colocó 100 µl por hoyo de la IgG purificada diluida a 1/500, 1/1000 y 1/1500 con buffer de cobertura (buffer carbonato 50 mM, pH 9.6). Después de incubar la placa a 37°C por 12 horas, se enjuagó tres veces por 3 minutos con buffer de enjuagado PBS-Tween (PBS ½ X + Tween 1%, pH7.4). Posteriormente se añadió savia de *N. occidentalis* o *N. tabacum* cv Samsum infectada con el virus (antígeno) de cada aislamiento y savia de un planta sana (testigo) diluidos a 1/10 y 1/100 [peso (g)/volumen (ml)] con buffer de maceración (PBS 1X-Tween + 2% de polivinilpirrolidona + 1% de albúmina de huevo. La placa fue incubada a 4°C hasta el día siguiente, se enjuagó nuevamente tres veces por 3 minutos por PBS-Tween y se añadió 100 µl por hoyo de la IgG-conjugada diluida a 1/500, 1/1000 7 1/1500 en buffer de conjugado (PBS 1X-Tween + 2% de polivinilpirrolidona + 0.2 de albúmina de huevo) y se encubó por 4 horas a 37°C. Finalmente, se lavó como en las veces anteriores con PBS-Tween y se añadieron 80 µl del sustrato de la enzima fosfatasa alcalina [a la dosis de 1 tableta por 100 ml de buffer de sustrato (dietanolamina + HCL 37%, pH 9.8)] por hoyo. Se dejó incubar a medio ambiente. Las lecturas se realizaron en un lector de placas de ELISA (Multiskan MCC, Thermo Electron Corporation) a 405 nm.

VIII. RESULTADOS.

8.1. Obtención de aislamientos.

A partir de 32 muestras colectadas en el Valle del Río Portoviejo, 20 aislamientos fueron obtenidos en ocho especies indicadoras de las 16 que se inoculó inicialmente.

8.2. Caracterización biológica.

En *C. annuum* cv. California Wonder el aislamiento Co:2.5 indujo mosaico suave, acompaño de ampolladuras y angostamiento de hojas. Con el aislamiento Ba:1.3 produjo mosaico suave. Con el aislamiento Ce:1.2 mostró franjeado de nervaduras y mosaico severo y con el aislamiento Co:2.4 produjo moteado variegado (Figura 1). El único aislamiento con infección sistémica asintomática fue Rr:1.1. Mientras que los aislamientos Co:1.1, Co:1.2, Co:1.3, Co:1.4, Co:2.1, Co:2.2, Co:2.3, Ba:1.1, Ba:1.2, Ba:1.4, Rr:1.2, Rr:1.5, Rr:1.6, Cr:1.2, Cr:1.4 no infectaron California Wonder. Para determinar o no infecciones sistémicas asintomáticas, fueron realizadas pruebas de back test con los aislamientos que no indujeron síntomas (Cuadro 2).

C. chinense PI 152225 fue infectado en forma sistémica asintomática cuando fue inoculado con los aislamientos Co:1.1, Rr:1.1, Cr:1.4, y los otros 17 aislamientos restantes no infectan esta especie, lo anterior fue confirmado mediante back test (Cuadro 2).

En *C. frutescens* cv. Tabasco, los aislamientos Co:1.1, Co:2.4 y Co:2.5 indujeron mosaico severo y ampolladuras de hojas. El aislamiento Co:1.3 indujo mosaico severo, ampolladuras de hojas y enanismo. El aislamiento Co:1.2 indujo mosaico, ampolladuras en las hojas y franjeado de nervaduras (Figura 1). Los aislamientos Rr:1.1, Rr:1.2, Rr:1.6 y Cr:1.2, resultaron sistémicos asintomáticos, mientras que los aislamientos Co:1.4, Ce:1.2, Co:2.1, Co:2.2, Co:2.3, Ba:1.1, Ba:1.2, Ba:1.3, Ba:1.4, Rr:1.5 y Cr:1.4, no infectan a Tabasco comprobado esto mediante back test (Cuadro 2).

N. glutinosa, solo reaccionó a dos aislamientos: Co:1.3 que indujo deformación y ondulación en el borde de la hoja, franjeado de nervaduras y mosaico. Mientras que el aislamiento Co:2.1 indujo franjeado de nervaduras y mosaico severo (Figura 2). Los

aislamientos Co:2.2 y Rr:1.2 resultaron sistémicos asintomáticos y los 16 aislamientos restantes no infectaron a esta especie: Co:1.1, Co:1.2, Co:1.4, Ce:1.2, Co:2.3, Co:2.4, Co:2.5, Ba:1.1, Ba:1.2, Ba:1.3, Ba:1.4, Rr:1.1, Rr:1.5, Rr:1.6, Cr:1.2, Cr:1.4 (Cuadro 2).

En *N. occidentalis* los aislamientos Ba:1.3, Co:1.4, Rr:1.1 y Rr:1.5 indujeron lesiones necróticas pequeñas y grandes acompañado de anillos concéntricos pajizos con borde marrón. Los aislamientos Co:2.1, Ba:1.4, Rr:1.2 y Cr:1.4 indujeron enanismo acompañado de mosaico severo. Los aislamiento Co:1.1 y Co:1.3 indujeron deformación de hoja, enanismo, ligera necrosis sistémica y mosaico suave. Los aislamientos Co:1.2 y Co:2.3 indujeron enanismo, moteado suave y ondulación en el borde de la hoja. Los aislamientos Co:2.5 y Ce:1.2 indujeron moteado suave y ampolladuras en las hojas. El aislamiento Ba:1.2 indujo manchas necróticas y anillos con centros pajizos y bordes rojizos. El aislamiento Cr:1.2 indujo manchas necróticas. El aislamiento Co:2.2 indujo anillos cloróticos y mosaico suave. El aislamiento Ba:1.1 manchas necróticas con borde rojizo. El aislamiento Co:2.4 indujo lesiones necróticas de color pajizo acompañado de un mosaico tenue, por último Rr:1.6 solo indujo mosaico severo (Figura 3- Cuadro 2).

En *N. rustica* los aislamientos Co:1.3 y Co:2.1 indujeron mosaico amarillo, ampolladuras en hojas, enanismo y reducción de la lámina foliar. El aislamiento Co:1.1 indujo manchas cloróticas irregulares. Mientras que el aislamiento Co:1.2 indujo mosaico y ampolladuras en hojas. El aislamiento Co:2.3 indujo mosaico amarillo acompañado de anillos cloróticos (Figura 2). Los otros 15 aislamientos (Co:1.4, Ce:1.2, Co:2.2, Co:2.4, Co:2.5, Ba:1.1, Ba:1.2, Ba:1.3, Ba:1.4, Rr:1.1, Rr:1.2, Rr:1.5, Rr:1.6, Cr:1.2, Cr:1.4) no infectaron a esta especie, comprobado mediante back test (Cuadro 2).

En *N. tabacum* cv. Samsum, los aislamientos Co:2.1 y Co:1.3 indujeron enanismo y mosaico suave. El aislamiento Co:2.3 indujo mosaico suave, aclaramiento de nervaduras y anillos cloróticos en hojas. El aislamiento Co:2.4 indujo mosaico moderado. El aislamiento Rr:1.6 indujo anillos y arcos cloróticos siendo este último síntoma la particularidad diferencial sobre los demás aislamientos. El aislamiento Co:1.1 indujo mosaico suave (Figura 4). Los aislamientos Co:1.2, Co:1.4, Co:2.2, Co:2.5 y Rr:1.2, fueron sistémicos asintomáticos y los aislados Ce:1.2, Ba:1.1, Ba:1.2, Ba:1.3, Ba:1.4, Rr:1.1, Rr:1.5, Cr:1.2 y Cr:1.4 no infectaron a esta especie, todo estos probado a través de back test (Cuadro 2).

N. tabacum cv. White Burley, esta especie solo reaccionó a un solo aislamiento de forma sistémica sintomática: Co:1.2 que indujo mosaico moderado a mosaico severo (Figura 4). Los aislamientos Co:1.3, Co:2.3 y Co:2.4 resultaron sistémicos asintomáticos y los aislamientos que no infectaron a esta especie fueron 16 (Co:1.1, Co:1.4, Ce:1.2, Co:2.1, Co:2.2, Co:2.5, Ba:1.1, Ba:1.2, Ba:1.3, Ba:1.4, Rr:1.1, Rr:1.2, Rr:1.5, Rr:1.6, Cr:1.2, Cr:1.4), comprobado a través de back test (Cuadro 2).

Cuadro 2. Síntomas mostrados en plantas indicadoras inoculadas con los 20 aislamientos.

Aislamiento	***N. occidentalis***	***N. tabacum* cv. Samsum**	***N. tabacum* cv. White Burley**	***N. rustica***	***N. glutinosa***	***C. annuum* California Wonder**	***C. chinense* PI 152225**	***C. frutescens* Tabasco**
Ba:1.1	MNBR	-*	-*	-*	-*	-*	-*	-*
Ba:1.2	MN/ ACPBR	-*	-*	-*	-*	-*	-*	-*
Ba:1.3	LNPG/ ACPBM	-*	-*	-*	-*	MS	-*	-*
Ba:1.4	MSe/E	-*	-*	-*	-*	-*	-*	-*
Ce:1.2	MoS/ AH	-*	-*	-*	-*	MSe/ FN	-*	-*
Co:1.1	E/ LNS/ MS/ DH	MS	-*	MCRE	-*	-*	ISA*	MSe/AH
Co:1.2	E/ MoS/ OBH	ISA*	MM/ MSe	M/ AH	-*	-*	-*	FN/ M/ AH
Co:1.3	E/ LNS/ MS/ DH	E/ MS	ISA*	E/ MA/AH/ RDLF	MSe/ FN/ DH	-*	-*	E/ MSe/ AH
Co:1.4	LNPG/ ACPBM	ISA*	-*	-*	-*	-*	-*	-*
Co:2.1	MSe/ E	E / MS	-*	MA/ E/ AH/ RDLF	MSe/ FN	-*	-*	-*
Co:2.2	ACl/MS	ISA*	-*	-*	ISA*	-*	-*	-*
Co:2.3	E/ MoS/ OBH	MS/ AN/ ACl	ISA*	ACl/ MA	-*	-*	-*	-*
Co:2.4	LNP/ MT	MM	ISA*	-*	-*	MoVa	-*	MSe/ AH
Co:2.5	MoS/ AH	ISA*	-*	-*	-*	MS/ AH/ AgDH	-*	MSe/ AH
Cr:1.2	MN	-*	-*	-*	-*	-*	-*	ISA*
Cr:1.4	MSe/ E	-*	-*	-*	-*	-*	ISA*	-*
Rr:1.1	LNPG/ ACPBM	-*	-*	-*	-*	ISA*	ISA*	ISA*
Rr:1.2	MSe/E	ISA*	-*	-*	ISA*	-*	-*	ISA*
Rr:1.5	LNPG/ ACPBM	-*	-*	-*	-*	-*	-*	-*
Rr:1.6	MSe	ACl/ ArCl	-*	-*	-*	-*	-*	ISA*

-*= ausencia del virus verificado por backtest, **ISA*=** infección sistémica asintomática verificado por backtest, **E=** enanismo, **M=** mosaico, **LNS=** ligera necrosis sistémica, **MS=** mosaico suave, **DH=** deformación de hoja, **MoS=** moteado suave, **OBH=** ondulación del borde de la hoja, **LNPG=** lesiones necróticas pequeñas y grandes, **ACPBM=** anillos concéntricos pajizos con borde marrón, **AH=** ampollas en hojas, **MSe=** mosaico severo, **LNP=** lesiones necróticas de color pajizo, **MT=** mosaico tenue **MNBR=** manchas necróticas con borde rojizo, **MN=** manchas necróticas **ACPBR=** anillos con centros pajizos y bordes rojizos, **MM=** mosaico moderado, **MCRE=** manchas cloróticas regulares escasas, **FN=** franjeado de nervaduras, **AN=** aclaramiento de nervaduras, **ACl=** anillos cloróticos, **ArCl=** arcos cloróticos, **MA=** mosaico amarillo, **RDLF=** reducción de lámina foliar, **MV=** mosaico verdoso, **MoVa=** moteado variegado, **AgDH=** angostamiento y deformación de hoja.

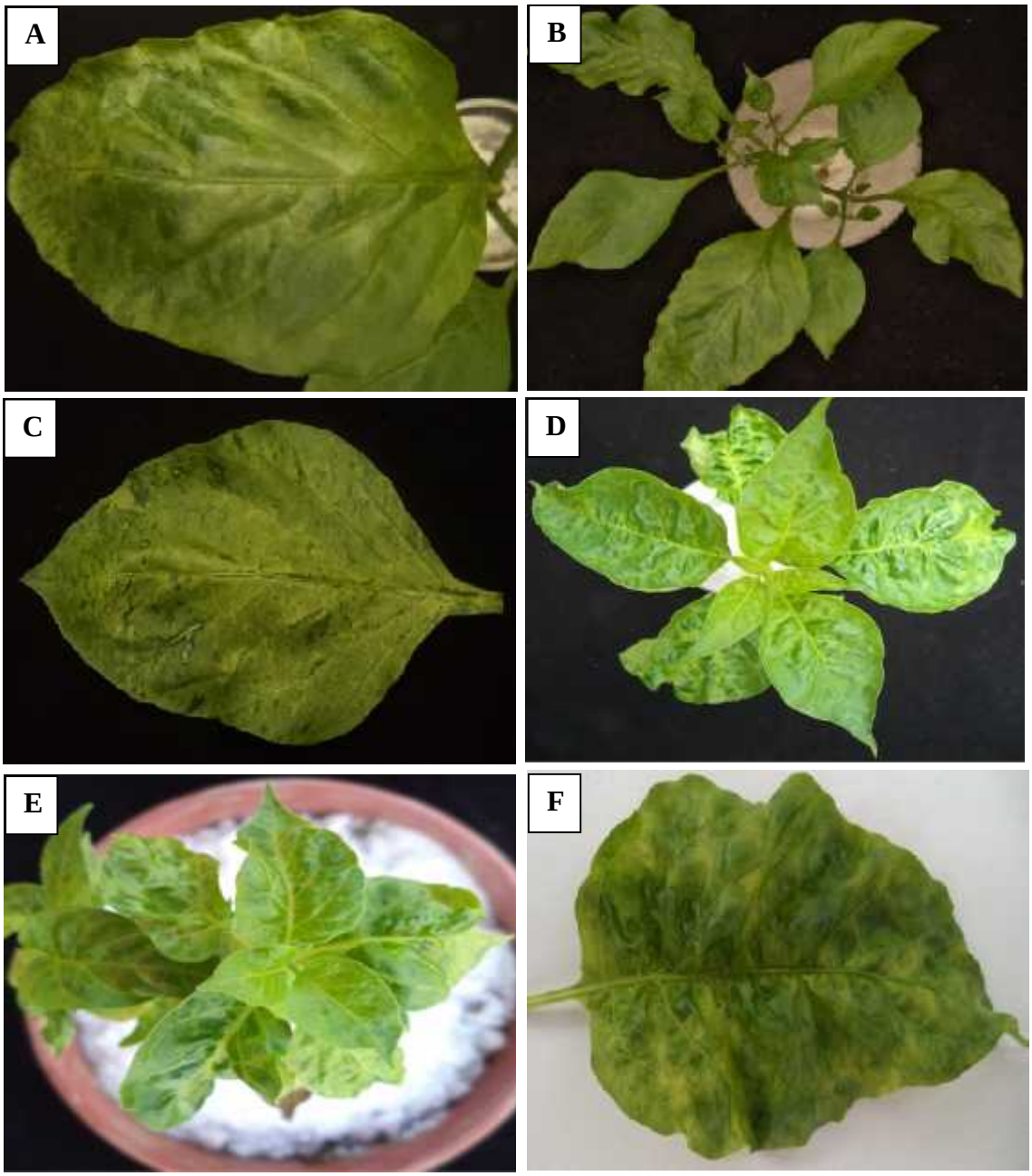

Figura 1. *Capsicum annuum* cv. California Wonder: **A)** moteado variegado inducido por el aislamiento Co:2.4. **B)** mosaico suave, ampolladuras, angostamiento y deformación de hoja inducido por el aislamiento Co:2.5. **C)** franjeado de nervaduras y mosaico severo inducido por el aislamiento Ce:1.2; *Capsicum frutescens* cv. Tabasco: **D)** ampolladuras de hojas y mosaico severo inducido por los aislamientos Co:1.1, Co:2.4 y Co:2.5. **E)** ampolladuras en hojas, enanismo y mosaico severo inducidos por el aislamiento Co:1.3. **F)** ampolladuras en hojas, franjeado de nervaduras y mosaico inducidos por el aislamiento Co:1.2.

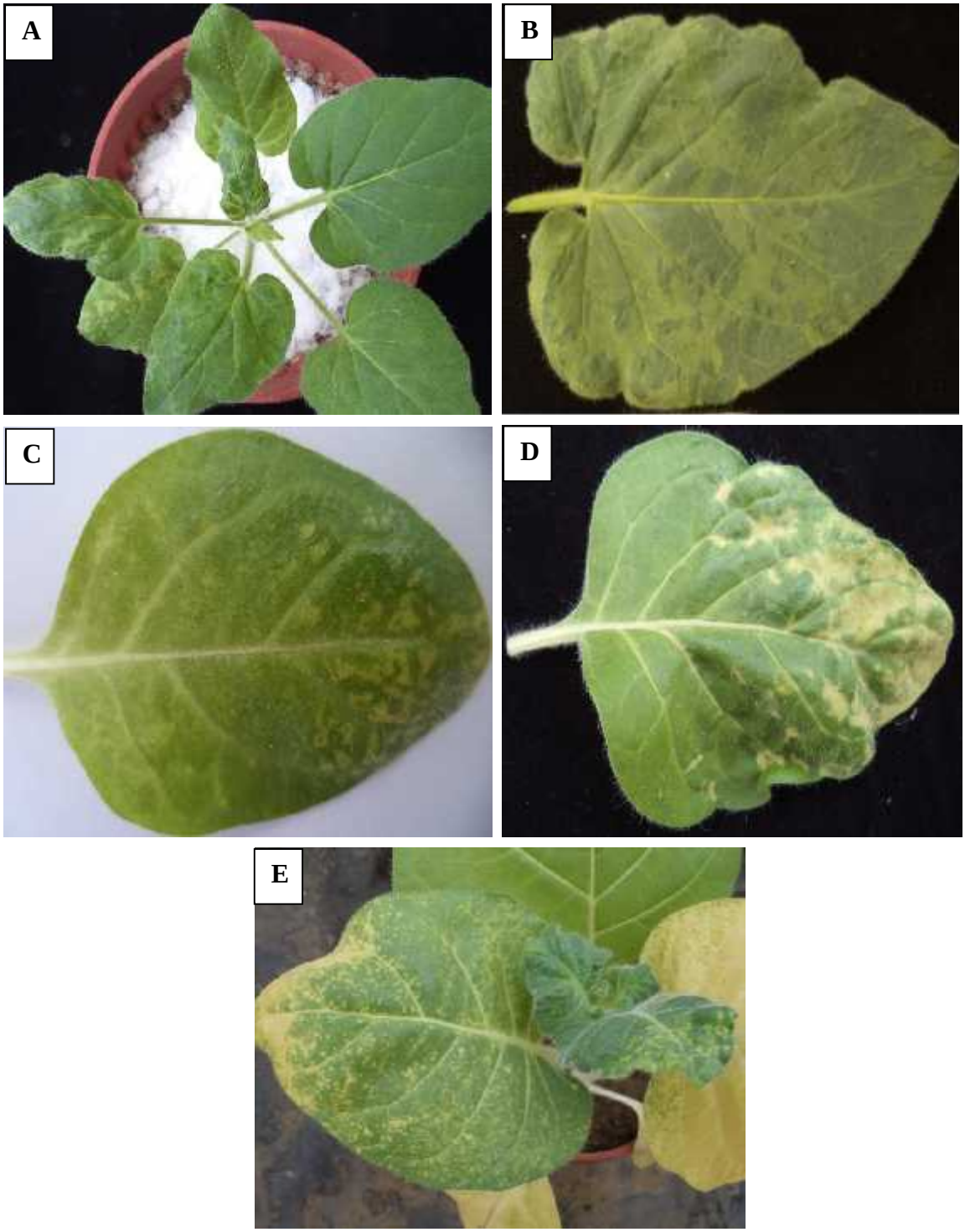

Figura 2. *N. glutinosa*: **A)** mosaico, franjeado de nervaduras, deformación y ondulación en el borde de la hoja inducidos por el aislamiento Co:1.3. **B)** mosaico severo y franjeado de nervaduras inducidos por el aislamiento Co:2.1; *N. rustica:* **C)** manchas cloróticas irregulares inducidas por el aislamiento Co:1.1. **D)** ampolladuras en hojas, enanismo, mosaico amarillo, y reducción de la lámina foliar inducidos por los aislamientos Co:1.3 y Co:2.1 **E)** ampolladuras de hojas y mosaico inducidos por el aislamiento Co:1.2.

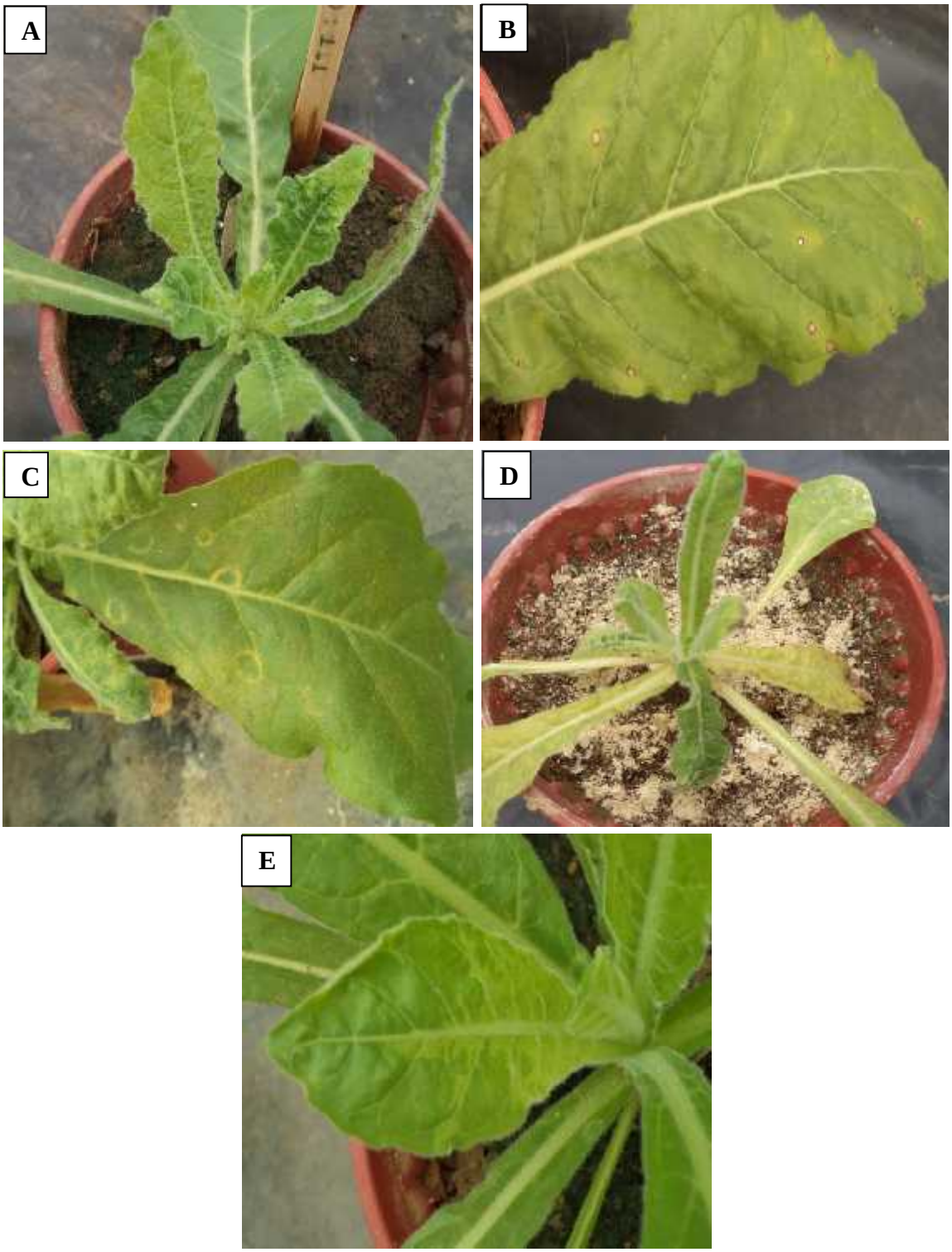

Figura 3. *N occidentalis:* **A)** deformación de hojas, enanismo, ligera necrosis sistémica y mosaico suave inducidos por los aislamientos Co:1.1, y Co:1.3. **B)** anillos concéntricos pajizos con borde marrón acompañado de lesiones necróticas pequeñas y grandes inducidos por los aislamientos Co:1.4, Ba:1.3, Rr:1.1, Rr:1.5. **C)** anillos cloróticos y mosaico suave en el aislamiento Co:2.2. **D)** enanismo acompañado de mosaico severo inducidos por los aislamientos Co:2.1, Ba:1.4, Rr: 1.2, Cr:1.4. **E)** ampolladuras en las hojas acompañado de moteado suave inducido por los aislamientos Co:2.5, y Ce:1.2.

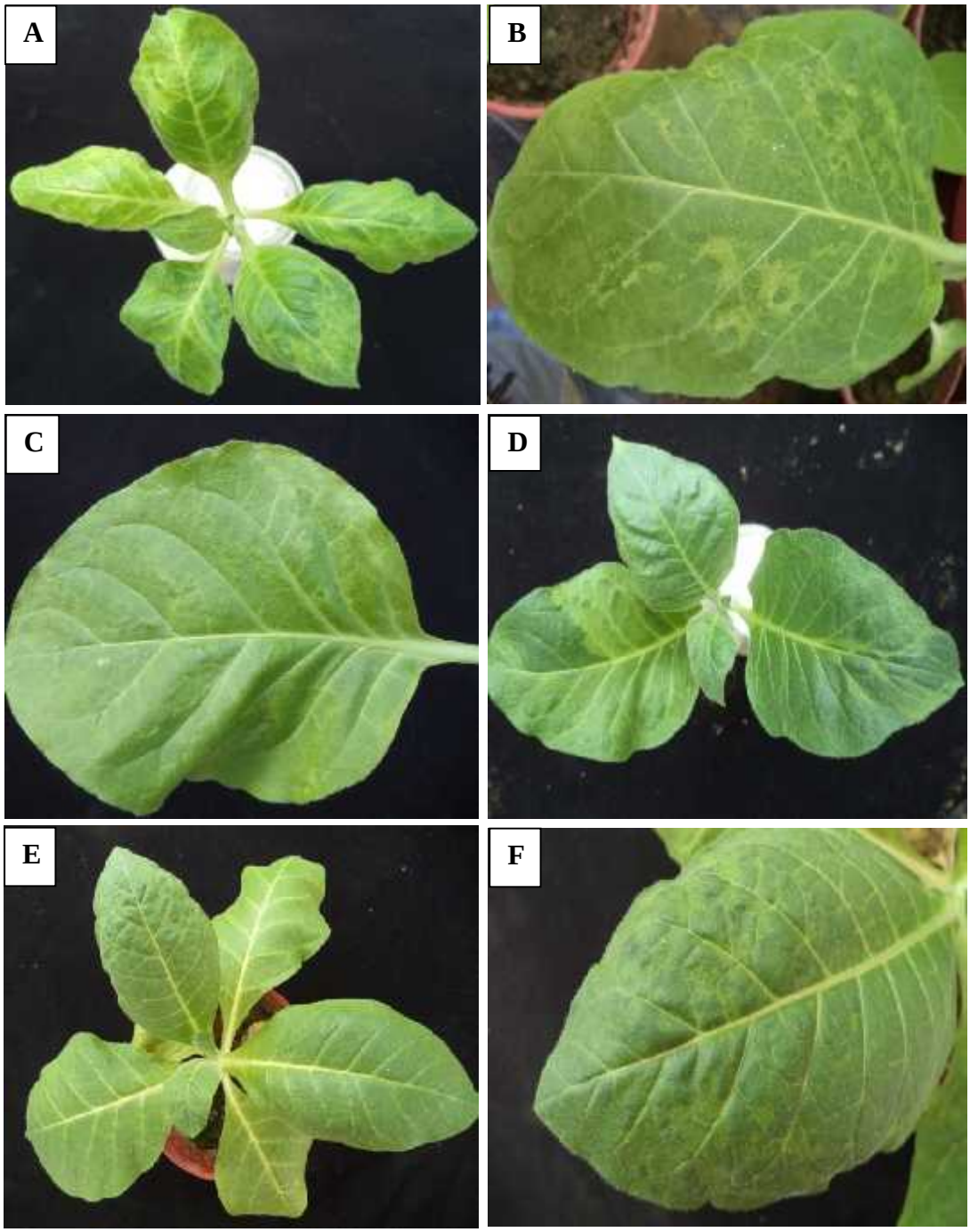

Figura 4. *N. tabacum* cv. Samsum: **A)** mosaico suave inducido por los aislamiento Co:1.1, Co:1.3 y Co:2.1. **B)** anillos y arcos cloróticos inducidos por el aislamiento Rr:1.6. **C)** aclaramiento de nervaduras, anillos cloróticos pequeños y mosaico suave inducidos por el aislamiento Co:2.3. **D)** mosaico moderado inducido por el aislamiento Co:2.4; *N. tabacum* cv. White Burley: **E)** y **F)** mosaico moderado a mosaico severo inducido por el aislamiento Co:1.2.

8.3. Caracterización serológica.

La prueba de conjugados enzimáticos [Doubleantibody sándwich enzyme-linkedimmuno-sorbentassay (DAS-ELISA)] permitió detectar al virus: *Tobacco ringspot virus* (TRSV), actuando en los aislamientos Co:2.2, Co:2.3, Co:2.4 y Rr:1.6. Por otra parte los aislamientos que no reaccionaron a ningún virus son: Ba:1.1, Ba:1.2, Ba:1.3, Ba:1.4, Co:1.1, Co:1.2, Co:1.3, Co:1.4, Co:2.1,Co:2.5, Ce:1.2, Cr:1.2, Cr:1.4, Rr:1.1, Rr:1.2 y Rr:1.5 (Anexo 4-Cuadro3.)

Cuadro 3. Caracterización serológica de 20 aislamientos.

Aislamientos	Virus	no reaccionaron
Ba:1.1		X
Ba:1.2		X
Ba:1.3		X
Ba:1.4		X
Ce:1.2		X
Co:1.1		X
Co:1.2		X
Co:1.3		X
Co:1.4		X
Co:2.1		X
Co:2.2	TRSV	
Co:2.3	TRSV	
Co:2.4	TRSV	
Co:2.5		X
Cr:1.2		X
Cr:1.4		X
Rr:1.1		X
Rr:1.2		X
Rr:1.5		X
Rr:1.6	TRSV	

8.4. Validación de resistencia del híbrido comercial.

En la caracterización biológica para la validación de resistencia del híbrido comercial Quetzal, se utilizaron tres plantas de cada especie indicadora por aislamiento. Obteniéndose infección sistémica sintomática de 14 aislamientos como se muestra en la Figura 5 y 6. Observándose mosaico inducido por los aislamientos Co:1.1, Co:1.2,

Rr:1.1 y Rr:1.5. Los aislamientos Co:1.3 y Cr:1.2 indujeron ampolladuras y deformación de hojas y mosaico suave. Se observó moteado moderado inducido por los aislamientos Co:1.4 y Co:2.1. El aislamiento Co:2.2 indujo mosaico severo. También se observaron ampolladuras, deformación de la punta de hoja y mosaico inducido por el aislamiento Co:2.3. El aislamiento Ba:1.4 indujo anillos cloróticos escasos. El aislamiento Rr:1.2 indujo deformación y puntos necróticos blanquecinos en hojas. El aislamiento Rr:1.6 indujo arcos y manchas cloróticas irregulares. El aislamiento Cr:1.4 indujo deformación de hojas, franjeado de nervadura y clorosis. Mientras que los aislamientos (Co:2.4, Co:2.5, Ba:1.1, Ba:1.2, Ba:1.3 y Ce:1.2) no infectaron a este cultivar

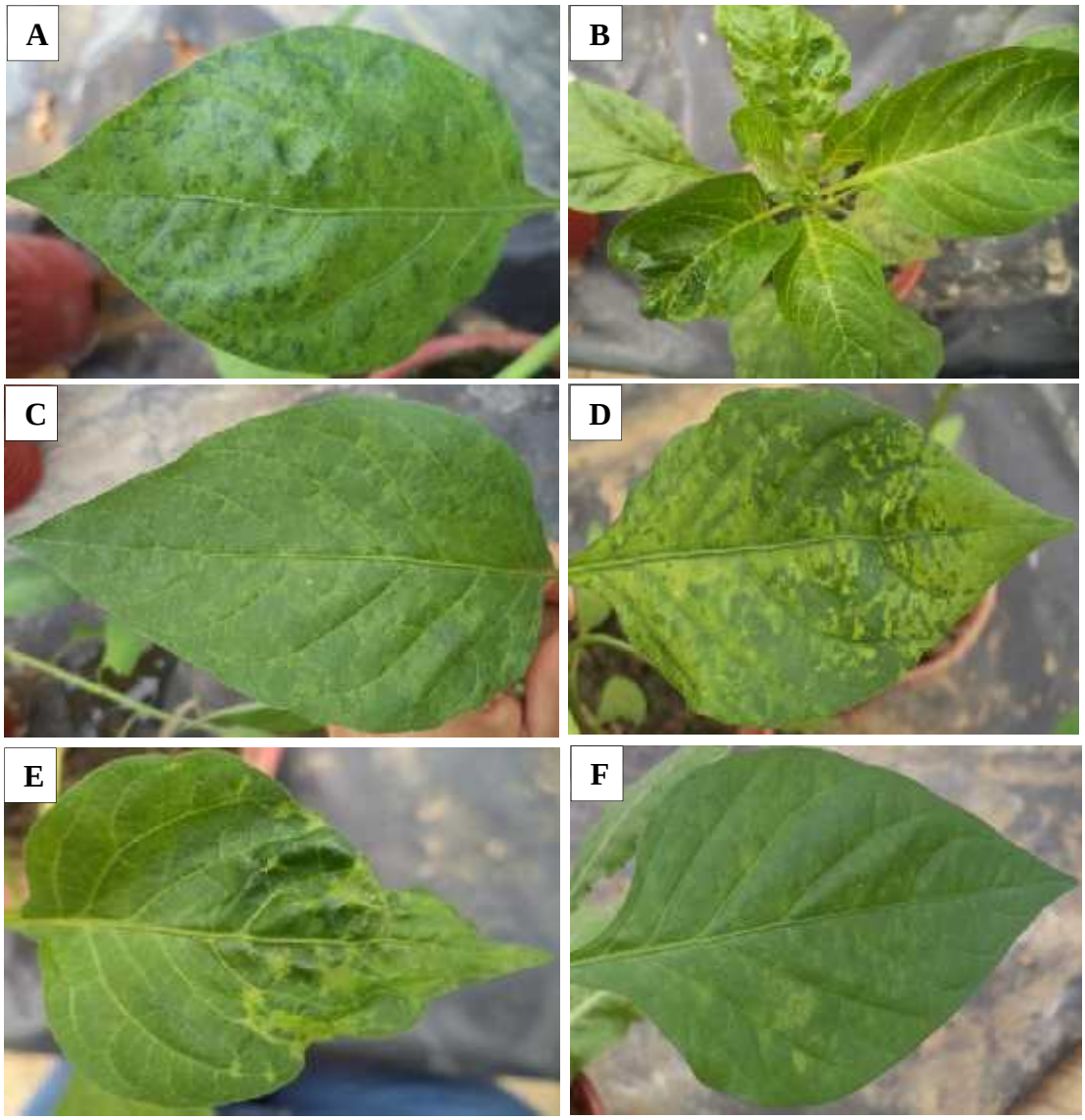

Figura 5. *Capsicum annuum* cv. Quetzal: **A)** Los aislamientos Co:1.1, Co:1.2, Rr:1.1 y Rr:1.5 indujeron mosaico. **B)** Ampolladuras y deformación de hojas acompañado de mosaico suave inducidos por los aislamientos Co:1.3 y Cr:1.2. **C)** Moteado moderado en los aislamientos Co:1.4 y Co:2.1. **D)** Mosaico severo inducido por el aislamiento Co:2.2. **E)** Ampolladuras mas deformación de la punta de hoja y mosaico inducido por el aislamiento Co:2.3. **F)** Anillos cloróticos escasos inducidos por el aislamiento Ba:1.4.

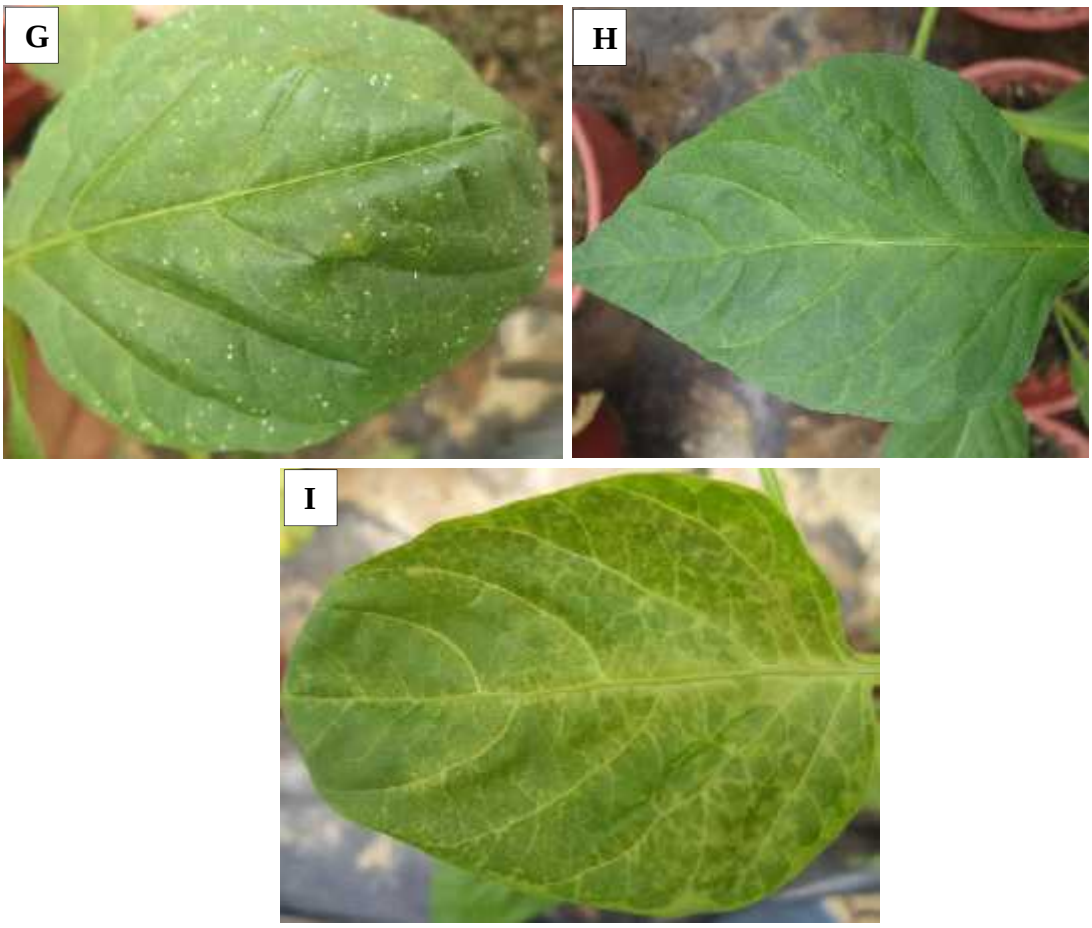

Figura 5. *Capsicum annuum* híbrido Quetzal: **G)** Deformación y puntos necróticos blanquecinos en hojas inducidos por el aislamiento Rr:1.2. **H)** Arcos y manchas cloróticas irregulares inducidos por el aislamiento Rr:1.6. **I)** Deformación de hojas, franjeado de nervadura y clorosis inducidos por el aislamiento Cr:1.4.

IX. DISCUSION.

Los síntomas manifestados por las especies indicadoras inducidos por cuatro aislamientos que tuvieron reacción en serología para TRSV (cuadro 3), coinciden con Stace (1985) que indica los siguientes síntomas sobre *Nicotiana tabacum*: patrón de anillos y líneas sobre el follaje, enanismo de la planta y reducción del área foliar. Pero también se observó otros síntomas en otras especies que reaccionaron a los mismos aislamientos tales como: mosaico, ampolladuras y deformación de hoja como otros síntomas en *Nicotiana occidentalis* en los aislamientos que tuvieron reacción a TRSV.

Este trabajo muestra indicios tentativos de la presencia de este virus en el país, en todo caso, son necesarios más estudios para poder confirmar la presencia de TRSV en pimiento, sobre todo estudios moleculares que indicaran con exactitud la identidad del virus y el agente causal de la enfermedad; en caso de confirmarse la presencia de este virus en la zona y en el país, probablemente su llegada se haya dado por la introducción de semillas contaminadas puesto que como indica Stace (1985) el virus se puede difundir a través de semillas o materiales de plantación contaminados hacia los lugares donde puede o no estar presente el vector natural, el nematodo *Xiphinema americanum*. A la vez es muy probable que la diseminación a lo largo del Valle del Río Portoviejo, este favorecida por el uso frecuente de semillas recicladas, que es muy común entre los agricultores.

De los 20 aislamientos obtenidos en 32 muestras colectadas en las plantaciones de pimiento del Valle del Río Portoviejo, no se encontró la presencia de *Potato virus Y* (PVY), dicho esto por no haberse encontrado reacción en serología ni en biología donde la especie indicadora *Capsicum frutescens* cv. Tabasco debía mostrar moteado leve a severo al igual que *Nicotiana glutinosa* (Kerlan, 2006).

En la presente investigación no se ha encontrado la presencia de *Tobacco etch virus* (TEV) en el Valle del Río Portoviejo como lo describió Chala (1978). De las 32 muestras colectadas ninguna indujo síntomas en la especie indicadora *Datura stramonium* y además en *C. frutescens* la mayoría de las cepas inducen necrosis radical, marchitez y muerte, síntomas que no se presentaron esta vez (Purcifull y Hiebert, 1982).

La infección de *Tobacco mosaic virus* (TMV) sobre pimiento en el Valle del Río Portoviejo en esta investigación no ha sido encontrada, aunque no fue probado en

serología, en la caracterización biológica no se presentaron síntomas necróticos locales en ninguna de las especies indicadoras, que es lo característico de este virus por ser un Tobamovirus; de las ocho especies indicadoras estudiadas en serología, en forma especial a *N. glutinosa*, debió haber mostrado manchas necróticas locales, cuando fue inoculada con los 20 aislamientos de pimiento (Zaitlin, 2000).

Alfalfa mosaic virus (AMV) en Ecuador ha sido reportado en los últimos años en la provincia de Imbabura, en este estudio fue probado en serología donde no reacciono al igual que en la caracterización biológica en la cual la especie indicadora *C. quinoa* no indujo síntomas frente a la inoculación de las 32 muestras colectas inicialmente, que según Jaspars y Bos (1980), esta especie muestra lesiones locales cloróticas o necróticas bajo la infección del virus.

A inicios de este año (2016) se reportó a *Potato virus X* (PVX) infectando cultivos de *Capsicum* en Imbabura, pero en el Valle del Río Portoviejo en esta ocasión no se ha encontrado, dicho esto por los resultados obtenidos mediante serología y además en la caracterización biológica la especie indicadora clave para descartarlo al igual que TEV fue *Datura stramonium* la misma que no indujo ningún síntoma frente a los diferentes aislamientos (Renate y Lesemann, 1989).

A pesar de algunos aislamientos coinciden biológicamente y serológicamente con TRSV, no se decarta la posibilidad en futuros trabajos se llegue a determinar de entidades virales distintas, esto debido a que en la actualmente los estudios biológicos y serológicos no son suficientes para determinar una especie dentro de un genero.

El cultivar comercial híbrido Quetzal en esta investigación reaccionó sistémicamente a 14 de los 20 aislamientos; aunque de ellos solo uno (Ce:1.2) provenía de plantaciones de este híbrido, el mismo que indujo síntomas en las plantas indicadoras de *N. occidentalis* y *C. annuum* cv. California Wonder, pero en serología no reaccionó a ninguno de los antisueros probados y sobre el híbrido tampoco.

X. CONCLUSIONES.

La síntomas observados en plantas indicadoras fueron: enanismo, mosaico, moteado, anillos y arcos cloróticos, anillos concéntricos, ampolladuras y deformación de hoja, lesiones necróticas, franjeado de nervaduras, ligera necrosis sistémica, reducción de lámina foliar.

De los 20 aislamientos obtenidos cuatro (Co:2.2, Co:2.3, Co:2.4 y Rr:1.6) reaccionaron positivamente contra las IgG de Tobacco ringspot virus (TRSV), en la prueba serológica DAS-ELISA.

El hibrido Quetzal presento susceptibilidad a 14 aislamientos (Co:1.1, Co:1.2, Rr:1.1, Rr:1.5, Co:1.3, Cr:1.2, Co:1.4, Co:2.1, Co:2.2, Co:2.3, Ba:1.4, Rr:1.2, Rr:1.6, Cr:1.4) y resistencia a seis (Co:2.4, Co:2.5, Ba:1.1, Ba:1.2, Ba:1.3 y Ce:1.2). Además, en esta prueba se observó un síntoma que generalmente no es característico a los inducidos por virus y que comúnmente se lo asocia a fitotoxicidad por herbicida, presentándose manchas necróticas en forma de puntos blanquecinos.

Con la remodelación e implementación del laboratorio de fitopatología se realizarán mejores investigaciones en el campo de la patología vegetal.

Según los resultados obtenidos en la caracterización biológica y serológica, existen sospechas que algunos de los aislamientos sean nuevas entidades virales.

XI. RECOMENDACIONES.

Para determinar la identidad de los aislamientos que no reaccionaron a ningún virus es necesario continuar con los estudios moleculares y de sus posibles vectores.

Para confirmar la identidad de Tobacco ringspot virus (TRSV), es necesario continuar con las investigaciones moleculares y uso del vector en caso de que este se encuentre presente, debido a que hasta la fecha no se conocen de reportes de Xiphinema americanum en el país.

Extender estos trabajos investigativos a otros cultivos de importancia agronómica.

XII. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.

Cuadro 4. Cronograma de actividades para el desarrollo del proyecto (noviembre 2015-julio 2016).

ACTIVIDAD	MESES								
	Nov	**Dic**	**Ene**	**Feb**	**Mar**	**Abr**	**May**	**Jun**	**Jul**
1. Acondicionamiento del laboratorio de fitopatología	X	x							
2. Dotación de equipos y materiales al laboratorio de fitopatología	X	x							x
3. Construcción del lugar de aislamiento	X								
4. Producción y mantenimiento de plantas indicadoras	X	x	x	x	x				
5. Recolección de muestras		x	x	x					
6. Caracterización biológica			x	x					
7. Caracterización serológica				x					
8. Análisis y redacción de resultados						x	x	x	x

XIII. PRESUPUESTO.

Cuadro 5. Presupuesto para el desarrollo de proyecto (noviembre 2015-julio 2016).

ACTIVIDAD	RECURSOS	COSTOS
1. Acondicionamiento del laboratorio de fitopatología	Reconstrucción de mesones	1500.00
2. Dotación de equipos y materiales al laboratorio de fitopatología.	Desecador de vidrio, dextrosa, pinzas anatómicas, termómetros, hojas de bisturí.	3937.87
3. Construcción del lugar de aislamiento	Jornales, malla, clavos, tachuelas, plástico, cañas, martillos.	548.78
4. Producción y mantenimiento de plantas indicadoras	Semillas, macetas, agroquímicos (fungicidas, herbicidas, insecticidas, molusquicidas) fertilizantes.	542.82
5. Recolección de muestras	Transporte, comidas, fundas y otros.	500.00
6. Caracterización biológica	Carborundum, jabón, detergente, cloro, papel toalla.	315.92
7. Caracterización serológica	Materiales del laboratorio	500.00
8. Análisis y redacción de resultados	Internet, hojas, impresiones-empastados, CD.	160.00
	TOTAL	8005. 39

XIV. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

Agrios, George. 2005. "Plant Pathology",Fifth edition. Florida: Elsevier, 922 pp.

Aguilar, Araceli, Peter Morrell, Mikeal Roose, y Seung Kim. 2009."Genetic diversity and structure in semiwild and domesticated chiles (Capsicum annuum; Solanaceae) from Mexico". Americam Journal of Botany 96, No.6: 1190-1202 DOI: 10.3732/ajb.0800155.

Chala Cruz, Víctor. 1978."Determinación de los virus que atacan el pimiento (Capsicum annuum L.) en el litoral ecuatoriano y evaluación de resistencia varietal". Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Manabí.

Clark, M, y A Adams. 1977."Characteristics of the Microplate Methods of Enzime-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Virus". Journal of General Virology. 34, No.3: 475-483. DOI: 10.1099/0022-1317-34-3-475

Colimba, J, E Falcon, E Castro, D Davila, V Pallas, J Sánchez, y G Gomez. 2015 "First Report of Alfalfa mosaic virus in Red Pepper Plants in Ecuador". Plant Disease 100, No. 5: 0191-2917. DOI:org/10.1094/PDIS-07-15-0820-PDN.

Dávila Aldás,Wilson. 2016. "Detección y caracterización de tres aislados virales presentes en plantas de pimiento (Capsicum annuum) de Ecuador". Tesis de Maestría, Universidad Politécnica de Valencia.

FAOSTAT. 2016. (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura Dirección De Estadística). Consultado 5 Enero, 2016. http://faostat.fao.org/.

Ferguson, Claudia. 2015. "Importation of Fresh Peppers From Ecuador Into the United States". The daily Journal of the United States Government. 80, No. 205: 64307-64309. Consultado 9 Abril, 2016. https://federalregister.gov/a/2015-27013 .

Francki, R, D Mossop, y T Hatta. 1979. "Cucumber mosaic virus". Descriptions of plant viruses No. 213. Consultado 9 Abril, 2016. http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=213.

Fribourg, Cesar, y E Fernández. 1982. "Perú tomato virus". Descriptions of plant viruses No. 255. Consultado 9 Abril, 2016. http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=255 .

Fribourg, Cesar. 2007. "Virus, Viroides y Mollicutes de las Plantas Cultivadas en el Perú". Biblioteca Nacional del Perú. Lima, Perú. 219 pp.

Green, S, y J Kim. 1991. "Characteristics and control of viruses infecting peppers: a literature review". Asian Vegetable Research and Development Center 806, No.18: 91-339. Consultado 15 Enero, 2016. http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/pnabk806.pdf.

Hortoinfo. 2016. Diario digital de actualidad hortofrutícola. Consultado 25 Enero, 2016. http://www.hortoinfo.es/index.php/noticias/4272-prod-mund-pimiento-071114

ICTV. 2014. (International Committee on Taxonomy of Viruses). Consultado 16 Mayo, 2016.http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?src=NCBI&ictv_id=19810087

Janzac, B, M Fabre, A Palloix, y B Moury. 2008. "Characterization of a new potyvirus infecting pepper crops in Ecuador". PubMed 153, No.8: 1543-8. DOI: 10.1007/S00705-008-0132-8.

Jaspars, E, y L Bos. 1980 "Alfalfa mosaic virus". Descriptions of plant viruses No. 229. Consultado 9 Abril, 2016. http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=229.

Jayasinghe, U, y L Salazar. 1993. "Manual de técnicas en virología de plantas". Unidad Técnica de Capacitacion 1 (TTU). CIP, Lima.

Kerlan, Camille. 2006. "Potato virus Y". Descriptions of plant viruses No. 414. Consultado 25 Febrero, 2016. http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=414 .

Kim, Seungill, M Par, S Yeom, Y Kim, J Lee, H Le, y K Jung. 2014. "Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in Capsicum species". Nature Genetics 3, No. 46: 270-278. DOI:10.1038/NG.2877.

Koenig, Renate, y D Lesemann. 1989."Potato virus X". Descriptions of plant viruses No. 354. Consultado 25 Febrero, 2016. http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=354.

López, M, y A López. 2000. Patología Vegetal. Madrid: Mundi-Prensa.

Mackenzie, DJ. 1990. Preparation of antibody-enzyme conjugates. In: Hampton, R; Ball, E; De Boer, eds. Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens; a Laboratory Manual. APS Prees. St Paul, Minnesota. USA. 87-92 pp.

Marín, Alicia, Federico Ferreres, Francisco A, Tomás Barberán, y María I. Gil. 2004. "Characterization and quantitation of antioxidant constituents of sweet pepper (Capsicum annuum L.)". Journal of Agricultural and Chemistry 12, No.52: 3861–3869. DOI:10.1021/jf0497915.

Murphy, J, y C Warren. 2003. "Diseases Caused by Virus. In: Pernezmy, K; Roberts, PD; Murphy, JF; Goldberg. Eds. Compendium of Pepper Diseases". APS Press. St. Paul, Minnesota, USA. 23-25 p.

Murphy, Jhon. 2006. "Applied Aspects of Induced Resistance to Plant Virus Infection. In: Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses". 1-3p.

Purcifull, D, y E Hiebert. 1982. "Tobacco Etch Virus". Descriptions of plant viruses No. 25. Consultado 25 Febrero, 2016. http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=25. .

Sivaprasad, Y, P Garrido, K Mendez, A Garrido, y L Ramos. 2016. "First Report of Potato Yellowing Virus Infecting Pepper In Ecuador". Journal of Plant Pathology 1, No.1 Consultado 3 Mayo, 2016. http://www.sipav.org/main/jpp/index.php/jpp/index.

Stace, Smith. 1985. " Tobacco ringspot virus". Descriptions of plant viruses No. 309. Consultado 9 Abril, 2016. http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=309.

Torres, R, J Larenas, C Fribourg, y J Romero. 2012. "Pepper necrotic spot virus, a new tospovirus infecting solanaceous crops in Peru". PubMed 4, No. 157: 609-15. DOI: 10.1007/s00705-011-1217-3.

Zaitlin, Milton. 2000. "Tobacco mosaic virus". Descriptions of plant viruses No. 370. Consultado 25 Febrero, 2016. http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=370 .

XV. ANEXO.

Anexo 1. Construcción del lugar de aislamiento.

Anexo 2. Preparación del sustrato de transplante.

Anexo 3. Recolección de muestras.

Anexo 4. Inoculación y obtención del inoculo.

Anexo 5. Prueba serológica.

Anexo 6. Acondicionamiento del laboratorio de fitopatología.

Anexo 7. Dotación de equipos y materiales al laboratorio de fitopatología.

Anexo 8. Mapa de muestreo sobre el Valle del Rio Portoviejo.