



**Caracterización molecular del virus RSNV (Rice Stripe Necrosis Virus) de plantas de arroz (*Oryza sativa*  
L.) de la variedad Arenillas INIAP FL con enfermedad de entorchamiento**

Ger Minda, Wilmer Sebastian

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Flores Flor, Francisco Javier PhD.

Sangolquí, 26 agosto del 2022



WGer Biotec ESPE Tesis 2022.txt

Scanned on: 18:24 August 16, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	11
Words with Minor Changes	0
Paraphrased Words	116
Omitted Words	0



Firmado electrónicamente por:  
**FRANCISCO  
JAVIER FLORES  
FLOR**



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

### Certificación

Certifico que el trabajo de titulación: “**Caracterización molecular del virus RSNV (Rice Stripe Necrosis Virus) de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) de la variedad Arenillas INIAP FL con enfermedad de entorchamiento**” fue realizado por el señor **Ger Minda, Wilmer Sebastian**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 16 de agosto del 2022

 Firmado electrónicamente por:  
FRANCISCO  
JAVIER FLORES  
FLOR

Flores Flor, Francisco Javier Ph.D.

C. C.: 1713443479



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

**Responsabilidad de autoría**

Yo, Ger Minda, Wilmer Sebastian, con C.C. 0401703434, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Caracterización molecular del virus RSNV (Rice Stripe Necrosis Virus) de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) de la variedad Arenillas INIAP FL con enfermedad de entorchamiento”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciado las citas bibliográficas.

Sangolquí, 16 de agosto del 2022

Ger Minda, Wilmer Sebastian

C. C.: 0401703434



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

**Autorización de publicación**

Yo, Ger Minda, Wilmer Sebastian, con C.C. 0401703434, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Caracterización molecular del virus RSNV (Rice Stripe Necrosis Virus) de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) de la variedad Arenillas INIAP FL con enfermedad de entorchamiento”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 16 de agosto del 2022

Ger Minda, Wilmer Sebastian

C. C.: 0401703434

## **Dedicatoria**

Dedico este trabajo a mi familia, a mis padres Wilmer Ger y Narciza Minda, mis hermanos Carlos, Ivonne y Camila; a mis sobrinos Juanito y Andrés, quienes son mi mayor fortaleza y apoyo incondicional.

### **Agradecimientos**

A mis padres, Wilmer y Narciza, que gracias a su apoyo he logrado culminar una etapa más en mi vida. Agradezco mucho la confianza, la paciencia y sobre todo el cariño que me han brindado.

A mis hermanos, Carlos, Ivonne y Camila con quienes compartimos muchas experiencias juntos. Agradezco sus consejos y que siempre están a mi lado en cualquier situación.

Al Dr. Lenin Paz quien me dio la oportunidad de desarrollar este proyecto bajo su tutela y guía dentro del laboratorio; al Dr. Francisco Flores quien con paciencia me ayudo a culminar satisfactoriamente esta etapa académica.

A mis amigos que siempre me han estado acompañando y apoyando durante todo el camino universitario.

Wilmer Sebastian Ger Minda

## Índice de contenido

Certificación COPYLEAKS.....	2
Certificación .....	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria .....	6
Agradecimientos .....	7
Listado de tablas .....	10
Listado de figuras .....	11
Abreviaturas .....	12
Resumen .....	15
Abstract .....	16
Capítulo I: Introducción .....	17
Antecedentes .....	17
Justificación .....	18
Objetivos del proyecto de grado .....	18
Objetivo General .....	18
Objetivos Específicos.....	18
Hipótesis.....	19
Capítulo II: Revisión Bibliográfica.....	19
El Arroz ( <i>Oryza sativa</i> L.).....	19
Enfermedades en el arroz.....	20
Entorchamiento del arroz.....	20
<i>Polymyxa graminis</i> L.....	21
Virus de la necrosis de la raya del arroz (RSNV).....	22
Morfología.....	22

Ácido nucleico .....	23
Organización del genoma y replicación .....	24
Diversidad genética del RSNV.....	24
Capítulo III: Metodología .....	25
Revisión Bibliográfica.....	25
Población de estudio .....	25
Toma de muestras .....	26
Extracción de ácidos nucleicos .....	26
Cuantificación de ácidos nucleicos .....	27
Retrotranscripción del RNA extraído .....	28
Amplificación por PCR del virus RSNV .....	28
Electroforesis.....	29
Purificación de productos de PCR.....	30
Secuenciación.....	30
Análisis Bioinformático .....	31
Análisis Estadístico.....	33
Capitulo IV: Resultados .....	33
Siembra y toma de muestras .....	33
Extracción de ácidos nucleicos .....	35
Retrotranscripción de RNA .....	36
Amplificación por PCR y productos purificados .....	38
Análisis bioinformático .....	39
Capitulo V: Discusión .....	45
Capítulo VI: Conclusiones.....	47
Capitulo VII: Recomendaciones .....	47
Bibliografía.....	48

**Listado de tablas**

Tabla 1_ <i>Volúmenes y concentraciones de reactivos para preparación de PCR para fragmentos de RSNV</i>	29
Tabla 2_ <i>Secuencias usadas para la fabricación del árbol filogenético</i> .....	32
Tabla 3_ <i>Cuantificación de ácidos nucleicos extraídos de plantas de arroz (Oryza sativa L.)</i> .....	36
Tabla 4_ <i>Cuantificación de cDNA producto de la retrotranscripción de RNA extraído de plantas de arroz (Oryza sativa L.)</i> .....	38
Tabla 5_ <i>Longitud de los fragmentos secuenciados con los primers RSNV1-2901F y RSNV1-3827R</i> .....	40

**Listado de figuras**

Figura 1_	<i>Organización de RNA1 y RNA2 del genoma de Benyvirus</i>	23
Figura 2_	<i>Siembra y crecimiento de plantas de arroz (Oryza sativa L.) en invernaderos</i>	33
Figura 3_	<i>Sintomatología de plantas de arroz (Oryza sativa L.) infectadas con RSNV</i>	34
Figura 4_	<i>Plantas de arroz (Oryza sativa L.) afectadas por la enfermedad del entorchamiento del arroz</i>	35
Figura 5_	<i>Electroforesis en gel de cDNA obtenido tras retrotranscripción</i>	37
Figura 6_	<i>Electroforesis de productos de PCR con los primers RSNV1-3827R y RSNV1-2901F</i>	39
Figura 7_	<i>Secuencias obtenidas de muestras amplificadas con los primers RSNV1-2901F y RSNV1-3827R</i>	40
Figura 8_	<i>Secuencia consenso obtenida del alineamiento múltiple de las secuencias curadas</i>	41
Figura 9_	<i>Secuencia consenso obtenida del alineamiento múltiple de las secuencias curadas</i>	42
Figura 10_	<i>BLAST de la secuencia consenso obtenida de las muestras de RNA1 secuenciado</i>	42
Figura 11_	<i>Árbol filogenético de WG Ecu de dominio helicasa de RNA1</i>	44

**Abreviaturas**

°C	Grados centígrados
APS	American Phytopathological Society
BaYMV	Barley yellow mosaic virus
BdMV	Bean dwarf mosaic virus
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BNYVV	Beet necrotic yellow vein virus
bp	Pares de bases
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CP	Cubierta principal
CRP	Cysteine Rich Protein
dNTP	Deoxinucleósido trifosfato
g	Gramos
Hel	Helicasa
INEC	Instituto Nacional de Estadística y Censos
INIAP	Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
kb	Kilo bases
mg	Mili gramos
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio

mL	Mili litro
mM	Mili molar
M-MLV RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
Mtr	Metiltransferasa
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nano metros
ORF	Open Reading Frame
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCV	Peanut Clump Virus
Pro	Proteasa
RdRp	RNA polimerasa dependiente de RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RSNV	Rice stripe necrosis virus
RT	Retro Transcripción
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa
TBE	Solución de Tris, Borato y EDTA
TGB	Triple Gene Block
u	Unidades
ug/mL	Micro gramos por mili litro

uL	Micro litros
uM	Micro molar
V	Voltios
VSR	Viral Supresor of RNA silencing

## Resumen

El arroz (*Oryza sativa* L.) se caracteriza por ser un alimento fundamental para la dieta de varias regiones en todo el mundo. Desde el apareamiento de la enfermedad del entorchamiento en el año de 1977, al oeste de África en Costa de Marfil, ha provocado pérdidas de rendimiento de hasta el 40% de los cultivos de arroz. (Lozano & Morales, 2009) La enfermedad se caracteriza por provocar en las plantas de arroz: deformaciones en la hoja a manera de zigzag, necrosis en los tallos y a lo largo del limbo, apareamiento de bandas cloróticas en el limbo y pérdida de masa en el sistema radicular; síntomas que pueden resultar hasta en la muerte de la planta. Esta enfermedad es causada por el virus Rice stripe necrosis virus (RSNV), el cual es transmitido por un endoparásito obligado *Polymyxa graminis* L. Molecularmente, el virus ha sido reportado en países africanos como Sierra Leona, Mali y Burkina Faso; en Sudamérica se ha confirmado la presencia de la enfermedad, siendo únicamente Colombia, Argentina y Brasil los países que han presentado aislados del virus. El presente estudio se encargó de realizar una caracterización molecular del virus que provoca la enfermedad del entorchamiento. Se utilizó para la amplificación de la región de dominio helicasa del RNA1 del virus los primers RSNV1-2901F y RSNV1-3827R, para posteriormente realizar el análisis filogenético correspondiente. La secuencia aislada tiene un porcentaje de identidad de 99,66% con la secuencia reportada en Colombia (EU099844). El árbol filogenético tiene estructura geográfica, la secuencia de Ecuador forma un clado junto con la de Colombia, este clado es divergente del formado por las secuencias de varios países en África, y las secuencias de Argentina y Brasil.

*Palabras Clave:* RSNV, Enfermedad del entorchamiento, First report of Rice stripe necrosis virus, Molecular characterization of RSNV.

### Abstract

Rice (*Oryza sativa* L.) is characterized as a fundamental food for the diet of several regions around the world. Since the appearance of the disease of the entorchamiento in the year of 1977, to the west of Africa in the Ivory Coast, it has caused yield losses of up to 40% of the rice crops. (Lozano & Morales, 2009) The disease is characterized by causing zigzag leaf deformations in rice plants, necrosis in the stems and along the limb, appearance of chlorotic bands in the limb and loss of mass in the root system; symptoms that can even result in the death of the plant. This disease is caused by the Rice stripe necrosis virus (RSNV), which is transmitted by an obligate endoparasite *Polymyxa graminis* L. Molecularly, the virus has been reported in African countries such as Sierra Leone, Mali and Burkina Faso; In South America, the presence of the disease has been confirmed, with only Colombia, Argentina and Brazil being the countries that have presented isolates of the virus. The present study was in charge of carrying out a molecular characterization of the virus that causes the entorchamiento disease. The primers RSNV1-2901F and RSNV1-3827R were obtained for the amplification of the helicase domain region of the RNA1 of the virus, to later carry out the corresponding phylogenetic analysis. The isolated sequence has an identity percentage of 99.66% with the sequence reported in Colombia (EU099844). The phylogenetic tree has a geographical structure, the sequence from Ecuador forms a clade together with that from Colombia, this clade is divergent from the one formed by the sequences from several countries in Africa, and the sequences from Argentina and Brazil.

*Key words:* RSNV, Enfermedad del entorchamiento, First report of Rice stripe necrosis virus, Molecular characterization of RSNV.

## Capítulo I: Introducción

### Antecedentes

La enfermedad del entorchamiento del arroz (*Oryza sativa* L.) tiene su apareamiento en el año de 1977, reportado al oeste de África en Costa de Marfil (Lozano & Morales, 2009). La enfermedad se caracteriza por provocar en las plantas de arroz, deformaciones en la hoja a manera de zigzag, necrosis en los tallos y a lo largo del limbo, apareamiento de bandas cloróticas en el limbo y pérdida de masa en el sistema radicular, estos síntomas que pueden resultar hasta en la muerte de la planta. Esta enfermedad es causada por el virus Rice stripe necrosis virus (RSNV), el cual es transmitido por un endoparásito obligado *Polymyxa graminis* L. (Bagayoko et al., 2021; Lozano & Morales, 2009). En Latinoamérica, los primeros reportes sintomatológicos se dieron en Argentina, Brasil y Colombia en el año 2000. En Ecuador, a partir del 2003, se observó la enfermedad del entorchamiento en plantaciones de arroz, siguiendo las descripciones reportadas anteriormente en Colombia (Paz, 2019; Paz et al., 2009). Molecularmente, se ha reportado la presencia del virus y sus variantes en países sudafricanos como: Burkina Faso (Sereme et al., 2014), Benín (Oludare et al., 2014), Mali (Decroës et al., 2017) y Sierra Leona (Tucker et al., 2020). En Sudamérica se tiene reportes en Argentina (Maurino et al., 2018), Colombia (Gutiérrez et al., 2010) y Brasil (de Souza et al., 2021). En Asia existe un reporte de apareamiento del virus en China (Xiong et al., 2008). Actualmente, el virus del entorchamiento se encuentra disperso en gran parte del mundo, y no se conoce a ciencia cierta todos los países en donde se puede encontrar el virus. Sin embargo, los países nombrados anteriormente son los únicos que han reportado molecularmente al virus causante del entorchamiento del arroz RSNV. En el 2020, según los datos de INEC (2021), la superficie total cosechada de arroz fue de 312,9 mil hectáreas, registrando un crecimiento del 21,6% respecto a la cifra del 2019; siendo el arroz una de las principales fuentes alimenticias del país (Marquez, 2021).

## **Justificación**

El virus de entorchamiento del arroz, desde su apareamiento en varias zonas de África, tiene una incidencia que varía entre 37 y 80% según la región. En países latinoamericanos, incluido Ecuador, ha provocado pérdidas de rendimiento de hasta el 40% de los cultivos de arroz (Bagayoko et al., 2021; Maurino et al., 2018). Esto resulta ser una problemática importante para la región puesto que el arroz es uno de los pilares alimenticios de la zona. El vector de la enfermedad es *Polymyxa graminis* L., un endoparásito capaz de invadir gramíneas, como el arroz, y provocar la enfermedad del entorchamiento (Paz et al., 2009). En la actualidad no existe una caracterización molecular del virus en Ecuador, además que en Sudamérica los únicos reportes que se tienen del virus son en Argentina, Brasil y Colombia, donde se ha observado que existe una diferenciación molecular entre las variantes virales de Sudamérica y las de Sudáfrica como Sierra Leona, Mali y Burkina Faso. Una descripción molecular más profunda del virus en Latinoamérica puede ayudar a entender como varía, además de su posible distribución e historia filogenética en relación a otras secuencias reportadas en múltiples países.

## **Objetivos del proyecto de grado**

### ***Objetivo General***

Caracterizar molecularmente el virus RSNV (Rice stripe necrosis virus) de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) de la variedad Arenillas INIAP FL con enfermedad de entorchamiento.

### ***Objetivos Específicos***

- Obtener la secuencia del dominio helicasa del RNA1 del virus RSNV (Rice stripe necrosis virus) de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) de la variedad Arenillas INIAP FL con enfermedad del entorchamiento, mediante técnicas moleculares.
- Estudiar la secuencia de los amplicones de dominio helicasa del RNA1 del virus RSNV (Rice stripe necrosis virus) mediante alineación múltiple y análisis filogenético.

## Hipótesis

El análisis filogenético basado en el dominio helicasa del virus RSNV extraído de la muestra de arroz (*Oryza sativa* L.) de la variedad Arenillas INIAP FL, agrupa a los genotipos ecuatorianos en un solo clado con soporte significativo, separado de genotipos descritos previamente en otros países.

## Capítulo II: Revisión Bibliográfica

### El Arroz (*Oryza sativa* L.)

El arroz (*Oryza sativa* L.) se encuentra dentro del grupo de las gramíneas, y se caracteriza por poseer baja cantidad en calorías, moderada en carbohidratos y un aporte considerable en azúcares. Debido a su bajo costo, lo convierten en un alimento fundamental para la seguridad alimentaria de varias regiones en todo el mundo (Dunna & Roy, 2013). Este cereal es el más cultivado en nuestro país, ocupando la tercera parte de la superficie total cultivada. En el mundo, el arroz se posiciona como el segundo cereal más cultivado, siendo superado únicamente por el maíz (Perez et al., 2018).

De manera general, la morfología de una planta de arroz (*Oryza sativa* L.) posee raíces delgadas, fibrosas y fasciculadas, su tallo es redondo y hueco, compuesto por nudos y entrenudos, de este se desprenden a manera de vainas las hojas de lámina plana, que se ubican de forma alternada. Las flores se encuentran en forma de espiguillas, las cuales forman la panícula, que es donde se forma el grano (Arregoces et al., 2005; Dunna & Roy, 2013).

Para el cultivo del arroz, con el fin de obtener una mayor productividad en su desarrollo, se debe tomar en cuenta que lo mejor para esta gramínea son las temperaturas relativamente altas, y con una radiación solar considerable, además de la suministración de agua suficiente, esto durante todo el periodo de crecimiento y desarrollo del cultivo, el cual varía entre los 3 y los 5 meses. Muchas de las condiciones ambientales a las cuales se cultiva el arroz puede incidir de manera directa e indirecta en

factores como la producción de grano o también la presencia de enfermedades o plagas en el cultivo (Arregoces et al., 2005; Dunna & Roy, 2013).

### **Enfermedades en el arroz**

En el arroz se pueden presentar gran variedad de enfermedades, ya sea causadas por hongos, bacterias o virus. Entre estas enfermedades, las que mayor impacto económico provocan se mencionan a continuación.

La quemazón, la cual es provocada por un hongo denominado *Pyricularia grisea* S., provocando en la planta un desarrollo anormal de la panícula, haciendo que el número de granos que se obtienen sea menor (Perez et al., 2018; Vivas & Intriago, 2012).

Hoja blanca, provocada por el virus del mismo nombre transmitido por un insecto denominado *Tagosodes orizicolus* M., que provoca una decoloración en las hojas de las plantas, lo cual afecta su crecimiento normal (Perez et al., 2018; Vivas & Intriago, 2012).

Tizón de la vaina, causado por dos especies de hongo del género *Rhizoctonia*, provoca en la planta un necrosamiento, precedido del apareamiento de manchas verdes grisáceas que avanzan desde la base de las hojas incluso llegando algunas veces a la panícula (Perez et al., 2018; Vivas & Intriago, 2012).

Entorchamiento, causado por el virus denominado RSNV (Rice stripe necrosis virus), enfermedad de la cual se abordará más adelante en este estudio (Perez et al., 2018; Vivas & Intriago, 2012).

### **Entorchamiento del arroz**

El entorchamiento del arroz es una enfermedad causada por el virus RSNV, el cual es transmitido por el vector *Polymyxa graminis* L. Los síntomas de la enfermedad del entorchamiento son enanismo lo que genera impedimento del desarrollo vegetal adecuado. En las hojas provoca el apareamiento de

estrías cloróticas, crecimiento en zigzag, láminas foliares enrolladas, arrugamiento de la lámina foliar, clorosis y necrosis en los tejidos y posibles deformaciones. A nivel radicular, se visualiza una disminución de su masa; la fase final de los síntomas pueden provocar la muerte de las plantas (Lozano & Morales, 2009; Paz, 2019).

### ***Polymyxa graminis* L.**

*Polymyxa graminis* L. es un parásito eucariota y biotrófico de las raíces de las plantas, perteneciente a una unidad taxonómica informal conocida como plasmodiofóridos, su clasificación formal corresponde al filo *Cercozoa*, la clase *Plasmodiophorea*, orden *Plasmodiophorida* y familia *Plasmodiophoridae* (Sarwar et al., 2020).

*P. graminis* L. tiene un ciclo de desarrollo compuesto en dos fases, esporádica y esporogénica. En primer lugar, las zoosporas de *P. graminis* L. penetran la pared celular de la planta para transferir así el citoplasma a la célula vegetal; lo que provoca el desarrollo de un plasmodio esporangial multinucleado. Una vez maduran a zoosporangios, se liberan a los espacios extracelulares y continúan con la penetración en nuevas células vegetales. Las condiciones ambientales o el riego de los cultivos liberan también zoosporas, las cuales son capaces de colonizar nuevas plantas y repetir el proceso anterior (R. Hull, 2014).

*P. graminis* L. no es un patógeno, sin embargo, es capaz de transmitir gran variedad de virus vegetales, los cuales provocan enfermedades graves en especies de cereales, causando así una reducción en el rendimiento de producción agrícola. Las esporas de *P. graminis* L. son capaces de permanecer inactivas pero viables hasta por décadas, haciendo posible que los virus estén protegidos del medio ambiente dentro de las esporas. La naturaleza resistente de *P. graminis* L. y su gran capacidad de transmitir enfermedades, hace que el control más eficaz para estas enfermedades sea la utilización de variedades resistentes a los virus. *P. graminis* L. puede transmitir al menos 12 virus vegetales

distintos, pertenecientes a los géneros *Benyvirus*, *Bymovirus*, *Furovirus* y *Pecluvirus*. Entre ellos, los de mayor importancia económica en cultivos de cereales son el BaYMV (virus del mosaico amarillo de la cebada), PCV (virus de los grumos del maní) o el RSNV (virus de la necrosis de la raya del arroz) (Sarwar et al., 2020; Tamada, 1999).

### **Virus de la necrosis de la raya del arroz (RSNV)**

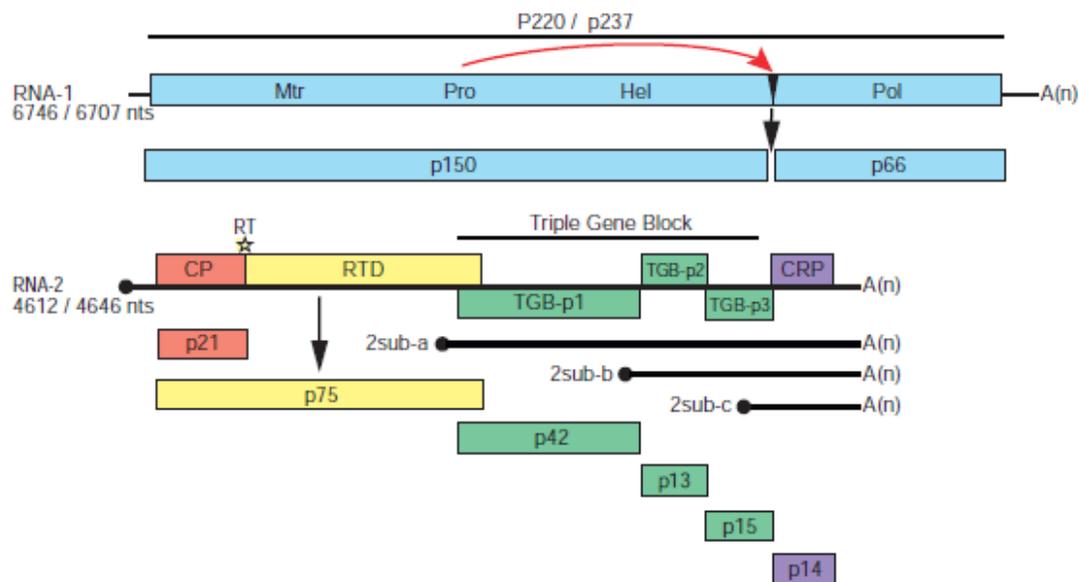
RSNV (del inglés, *Rice stripe necrosis virus*), corresponde a un tipo de virus perteneciente al género *Benyvirus*, los cuales son virus que se caracterizan por ser de RNA en sentido positivo, monocatenario, multipartito con casquete 5' m7G y poli A 3', con forma de bastoncillo (Gilmer et al., 2017).

### **Morfología**

La mayoría de los virus pertenecientes al género *Benyvirus*, poseen entre dos a cinco RNAs de sentido positivo lineales, siendo el virus de la necrosis de las rayas del arroz (RSNV) y el virus del moteado de bardana (BdMV) poseedores de dos RNA genómicos (Kondo et al., 2013; Lozano & Morales, 2009). Las partículas virales constan de entre dos a cinco estructuras en forma de varilla construidas helicoidalmente, no envueltas, con un canal axial. Las longitudes predominantes de las estructuras son de aproximadamente 390, 265, 100, 85 y 80 a 65 nm y con un diámetro constante de 20 nm. Las proteínas de la cápside, constituyen el 95% del peso de las partículas, y están compuestas por 49 subunidades, ocupando 4 nucleótidos cada una (King et al., 2012).

Figura 1

Organización de RNA1 y RNA2 del genoma de Benyvirus



*Nota.* En el RNA1 se evidencia la auto-escisión de la proteína replicasa (flecha roja). El RNA2 posee el casquete m7G (puntos negros) y la cola poliadenilada. Tomado de *Virus Taxonomy* (p. 1120), por King et al. (2012).

### Ácido nucleico

Los *Benyvirus* poseen entre dos a cinco RNA, los cuales tienen tamaños aproximados de 6,7; 4,6; 1,8; 1,4; y 1,3 Kb del RNA1 hasta el RNA5 respectivamente. El RNA viral está protegido en el extremo con el casquete 5' m7G y poliadenilado en 3'. Además, se sabe que los RNA virales tienen una estructura 3' conservada esencial para la iniciación de la replicación del RNA. En virus pertenecientes al género *Benyvirus*, tales como el virus de la vena amarilla necrótica de la remolacha (BNYVV), se ha visto que, tras la transmisión mecánica, los RNA 3, 4 y 5 pueden tener deleciones o perderse por completo. En RSNV, al igual que en BdmV, se ha identificado únicamente dos estructuras de RNA (Bagayoko et al., 2021; King et al., 2012).

### **Organización del genoma y replicación**

El RNA1 contiene un ORF grande que codifica una proteína asociada a la replicación que se escinde postraduccionalmente. Esta escisión proteolítica de la replicasa distingue a los *Benyvirus* de todos los demás virus con partículas en forma de bastón, que tienen sus proteínas asociadas a la replicación codificadas en dos ORF. Este ORF del RNA1 codifica la poliproteína de replicación que incluye metiltransferasa (Mtr), helicasa (Hel), proteasa (Pro) y los dominios de RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp). Para el RNA2 se tiene seis ORF (ORF2-ORF7). El ORF2 es el encargado de codificar la proteína de cubierta principal (CP). El ORF3 tras su traducción a mecanismo de lectura (RT, readthrough), produce una fusión de los dominios RT y CP en la cápside viral y participa en la transmisión del vector. En los ORF4, 5 y 6, se forma el Triple Gene Block (TGB) que está involucrado en el movimiento del virus. La primera parte del TGB (TGBp1) se une al RNA e interactúa con TGBp2 y TGBp3. Finalmente, el ORF7 se encarga de codificar la proteína rica en cisteína (CRP) dedicada al supresor viral de silenciamiento del RNA (VSR). En RSNV únicamente se tiene estos dos componentes de RNA, sin embargo, en otros virus pertenecientes al género *Benyvirus*, se tienen más RNA que tienen funciones adicionales como lo hace el RNA3 que codifica una proteína p25 encargada de la modulación de los síntomas en hojas y raíces; y el RNA4, que codifica una proteína p31 que está relacionada con la transmisión del vector (Bagayoko et al., 2021; King et al., 2012; Lozano & Morales, 2009).

Se ha visto que muchas veces la partícula viral resulta inestable en la savia de las plantas, donde pierde infectividad a temperatura ambiente entre uno y cinco días (King et al., 2012).

### **Diversidad genética del RSNV**

Como se vio anteriormente, los virus del género *Benyvirus*, poseen entre dos a cinco RNA, de los cuales RSNV posee únicamente dos, el RNA1 y RNA2, que poseen los principales genes de mantenimiento para cumplir con el ciclo viral de los *Benyvirus*. Hasta el 2019 se tenía un solo

genoma completo de RSNV, proveniente de un aislado colombiano, disponible públicamente en GenBank (Gutiérrez et al., 2010), en Brasil se han publicado cuatro genomas adicionales, relacionados al apareamiento de RSNV en Sudamérica (de Souza et al., 2021), además de las secuencias obtenidas en los estudios y reportes hechos en varios países sudafricanos. En el estudio realizado por Bagayoko et al. (2021), se revelaron eventos de recombinación en el genoma de RSNV, donde se evidencia dos linajes principales de RSNV originarios de América y África, suponiendo una diversidad en el virus con dependencia geográfica.

### **Capítulo III: Metodología**

#### **Revisión Bibliográfica**

Se realizó la revisión bibliográfica de la enfermedad del entorchamiento del arroz, el virus RSNV, el vector que lo transmite *Polymyxa graminis* L., la incidencia y sintomatología de la enfermedad, además de las metodologías utilizadas para la infección de las gramíneas utilizadas en el estudio y el aislamiento del patógeno en cuestión. Se utilizó motores de búsqueda para la recopilación, clasificación y adquisición de información científica y de metodologías, de páginas como: NCBI (National Center for Biotechnology Information), APS (American Phytopathological Society), Science Direct y Research Gate; además, se usó la herramienta de gestión bibliográfica Mendeley en su versión 1.19.4. Con el fin de optimizar la búsqueda, se usaron palabras clave como RSNV, Enfermedad del entorchamiento, First report of Rice stripe necrosis virus, Molecular characterization of RSNV.

#### **Población de estudio**

El estudio de la enfermedad de entorchamiento del arroz se realizó en plantas de la variedad INIAP FL Arenillas, las cuales fueron sembradas en suelo contaminado, que fue tomado de la zona de Vinces en la provincia de Los Ríos, de coordenadas -1,3467043; -79,5890158 en latitud y longitud, respectivamente.

La población total de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) sembradas fue de 60, de las cuales 30 fueron enfocadas al cultivo en suelo contaminado, y 30 como control absoluto, sembradas en suelo destinado al cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.).

La variedad de arroz INIAP FL Arenillas fue sembrada en dos invernaderos pertenecientes al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias del Litoral Sur. Se separó en dos grupos, problema y control. Los invernaderos se encontraban a una temperatura media de 38 °C, un porcentaje de humedad promedio de 47% y una intensidad luminosa promedio de 26 000 luxes.

### **Toma de muestras**

Se tomaron aquellas plantas que mostraron síntomas claros de la enfermedad del entorchamiento. De las plantas de arroz se usaron las hojas que tenían láminas enrolladas y estrías cloróticas. El número de muestras que se analizaron fue de 6 plantas sembradas en el suelo contaminado, y 6 plantas sembradas en el suelo control.

### **Extracción de ácidos nucleicos**

La extracción de ácidos nucleicos se realizó en base a las muestras tomadas de las hojas de plantas enfermas, y utilizando el protocolo del kit de extracción PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen).

En un ambiente frío y correctamente esterilizado se procedió a preparar adecuadamente los reactivos de extracción según las indicaciones del fabricante. En primera instancia se añadió en un mortero con pistilo el tejido vegetal, y con ayuda de nitrógeno líquido se procedió a triturar hasta obtener un polvo homogéneo, a esto se le añadió el buffer de lisis con 2- mercaptoetanol (500 uL por cada 100 mg de tejido), se homogeneizó la mezcla y se procedió a centrifugar durante 5 minutos a 2600 gravedades. Posteriormente, se tomó el sobrenadante, y por cada 1 uL de sobrenadante recuperado se añadió 0,5 uL de etanol 96%; se mezcló con la ayuda de un vortex y se procedió a precipitar la muestra dentro de los filtros Spin Cartridge presentes en el kit, usando centrifugación a 12 000 gravedades por

15 segundos. Se realizaron 3 lavados con los buffers del kit centrifugando cada vez 12 000 gravedades por 15 segundos. Finalmente, el RNA fue recuperado con agua libre de ribonucleasas en un volumen de 100 uL, se centrifugó por 2 minutos a 12 000 gravedades y se almacenó a -20 °C para posteriores tratamientos.

### **Cuantificación de ácidos nucleicos**

La cuantificación de ácidos nucleicos se realizó en un espectrofotómetro GENESYS 10S de Thermo Scientific™.

El RNA se encontraba diluido en agua libre de nucleasas, por ende, el blanco utilizado consistió en agua libre de nucleasas para el espectrofotómetro. El factor de dilución utilizado fue de 10 en 1000, es decir, 10 uL de muestra con 990 uL de agua libre de nucleasas. Así entonces la concentración de las muestras de ácidos nucleicos se calcula mediante el valor de absorbancia obtenido a una longitud de onda de 260 nm.

Se midieron también las absorbancias 230 y 280, con el fin de verificar las ratios de pureza A260/280 y A260/230. La relación de absorbancias obtenidas de A260/280 se consideró que valores entre 2,0 y 2,2 es pureza óptima de RNA, mayores a 1,7 se consideraban aceptables, y aquellos menores a 1,7 significaría contaminación por compuestos aromáticos. Asimismo, para la relación A260/230 se consideró que valores superiores a 2,0 significan que la pureza del RNA es óptimo, valores inferiores serían debido a contaminación, ya sea con sales, carbohidratos o fenoles.

Para el cDNA igualmente se calculó las relaciones de absorbancias A260/280 y A260/230. La relación A260/280 considera valores de 1,8 hasta 2,1 como pureza óptima, 1,6 y 1,7 aceptable y valores inferiores a 1,6 significa contaminación en la muestra. Para la ratio de A260/230 se considera pureza óptima valores entre 2,0 y 2,2; mayores a 1,8 serían aceptables, y aquellos inferiores a 1,8 serían muestras contaminadas.

### **Retrotranscripción del RNA extraído**

El proceso de retrotranscripción se realizó posterior a la extracción de RNA. Se utilizó la metodología sugerida por el fabricante de M-MLV Reverse Transcriptase de Promega.

En primera instancia en un tubo de 1,5 mL se preparó una mezcla en donde se encontraba el RNA extraído (3 uL), el primer Oligo dT (2 uL), y agua libre de nucleasas en un volumen total de 15 uL. Esta mezcla se mantuvo a 70 °C durante 5 minutos, luego se colocó inmediatamente en un bloque frío, mientras se preparaba una segunda solución, la cual contenía 5 uL de M-MLV 5x Reaction Buffer; 1,25 uL de dNTPs mix; 0,625 uL de inhibidor de ribonucleasa, 1 uL de M-MLV RT y 2,125 uL de agua libre de nucleasas. Se mezcló ambas soluciones para tener un volumen final de 25 uL y se incubó durante 60 minutos a 37 °C para obtener así la primera cadena de cDNA, que se mantuvo a -20 °C hasta su posterior uso.

### **Amplificación por PCR del virus RSNV**

El protocolo de amplificación para el virus se realizó según las indicaciones de Oludare et al. (2014) y Sereme et al. (2014), se utilizó los primers reverse y forward, RSNV1-3827R (5'-TGTGGCGTTTCCAGACCTAAA-3') y RSNV1-2901F (5'-TGAATTTGGTGCTCTCTTG-3') respectivamente. Se utilizó el kit GoTaq Flexi Polymerase (Promega) para ensamblar la PCR, los detalles de concentraciones se detallan a continuación en la tabla 1.

**Tabla 1**

*Volúmenes y concentraciones de reactivos para preparación de PCR para fragmentos de RSNV*

<b>Componente</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Volumen final (50 uL) x 1 reacción</b>
Agua libre de nucleasas	-	28,75 uL
5x Colorless Go taq Flexi Buffer	1x	10 uL
MgCl <sub>2</sub>	1-40 mM	6 uL
Mix dNTPs	0,2 mM cada dNTP	1 uL
Primer F	0,4 uM	0,5 uL
Primer R	0,4 uM	0,5 uL
Polymerase	1,25 u	0,25 uL
cDNA		3 uL
Total		50 uL

### **Electroforesis**

La electroforesis en gel de agarosa se realizó para corroborar el estado de las muestras extraídas y amplificadas. En primer lugar, se preparó el gel de agarosa al 2%, se pesó 1 g de agarosa y se diluyó en 50 mL de buffer TBE 0.5X. Se procedió a calentar hasta la ebullición y agitar por 5 minutos para disolver completamente. Se dispensó en la cámara de electroforesis desde un extremo con el fin de distribuir por toda la cámara evitando la formación de burbujas y colocando las peinetas para los pocillos en dependencia de la cantidad de muestras con las que se trabajaría. Se dejó solidificar para posteriormente proceder a cargar las muestras en los pocillos; en cada pocillo se colocó 7 uL de muestra más 3 uL del buffer de carga y en el pocillo para el marcador se colocó 3 uL de buffer de carga más 2 uL

de marcador. Se cubrió el gel con TBE 0.5X aproximadamente 700mL y se dejó correr a un voltaje de 100V por 45 minutos.

Después de la electroforesis, se colocó el gel en una bandeja de tinción de plástico y se cubrió completamente el gel con solución de tinción, que corresponde a una dilución 1:1000 de diamond Dye en TBE al 1X. Se incubó el gel en solución de tinción a temperatura ambiente en un agitador orbital o mecedor con agitación suave y protegido de la luz por al menos 30 minutos. Finalmente, se visualizó el gel con ayuda del equipo ENDURO GDS TOUCH.

### **Purificación de productos de PCR**

Los productos de PCR obtenidos de la amplificación de los fragmentos del virus RSNV fueron purificados mediante el kit PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen).

Por cada muestra obtenida de la amplificación, se le añadió la solución Binding Buffer presente en el kit 4 veces el volumen inicial de la muestra, esta mezcla se introdujo dentro de la columna con filtro propia del kit, y se procedió a centrifugar a 10 000 gravedades por 1 minuto, se descartó el precipitado y se procedió a realizar un lavado con el buffer del kit a 10 000 gravedades durante 1 minuto. Finalmente, se recuperó el purificado en 50 uL de agua libre de nucleasas tras centrifugarlo a 21 000 gravedades durante 2 minutos. La muestra purificada se almacenó a -20 °C para posteriores usos.

### **Secuenciación**

La secuenciación se realizó en la empresa MacroGen, mediante el nexo con los laboratorios IDGen de la ciudad de Quito, quienes fueron los encargados de enviar las muestras a MacroGen. Se enviaron 2 muestras de un mismo aislado de producto de PCR purificado, para las cuales se realizó una secuenciación forward y otra reverse para cada muestra.

### **Análisis Bioinformático**

Las secuencias fueron curadas de manera individual en el programa bioinformático Geneious Prime 2022.0.1, donde se eliminaron los extremos utilizando la herramienta Trim ends, a un límite de error de 0,05.

Posteriormente, se procedió a alinear las muestras tanto forward y reverse, mediante alineamiento múltiple utilizando Muscle alignment, dentro del software bioinformático Geneious Prime. El alineamiento consenso obtenido fue analizado y emparejado con la base de datos de la NCBI, mediante la herramienta online BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Para el análisis filogenético, con las secuencias obtenidas del dominio helicasa del RNA1 de RSNV, se fabricó un árbol filogenético con la ayuda del programa bioinformático MEGA11, en donde se emparejó la secuencia obtenida en este estudio junto a 18 secuencias adquiridas de la base de datos de la NCBI, las cuales se muestran a continuación en la tabla 2. El árbol fue elaborado siguiendo un modelo estadístico de máxima verosimilitud, test de filogenia basado en método de Bootstrap con 2000 replicaciones con un modelo de sustitución de tiempo general reversible (GTR), con una distribución Gamma con supuesto de independencia (G+I).

**Tabla 2***Secuencias usadas para la fabricación del árbol filogenético*

<b>País</b>	<b>Año</b>	<b>Nombre</b>	<b>Numero de accesión</b>
Argentina	2017	Cor4	MG792545
Argentina	2017	STFe5	MG792546
Argentina	2017	STFe10.1	MG792544
Benin	2013	Be1	KP099623
Benin	2013	Be2	MW187590
Brazil	2019	UFT/2019	MT027255
Brazil	2019	BR-LE01-19	MT270127
Brazil	2019	BR-TT01-19	MT270129
Brazil	2020	UFGEm/2020-1	MT507288
Burkina Faso	2016	BF-VK1	MF115599
Burkina Faso	2016	BF-K1	MF115600
Burkina Faso	2016	BF01Bama	MW117944
Colombia	2007	col	EU099844
Mali	2015	MALI-SK1	MF115602
Mali	2015	MALI-I1	MF115603
Mali	2016	MALI-B1	MF115601
Sierra Leona	2019	SL254	MN750254 MW187592

## Análisis Estadístico

Se realizó un análisis de medias significativas, respecto a la presencia o ausencia de la sintomatología en las plantas control y problema; donde se distinguió de entre el total de plantas como presencia a aquellas que tenían en las hojas láminas enrolladas y estrías cloróticas.

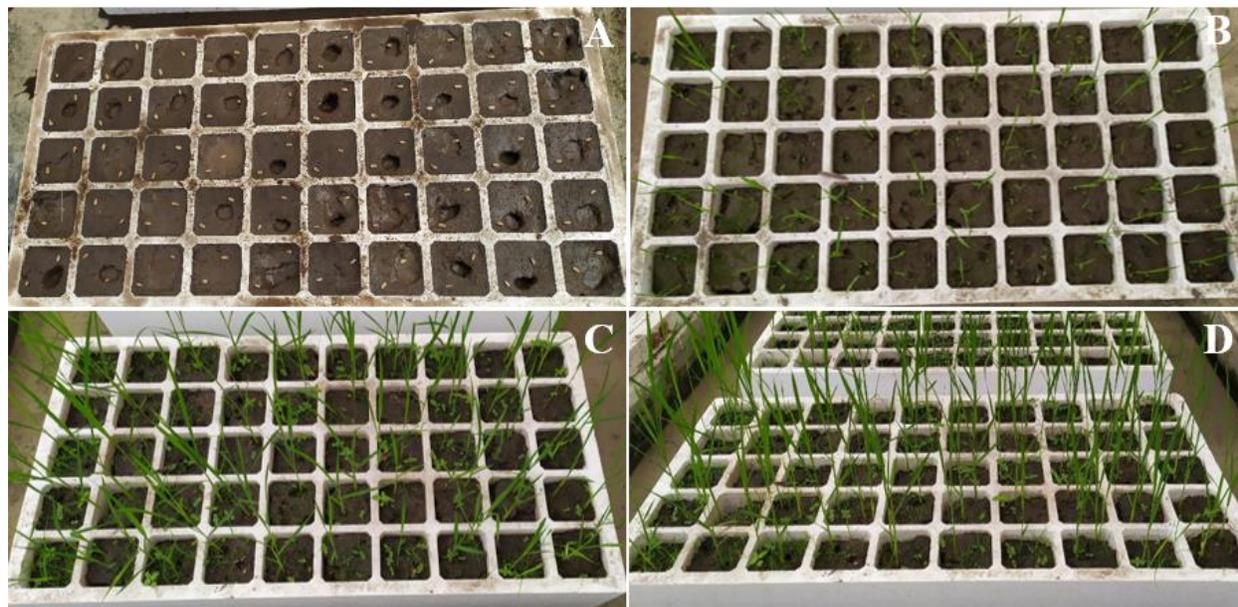
## Capítulo IV: Resultados

### Siembra y toma de muestras

Las plántulas del grupo control y grupo problema tuvieron un crecimiento normal hasta los 20 días (Figura 2), donde ninguno de los grupos de estudio presentó síntoma alguno de la enfermedad del entorchamiento del arroz. El grupo control tuvo un crecimiento normal hasta el final del estudio.

### Figura 2

*Siembra y crecimiento de plantas de arroz (Oryza sativa L.) en invernaderos*

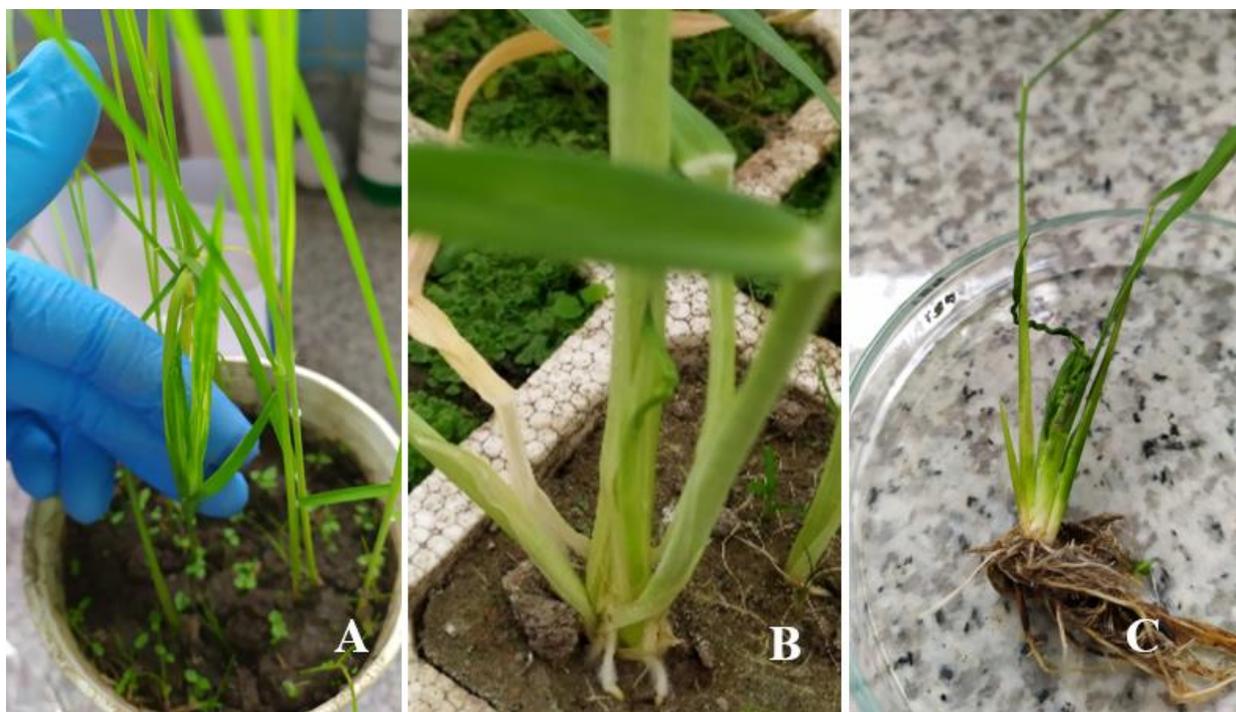


*Nota.* Las figuras A y C corresponden al grupo de estudio problema, las cuales son al inicio de la siembra de las semillas, y a los 20 días de siembra, respectivamente. Las figuras B y D, pertenecen al grupo control, donde se observa el crecimiento a los 5 días de siembra y a los 20 días respectivamente.

A partir del día 20 en adelante se empezó a notar los primeros síntomas de la enfermedad en algunas plantas de arroz (*Oryza sativa* L.). Se encontró las láminas de las hojas cloróticas y estriadas, además del entorchamiento característico de la enfermedad causada por el RSNV, tal como se muestra en la Figura 3.

### Figura 3

*Sintomatología de plantas de arroz (Oryza sativa L.) infectadas con RSNV*

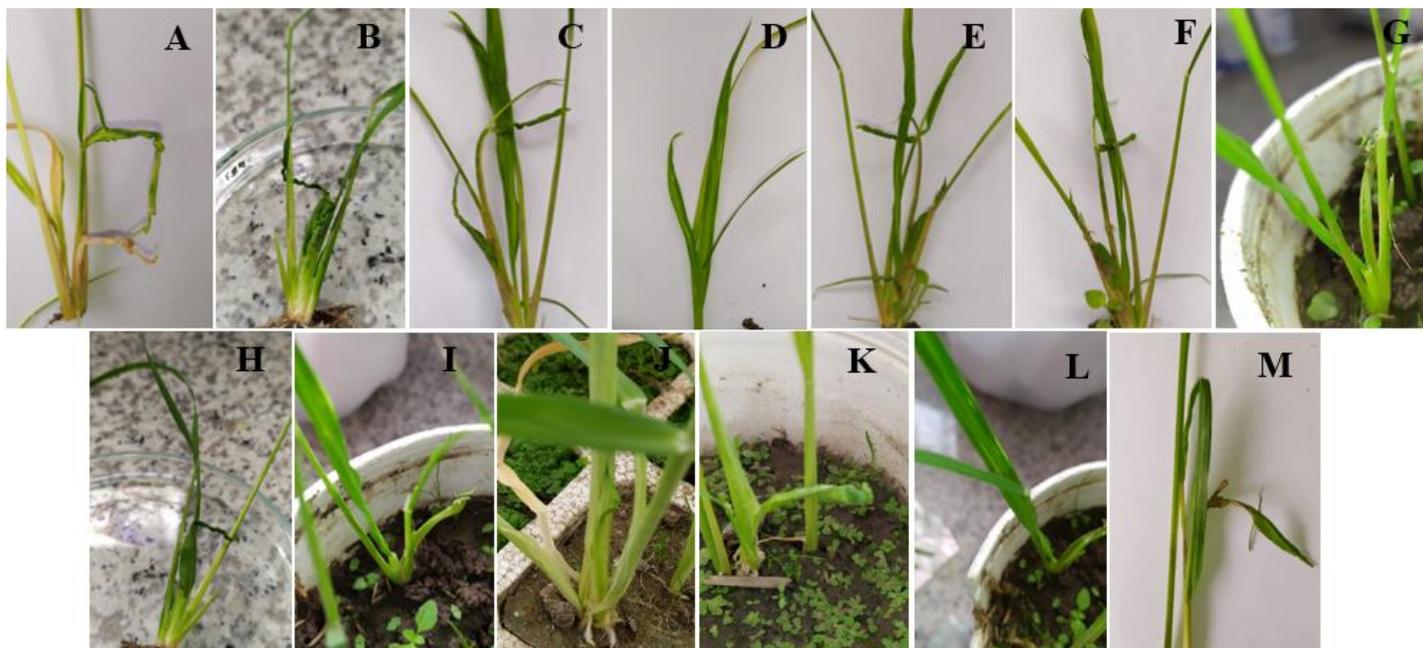


*Nota.* La figura A muestra una planta enferma con síntomas leves de la enfermedad, se puede observar que la nervadura tiene estrías cloróticas e inicio de arrugamiento en las hojas. En la figura B, se observa que los síntomas son moderados, existen estrías cloróticas en las hojas, y un arrugamiento ya pronunciado en una de ellas, además del crecimiento característico en zigzag. La figura C muestra ya la sintomatología grave de la enfermedad, enanismo en la planta, impedimento del desarrollo vegetal, el crecimiento en zigzag, las láminas enrolladas, y un arrugamiento agresivo de la lámina foliar.

Los daños en las plantas característicos de la enfermedad se extendieron considerablemente, evitando el crecimiento y desarrollo normal. Del total de 30 plantas del grupo problema, se obtuvo a los 30 días de siembra un total de 13 plantas enfermas, lo que corresponde a una prevalencia de la enfermedad del 43,33%.

#### Figura 4

*Plantas de arroz (Oryza sativa L.) afectadas por la enfermedad del entorchamiento del arroz*



*Nota.* En las figuras de la A hasta la M se muestran síntomas de la enfermedad del entorchamiento de 13 plantas del total sembradas del grupo problema. Los síntomas más graves se vieron en las plantas A, B, H, I y M. Plantas como la C, E, F, G, J y K, mostraron síntomas moderados de la enfermedad. Los síntomas más leves que se observaron fueron de las plantas D y L.

#### Extracción de ácidos nucleicos

La extracción del RNA comenzó a partir del día 30 posterior a la siembra, donde se tomaron las muestras de las hojas de aquellas plantas con síntomas claros de la enfermedad; y se realizó la extracción para posteriormente cuantificar el RNA (tabla 3).

**Tabla 3**

*Cuantificación de ácidos nucleicos extraídos de plantas de arroz (Oryza sativa L.)*

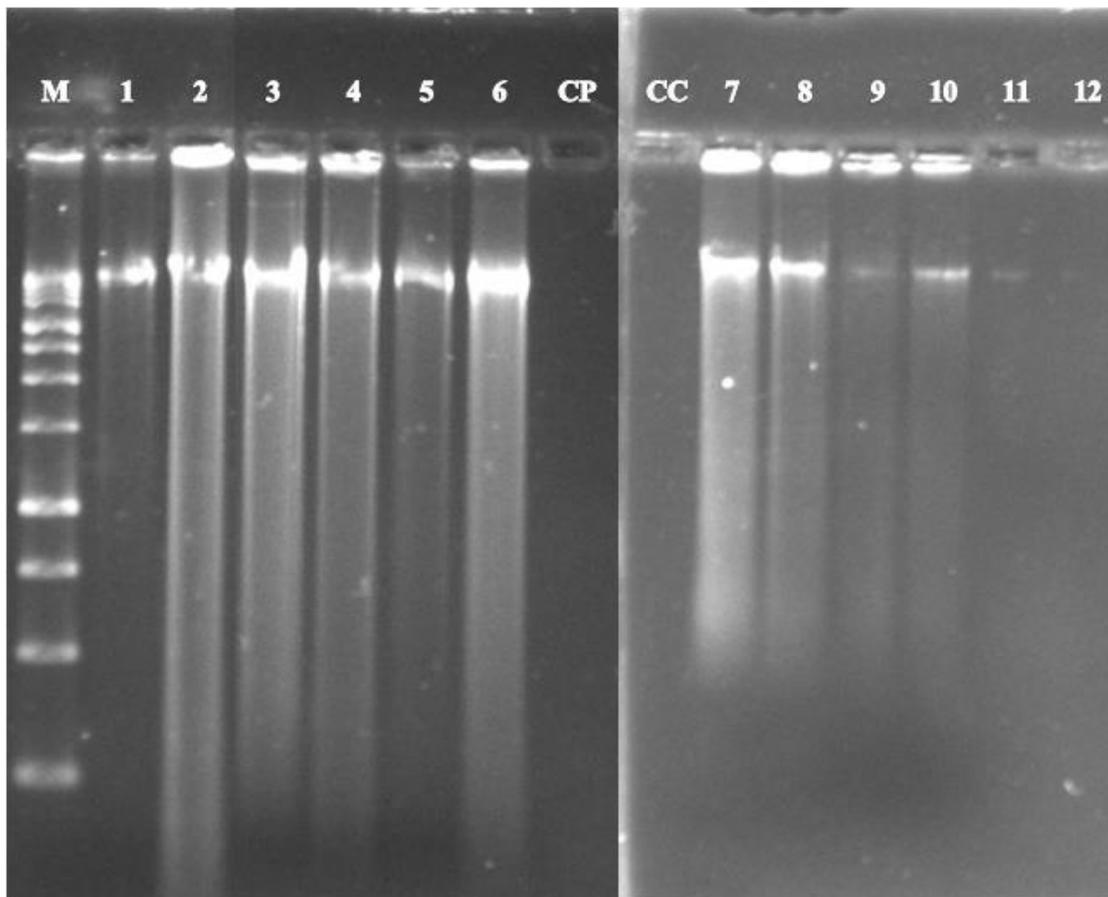
	<b>Muestra</b>	<b>A260/280</b>	<b>A260/230</b>	<b>Concentración (ug/mL)</b>
<b>Grupo problema</b>	1	1,75	1,88	221,4
	2	1,68	1,91	196,8
	3	1,82	1,85	185,3
	4	1,94	2,12	210,5
	5	1,71	1,96	215,8
	6	1,60	1,83	193,6
<b>Grupo control</b>	1	1,42	1,55	160,2
	2	1,48	1,63	157,1
	3	1,39	1,48	163,7
	4	1,52	1,51	162,6
	5	1,47	1,59	154,4
	6	1,35	1,45	147,8

### **Retrotranscripción de RNA**

El cDNA obtenido fue verificado en una electroforesis en gel que se muestra a continuación en la Figura 5, donde se observa que es un material bastante sensible a la degradación. Las muestras correspondientes al problema tienen una banda más intensa en algunos casos que aquellas bandas de las muestras control.

**Figura 5**

*Electroforesis en gel de cDNA obtenido tras retrotranscripción*



*Nota.* La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 2%. Las muestras desde el pocillo 1 al 6 pertenecen a las muestras problema. Del pocillo 7 al 12 corresponden a las muestras control. CP: control negativo de muestras problema. CC: control negativo de muestras control. M: marcador 1kb

Los valores de cuantificación de cDNA se muestran en la tabla a continuación.

**Tabla 4**

*Cuantificación de cDNA producto de la retrotranscripción de RNA extraído de plantas de arroz (Oryza sativa L.)*

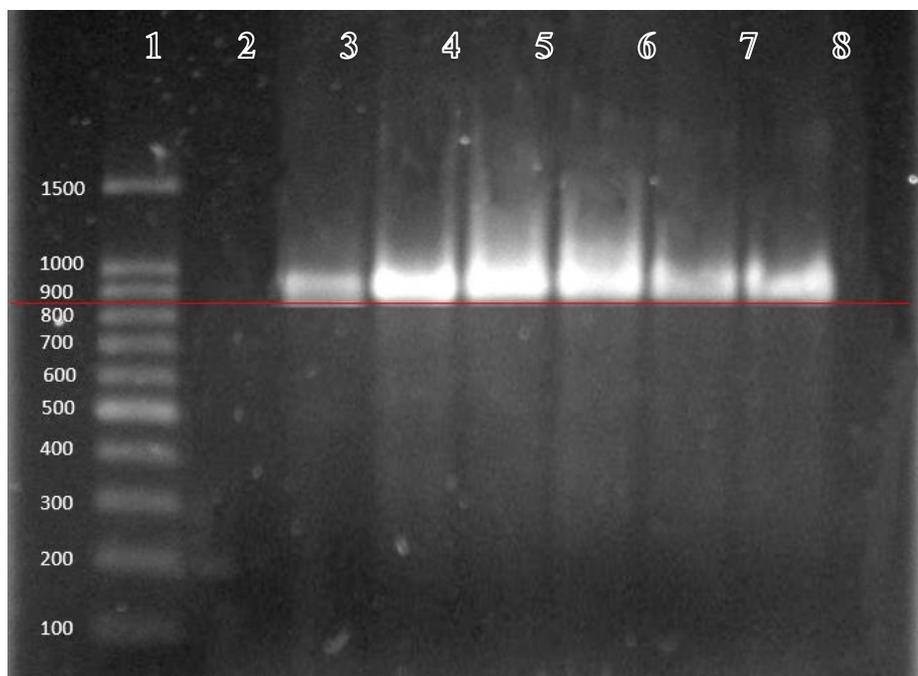
<b>Muestra</b>	<b>A260/280</b>	<b>A260/230</b>	<b>Concentración (ug/mL)</b>
C	1,28	1,43	85,1
1	1,58	1,75	83,2
2	1,61	1,77	94,6
3	1,68	1,83	79,5
4	1,73	1,89	82,4
5	1,55	1,69	86,3
6	1,52	1,65	92,3

#### **Amplificación por PCR y productos purificados**

Se realizó la electroforesis de los productos de la amplificación por PCR (Figura 6), donde se observa que las bandas obtenidas tienen una longitud aproximada de 900 bp, esto siguiendo las indicaciones del marcador 100 bp utilizado en la electroforesis.

**Figura 6**

*Electroforesis de productos de PCR con los primers RSNV1-3827R y RSNV1-2901F*



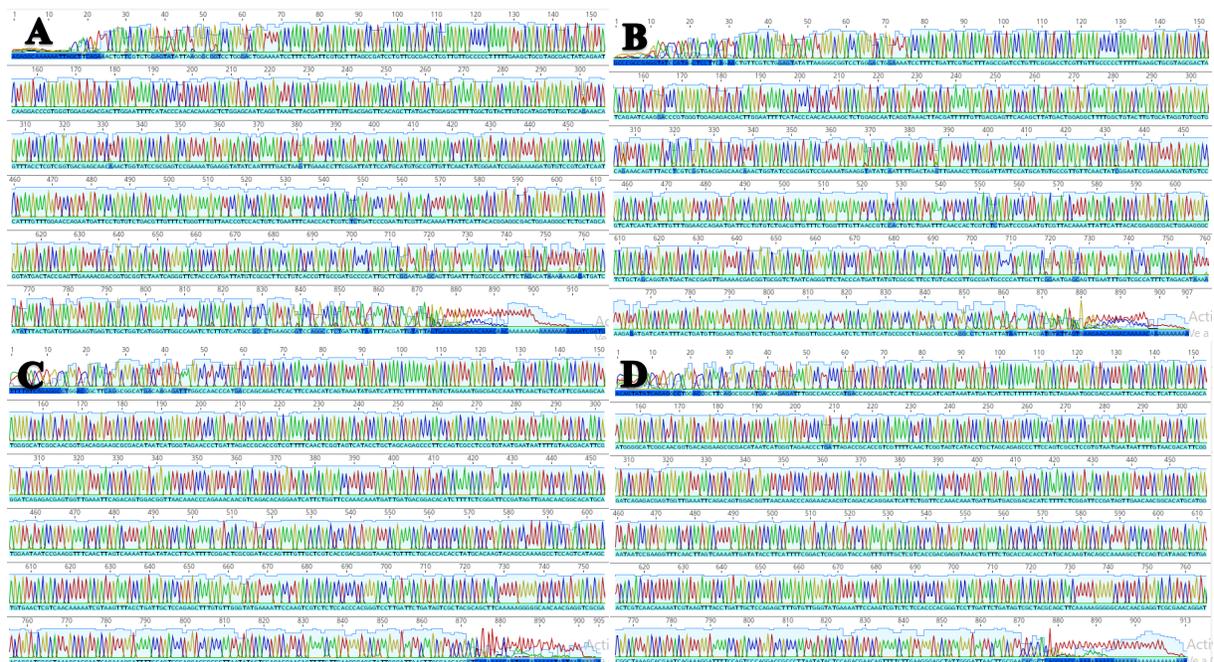
*Nota.* Gel de agarosa al 2%. Marcador 100 bp en el primer pocillo. Muestra control en el segundo pocillo, muestras problemas desde el pocillo 3 al 8.

### **Análisis bioinformático**

Las secuencias obtenidas tras la secuenciación Sanger fueron en formato. ab1, y se muestran a continuación los electroferogramas analizados (Figura 7). Las longitudes de cada una de las muestras usadas para la secuenciación se muestran en la tabla 5.

Figura 7

Secuencias obtenidas de muestras amplificadas con los primers RSNV1-2901F y RSNV1-3827R



*Nota.* La secuenciación se realizó por duplicado. Las figuras A y B corresponden a la secuenciación realizada con el primer RSNV1-2901F, y las figuras C y D corresponden a la secuenciación realizada con el primer RSNV1-3827R

Tabla 5

Longitud de los fragmentos secuenciados con los primers RSNV1-2901F y RSNV1-3827R

Muestra	Numero de bases muestras sin curar	Numero de bases muestras curadas
WG1_2901F	1478	850
WG2_2901F	907	849
WG1_3827R	905	862
WG2_3827R	913	863

El alineamiento de las secuencias dio como resultado un consenso de 895 pares de bases, con un porcentaje de identidad de 99,8%, que puede ser debido a la lectura errónea en uno de los nucleótidos, que se observa en la Figura 9.

La secuencia obtenida tras la curación y el alineamiento múltiple se muestra en la Figura 8, esta secuencia consenso al ser introducida en la base de datos de BLAST, correspondió a un porcentaje de identidad del 99,66% (Figura 10) con la secuencia reportada en Colombia por Lozano & Morales (2009), con número de accesión EU099844 específico para el dominio helicasa del RNA1. Con otras secuencias reportadas se tuvo un porcentaje de identidad entre 96,92 y 95%, siendo las más próximas con 96,92% y 96,28% las secuencias de Sierra Leona (MW187592) y Benin (MW187590) respectivamente. Con las secuencias reportadas en Argentina (MG792544), se tuvo una identidad del 96,06%, y con la brasileña (MT027255) un 95,95%.

**Figura 8**

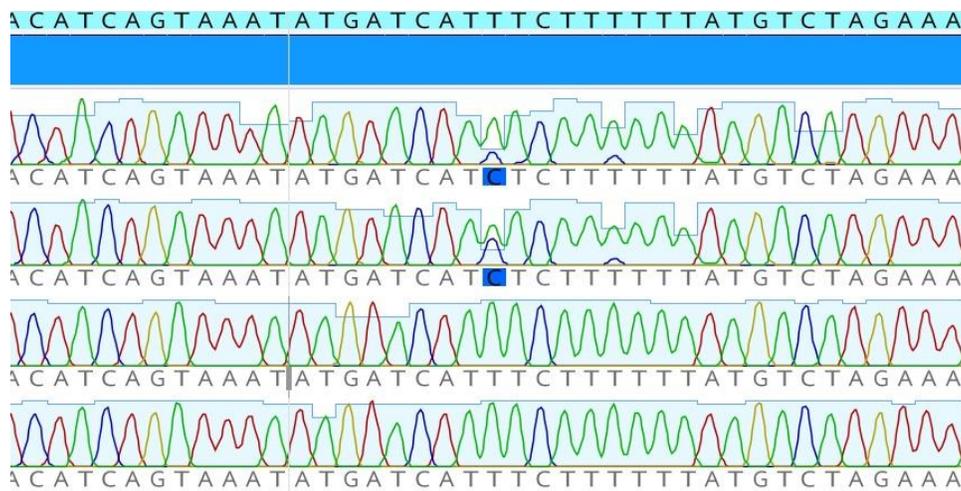
*Secuencia consenso obtenida del alineamiento múltiple de las secuencias curadas*

Consensus	CAHTATACAAATGTAATATAAATACAGAGGCTGACGCGCTTCAAGCCGCAATGCA	57	Consensus	TATCCGAGAGGTTTCACTTATGTCAGAAATGATATACCTTCTGACGACACCTATGCAAGT	527
WG2_3827R.abi	CAHTATACAAATGTAATATAAATACAGAGGCTGACGCGCTTCAAGCCGCAATGCA	41	WG2_3827R.abi	TATCCGAGAGGTTTCACTTATGTCAGAAATGATATACCTTCTGACGACACCTATGCAAGT	521
WG1_3827R.abi	CAHTATACAAATGTAATATAAATACAGAGGCTGACGCGCTTCAAGCCGCAATGCA	38	WG1_3827R.abi	TATCCGAGAGGTTTCACTTATGTCAGAAATGATATACCTTCTGACGACACCTATGCAAGT	518
WG2_2901F.abi	CAHTATACAAATGTAATATAAATACAGAGGCTGACGCGCTTCAAGCCGCAATGCA	83	WG2_2901F.abi (reverse)	TATCCGAGAGGTTTCACTTATGTCAGAAATGATATACCTTCTGACGACACCTATGCAAGT	563
WG1_2901F.abi (reverse)	CAHTATACAAATGTAATATAAATACAGAGGCTGACGCGCTTCAAGCCGCAATGCA	660	WG1_2901F.abi (reverse)	TATCCGAGAGGTTTCACTTATGTCAGAAATGATATACCTTCTGACGACACCTATGCAAGT	1140
Consensus	AGAGATTGGCCACCCATGACGACGAGCTCCTTCCACATCAGTAAATGATCAIT	117	Consensus	CCAGTTTGTGCTGCTCACCAGGAGTAACTGTTCTGACACACACTATGCAAGT	597
WG2_3827R.abi	AGAGATTGGCCACCCATGACGACGAGCTCCTTCCACATCAGTAAATGATCAIT	101	WG2_3827R.abi	CCAGTTTGTGCTGCTCACCAGGAGTAACTGTTCTGACACACACTATGCAAGT	581
WG1_3827R.abi	AGAGATTGGCCACCCATGACGACGAGCTCCTTCCACATCAGTAAATGATCAIT	98	WG1_3827R.abi	CCAGTTTGTGCTGCTCACCAGGAGTAACTGTTCTGACACACACTATGCAAGT	578
WG2_2901F.abi (reverse)	AGAGATTGGCCACCCATGACGACGAGCTCCTTCCACATCAGTAAATGATCAIT	143	WG2_2901F.abi (reverse)	CCAGTTTGTGCTGCTCACCAGGAGTAACTGTTCTGACACACACTATGCAAGT	623
WG1_2901F.abi (reverse)	AGAGATTGGCCACCCATGACGACGAGCTCCTTCCACATCAGTAAATGATCAIT	720	WG1_2901F.abi (reverse)	CCAGTTTGTGCTGCTCACCAGGAGTAACTGTTCTGACACACACTATGCAAGT	1200
Consensus	TCTTTTTATGCTAGAAATGGGACCAATTAATCACTGCTCATTCGAGCAATGGGGCA	177	Consensus	ACAGCABAAAGGCTCCAGTCAAGCTGTGACTGTGACAAAATGTAAGTTACT	657
WG2_3827R.abi	TCTTTTTATGCTAGAAATGGGACCAATTAATCACTGCTCATTCGAGCAATGGGGCA	161	WG2_3827R.abi	ACAGCABAAAGGCTCCAGTCAAGCTGTGACTGTGACAAAATGTAAGTTACT	641
WG1_3827R.abi	TCTTTTTATGCTAGAAATGGGACCAATTAATCACTGCTCATTCGAGCAATGGGGCA	158	WG1_3827R.abi	ACAGCABAAAGGCTCCAGTCAAGCTGTGACTGTGACAAAATGTAAGTTACT	638
WG2_2901F.abi (reverse)	TCTTTTTATGCTAGAAATGGGACCAATTAATCACTGCTCATTCGAGCAATGGGGCA	203	WG2_2901F.abi (reverse)	ACAGCABAAAGGCTCCAGTCAAGCTGTGACTGTGACAAAATGTAAGTTACT	683
WG1_2901F.abi (reverse)	TCTTTTTATGCTAGAAATGGGACCAATTAATCACTGCTCATTCGAGCAATGGGGCA	780	WG1_2901F.abi (reverse)	ACAGCABAAAGGCTCCAGTCAAGCTGTGACTGTGACAAAATGTAAGTTACT	1260
Consensus	TGGCAGCGTGCAGGAGGCGGACATATCATGGGTAGAACCTGATTAGACCGCAC	237	Consensus	GATGCTCCAGAGCTTGTGTTGGGTATGAAATCCAACTGCTCTCCACCCAGGGT	717
WG2_3827R.abi	TGGCAGCGTGCAGGAGGCGGACATATCATGGGTAGAACCTGATTAGACCGCAC	221	WG2_3827R.abi	GATGCTCCAGAGCTTGTGTTGGGTATGAAATCCAACTGCTCTCCACCCAGGGT	701
WG1_3827R.abi	TGGCAGCGTGCAGGAGGCGGACATATCATGGGTAGAACCTGATTAGACCGCAC	218	WG1_3827R.abi	GATGCTCCAGAGCTTGTGTTGGGTATGAAATCCAACTGCTCTCCACCCAGGGT	698
WG2_2901F.abi (reverse)	TGGCAGCGTGCAGGAGGCGGACATATCATGGGTAGAACCTGATTAGACCGCAC	263	WG2_2901F.abi (reverse)	GATGCTCCAGAGCTTGTGTTGGGTATGAAATCCAACTGCTCTCCACCCAGGGT	743
WG1_2901F.abi (reverse)	TGGCAGCGTGCAGGAGGCGGACATATCATGGGTAGAACCTGATTAGACCGCAC	840	WG1_2901F.abi (reverse)	GATGCTCCAGAGCTTGTGTTGGGTATGAAATCCAACTGCTCTCCACCCAGGGT	1320
Consensus	TGAAATATTTTGTACAGCATTTGGGATCAGAGAGGATGTTGAAATTCAGACGTGG	297	Consensus	GGATCGCTAAGGACGAAATCAGAAAGGATTTCCAGTCCGAGGACCGCTTAATATAC	837
WG2_3827R.abi	TGAAATATTTTGTACAGCATTTGGGATCAGAGAGGATGTTGAAATTCAGACGTGG	281	WG2_3827R.abi	GGATCGCTAAGGACGAAATCAGAAAGGATTTCCAGTCCGAGGACCGCTTAATATAC	821
WG1_3827R.abi	TGAAATATTTTGTACAGCATTTGGGATCAGAGAGGATGTTGAAATTCAGACGTGG	278	WG1_3827R.abi	GGATCGCTAAGGACGAAATCAGAAAGGATTTCCAGTCCGAGGACCGCTTAATATAC	818
WG2_2901F.abi (reverse)	TGAAATATTTTGTACAGCATTTGGGATCAGAGAGGATGTTGAAATTCAGACGTGG	363	WG2_2901F.abi (reverse)	GGATCGCTAAGGACGAAATCAGAAAGGATTTCCAGTCCGAGGACCGCTTAATATAC	863
WG1_2901F.abi (reverse)	TGAAATATTTTGTACAGCATTTGGGATCAGAGAGGATGTTGAAATTCAGACGTGG	960	WG1_2901F.abi (reverse)	GGATCGCTAAGGACGAAATCAGAAAGGATTTCCAGTCCGAGGACCGCTTAATATAC	1440
Consensus	GGTTACAAAACCCGAAACCAAGCTCAGACAGGAGATCAITCTGGTTCCAAACAAATGA	417	Consensus	TCGACGACACAGTCTTCTTAAAGGAGCAITGGGATTAATCTTCGACAGCCTCAG	897
WG2_3827R.abi	GGTTACAAAACCCGAAACCAAGCTCAGACAGGAGATCAITCTGGTTCCAAACAAATGA	401	WG2_3827R.abi	TCGACGACACAGTCTTCTTAAAGGAGCAITGGGATTAATCTTCGACAGCCTCAG	881
WG1_3827R.abi	GGTTACAAAACCCGAAACCAAGCTCAGACAGGAGATCAITCTGGTTCCAAACAAATGA	398	WG1_3827R.abi	TCGACGACACAGTCTTCTTAAAGGAGCAITGGGATTAATCTTCGACAGCCTCAG	878
WG2_2901F.abi (reverse)	GGTTACAAAACCCGAAACCAAGCTCAGACAGGAGATCAITCTGGTTCCAAACAAATGA	443	WG2_2901F.abi (reverse)	TCGACGACACAGTCTTCTTAAAGGAGCAITGGGATTAATCTTCGACAGCCTCAG	917
WG1_2901F.abi (reverse)	GGTTACAAAACCCGAAACCAAGCTCAGACAGGAGATCAITCTGGTTCCAAACAAATGA	1020	WG1_2901F.abi (reverse)	TCGACGACACAGTCTTCTTAAAGGAGCAITGGGATTAATCTTCGACAGCCTCAG	1494

**Nota.** La secuencia consenso obtenida, tiene una longitud de 895 bp.

Figura 9

Secuencia consenso obtenida del alineamiento múltiple de las secuencias curadas



*Nota.* Electroferograma de secuencias alineadas, region subrayada corresponde a error en la lectura del nucleótido

Figura 10

BLAST de la secuencia consenso obtenida de las muestras de RNA1 secuenciado

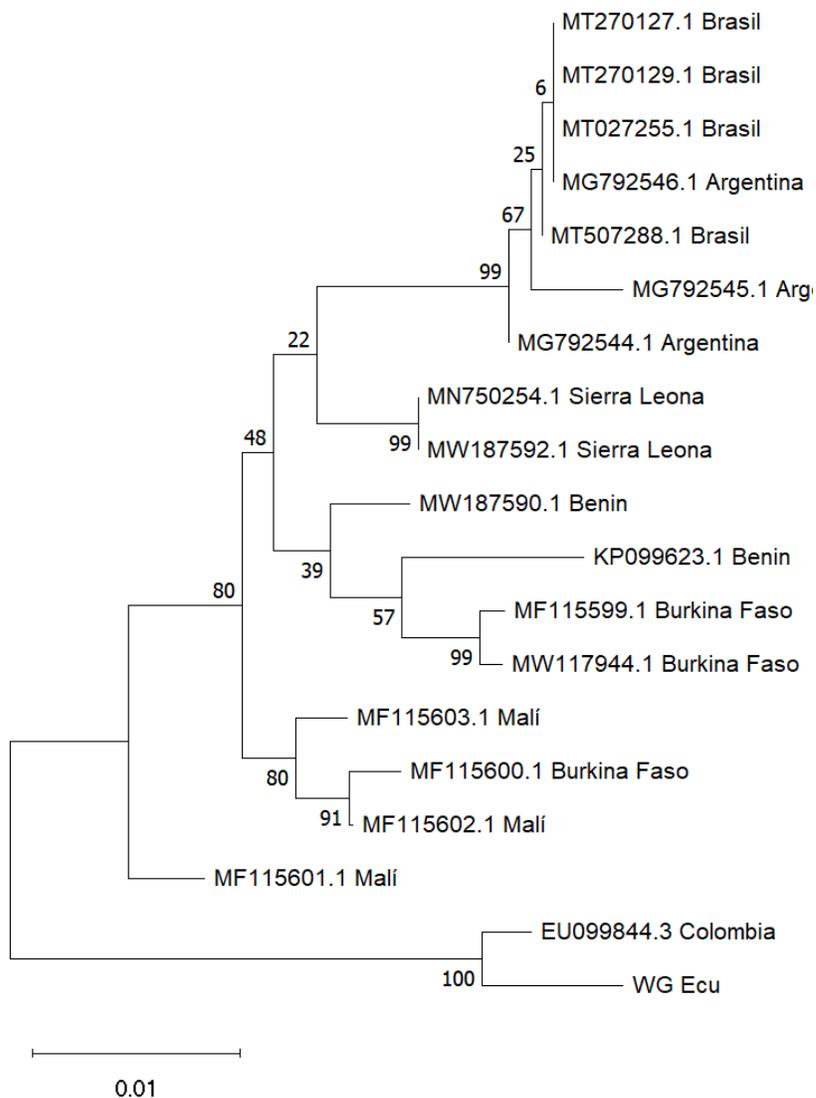
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rice stripe necrosis virus segment RNA1 .complete sequence</a>	<a href="#">Rice stripe necrosis virus</a>	1622	1622	99%	0.0	99.66%	6634	<a href="#">NC_038775.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rice stripe necrosis virus isolate SI254 segment RNA1 .complete sequence</a>	<a href="#">Rice stripe necrosis virus</a>	1471	1471	98%	0.0	96.92%	6571	<a href="#">MW187592.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rice stripe necrosis virus isolate Be2 segment RNA1 .complete sequence</a>	<a href="#">Rice stripe necrosis virus</a>	1456	1456	99%	0.0	96.28%	6582	<a href="#">MW187590.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rice stripe necrosis virus isolate STFe10.1 segment RNA1 helicase mRNA .partial cds</a>	<a href="#">Rice stripe necrosis virus</a>	1445	1445	99%	0.0	96.06%	927	<a href="#">MG792544.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rice stripe necrosis virus isolate UFT/2019 segment RNA1 .complete sequence</a>	<a href="#">Rice stripe necrosis virus</a>	1439	1439	99%	0.0	95.95%	7021	<a href="#">MT027255.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rice stripe necrosis virus isolate STF5 segment RNA1 helicase mRNA .partial cds</a>	<a href="#">Rice stripe necrosis virus</a>	1439	1439	99%	0.0	95.95%	927	<a href="#">MG792546.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rice stripe necrosis virus isolate SF2.1 segment RNA 1 replication-associated protein gene .complete cds</a>	<a href="#">Rice stripe necrosis virus</a>	1439	1439	99%	0.0	95.95%	6578	<a href="#">MW147224.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rice stripe necrosis virus isolate UFGEm/2020-1 segment RNA1 .complete sequence</a>	<a href="#">Rice stripe necrosis virus</a>	1439	1439	99%	0.0	95.95%	6621	<a href="#">MT507288.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rice stripe necrosis virus isolate BR-TT01:19 segment RNA1 .complete sequence</a>	<a href="#">Rice stripe necrosis virus</a>	1439	1439	99%	0.0	95.95%	6620	<a href="#">MT270129.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rice stripe necrosis virus isolate BR-LE01:19 segment RNA1 .complete sequence</a>	<a href="#">Rice stripe necrosis virus</a>	1439	1439	99%	0.0	95.95%	6620	<a href="#">MT270127.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rice stripe necrosis virus isolate Cor18 segment RNA1 .complete sequence</a>	<a href="#">Rice stripe necrosis virus</a>	1434	1434	99%	0.0	95.83%	6617	<a href="#">MW147222.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rice stripe necrosis virus isolate M2-1 segment RNA1 replication-associated protein gene .complete cds</a>	<a href="#">Rice stripe necrosis virus</a>	1423	1423	99%	0.0	95.61%	6617	<a href="#">MK170453.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rice stripe necrosis virus isolate M1-1 segment RNA1 replication-associated protein gene .complete cds</a>	<a href="#">Rice stripe necrosis virus</a>	1423	1423	99%	0.0	95.61%	6617	<a href="#">MK170452.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Rice stripe necrosis virus isolate ML01San segment RNA1 .complete sequence</a>	<a href="#">Rice stripe necrosis virus</a>	1423	1423	99%	0.0	95.61%	6617	<a href="#">MW117948.1</a>

*Nota.* Se obtuvieron coincidencias con 26 secuencias reportadas en la base de datos de la NCBI, todas respecto al dominio helicasa del RNA1 del virus RSNV

Finalmente, el análisis filogenético realizado en MEGAX, dio como resultado, al aplicar el método de máxima verosimilitud, el árbol filogenético presentado en la Figura 11, el cual muestra claramente la aparición de dos grupos muy separados, en el primero donde se agrupan la mayoría de las secuencias, tanto africanas como de Argentina y Brasil, y es en el segundo grupo donde se encuentran las secuencias colombiana (EU099844) y la presentada en este estudio WG Ecu.

Figura 11

Árbol filogenético de WG Ecu de dominio helicasa de RNA1



*Nota.* Relaciones filogenéticas entre secuencias genómicas de RSNV. El árbol filogenético fue construido siguiendo un modelo estadístico de máxima verosimilitud, con las secuencias del dominio helicasa del RNA1 de RSNV, test de filogenia basado en método de Bootstrap con 2000 replicaciones con un modelo de sustitución de tiempo general reversible (GTR), con una distribución Gamma con supuesto de independencia (G+I).

## Capítulo V: Discusión

El estudio comienza con el análisis de 30 plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) de la variedad INIAP FL Arenillas, que fue sembrada en suelos contaminados con la enfermedad del entorchamiento de la región de Vinces en la provincia de Los Ríos, durante un periodo de 30 días. Durante este periodo lo que se obtuvo fue que 13 de las 30 plantas sembradas tenían la enfermedad del entorchamiento causada por RSNV, lo que corresponde a un total de 43,33%. En el estudio de Maurino et al. (2018), se menciona que las plántulas sembradas en un suelo con virus, tan solo el 1,6% del total sembrado desarrollo los síntomas de la enfermedad, siendo confirmado posteriormente mediante PCR.

Tras la extracción de RNA, se realizó la retrotranscripción para obtener el cDNA de las muestras, para las cuales se utilizó como primer oligo dT, como se observa en la Figura 5, se tiene una degradación pronta de las muestras, además de que las concentraciones son relativamente bajas. En el estudio de Lozano & Morales (2009), aplica la misma metodología obteniendo el cDNA mediante la utilización de primer oligo dT.

La amplificación por PCR utilizando los primers RSNV1-3827R y RSNV1-2901F, arrojó como resultado bandas de tamaño aproximado de 900 bp, esto concuerda con lo reportado en los estudios de de Souza et al. (2021); Decroës et al. (2017); Oludare et al. (2014) y Sereme et al. (2014), en donde reportan que el tamaño del dominio helicasa del RNA1 del virus del entorchamiento tiene un tamaño de banda de 921 bp.

Posterior a la secuenciación de las muestras se realizó el análisis de secuencias con la base de datos de GenBank, donde se tuvo que la secuencia consenso obtenida tiene mayor cercanía a la secuencia reportada en Colombia (EU099844), que se vuelve a confirmar más adelante con el árbol filogenético de la región de dominio helicasa correspondiente al RNA1, el cual creó un patrón de agrupamiento geográfico de los aislados, donde se obtuvo clados diferenciados donde se reunieron por

grupos: las secuencias argentinas junto con las brasileñas, los países africanos formaron distintos grupos entre ellos, y finalmente los aislados colombiano junto al reportado en este trabajo formaron otro grupo. Esto concuerda con la información de de Souza et al. (2021) y Tucker et al. (2020), quienes presentaron el mismo resultado respecto a las agrupaciones geográficas de las secuencias de RSNV, donde el aislado colombiano siempre crea un grupo a parte de las secuencias de África y las restantes de Sudamérica.

En el estudio de Bagayoko et al. (2021), denotó tras un análisis de diversidad, índices 3 veces superiores de variabilidad en el RNA1 del RSNV que cualquiera visto en otros *Bennyvirus*. El análisis realizado y la divergencia presentada en el árbol filogenético, puede ser a causa de un posible reordenamiento en el RNA1 del virus.

Los reportes para BNYVV en el estudio de Chiba et al. (2011); y el estudio de BNYVV y el virus del mosaico de la remolacha según Laufer et al. (2018), informan acerca de un posible reordenamiento del RNA1, similar a lo reportado para el RNA1 de RSNV en el estudio de de Souza et al. (2021), quien también presentó divergencia de las muestras de RSNV entre Sudamérica y África. Sin embargo, esta posibilidad debe ser estudiada con mayor cantidad de secuencias del virus, y estudiar posibles coocurrencias entre secuencias reordenadas y no reordenadas.

Con los resultados presentados, es normal preguntarse acerca del origen de los virus de las plantas y la forma en la que se propagan entre continentes, en el estudio de de Souza et al. (2021), se habla acerca de los primeros reportes que se dieron del virus en África y posteriormente en Colombia, donde suponen una introducción del virus a América desde África, esto debido a la contaminación de las semillas posiblemente con esporas de resistencia del vector *P. graminis* L.. Sin embargo, se puede suponer que hubo más de un evento de introducción, debido a las divergencias entre los demás aislados sudamericanos con los de Colombia y el presentado en este estudio.

## Capítulo VI: Conclusiones

La secuencia obtenida a partir de las muestras de arroz (*Oryza sativa* L.) de la variedad Arenillas INIAP FL, correspondieron a un tamaño aproximado de 900 bp tras la amplificación por PCR, y mediante el análisis bioinformático posterior a la secuenciación se obtuvo un tamaño final de 895 bp que pertenecen al dominio helicasa del RNA1 del virus del entorchamiento del arroz.

El análisis bioinformático confirmó que la secuencia obtenida corresponde al virus del entorchamiento de arroz RSNV, teniendo un porcentaje de identidad mayor con la secuencia reportada en Colombia de 99,66%.

En el análisis filogenético se obtuvo que las secuencias del virus tienden a agruparse geográficamente, creando subgrupos de secuencias reportadas en: Argentina y Brasil; Sierra Leona, Benín y Burkina Faso; Mali y Burkina Faso, y en un grupo aislado las secuencias reportadas en Colombia y en el presente estudio.

## Capítulo VII: Recomendaciones

Es recomendable recolectar mayor cantidad de secuencias moleculares del RSNV en países donde se haya reportado la enfermedad del entorchamiento, para así poder analizar de mejor manera las posibles recombinaciones y eventos de introducción del virus en muchas regiones del mundo.

Se recomienda analizar más regiones genómicas del virus, no únicamente la región helicasa del RNA1 ya que en los demás RNA del RSNV se podría encontrar también respuestas a la variabilidad del virus en las diferentes regiones.

### Bibliografía

- Arregoces, O., Rosero, M., & Gonzales, J. (2005). *Morfología de la Planta de Arroz* (p. 16). Centro Internacional de Agricultura Tropical. [https://betuco.be/rijst/Morfologia\\_planta\\_arroz.pdf](https://betuco.be/rijst/Morfologia_planta_arroz.pdf)
- Bagayoko, I., Celli, M. G., Romay, G., Poulicard, N., Pinel-Galzi, A., Julian, C., Filloux, D., Roumagnac, P., Sérémé, D., Bragard, C., & Hébrard, E. (2021). Genetic Diversity of Rice stripe necrosis virus and New Insights into Evolution of the Genus Benyvirus. In *Viruses* (Vol. 13, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/v13050737>
- Chiba, S., Kondo, H., Miyanishi, M., Andika, I. B., Han, C., & Tamada, T. (2011). The Evolutionary History of Beet necrotic yellow vein virus Deduced from Genetic Variation, Geographical Origin and Spread, and the Breaking of Host Resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*<sup>®</sup>, 24(2), 207–218. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-10-0241>
- de Souza, D. D., de Queiroz, A. P., Pereira, F. S., de Campos Dianese, É., Fajardo, T. V. M., Nhani Júnior, A., Lau, D., da Silva, L. A., Ribeiro, B. M., Coelho, A. S. G., Aguiar, R. W. de S., de Mello, R. N., & da Silva, F. N. (2021). Molecular characterization and sequence analysis of four Brazilian rice stripe necrosis virus isolates. *Archives of Virology*, 166(6), 1763–1767. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05037-7>
- Decroës, A., Bagayoko, I., Mahillon, M., Verhaegen, H., Liénard, C., Legrève, A., & Bragard, C. (2017). Detection of the Rice stripe necrosis virus Causing Rice Crinkle Disease and its Vector *Polymyxa graminis* f. sp. *colombiana* in Mali. *Plant Disease*, 101(12), 2155. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-17-0801-PDN>
- Dunna, V., & Roy, B. (2013). *Rice (Oryza sativa L.)* (p. 52).
- Gilmer, D., Ratti, C., & Consortium, I. R. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Benyviridae. *Journal of*

*General Virology*, 98(7), 1571–1572. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/jgv.0.000864>

Gutiérrez, A. G., Carabalí, S. J., Giraldo, O. X., Martínez, C. P., Correa, F., Prado, G., Tohme, J., & Lorieux, M. (2010). Identification of a Rice stripe necrosis virus resistance locus and yield component QTLs using *Oryza sativa* × *O. glaberrima* introgression lines. *BMC Plant Biology*, 10(1), 6. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-6>

Hull, R. (2014). *Chapter 12 - Plant to Plant Movement* (R. B. T.-P. V. (Fifth E. Hull (ed.); pp. 669–751). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384871-0.00012-1>

King, A. M. Q., Lefkowitz, E., Adams, M. J., & Carstens, E. B. (2012). *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Science. <https://books.google.com.ec/books?id=KXRCYay3pH4C>

Kondo, H., Hirano, S., Chiba, S., Andika, I. B., Hirai, M., Maeda, T., & Tamada, T. (2013). Characterization of burdock mottle virus, a novel member of the genus Benyvirus, and the identification of benyvirus-related sequences in the plant and insect genomes. *Virus Research*, 177(1), 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.07.015>

Laufer, M., Mohammad, H., Maiss, E., Richert-Pöggeler, K., Dall'Ara, M., Ratti, C., Gilmer, D., Liebe, S., & Varrelmann, M. (2018). Biological properties of Beet soil-borne mosaic virus and Beet necrotic yellow vein virus cDNA clones produced by isothermal in vitro recombination: Insights for reassortant appearance. *Virology*, 518, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.01.029>

Lozano, I., & Morales, F. (2009). Molecular characterisation of Rice stripe necrosis virus as a new species of the genus Benyvirus. *European Journal of Plant Pathology*, 124(4), 673–680. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9453-z>

Marquez, J. (2021). *Boletín Técnico. Encuesta de superficie y producción Agropecuaria Continua, 2020*.

[https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas\\_agropecuarias/espac/espac-2020/Boletin Tecnico ESPAC 2020.pdf](https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2020/Boletin_Tecnico_ESPAC_2020.pdf)

Maurino, M. F., Giménez Pecci, M. de la P., Kruger, R. D., Cúndom, M. A., Gutierrez, S. A., & Celli, M. G. (2018). First report of Rice stripe necrosis virus in Argentina. *Crop Protection*, *114*, 143–147. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.08.012>

Oludare, A., Afolabi, T., Sow, M., Pinel-Galzi, A., Hébrard, E., & Silue, D. (2014). First Report of Rice stripe necrosis virus Infecting Rice in Benin. *Plant Disease*, *99*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-14-1126-PDN>

Paz, L. (2019). *Entorchamiento del Arroz*. <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/5555/1/iniapbeelsP442.pdf>

Paz, L., Espinoza, & Amano. (2009). *El virus del “entorchamiento” del arroz en Ecuador*.

Perez, H., Rodriguez, I., & Garcia, R. (2018). Principales enfermedades que afectan al cultivo de arroz en Ecuador y alternativas para su control. *Revista Científica Agroecosistemas*, *6*(1), 16–27. <https://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes>

Sarwar, M., Aslam, M., Sarwar, S., & Iftikhar, R. (2020). *Chapter 21 - Different nematodes and plasmodiophorids as vectors of plant viruses* (L. P. B. T.-A. P. V. Awasthi (ed.); pp. 275–290). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818654-1.00021-9>

Sereme, D., Neya, B. J., Bangratz, M., Brugidou, C., & Ouedraogo, I. (2014). First Report of Rice stripe necrosis virus Infecting Rice in Burkina Faso. *Plant Disease*, *98*(10), 1451. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-14-0626-PDN>

Tamada, T. (1999). *BENYVIRUSES* (A. Granoff & R. G. B. T.-E. of V. (Second E. Webster (eds.); pp. 154–160). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/rwvi.1999.0325>

Tucker, M. J., Celli, M., Conteh, A. B., Taylor, D. R., Hébrard, E., & Poulicard, N. (2020). First report of Rice stripe necrosis virus infecting rice in Sierra Leone. *New Disease Reports*, 41, 10.  
<https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2020.041.010>

Vivas, L., & Intriago, D. (2012). *Guía para el reconocimiento y manejo de las principales enfermedades en el cultivo de arroz en Ecuador*.  
<https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/2009/1/iniaplsbd426.pdf>

Xiong, R. Y., Cheng, Z. B., Wu, J. X., Zhou, Y. J., Zhou, T., & Zhou, X. P. (2008). First report of an outbreak of Rice stripe virus on wheat in China. *Plant Pathology*, 57(2), 397.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01642.x>