



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



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

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

Autor: Ger Minda, Wilmer Sebastian

Director: Flores Flor, Francisco Javier Ph.D.

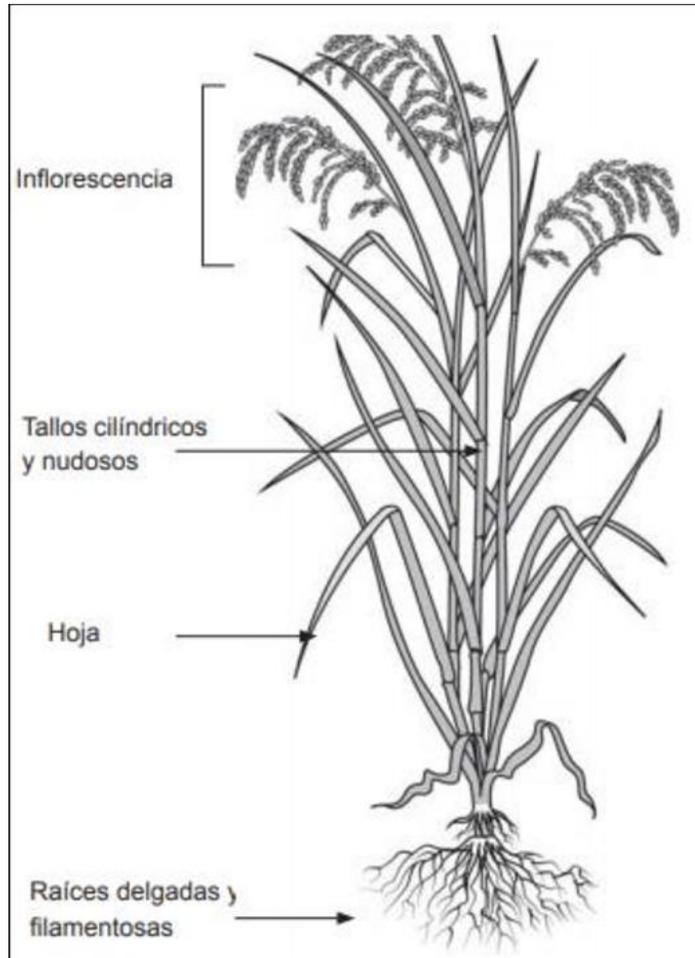
Sangolquí – 31 de agosto de 2022



- Introducción
- Objetivos
- Hipótesis
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones

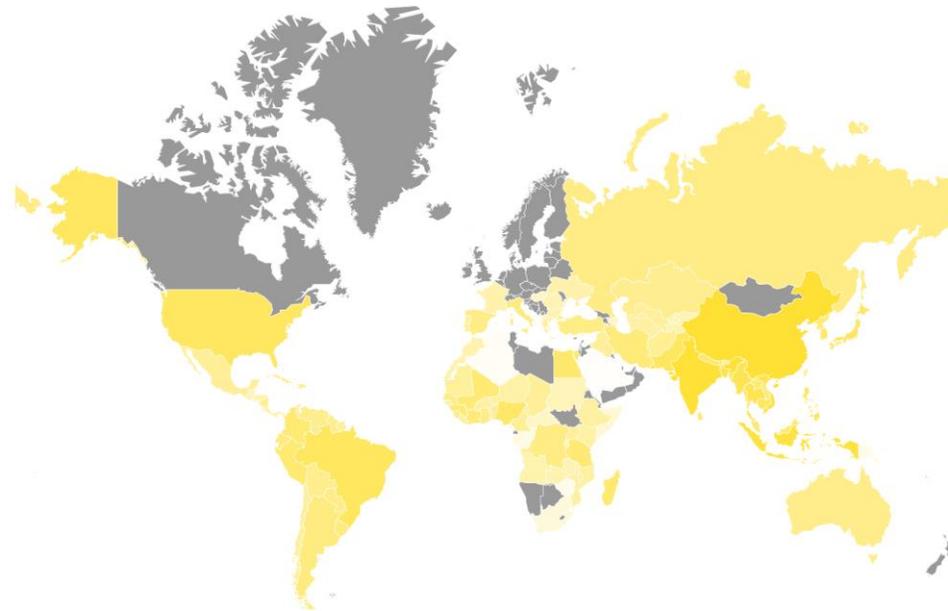
- Introducción
- Objetivos
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones
- Agradecimientos

El arroz (*Oryza sativa* L.) y sus enfermedades



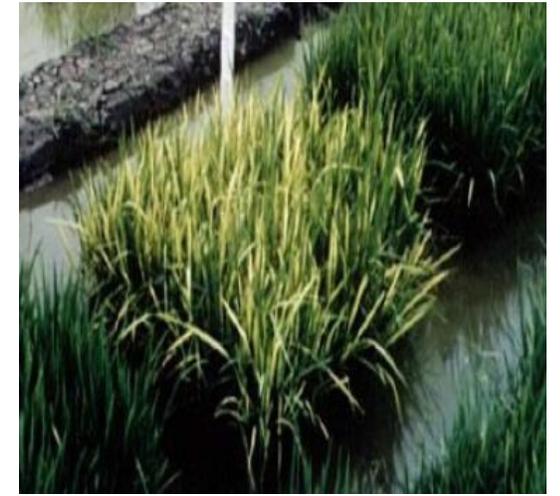
(INATEC, 2017)

Cultivo de arroz en el mundo



(Atlas Big, 2018)

Virus de la hoja blanca



Tizón de la vaina



(Perez et al., 2018)

INTRODUCCIÓN

Entorchamiento del arroz

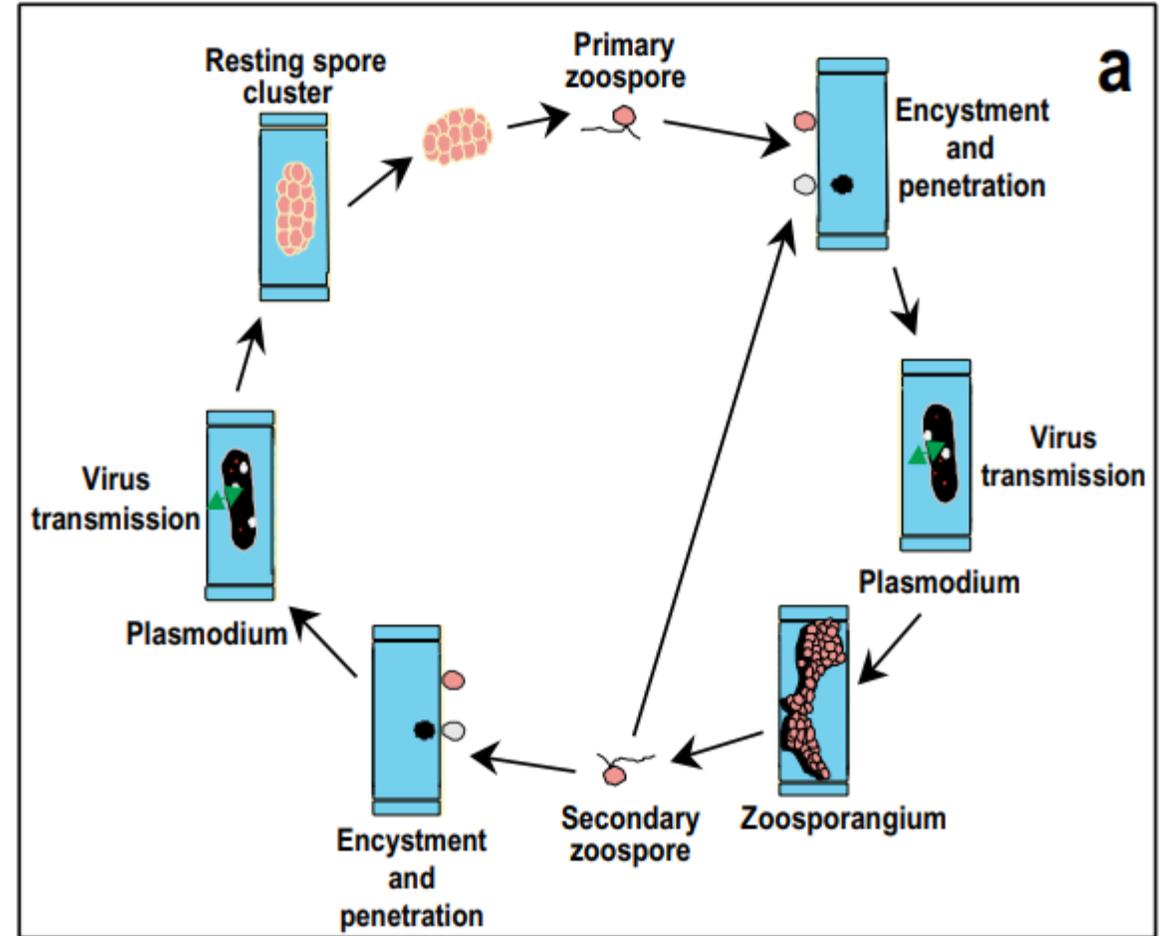


(Paz, 2019)



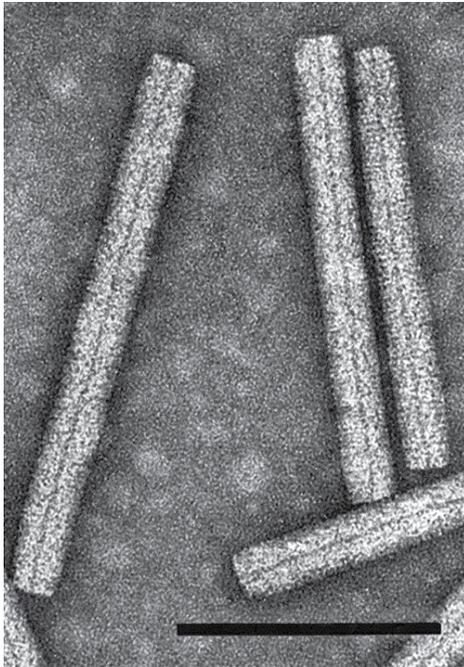
(Ger, 2021)

Polymyxa graminis L.

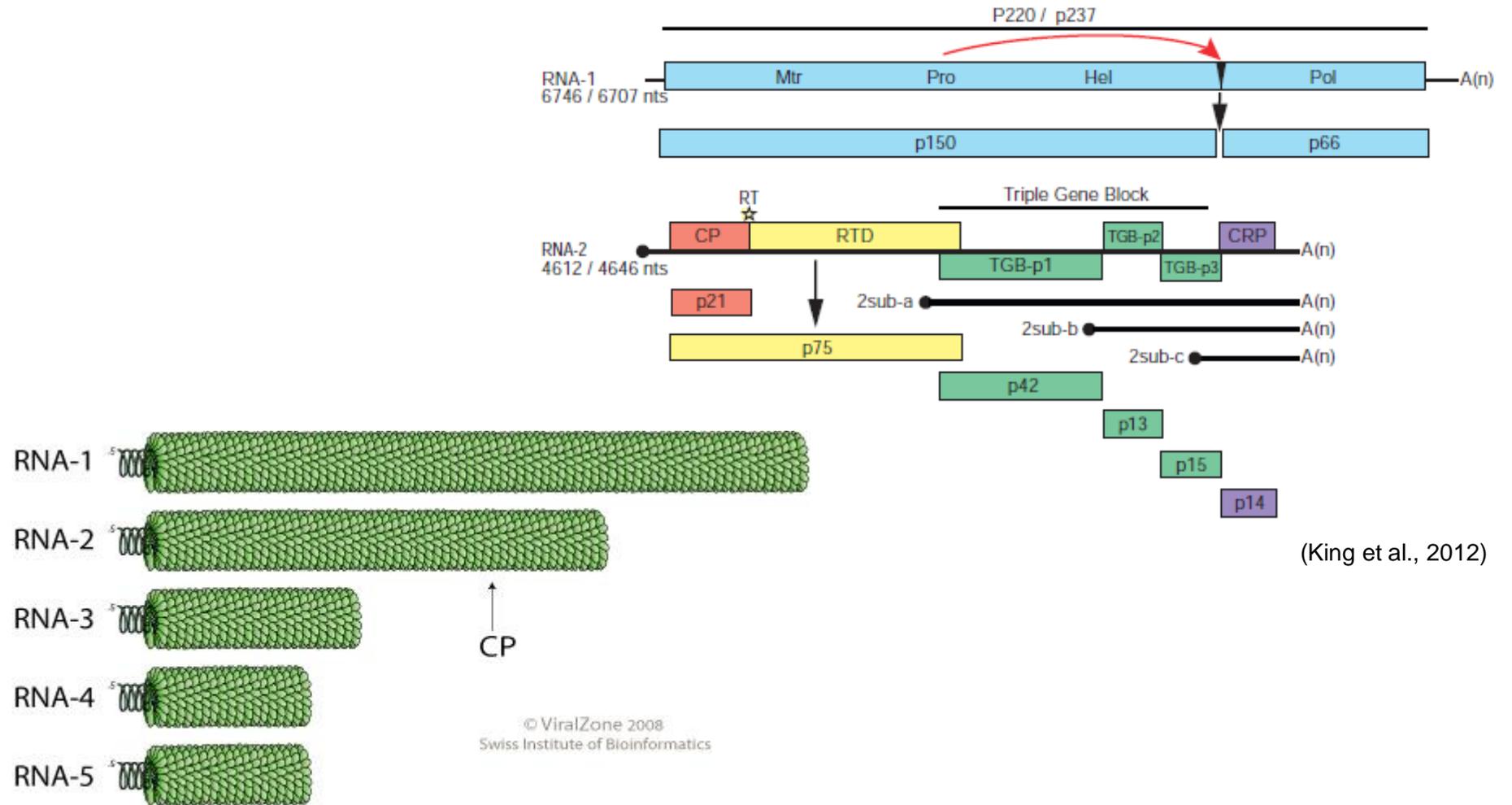


(Kanyuka et al., 2003)

Virus de la necrosis de la raya (RSNV, del ingles Rice stripe necrosis virus)



(Gilmer et al., 2012)



(King et al., 2012)

(SIB Swiss Institute of Bioinformatics, 2008)

- Introducción
- **Objetivos**
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones
- Agradecimientos

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.

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.

- Introducción
- Objetivos
- **Materiales y métodos**
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones
- Agradecimientos

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio



Muestras de suelo contaminadas tomadas de la zona de Vinces en la provincia de Los Ríos, de coordenadas -1,3467043; -79,5890158 en latitud y longitud, respectivamente.



Variedad Arenillas INIAP FL

Plantas sembradas en los invernaderos de la Estación Experimental Litoral Sur del INIAP

Se tomaron las plantas de arroz que presentaban los síntomas de la enfermedad del entorchamiento.

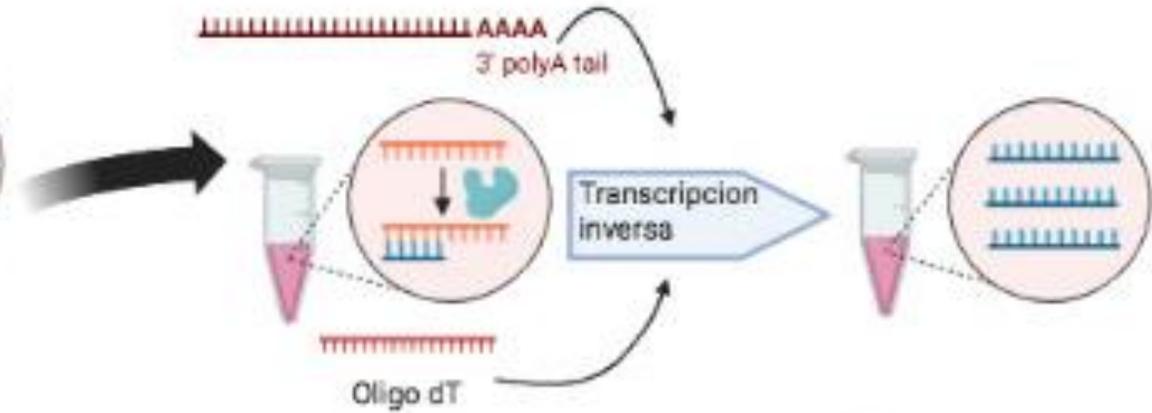


MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de RNA



Retrotranscripción de RNA extraído



Amplificación por PCR



RSNV1-3827R (5'-TGTGGCGTTTCCAGACCTAAA-3')

RSNV1-2901F (5'-TGAATTTGGTGCTCTCTTG-3')

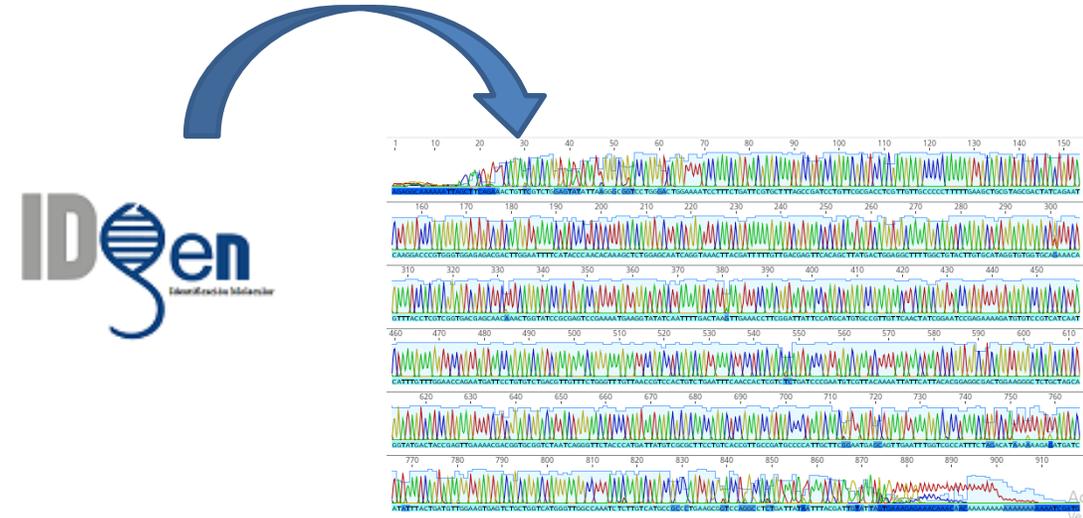


MATERIALES Y MÉTODOS

Parámetros de PCR

Componente	Concentración final	Volumen final (50 uL) x 1 reacción
Agua libre de nucleasas	-	28,75 uL
5x Colorless Go taq Flexi Buffer	1x	10 uL
MgCl ₂	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

Secuenciación y análisis bioinformático



Condiciones	Nº ciclos	°T	t
Desnaturalización inicial	1	94°C	3 min
Desnaturalización	35	94°C	30 s
Anillamiento	35	52°C	40 min
Extensión	35	72°C	1 min 10 s
Extensión final	1	72°C	8 min
		4°C	-

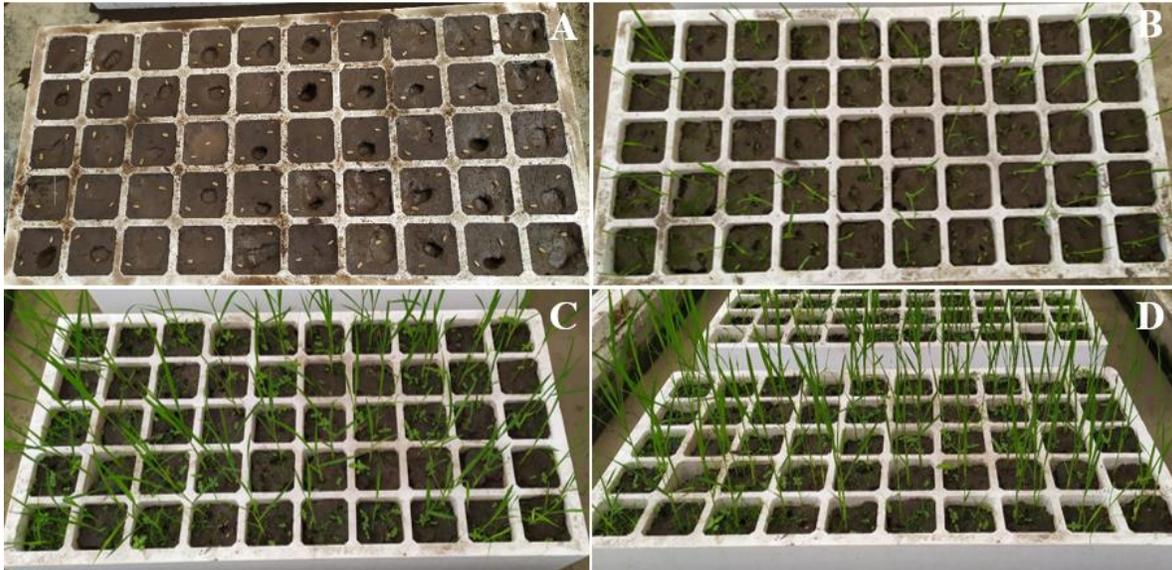
geneious prime



- Introducción
- Objetivos
- Materiales y métodos
- **Resultados y discusión**
- Conclusiones
- Recomendaciones
- Agradecimientos

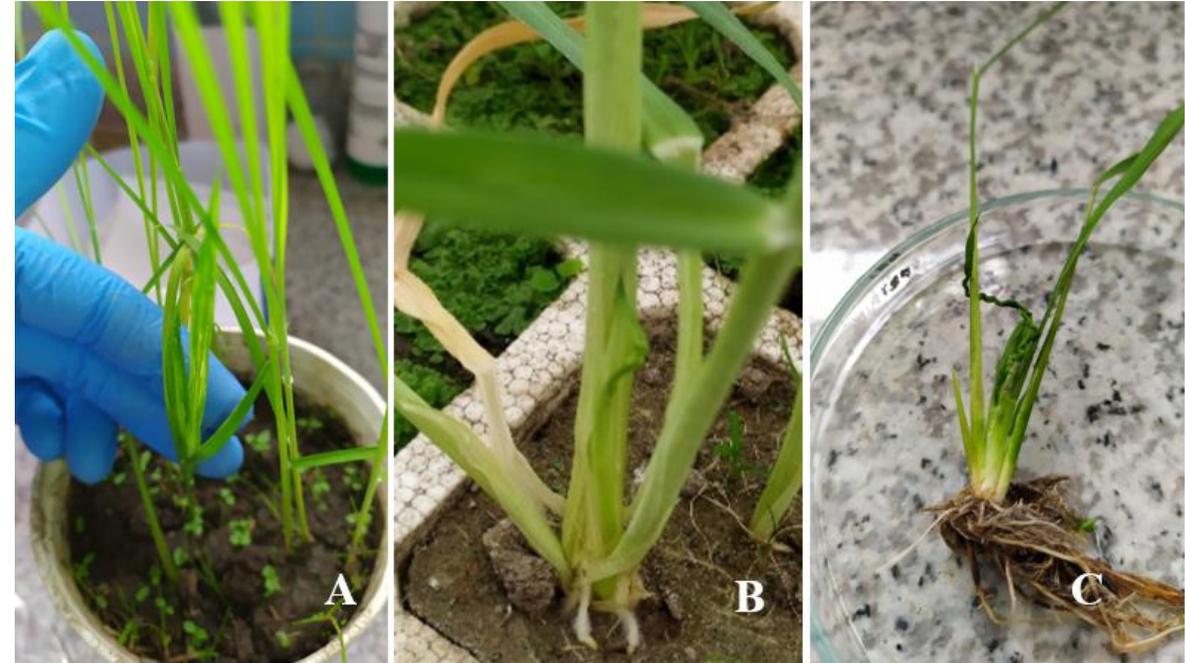
Siembra y toma de muestras

Figura 1



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.

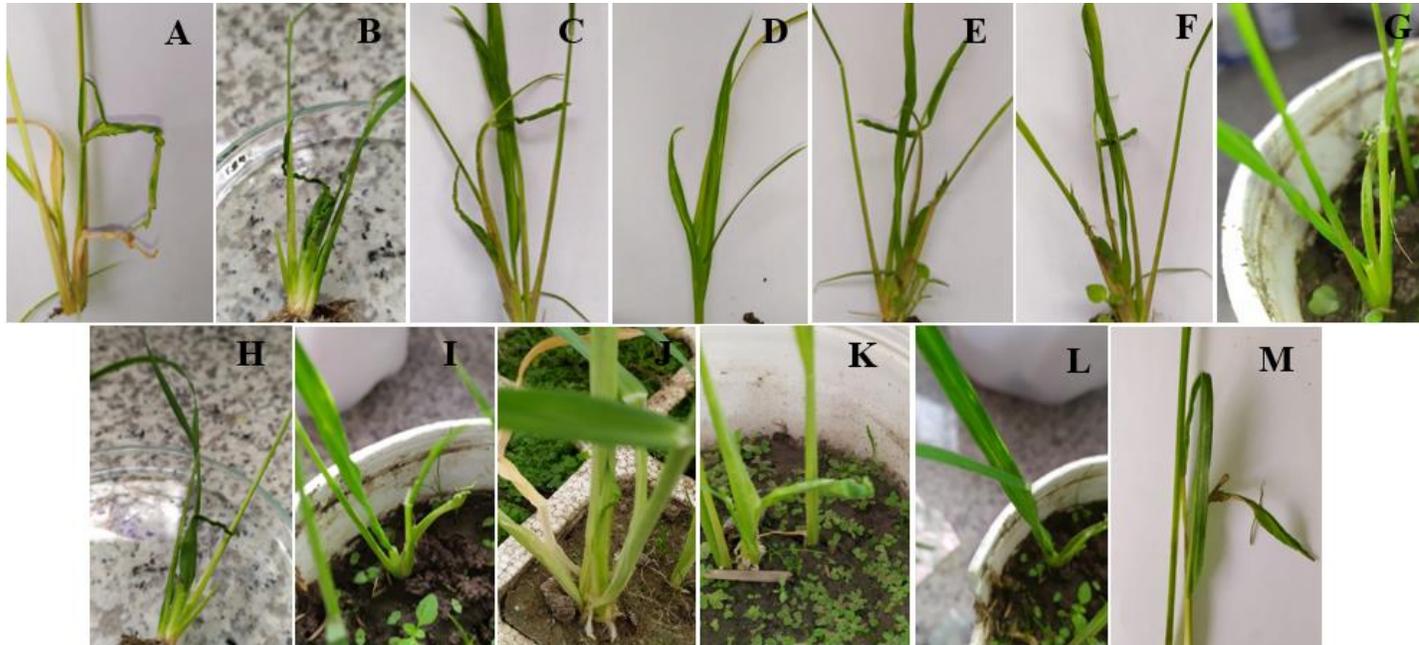
Figura 2



Nota. La figura A muestra una planta enferma con síntomas leves de la enfermedad. En la figura B, se observa que los síntomas son moderados. La figura C muestra ya la sintomatología grave de la enfermedad.

Siembra y toma de muestras

Figura 3



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 incidencia de la enfermedad del 43,33%.

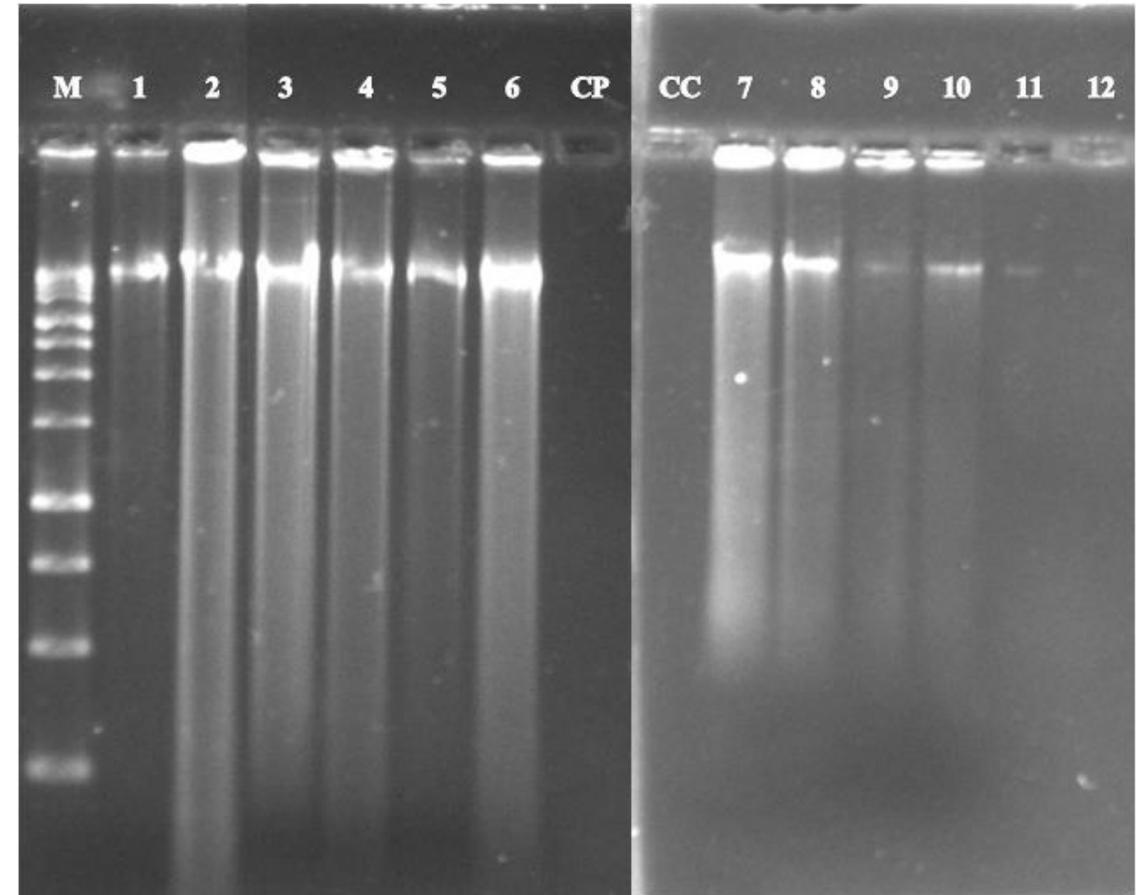
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de RNA y Transcripción Inversa

Tabla 1

	Muestra	A260/280	A260/230	Concen tración (ug/mL)
Grupo problema	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
Grupo control	7	1,42	1,55	160,2
	8	1,48	1,63	157,1
	9	1,39	1,48	163,7
	10	1,52	1,51	162,6
	11	1,47	1,59	154,4
	12	1,35	1,45	147,8

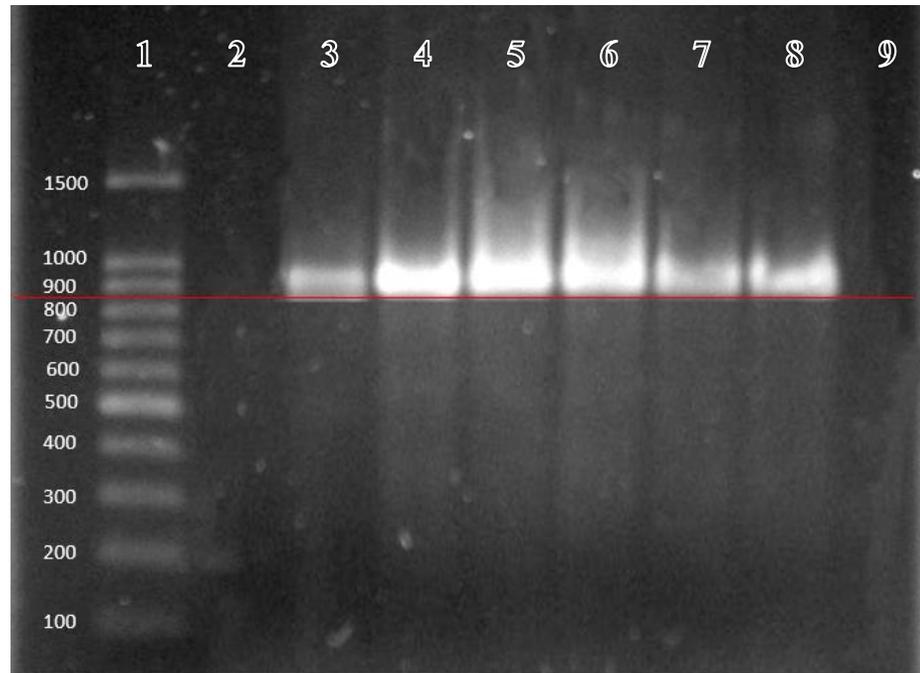
Figura 4



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

Amplificación por PCR

Figura 5



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, y control blanco en el pocillo 9

Las bandas obtenidas tienen una longitud aproximada de 900 bp, de Souza et al. (2021); Decroës et al. (2017); Oludare et al. (2014) y Sereme et al. (2014), reportan que el tamaño del dominio diana tiene 921 bp.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

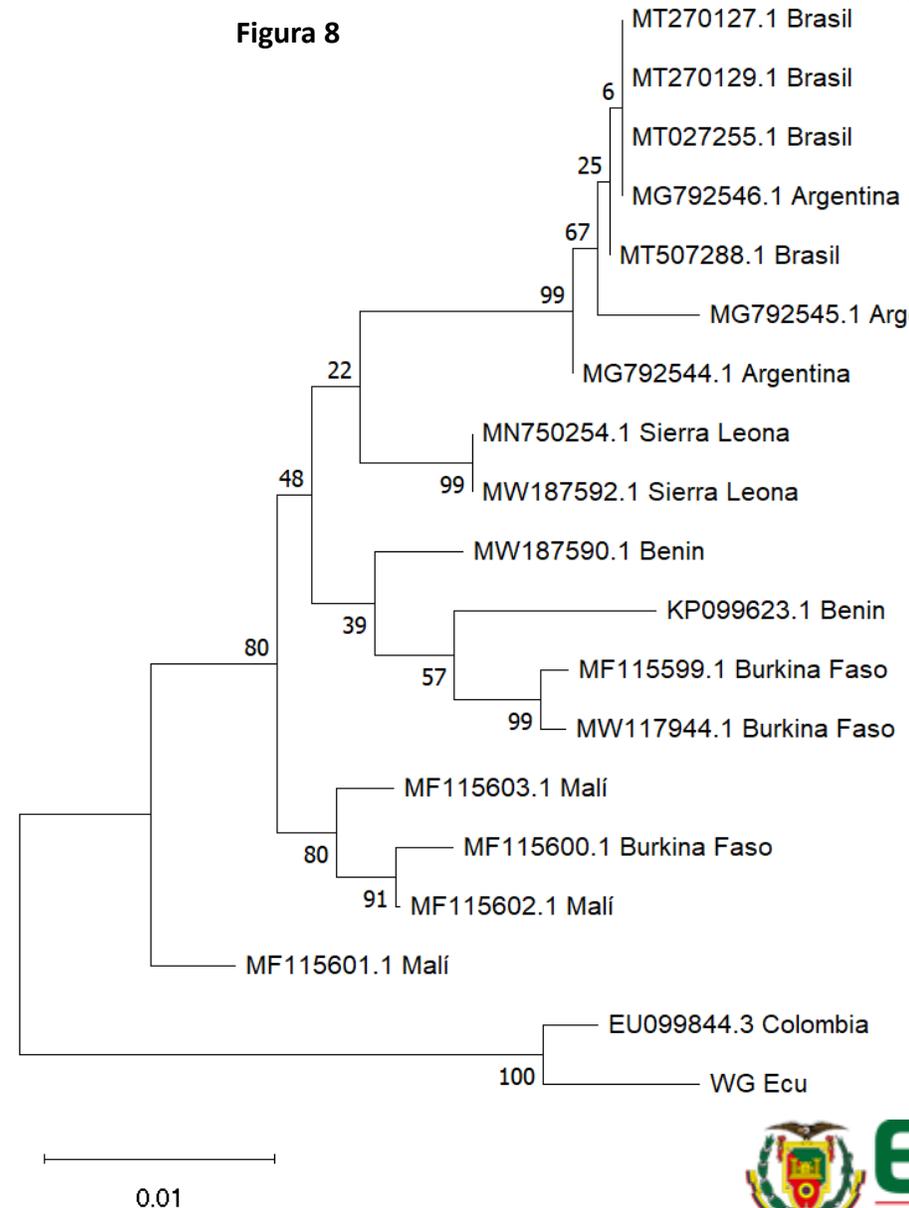
Análisis filogenético

Tabla 2

País	Año	Nombre	Numero de accesión
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

(Bagayoko, 2021)
 (Chiba, 2011); (Laufer, 2018); (Souza, 2021)
 (Souza, 2021); (Maurino, 2018)

Figura 8



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).

- Introducción
- Objetivos
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones
- Agradecimientos

- 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.

- Introducción
- Objetivos
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones
- Agradecimientos

RECOMENDACIONES

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



- Introducción
- Objetivos
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones
- Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS

INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



Lenin Paz, Ph.D.
Director externo del proyecto

Francisco Javier Flores Flor Ph.D.
Director académico del Proyecto

FAMILIA Y AMIGOS