



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



Maestría de Investigación en Biotecnología Vegetal

**Identificación de virus fitopatógenos en Estátice (*Limonium sinuatum* (L.) Mill.) mediante la aplicación de secuenciación de alto rendimiento (HTS- High Throughput Sequencing)**

Autor: Marco Taipe Bolaños

Diciembre 2022



# INTRODUCCIÓN

## Floricultura en Ecuador

- Uno de los sectores agrícolas más importantes de la sierra ecuatoriana y de la economía del país
- Tercera actividad agrícola que más divisas genera después del banano y el camarón

### Principales especies de exportación



Fuente: Reporte estadístico anual 2020- *Expoflores*

### **Cultivo de flores de corte o de verano.**

Ecuador: todo el año entre 2200 y 2700 m.s.n.m.

- Varias empresas florícolas
- Medianos y pequeños agricultores (invernadero y campo)
- Flor complemento para el florero.



\* Pichincha 661.70 ha (Proecuador 2015)

\* Cotopaxi, Azuay e Imbabura en conjunto cultivan 188.90 ha



- **Estátice** (*Limonium sinuatum* (L.) Mill.).



# INTRODUCCIÓN

## Estátice: *Limonium sinuatum* (L.) Mill.

Originaria del Mediterráneo, de la familia *Plumbaginacea*  
Mas de 300 especies ornamentales.  
\* “Siempreviva azul”



### Clasificación taxonómica

Reino: *Plantae*; Subreino: *Viridiplantae*; División: Tracheophyta;  
Subdivisión: Spermatophytina; Clase: Magnoliopsida;  
Superorden: Caryophyllanae; Orden: Caryophyllales; Familia:  
*Plumbaginaceae*; Género: *Limonium*; Especie: *sinuatum*.

Fuente: Integrated Taxonomic Information System (ITIS)

Algunas variedades: Pedro White, Cristal Dark Blue, Cristal Lilac, Ara Purple, Ara Blue, Ara Lavander, Ara Violet



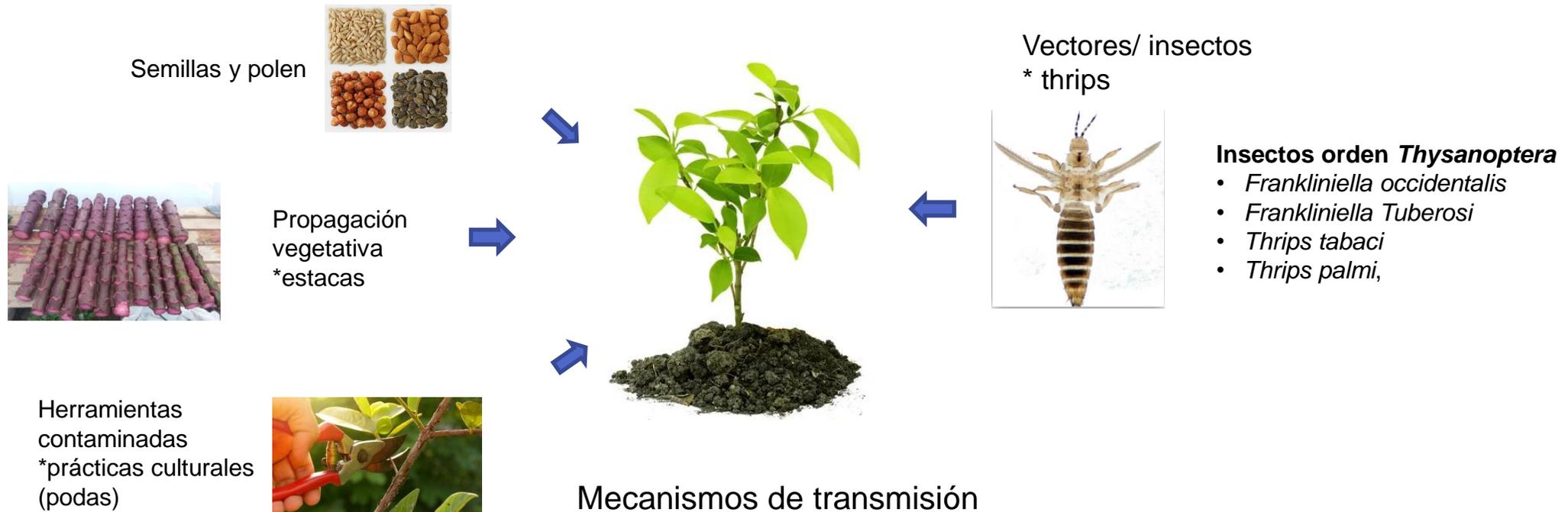
Fuente: <https://astraflowers.com/en/search/?utf8=%E2%9C%93&search=limonium+sinuatum>



# INTRODUCCIÓN

## Virus fitopatógenos

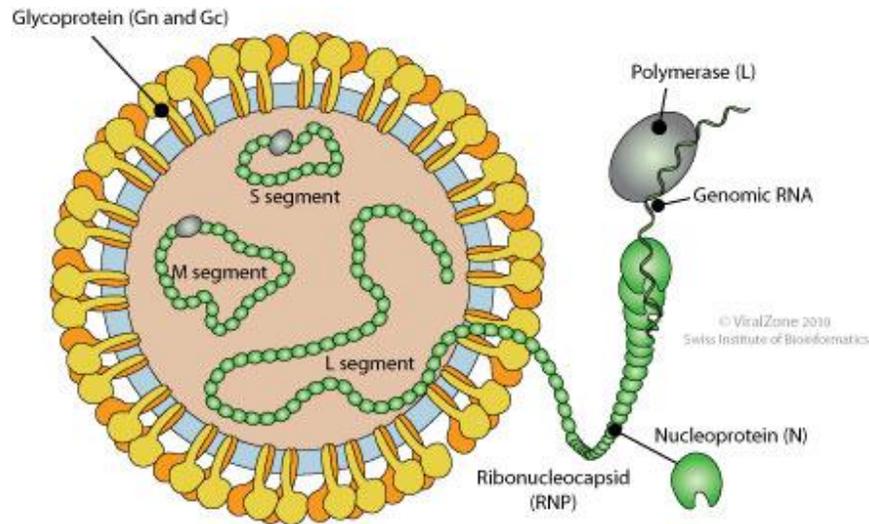
- Considerados como el segundo grupo de patógenos mas importante después de hongos
- Se propagan de forma amplia y rápida a cultivos aledaños



# INTRODUCCIÓN

## Genero Tospovirus (Orthotospovirus) de la familia Tospoviridae

- \*Infectan a un gran número de especies vegetales (cultivos alimenticios como ornamentales)
- Patógenos agrícolas / representan riesgo para la seguridad alimentaria en todo el mundo.
- Transmitidos por insectos: orden *Thysanoptera* (también medios mecánicos)



Fuente: <https://viralzone.expasy.org/>

Virus envueltos con forma esférica o viriones pleomórficos de 80 a 120 nm de diámetro

- genoma tripartito de ssRNAs negativos o ambisentidos de aproximadamente 16,6 kb.
- genoma de ARN monocatenario tripartito (clasificado-tamaño).
  - Segmento pequeño *S* (*Small*)
  - Segmento mediano *M* (*Medium*)
  - Segmento grande *L* (*Large*)



## El virus *Alstroemeria necrotic streak virus* (ANSV)

\* Pertenece al género *Orthospovirus*

- En Colombia fue reportado sobre plantas ornamentales de *Alstroemeria*
- *Infecta naturalmente a lulo/naranjilla* (*Solanum quitoense*), tomate (*Solanum lycopersicum*) y pimiento (*Capsicum annum*). Gallo, et.all, 2019

### Clasificación taxonómica de (ANSV)

Dominio: Riboviria; Reino: Orthornavirae; Filo: Negarnaviricota; Subfilo: Polyploviricotina, Clase: Ellioviricetes, Orden: Bunyavirales, Familia: Tospoviridae, Género: Orthospovirus, Especie: *Alstroemeria necrotic streak orthospovirus*.

Fuente: "International Committee on Taxonomy of Viruses" (ICTV)



Fuente: Hassani, 2010 (Planta de *Alstroemeria*)

Los síntomas asociados con la infección por ANSV incluyen:

- rayas necróticas en hojas y tallos, anillos necróticos y necrosis venal



# INTRODUCCIÓN

## Detección de virus fitopatógenos

\* *Importancia detectar virus (patógenos) en plantas para su control*

### 1. SINTOMATOLOGÍA

\* Observación macro y microscópica.

\* Diagnóstico por sintomatología mas difícil que otros patógenos

### 2. SEROLOGÍA

\* Antisuero / antígeno / precipitación

ELISA

ELISA en placa

- ELISA de sandwich de doble anticuerpo (DAS)
- ELISA de sandwich de triple anticuerpo (TAS)
- ELISA de placa sensibilizada con antígeno (ACP)

### 3. MÉTODOS MOLECULARES

\* Alternativos a los serológicos

Hibridación ácidos nucleicos

PCR

- PCR convencional (ADN) / RT-PCR (ADNc) transcripción reversa
- qPCR (PCR en tiempo real) / PCR Nested / PCR multiplex

HTS o NGS

*Plataformas principales*

- Illumina (Solexa) sequencing
- Roche 454 sequencing
- Ion torrent: Proton / PGM sequencing
- SOLiD sequencing,

- Generan miles de millones de secuencias cortas.
- *Estudios Metagenómicos*



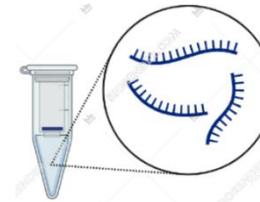
# INTRODUCCIÓN

## Metagenómica de virus en plantas

- Estudio de poblaciones virales en muestras ambientales
- Recupera y analiza genomas completos o parciales de potenciales virus
- A través de secuenciación de ácidos nucleicos

### 1. Muestreo y recolección

Tejidos o muestra vegetal  
\* Extracción de ARN total



### 2. Secuenciación de ácidos nucleicos

Principalmente técnicas HTS  
\* *High Throughput Sequencing*



Novaseq 6000  
\*Illumina

### 3. Análisis bioinformático

Pipeline / flujos de trabajo

- Programas código abierto
- Uso de cluster



*“Identificar virus fitopatógenos en conjunto de datos de secuencias metagenómicas”*



# INTRODUCCIÓN

## Análisis filogenético - Filogenia. \*Reconstrucción evolutiva o histórica

- Estudio las relaciones evolutivas de grupos taxonómicos, secuencias o especies.
- Permite la construcción de un árbol filogenético que evidencia la historia evolutiva

Métodos estadísticos basados en modelos de evolución molecular

### 1. Máxima Parsimonia (MP)

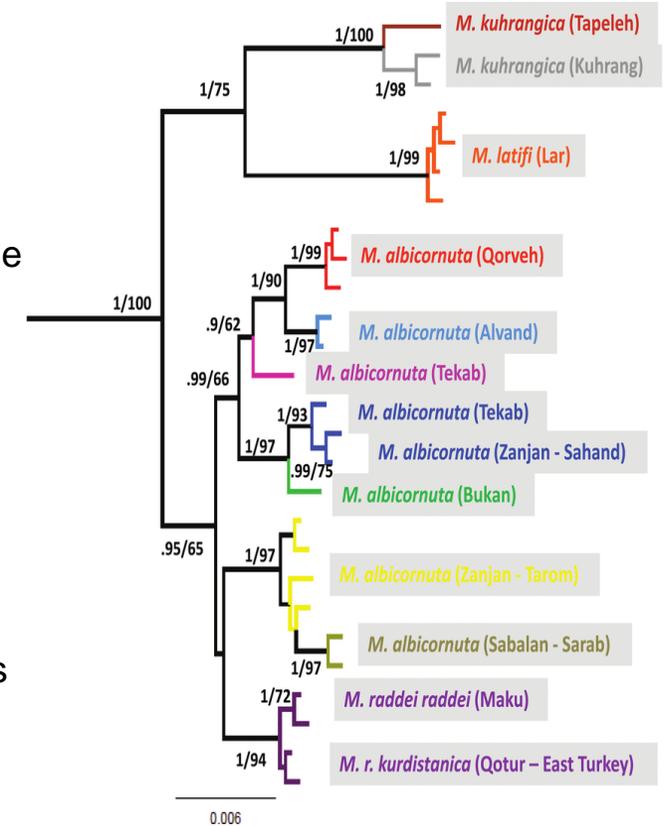
Explica la filogenia de un grupo con el menor numero de cambios evolutivos

### 2. Máxima Verosimilitud (ML) \* *Maximum Likelihood*

Selecciona el árbol con la mas alta probabilidad (verosimilitud) de reflejar el proceso evolutivo real

### 3. Inferencia Bayesiana (IB)

Estima la probabilidad de que los árboles filogenéticos sean explicados por los datos



# OBJETIVOS

## Objetivo general

Identificar virus fitopatógenos en Estátice (*Limonium sinuatum* (L.) Mill.) mediante la aplicación de secuenciación de alto rendimiento (*HTS-High Throughput Sequencing*)



# OBJETIVOS

## Objetivos específicos

- Ensamblar secuencias genómicas de virus fitopatógenos presentes en muestras foliares de plantas de *Limonium sinuatum* (L.) Mill, aplicando herramientas bioinformáticas.
- Anotar los genomas de los virus fitopatógenos presentes en muestras foliares de plantas de *Limonium sinuatum* (L.) Mill. aplicando métodos basados en homología.
- Reconstruir la historia evolutiva de los virus encontrados utilizando las secuencias de sus genomas.



# HIPOTESIS

Se pueden identificar virus fitopatógenos, en muestras de hojas de plantas de estátice *Limonium sinuatum* (L.) Mill, aplicando secuenciación de alto rendimiento (HTS-High Throughput Sequencing) y programas bioinformáticos



# METODOLOGÍA

Obtención de muestras foliares de *Limonium sinuatum*



Sintomatología para virus: malformación de hojas, enanismo y rayado de hojas "streaking"

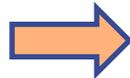


## Plantación florícola

Provincia: Pichincha

Parroquia: El Quinche

- "Muestra El Quinche"
- "Cod. IDgen. M69"



## Extracción de ARN total



Kit: SV Total RNA Isolation System de Promega

\* Precipitó con acetato de sodio y etanol / condiciones de envío



Laboratorios



## Secuenciación Preparación de librerías



Kit: TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plant



Sistema NovaSeq 6000

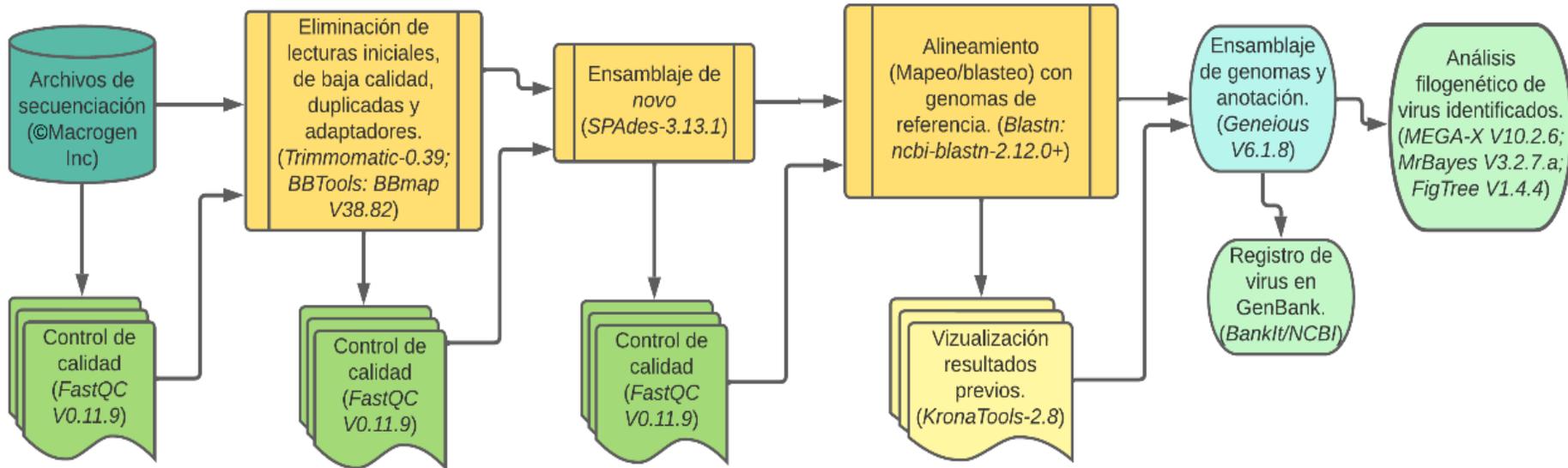
Illumina

\* Reads paired-end 100 pb



# METODOLOGÍA

## Flujo de trabajo: Análisis bioinformático



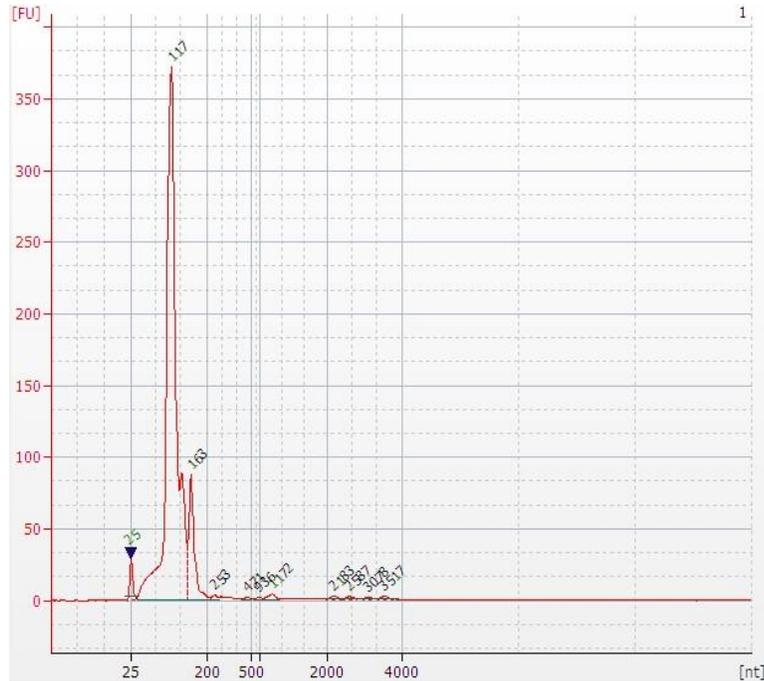
\* Software de código abierto y licenciado  
\* Cluster de CEDIA Corporación Ecuatoriana para el Desarrollo de la Investigación y Academia

1. Control de calidad
2. Eliminación secuencias contaminantes
3. Ensamblaje de *novo*
4. Mapeo búsqueda de homólogos (contigs ensamblados con genomas de referencia)
5. Ensamblaje genomas completos
6. Visualización de resultados



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Características del ARN total y muestra secuenciada (*reads*)



Fuente: ©Macrogen Inc. Corea del Sur

- Concentración de 36.7 ng/uL en el nanodrop
- Número de integridad de RNA de 2.5 con Bioanalyser.
- Cantidad de lecturas 5.3 G



Características de la muestra secuenciada, *Macrogen Inc.*

Sample ID	Total read bases (bp)	Total reads	GC(%)	AT(%)	Q20(%)	Q30(%)
M69-El Quinche	5.278.306.258	52.260.458	41.45	58.55	98.14	94.91

Fuente: ©Macrogen Inc. Corea del Sur



## Análisis de calidad inicial-final de datos secuenciados (*reads*)

FastQC V0.11.9

Archivos en formato  
\*.html

**FastQC Report**

**Summary**

- ✓ [Basic Statistics](#)
- ✓ [Per base sequence quality](#)
- ✓ [Per tile sequence quality](#)
- ✓ [Per sequence quality scores](#)
- ✗ [Per base sequence content](#)
- ! [Per sequence GC content](#)
- ✓ [Per base N content](#)
- ✓ [Sequence Length Distribution](#)
- ✗ [Sequence Duplication Levels](#)
- ! [Overrepresented sequences](#)
- ✓ [Adapter Content](#)



**FastQC Report**

**Summary**

- ✓ [Basic Statistics](#)
- ✓ [Per base sequence quality](#)
- ✓ [Per tile sequence quality](#)
- ✓ [Per sequence quality scores](#)
- ✓ [Per base sequence content](#)
- ! [Per sequence GC content](#)
- ✓ [Per base N content](#)
- ! [Sequence Length Distribution](#)
- ✗ [Sequence Duplication Levels](#)
- ! [Overrepresented sequences](#)
- ✓ [Adapter Content](#)

Parámetro

- ✓ Adecuado
- ! Aceptable
- ✗ No tan aceptable

## Análisis de calidad de los datos secuenciados

Zona de colores

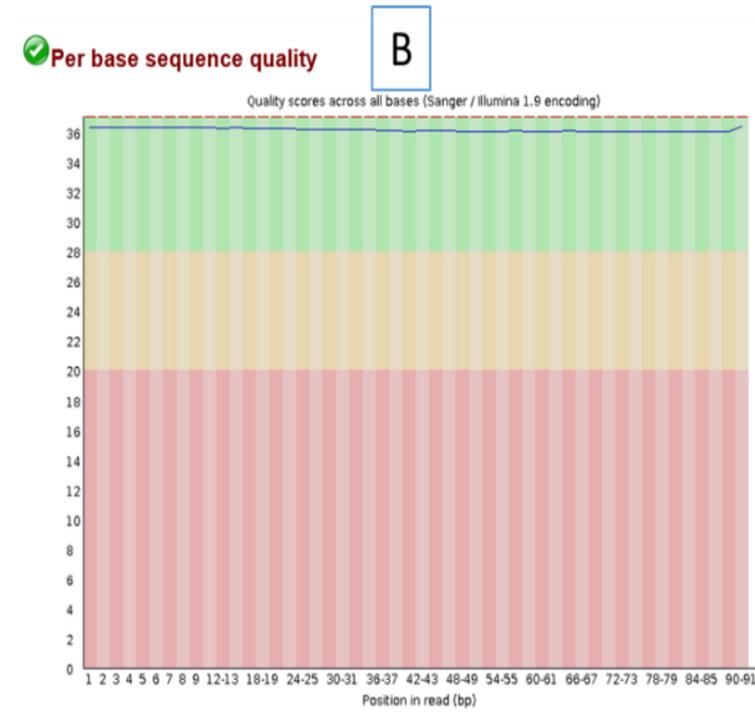
Muy buena calidad

Calidad intermedia

Mala calidad



M69\_1.fastq.gz



M69\_2.fastq.gz



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Remoción de adaptadores, lecturas de baja calidad y eliminación lecturas duplicadas

FastQC V0.11.9

Luego de usar



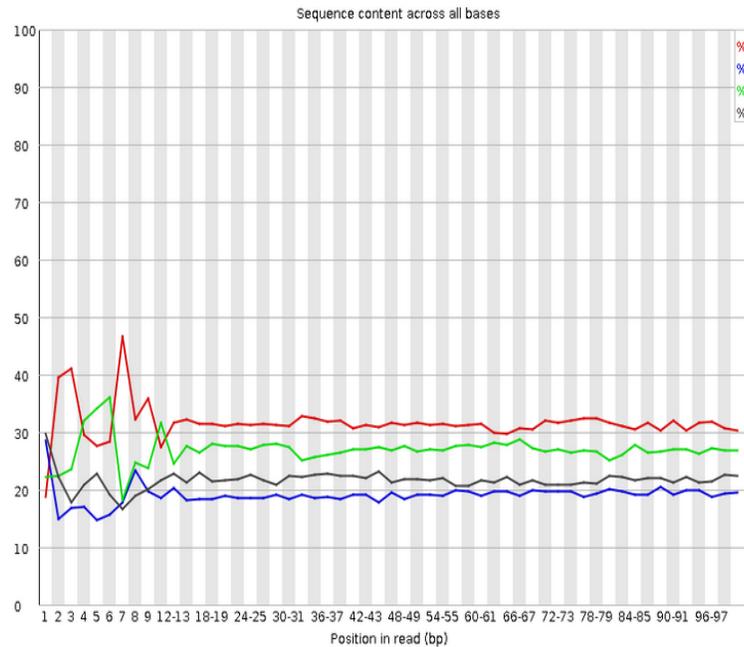
Trimmomatic-0.39

y

BBTools:BBMap V38.8

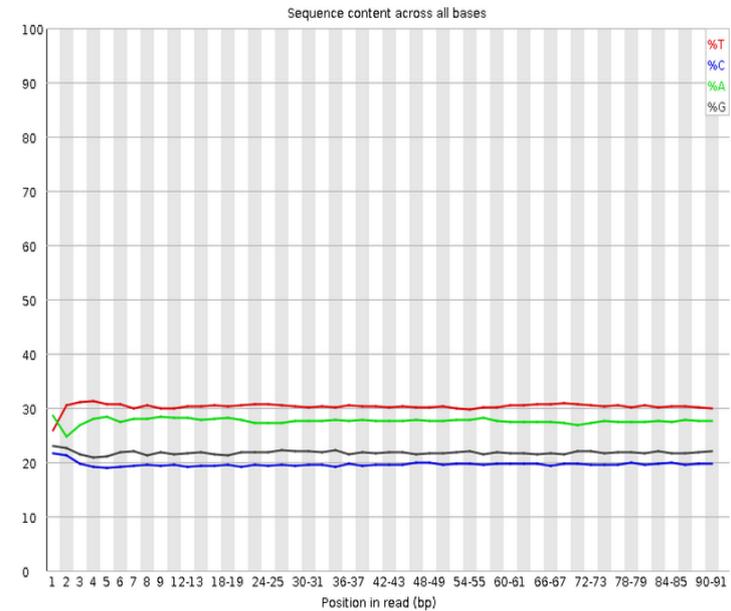
A: Antes del corte/eliminación lecturas baja calidad / duplicados

✖ Per base sequence content



B: Después del proceso

✔ Per base sequence content



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Remoción de adaptadores, lecturas de baja calidad y eliminación lecturas duplicadas

FastQC V0.11.9

Luego de usar

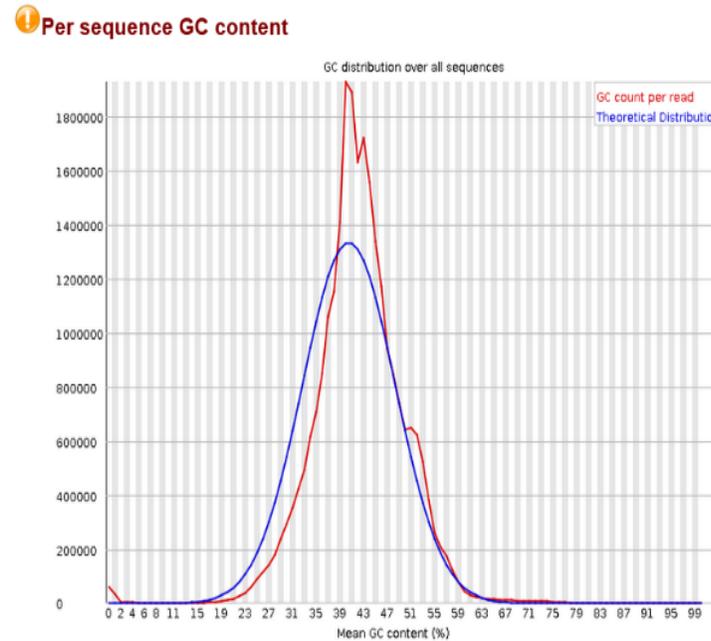


Trimmomatic-0.39

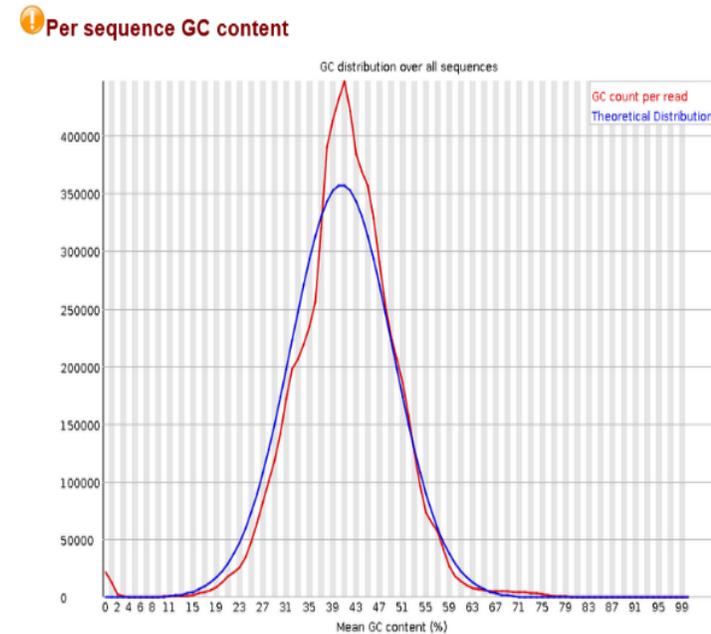
y

BBTools:BBMap V38.8

A: antes del proceso



B: Después del proceso



### Resultado final de datos secuenciados (*reads*)

#### Basic Statistics

Measure	Value
Filename	M69_1.Rded.fq
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	7036551
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	40-91
%GC	41

#### Basic Statistics

Measure	Value
Filename	M69_2.Rded.fq
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	7036551
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	40-91
%GC	41

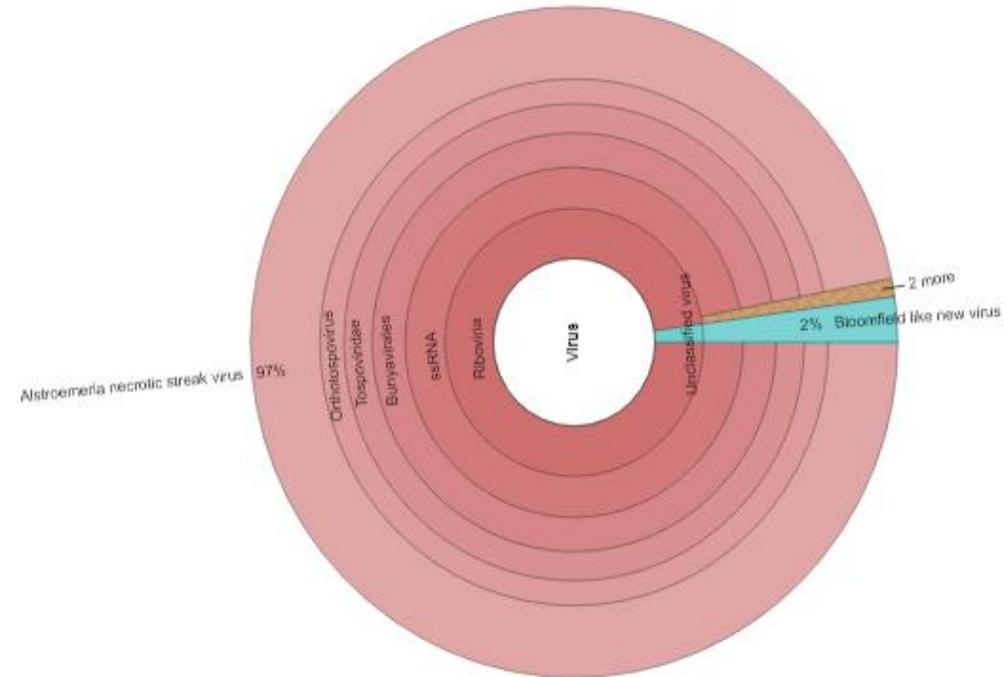
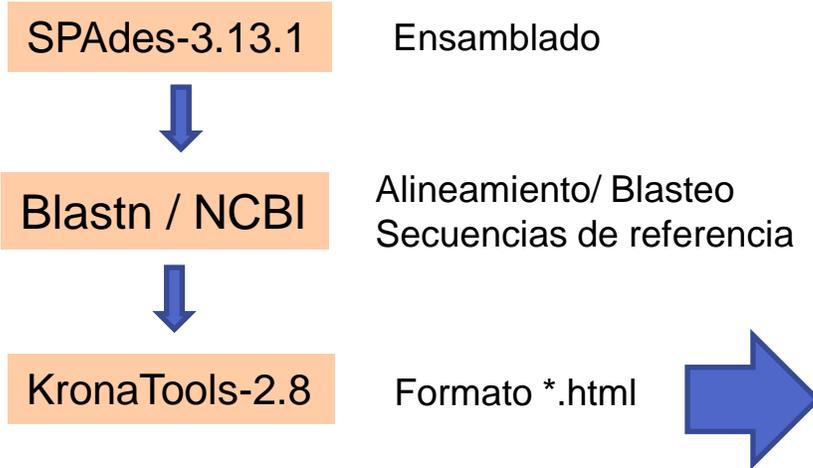
Total de secuencias: **7036551**

Largo secuencia: entre **40-91 pb**

%GC: **41**



## Identificación de secuencias virales (patógenos)



\* Se obtuvo el genoma completo de *Alstroemeria necrotic streak virus (ANSV)*

Tabla 1: Organismos identificados - KronaTools

Organismos identificados	% de lecturas virales	% identidad con secuencias reportadas
<i>Alstroemeria necrotic streak virus</i>	97	96
<i>Satellite tobacco necrosis virus 2</i>	0.2	95
<i>Bloomfield like new virus</i>	2	40
<i>New chrysovirus</i>	0.8	50

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Re-ensamblado de *Alstroemeria necrotic streak virus* ANSV

Geneious V6.1.8

Tabla 2. Características de los segmentos del virus ANSV

Segmento ensamblado del virus ANSV	# de Contigs	Refseq (Accesión de referencia)	Largo (pb)	% GC	% Identidad	Profundidad de cobertura
L	1	NC_055298	8755	34.2	98.9	890 X
M	1	NC_055297	4869	35.6	98.7	2870 X
S	2	NC_055299	3135	35.1	99.3	3500 X

- \* Cuatro *contigs* coincidieron con secuencias de referencia en GenBank.
- Dos de los *contigs* ensamblaron el *segmento S*
  - Los otros dos *contigs* representan los *segmentos L y M* completos



Anotación para los segmentos del virus de ANSV

Geneious V6.1.8

Tabla 3. Características de la anotación de los segmentos del virus ANSV

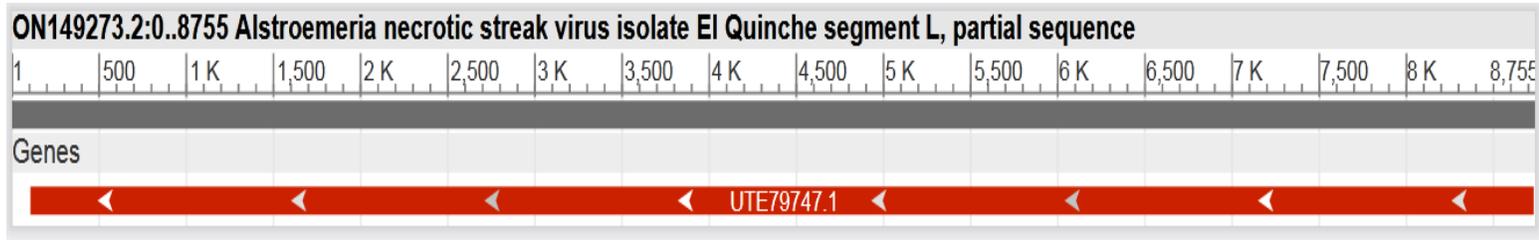
Segmento del virus de ANSV	# de Accesoión	Largo de la secuencia (pb)	ORFs	Largo secuencia de ORFs (pb)	Proteína	ID_proteína	% Similaridad en la anotación
L	ON149273	8755	ORF	8625	Proteína L	AYJ76753.1	98.92
M	ON149272	4869	ORF1	912	Non-estructural	AYJ76755.1	99.12
			ORF2	3381	Glicoproteína precursora	AYJ76754.1	99.05
S	ON149271	3135	ORF1	1404	Non-estructural	YP_010086065.1	99.55
			ORF2	777	Proteína de la nucleocapside	YP_010086066.1	99.87

\* Segmentos registrados en GenBank con la herramienta BankIt (<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/about/bankit/>)



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

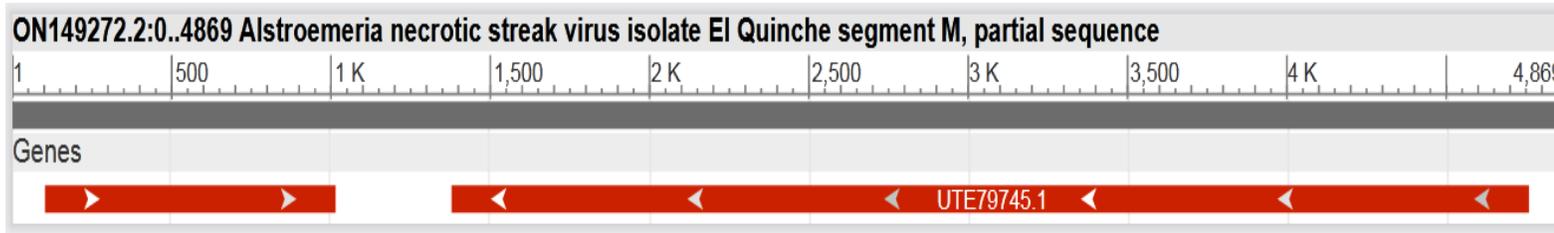
Segmento L del virus de *Alstroemeria necrotic streak virus* ANSV-L registrado en GenBank (ON149273).



Segmento L (8755 pb)

- Gallo Yuliana, 2019 (8967 pb)
- G.Y. 2018 (8756 pb)

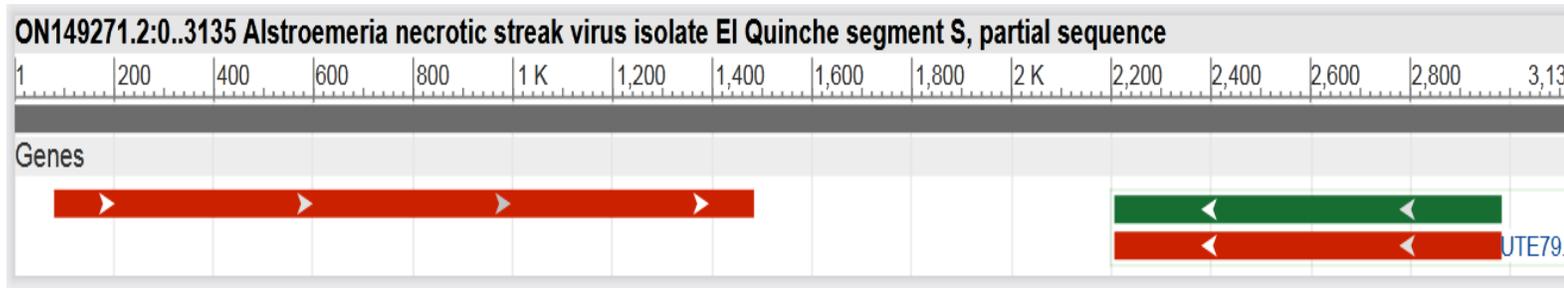
Segmento M del virus de *Alstroemeria necrotic streak virus* ANSV-M registrado en GenBank (ON149272).



Segmento M (4869 pb)

- Gallo Yuliana, 2019 (4859 pb)
- G.Y. 2018 (4839 pb)

Segmento S del virus de *Alstroemeria necrotic streak virus* ANSV-S registrado en GenBank (ON149271).



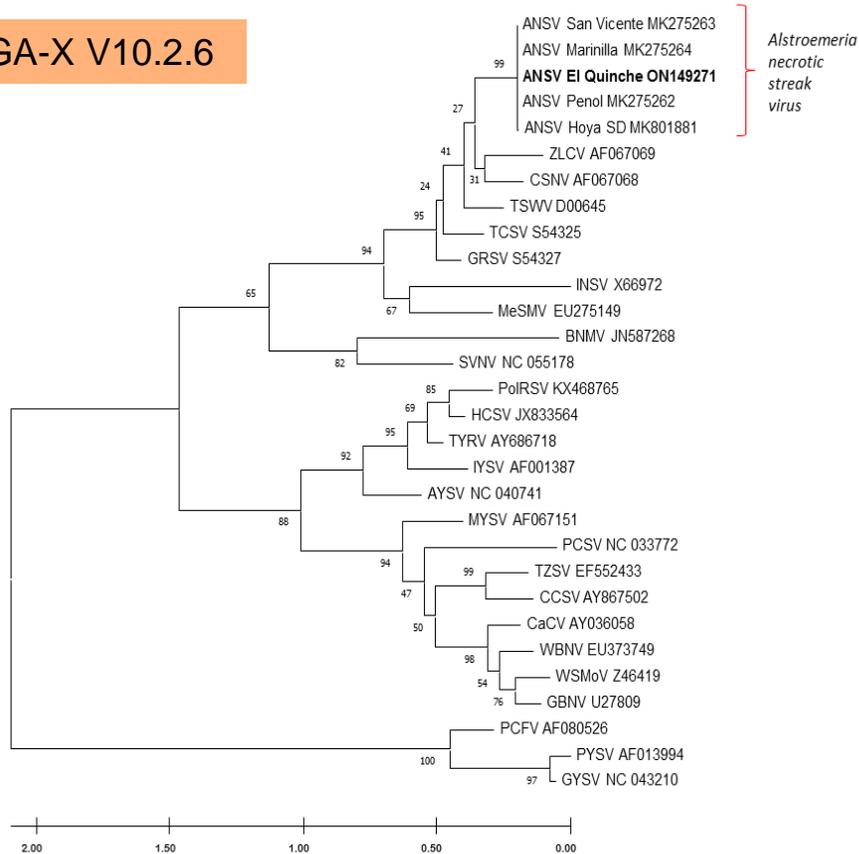
Segmento S (3135 pb)

- Gallo Yuliana, 2019 (3132pb)
- G.Y. 2018 (3113 pb)

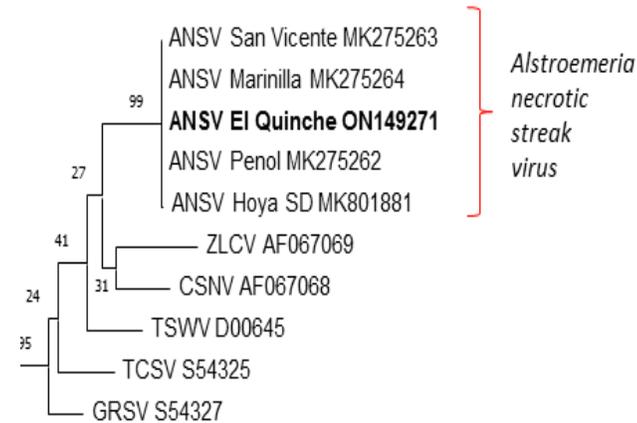


## Reconstrucción histórica evolutiva del virus de ANSV

MEGA-X V10.2.6



- Secuencias de a.a. del gen *N* de la nucleocapside (Segmento S de ANSV y 29 orthotospovirus)
- Método de Máxima Verosimilitud, Modelo evolutivo: General Time Reversible con distribución Gamma.
- Valor de soporte 99, con bootstrap de 1000 para el clado.
- ANSV muestra El Quinche, se ubica en el clado de reportes Colombianos.
- **Hassani, 2010; Gallo Yuliana, 2018; 2019.**

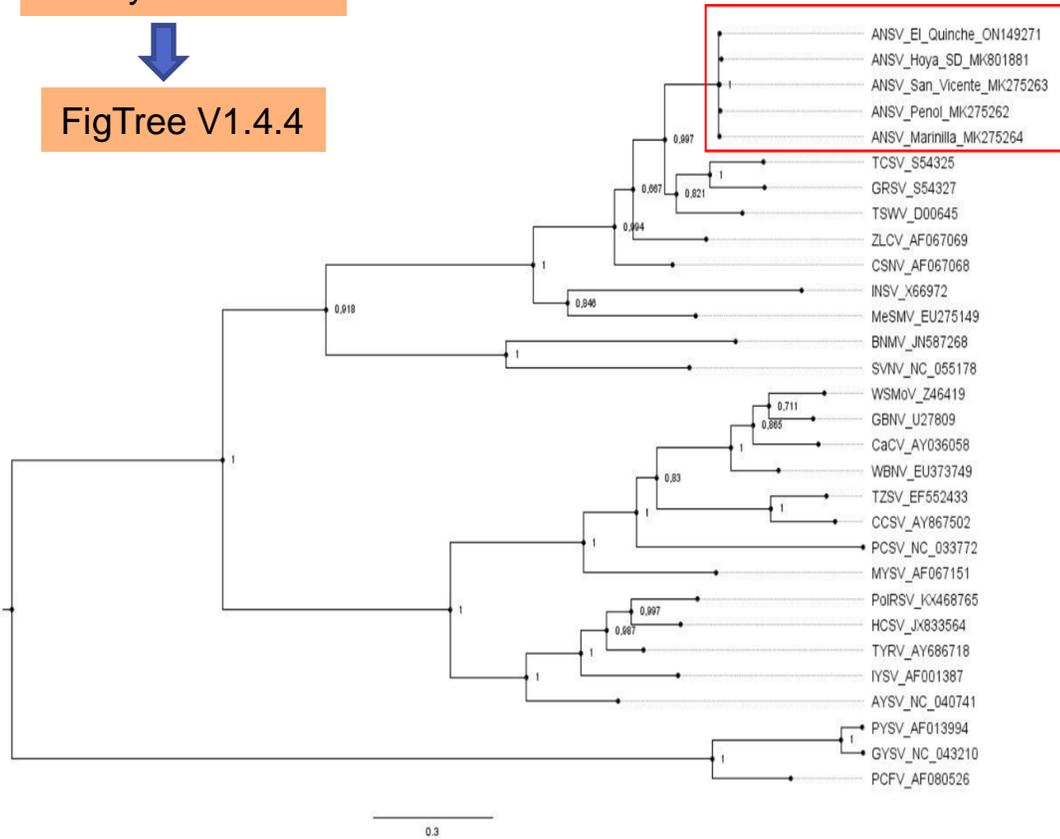


## Reconstrucción histórica evolutiva del virus de ANSV

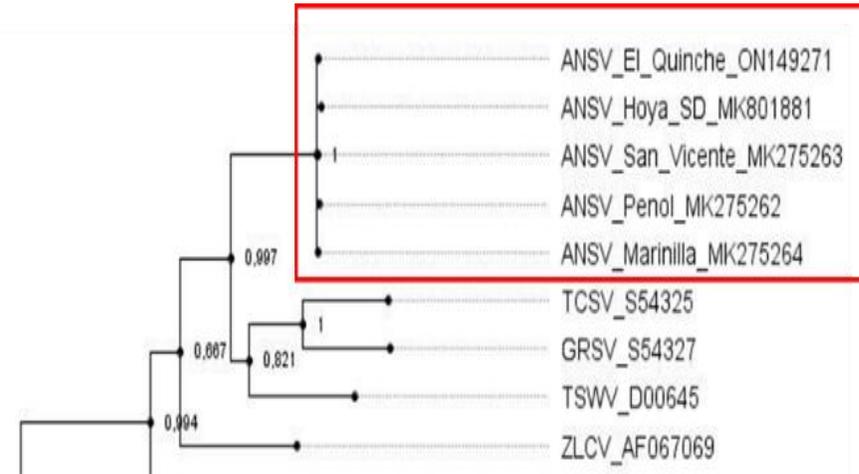
MrBayes V3.2.7a



FigTree V1.4.4



- Método de Inferencia Bayesiana, Modelo evolutivo: General Time Reversible con distribución Gamma y algoritmo MCMC.
- Topología semejante al de MV.
- *Valor de probabilidad 1, para el clado.*
- *ANSV muestra El Quinche, se ubica en el clado de reportes Colombianos.*
- **Gallo Yuliana, 2018, 2019. Hassani, 2010**



Publicación indexada en revista



GENOME SEQUENCES



## Complete Genome Sequence of *Alstroemeria* Necrotic Streak Virus Isolated from *Limonium sinuatum* in Ecuador

 Marco Taípe,<sup>a,b</sup> Francisco Flores<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup>Centro de Estudios de Posgrado de la Universidad de las Fuerzas Armadas, Sangolquí, Ecuador

<sup>b</sup>Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Universidad de las Fuerzas Armadas, Sangolquí, Ecuador

<sup>c</sup>Centro de Investigación de Alimentos, Facultad de Ciencias de la Ingeniería e Industrias, Universidad UTE, Quito, Ecuador



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

# CONCLUSIONES

- Aplicando herramientas de secuenciación de alto rendimiento (HTS-High Throughput Sequencing) y programas bioinformáticos, fue posible identificar virus fitopatógenos presentes en la muestra de hojas de flores de corte de *Limonium sinuatum*.
- La presencia de *Alstroemeria Necrotic Streak Virus* (ANSV) fue de un 97%, el 3% restante de los virus fitopatógenos encontrados en la muestra foliar, corresponden a la secuencia de otros tres virus: *Satellite tobacco necrosis virus 2* (0.2%), *Bloomfield like new virus* (2%) y *New chrysovirus* (0.8%), de los cuales aún no existen reportes.



# CONCLUSIONES

- Fue posible ensamblar el genoma completo del virus *Alstroemeria Necrotic Streak Virus* (ANSV) con sus tres segmentos, *segmento L* con 8755 pb, *segmento M* con 4869 pb y *segmento S* con 3135 pb.
- Se realizó la anotación del virus de ANSV y su reporte se encuentra registrado en GenBank con los números de accesoión *ON149273* para el *segmento L*, accesoión *ON149272* para el *segmento M* y accesoión *ON149271* para el *segmento S*.



# CONCLUSIONES

- Se realizó una publicación indexada en la revista Microbiology Resource Annoucenment con la información de la presencia del virus fitopatógeno *Alstroemeria Necrotic Streak Virus* (ANSV) en plantas de corte de *Limonium sinuatum* en Ecuador. <https://journals.asm.org/eprint/MXKPEHT43FUXI9HXXAGQ/full>.
- Se realizó la reconstrucción evolutiva para *Alstroemeria Necrotic Streak Virus* (ANSV) en base a las secuencias de los aminoácidos del *gen N de la nucleocapside* y de las secuencias genómicas de los *Orthospovirus* disponibles en GenBank, determinando su cercanía evolutiva del virus de ANSV- muestra El Quinche, al clado donde se encuentran los reportes colombianos.



# CONCLUSIONES

- Existe alta posibilidad que el agente causal de la sintomatología observada en campo para malformación de hojas, enanismo y rayado necrótico de hojas “streaking” en las hojas de flores de corte de *Limonium sinuatum*, sean provocadas por *Alstroemeria Necrotic Streak Virus (ANSV)*.



# RECOMENDACIONES

- Se recomienda la aplicación de la secuenciación de alto rendimiento (HTS-High Throughput Sequencing) propuestas en el pipeline del presente trabajo, como una herramienta en la determinación de secuencias de virus fitopatogénos en muestras de flores de corte de *Limonium sinuatum* (L.) Mill con posible extrapolación a otros cultivos de interés.
- Realizar más muestreos foliares a nivel de campo e invernaderos, en fincas pequeños y grandes agricultores de plantas de corte, para determinar si el virus encontrado es el único presente en el Ecuador.



# RECOMENDACIONES

- Se recomienda desarrollar un método rápido de diagnóstico mediante el uso de PCR para la detección de ANSV en *Limonium sinuatum* (L.) Mill.
- Desarrollar un plan estratégico de control fitosanitario integral a nivel de fincas florícolas y cultivos de interés económico, dado que el vector de propagación del virus ANSV pertenece al orden de insectos *Thysanoptera* cuya presencia en Ecuador ha sido ya reportada como problema sanitario.



# AGRADECIMIENTOS



Francisco Flores, PhD.  
Carlos Noceda, PhD.  
Ligia Ayala, PhD.  
Karina Proaño, PhD.  
Valeria Ochoa, PhD.  
Gabriela Miño, MsC.