



Caracterización molecular de *Polymyxa graminis* L. en suelos dedicados al cultivo de arroz y raíces de *Oryza sativa* L. en invernadero

Quinde Tarco Gisell Estefanía

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 Ingeniera en Biotecnología

Lic. Koch Kaiser Alma Rosel, MSc.

05 de enero del 2022

COPYLEAKS

QUINDE_DOCUMENTO URKUND (1).pdf

Scanned on: 12:4 January 31, 2022 UTC



Finanziert durch:
**ALMA ROSEL
KOCH KAISER**



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	0
Words with Minor Changes	0
Paraphrased Words	0
Ommited Words	0



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación, denominado "**Caracterización molecular de *Polymyxa graminis* L. en suelos dedicados al cultivo de arroz y raíces de *Oryza sativa* L. en invernadero**" fue realizado por la señorita **Quinde Tarco, Gisell Estefanía**, el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 28 de enero de 2022.



firmado digitalmente por:
ALMA ROSEL
KOCH KAISER

Koch Kaiser, Alma Rosel, Mgs.

C. C.: 1708880792



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de autoría

Yo, **Quinde Tarco, Gisell Estefanía**, con C.C. 1727366021, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: "**Caracterización molecular de *Polymyxa graminis* L. en suelos dedicados al cultivo de arroz y raíces de *Oryza sativa* L. en invernadero**" 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 referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 28 de enero de 2022



Quinde Tarco, Gisell Estefanía

C.C.: 1727366021



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de publicación

Yo, **Quinde Tarco, Gisell Estefanía**, con C.C. 1727366021, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: "**Caracterización molecular de *Polymyxa graminis* L. en suelos dedicados al cultivo de arroz y raíces de *Oryza sativa* L. en invernadero**" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 28 de enero de 2022



Quinde Tarco, Gisell Estefanía

C.C.: 1727366021

Dedicatoria

Dedicado a mis padres Rocío Tarco y Mario Quinde, a mi hermana Johanna y mi sobrina Isabella. Son mi mayor ejemplo a seguir, este trabajo es reflejo de su amor, apoyo y soporte incondicional. Cada logro en mi vida será siempre de ustedes.

Gisell Estefanía Quinde Tarco

Agradecimientos

A mis padres, Rocío y Mario. Por su apoyo he podido culminar esta etapa de mi preparación académica. Agradezco su paciencia, confianza, sacrificio y esfuerzo; son los pilares que, basados en valores, han logrado forjar la profesional en la que me he convertido.

A mi hermana Johanna por cuidarme como una hija más, por cada consejo y apoyo a lo largo de toda mi vida.

Al Dr. Lenin Paz por brindarme la oportunidad de desarrollar este proyecto en su laboratorio y ser una guía en mi desarrollo profesional y al MSc. Alma Koch por su paciencia y dedicación en la realización del proyecto.

A Liliam y Dra. Elisa por ser mi apoyo y ayuda incondicional lejos de casa, por aconsejarme y brindarme cada día algo de ellas sin interés alguno.

A Marcos por ser mi gran amigo, por apoyarme en los momentos de enfermedad, de soledad, de alegría y de tristeza estando lejos de casa, como decía siempre “solo le hacía falta volar”. Te quiero mucho Markitos.

A mis amigos, Nicole, Doménica, Brandon, Sebastián, Alejandra y Alex que son mi segunda familia, gracias por volver el camino universitario más divertido, espero siempre verlos volar tan lejos como son capaces.

A Daniela, por ser mi mejor amiga, por su amor infinito hacia mí, por escucharme y nunca dejarme sola. A Fernando, por su apoyo y cariño en estos momentos. Tienen todo mi corazón.

Gisell Estefanía Quinde Tarco

Índice de Contenidos

Certificación Copyleaks	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de Publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos	7
Índice de Contenidos	8
Índice de Tablas	12
Índice de figuras.....	13
Abreviaturas.....	14
Resumen	16
Abstract.....	17
Capítulo I: Introducción	18
Antecedentes	18
Justificación.....	18
Objetivos del Proyecto de Grado.....	19
Objetivo General	19
Objetivos Específicos	20

Capítulo 2: Revisión Bibliográfica.....	20
Generalidades	20
<i>Polymyxa graminis</i> L.	20
Taxonomía y Morfología	20
Ciclo de vida	21
<i>Polymyxa graminis</i> L. y su Mecanismo de Adquisición de Virus	23
Diversidad Genética de <i>Polymyxa graminis</i> L.	23
<i>Oryza sativa</i> L.	25
Cultivo de Arroz en el Ecuador.....	25
Requerimientos Edafoclimáticos del Cultivo de Arroz.....	25
Taxonomía y Morfología del Arroz	26
Enfermedades y Plagas del Arroz.....	26
Capítulo 3: Metodología	29
Participantes	29
Zona de Estudio	29
Periodo de Investigación.....	29
Recolección de muestras de suelo contaminado con <i>Polymyxa graminis</i> L.	29
Siembra de plantas de arroz	29
Evaluación de infección de las plantas de arroz	30
Caracterización molecular	30

	10
Preparación de las raíces de <i>Oryza sativa</i> L.....	30
Extracción ADN de raíces de <i>Oryza sativa</i> L.....	30
Extracción de ADN de suelo.....	31
Cuantificación de ADN.....	31
Electroforesis para evaluar integridad.....	31
PCR punto final para la amplificación de los fragmentos de <i>Polymyxa graminis</i> L.....	32
Purificación de productos de PCR.....	35
Secuenciación Sanger de los productos de PCR.....	35
Análisis Bioinformático.....	35
Curación de secuencias.....	35
Secuencias consenso.....	36
Identificación de las secuencias consenso.....	36
Análisis filogenético.....	36
Capítulo 4: Resultados.....	37
Raíces de <i>Oryza sativa</i> L. infectadas con <i>Polymyxa graminis</i> L.....	37
Extracción de ADN de raíces de <i>Oryza sativa</i> L.....	37
Extracción de ADN de suelo.....	38
Integridad del ADN extraído de muestras de suelo.....	39
Amplificación de los fragmentos de <i>Polymyxa graminis</i> L.....	40
Resultados de la PCR.....	40

	11
Secuenciación Sanger	43
Alineamiento.....	44
Análisis filogenéticos.....	46
Capítulo 5: Discusión.....	50
Capítulo 6: Conclusiones.....	52
Capítulo 7: Recomendaciones	52
Bibliografía	53

Índice de Tablas

Tabla 1 Componentes de la PCR con primer Psp1-Psp2 rev	32
Tabla 2 Componentes para la PCR con primer ITS5- Pxrev7.....	33
Tabla 3 Programa PCR para Psp1-Psp2rev.....	34
Tabla 4 Programa PCR para ITS- Pxrev.....	34
Tabla 5 Valores de cuantificación obtenidos luego de la extracción de ADN de raíces de <i>Oryza sativa</i> L.....	38
Tabla 6 Valores de cuantificación obtenidos luego de la extracción de ADN de suelo.	39
Tabla 7 Secuencias de ADNr de <i>Polymyxa graminis</i> utilizadas para establecer identidades de secuencia y para análisis filogenético.....	46

Índice de figuras

Figura 1. Morfología de <i>P. graminis</i> en raíces (zoosporas maduras).....	21
Figura 2. Raíces de <i>Oryza sativa</i> L.....	37
Figura 3. Integridad de ADN de muestras de suelo.....	39
Figura 4. Amplicones obtenidos de muestras de raíces de <i>Oryza sativa</i> L. sembradas en suelos S para cebador Psp1-Psp2rev.....	40
Figura 5 Amplicones obtenidos de muestras de raíces de <i>Oryza sativa</i> L. sembradas en suelos S para cebador ITS5-Pxrev7.....	41
Figura 6. Amplicones obtenidos de muestras de raíces de <i>Oryza sativa</i> L. sembradas en suelos R para cebador Psp1-Psp2 rev7.	41
Figura 7. Amplicones Amplicones obtenidos de muestras de raíces de <i>Oryza sativa</i> L. sembradas en suelos R para cebador ITS5-Pxrev7.....	42
Figura 8. PCR de las raíces de las plantas control para cebador ITS5-Pxrev7.....	42
Figura 9. Amplicones de muestras de suelo amplificados con par de cebador ITS5-Pxrev7.....	43
Figura 10. Secuencia obtenida de la muestra de raíz amplificada con Psp1-Psp2rev (EcuGQ).....	43
Figura 11. Secuencia obtenida de la muestra de raíz amplificado con ITS5-Pxrev7 (EcuGQITS5).....	44
Figura 12. Alineamiento de la secuencia consenso EcuGQ con AJ010424(Meta).....	45
Figura 13. Alineamiento de la secuencia consenso EcuGQ con AM075820 (Afr2).....	46
Figura 14. Árbol filogenético para ECUGQ.....	48
Figura 15. Árbol filogenético para ECUGQIT5.....	48

Abreviaturas

°C	Grados centígrados
ADN	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (Siglas en inglés)
HCl	Ácido clorhídrico (Siglas en inglés)
min	Minuto
mM	Milimolar
mm	Milímetro
ng	Nanogramo
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PubMLST	Bases de datos públicas para tipificación molecular y diversidad del genoma microbiano (Siglas en inglés)
RSNV	<i>Rice stripe necrosis virus</i> (Siglas en inglés)
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
TRIS	Trisaminometano (Siglas en inglés)
μL	Microlitro
μM	Micromolar

U/ μ L	Unidades por microlitro
v/w	Porcentaje volumen peso

Resumen

En los últimos años, los cultivos de arroz en el Ecuador, principalmente en la región Costa, se han visto afectados por la enfermedad viral *Rice stripe necrosis virus* (RSNV) que ha provocado daños parciales y, en ciertos casos, totales de los sembríos, causando pérdidas económicas a los agricultores. Dicha enfermedad es transmitida mediante el plasmodiofórido *Polymyxa graminis* L., un patógeno obligado, que al infectar las raíces de *Oryza sativa* L., induce varios síntomas, siendo el más común la necrosis (amarillamiento) de las raíces, tallos y limbo de la planta. Además, produce un entorchamiento en las hojas, evidente para identificar la enfermedad, provocando la muerte de la planta. El presente estudio caracterizó molecularmente al vector *P. graminis* a partir de muestras de raíces de plantas enfermas y suelo. Se usaron para la amplificación de los fragmentos mediante PCR dos pares de cebadores específicos del vector Psp1-Psp2rev y ITS5-Pxrev7 para finalmente realizar el análisis filogenético de las secuencias obtenidas. Las secuencias corresponden al ribotipo V forma especial *colombiana* con una distancia de 0.02 entre Meta y Afr2; secuencias aisladas de arroz que presentan un porcentaje del 98% de identidad.

Palabras Clave:

- ***POLYMYXA GRAMINIS* L.**
- **FORMA ESPECIAL COLOMBIANA**
- **RIBOTIPO**
- **RSNV**
- **ENTORCHAMIENTO**

Abstract

In recent years, rice crops in Ecuador, mainly in the Costa region, have been affected by a viral disease: *Rice stripe necrosis virus* (RSNV) that has caused partial and in certain cases, total damage to crops, causing economic losses to farmers. This disease is transmitted by the plasmodiophorid *Polymyxa graminis* L., an obligate pathogen that, when infecting the roots of *Oryza sativa* L., induces several symptoms, the most common being necrosis (yellowing) of the roots, stems and limb of the plant, as well as an entorchamiento in the leaves being the most evident symptom to identify the disease causing the death of the plant. The present study molecularly characterized the vector *P. graminis* from samples of roots of diseased plants and soil. Two pairs of specific primers of the vector Psp1-Psp2rev and ITS5-Pxrev7 were used for the amplification of the fragments by PCR to finally carry out the phylogenetic analysis of the sequences obtained, reporting that they correspond to the ribotype V, special form *colombiana* with a distance of 0.02 between Meta and Afr2 isolated sequences from rice showing 98% percent identity.

Key words.

- ***POLYMYXA GRAMINIS* L.**
- **SPECIAL FORM *COLOMBIANA***
- **RIBOTYPE**
- **RSNV**
- **TWISTING**

Capítulo I: Introducción

Antecedentes

Polymyxa graminis L. es un parásito obligado que infecta las raíces de gramíneas en diferentes partes del mundo. Inicialmente se lo describió a partir del trigo por Ledingham en 1939. Los plasmodiofóridos se consideraban como hongos patógenos pero el análisis de sus secuencias de ADNr de subunidades pequeñas ha demostrado que probablemente deberían clasificarse dentro de los protistas y que no están estrechamente relacionados con los hongos verdaderos u otros parásitos de las plantas zoospóricas (Ward et al., 2004).

Sin embargo, *P. graminis* no puede hacer daño medible a su planta huésped, pero es el vector de varios virus muy importantes, incluidos los *Bymovirus* y *Furovirus* causantes de enfermedades en los diferentes tipos de hospederos. La identificación morfológica ha permitido la distinción entre dos especies parecidas *P. graminis* y *P. betae* aisladas de trigo y remolacha azucarera, respectivamente (Thompson et al., 2011).

Legrève y colaboradores, en el 2002, reportaron el amplio rango de hospederos a los cuales infecta *P. graminis*. Según los requisitos de temperatura, es decir, zonas templadas o cálidas, además del origen geográfico, se pueden encontrar cinco ribotipos de *P. graminis* o formas especiales, siendo la forma especial *colombiana* proveniente únicamente del arroz.

Justificación

El arroz (*Oryza sativa* L.) es el cultivo más extenso del Ecuador, se cultiva principalmente en las provincias de Guayas, Manabí, Los Ríos, El Oro y Loja. El rendimiento nacional para el 2020 fue de 4.53 t/ha siendo Loja la provincia que presentó la tasa de productividad más alta con 9.27 t/ha. El informe presentado por el SIPA 2020, en el primer ciclo, detectó como principal problema fitosanitario, con un 44%, a la presencia de las plagas y enfermedades y, para el

segundo ciclo del 2020, aumentó al 50%. Las enfermedades más comunes y reportadas son el vaneamiento del grano, el manchado del grano, caracol manzana y entorchamiento (SIPA, 2020).

En el Ecuador, en el año 2003, se reportó el entorchamiento del arroz, una enfermedad viral provocada por el *Rice stripe necrosis virus* (RSNV) y transmitida por el plasmodioforomycete *Polymyxa graminis* L. que ha causado grandes pérdidas económicas de hasta el 70% del total de la producción (Díaz, 2018).

P. graminis ha sido reportado como un importante vector de virus, el cual dañan los cultivos de cereales en diferentes partes del mundo. Puede sobrevivir en el suelo por largos periodos de tiempo a través de las estructuras complejas denominadas cistosoros, estos dan origen a zoosporas móviles transportadoras del RSNV de plantas enfermas a plantas sanas de arroz y, una vez que alcanzan las raíces de una planta huésped, penetran y dan origen a nuevos cistosoros aumentando la transmisibilidad del virus (Xu et al., 2018).

Sin embargo, por el amplio rango de hospedadores de los diferentes cereales, los requisitos de temperatura y el origen geográfico se han reconocido formas especiales, siendo las más significativas para el estudio *P. graminis* f. sp. *tropicalis*, *P. graminis* f. sp. *subtropicalis*, *P. graminis* f. sp. *colombiana* ya que temperaturas mayores a 23°C, característica de zonas cálidas, favorecen el desarrollo de estos grupos (Legréve et al., 2002).

Objetivos del Proyecto de Grado

Objetivo General

- Caracterizar molecularmente a *Polymyxa graminis* L. en suelos dedicados al cultivo de arroz y raíces de *Oryza sativa* L. en invernadero.

Objetivos Específicos

- Detectar *Polymyxa graminis* L. mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las raíces de *Oryza sativa* L. y de los suelos dedicados al cultivo de arroz.
- Realizar la secuenciación de los fragmentos amplificados de *Polymyxa graminis* L. mediante Sanger.
- Elaborar el análisis filogenético de las secuencias de los amplicones de *Polymyxa graminis* L. mediante programas bioinformáticos.

Capítulo 2: Revisión Bibliográfica

Generalidades

Polymyxa graminis L.

Taxonomía y Morfología

Polymyxa graminis L. es un organismo eucariota (protista), perteneciente al orden Plasmodiophorales y familia Plasmodiophoraceae; existen 10 géneros en los que se incluye a *Polymyxa*. Se considera a *P. graminis* la principal especie que infecta a cereales y gramíneas. Además, debido a los estudios filogenéticos y análisis de secuencias de ADNr de subunidades pequeñas, se demostró a *Polymyxa* como un grupo monofilético dentro de los protistas, sin relación con hongos o con otros parásitos de las plantas zoospóricas (Kanyuka et al., 2003).

Dentro de las principales características morfológicas de esta especie, se tiene un mecanismo de división nuclear conocido como cruciforme, basado en el alargamiento del nucleolo perpendicularmente a la cromatina dentro de la metafase. Poseen en las zoosporas dos flagelos anteriores a la longitud, de manera desigual; también se caracterizan por ser multinucleados. Es un parásito intracelular obligatorio y sus esporas o quistes tienen la capacidad de sobrevivir en lugares hostiles como el medio ambiente (Fonseca & Perez, 1997).

Durante las cinco primeras semanas en las cuales se desarrolla este parásito, los plasmodios esporogénicos y las esporas en reposo tienen una morfología muy similar. A medida que se desarrollan, existen cambios en los esporogénicos ya que infectan las células epidérmicas de la raíz del huésped (Figura 1). Otra de las diferencias en su morfología se observa en las células infectadas pues se encuentran separadas del citoplasma de la célula hospedera por una capa membranal (Kanyuka et al., 2003).

Figura 1.

Morfología de P. graminis en raíces (zoosporas maduras).



Nota: Tomado de *Plant Protect. Sci.* (p. 68), por Ketta et al., 2012.

Ciclo de vida

Los plasmodiofóridos en los cuales se encuentra *Polymyxa graminis* L., tiene un ciclo de vida bifásico, esporogénico y esporangial. En el caso del esporogénico o primera fase, resulta en la producción de esporosori la cual contiene esporas en reposo que producen zoosporas primarias y la fase esporangial, que resulta en la producción de zoosporangios y zoosporas secundarias (Cox et al., 2014).

En el inicio de la fase, se da la unión o acoplamiento de las zoosporas y el proceso de penetración de las células ciliadas radiculares o epidérmicas. Como primer paso es el enquistamiento de la zoospora en la superficie de la célula hospedadora. El segundo aspecto es el desarrollo de una estructura tubular o rohr en la zoospora enquistada, contiene un cuerpo conocido como "stachel", similar a una daga. La zoospora enquistada genera una adhesión (adhesorium), por donde se inserta el cuerpo stachel y las zoosporas en el interior de la pared de la célula huésped y, de igual manera, en la membrana plasmática en el citoplasma de las células de la raíz (Kanyuka et al., 2003).

En la célula se llevan a cabo distintos procesos de división nuclear mitótica (cruciformes), que resultan en la disminución de su tamaño, generando la transformación a un plasmodio esporangial multinucleado, separado del citoplasma de las células hospedadoras gracias a una pared celular diferente. La siguiente fase se basa en la formación de septos en los zoosporangios, se dividen en lóbulos que aumentan su volumen, se dan varios ciclos de división mitótica no cruciformes y forman tubos de salida hacia la célula del huésped (Tyagi et al., 2016).

En este proceso se originan zoosporas secundarias, las cuales se dividirán y resultarán en células redondas y sin tabiques presentes en los segmentos de los zoosporangiales, generando así una maduración en las mismas. Las zoosporas ya maduras son liberadas al exterior de la raíz o dentro de células cercanas la raíz, mediante el mecanismo de tubos de salida especializados en la disolución y generación de una abertura dentro de la pared de la célula huésped. En cuanto a las zoosporas secundarias inician una nueva fase esporangial, de la cual resultan una generación de zoosporas y se transformarán en esporas en reposo o en plasmodios (Ratti et al., 2004).

Polymyxa graminis L. y su Mecanismo de Adquisición de Virus

Si bien el parásito intracelular ha sido categorizado como un organismo infeccioso de la cosecha de los cereales y otros productos de consumo humano, según investigaciones realizadas, se conoce que de manera natural no afecta a ningún cultivo. Sin embargo, ciertos virus de plantas infectan al plasmodio y es usado como un vector para las futuras infecciones en plantas; los principales géneros de virus reportados son: *Furovirus*, *Bymovirus*, *Benyvirus*, BaYMV (*virus del mosaico amarillo de la cebada*), *Pecluvirus* y otros patógenos que interfieren directamente en la producción y calidad de los cereales (Kanyuka et al., 2003).

Durante varios años se ha investigado el mecanismo de adquisición o infección del virus en *Polymyxa graminis* L. y cómo llega a la célula de la planta que será infectada; sin embargo, no se han realizado estudios específicos de dicho fenómeno. Varias hipótesis planteadas sugieren que las zoosporas transfieren su contenido genético dentro de la célula hospedera, el virus puede penetrar con el material genético del vector. También es posible la adquisición durante el desarrollo de los plasmodios esporogénicos de *P. graminis*, por la membrana que separa el plasmidioforido del exterior (Thompson et al., 2011).

Diversidad Genética de Polymyxa graminis L.

Estudios de las regiones de ADN ribosómico nuclear (ADNr) 18S, 5.8S y espaciadores transcritos internos (ITS 1 e ITS2) han demostrado la existencia de varios subgrupos (ribotipos) de *Polymyxa graminis* L. en diferentes formas especiales debido a la correlación con el rango de hospedadores, los requisitos de temperatura y el origen geográfico (Legrève et al., 2002).

Legrève et al. (2002) en su estudio propone diferenciar los subgrupos de *P. graminis* en cinco formas especiales que se detallan a continuación, cada una con una combinación

específica de rango de hospederos, requisitos de temperatura y características del genoma para los aislados de *Polymyxa* que parasitan especies monocotiledóneas.

P. graminis f. sp. *temperata* Legréve, Delfosse & Maraite, f. sp. nov.

Forma especial aislada de gramíneas especialmente en cebada o trigo, fue detectada infectando la remolacha azucarera, favorecido por temperaturas de 15 a 20°C en regiones templadas, gen ITS1-5.8S-ITS2 secuencia tipo Pg-I (ribotipo I).

P. graminis f. sp. *tepida* Legréve, Delfosse & Maraite, f. sp. nov.

Subtipo aislado de cebada, avena y trigo, favorecido por temperaturas de 15 a 20°C en regiones templadas, gen ITS1-5.8S-ITS2 secuencia tipo Pg-II (ribotipo II).

P. graminis f. sp. *tropicalis* Legréve, Delfosse & Maraite, f. sp. nov.

Ribotipo aislado a partir de sorgo, mijo perla y maíz. Algunos estudios lo han identificado en trigo y cebada, favorecido por temperaturas superiores a 23°C, de regiones tropicales, gen ITS1-5.8S ITS2 secuencia tipo Pg-III_a ó _b (ribotipo III).

P. graminis f. sp. *subtropicalis* Legréve, Delfosse & Maraite, f. sp. nov.

Aislado de sorgo y mijo perla, pero también en trigo y cebada ocasionalmente en maní y remolacha azucarera, favorecido por temperaturas superiores a 23°C, de regiones subtropicales, gen ITS1-5.8S ITS2 secuencia tipo Pg-IV_a ó _b (ribotipo IV).

P. graminis f. sp. *colombiana* Legréve, Delfosse & Maraite, f. sp. nov.

Forma especial aislada a partir de arroz, favorecido por temperaturas superiores a 23°C, gen ITS1-5.8S ITS2 secuencia tipo Pg-V (ribotipo V).

Oryza sativa L.

Cultivo de Arroz en el Ecuador

El arroz es uno de los cultivos más extensos del Ecuador, se lo considera como un producto transitorio. En términos sociales y productivos, el cultivo de arroz es la producción más importante del país, la mayor área sembrada del cereal está en la región litoral en las provincias de El Oro, Guayas, Los Ríos y Manabí; sin embargo, la provincia de Loja ha tenido un alto rendimiento nacional durante el primer ciclo del 2020 de 9.27 t/ha, en comparación a las provincias de la región litoral que no superan el 5.02 t/ha (SIPA, 2020). Además, a nivel mundial se lo considera como una gramínea con mayor aporte nutricional de todos los cereales (FAO, 2018).

Requerimientos Edafoclimáticos del Cultivo de Arroz

Suelo.

El suelo donde se puede desarrollar el arroz exhibe diferentes características, la textura varía desde franco arcilloso a franco limoso, con buen drenaje superficial y el pH oscila entre 6.5 y 7.5. El contenido de materia orgánica es mayor al 5%, el contenido de arcilla es de 40% y se requiere de una topografía plana (INIAP, 2014).

Temperatura.

Las zonas arroceras del país presentan una diversidad de condiciones ambientales que varían desde un clima trópico húmedo hasta el trópico seco, con temperaturas que oscilan entre 20°C y 30°C, precipitaciones máximas de 2500 mm y mínimas de 500 mm por año con humedad relativa alta (INIAP, 2014).

Taxonomía y Morfología del Arroz

Oryza sativa L. está clasificada dentro de la familia *Poaceae* de las gramíneas. Esta especie tiene su origen en Asia y una gran importancia económica ya que su semilla es uno de los principales alimentos para la mayoría de la población humana. *O. sativa* L. es un tipo de Espermatofitas y subtipo Angiospermas, planta monocotiledónea (Beltramo et al., 2010).

En cuanto a su morfología, las raíces se caracterizan por ser fasciculadas, delgadas y fibrosas. Pueden existir dos clases de raíces, las seminales con origen en la radícula y son temporales; las adventicias secundarias, con una ramificación libre originada de los nudos inferiores del tallo en desarrollo. En cuanto al tallo de la planta, está formado por entrenudos y nudos de forma alternada, tiene forma de cilindro que puede llegar a medir de 60 a 120 cm de longitud (Rodríguez, 2013).

Las hojas están organizadas de forma alterna, constan de un limbo lineal, largo, plano y agudo, la lígula de la hoja se encuentra en el borde inferior entre el punto de la vaina y el limbo, se caracteriza por ser membranosa, erguida y bífida. Las flores de *O. sativa* L., tienen un color verdoso blanquecino y están presentes en forma de espiguillas uniflorales. La inflorescencia es una panícula localizada sobre el vástago terminal y constituida por dos lemmas estériles que son la raquilla y el flósculo; finalmente, el grano es el ovario maduro de la planta, el grano con su envoltura lleva el nombre de paddy, mientras que al grano expuesto se le llama arroz café (Beltramo et al., 2010).

Enfermedades y Plagas del Arroz

Si bien *Oryza sativa* L. es de gran importancia comercial, existen varios factores que intervienen en la pérdida de la cosecha, como las enfermedades de la planta y las posibles plagas causando grandes pérdidas económicas, no solo debido a la inversión para el control,

sino a la existencia de enfermedades virales de las cuales aún no se conoce un método de control. Se ha reportado que la pérdida puede llegar hasta el 33% de su producción (Paz, 2019).

En cuanto a plagas, se encuentran “Gusanos rojos y blancos del arroz”, géneros de las especies *Ortocladius* sp. y *Cricotopus* sp. respectivamente, afectan a las raicillas de la plántula porque es la principal alimentación de dichas larvas. Otra plaga es el gusano de los planteles del arroz o larvas de dípteros como *Chironomus*, *Ephydra* y *Ortocladius*. El chinche del arrozal es otra plaga causada por heterópteros *Eusarcoris inconspicuus* y *Eusarcoris perlatus*, sus larvas pueden alimentarse de las espigas de arroz (Ramón & Rodas, 2007).

Entre las enfermedades más destacadas se encuentra *Pyricularia oryzae*, basada en la producción de piricularia, sustancia tóxica producida por los micelios del hongo, este compuesto inhibe el desarrollo de los tejidos y produce una alteración en los mismos. Por otra parte, *Rhizoctonia solani* es otra de las enfermedades que afecta a la producción de arroz, el daño se direcciona a la vaina que interfiere en el desarrollo de su forma ovoide, causando la muerte de las hojas o incluso de la planta (Bernis & Pàmies, 2004).

La podredumbre del tallo es otra enfermedad, en la cual los hongos *Fusarium moniliforme* y *Sarocladium oryzae* producen la putrefacción de las hojas de la planta que envuelven a la panícula, puede extenderse a toda la hoja y llegar a una podredumbre parcial. El entroncamiento del arroz acaba con los cultivos de arroz, dada por la acción de un endoparásito del suelo que afecta directamente a las raíces del arroz y otros cereales, el mismo sirve como un vector para la introducción de varios virus que afectan al desarrollo y productividades del arroz (Marys & Carballo, 2007).

En el año 2000, se detectó en el Ecuador por primera vez un reporte de la enfermedad del entorchamiento del arroz, provocada por el *Rice stripe necrosis virus* (RSNV) perteneciente al

género *Benyvirus*, el cual es transmitido mediante el vector *Polymyxa graminis* L., un parásito obligado de las raíces de plantas susceptibles. La erradicación de *P. graminis* resulta imposible una vez que infesta todo el campo de producción, los tratamientos químicos para la semilla no son eficientes para combatirlo, sin embargo, se está probando un control biológico mediante la acción antagonista con microorganismos (Morales, 2001).

Capítulo 3: Metodología

Participantes

La parte experimental de este trabajo se realizó en el Laboratorio de Fitopatología del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias -INIAP Litoral Sur, bajo la dirección del Dr. Lenin Paz, Ph.D. Además, tutorías a cargo del MSc. Alma Koch y la colaboración de Sebastián Ger.

Zona de Estudio

El presente trabajo se ejecutó en el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias INIAP-Litoral sur, en el Laboratorio de Fitopatología, ubicado en el Km 26 Durán-Tambo Virgen de Fátima, del Cantón Yaguachi de la provincia del Guayas, localizado en las coordenadas 2°15'15"S 79°30'40"W.

Periodo de Investigación

El trabajo de titulación se inició en el mes de octubre de 2021 y se culminó en enero 2022.

Recolección de muestras de suelo contaminado con *Polymyxa graminis* L.

Las muestras de suelo para el cultivo de plantas de arroz fueron tomadas en el cantón Vinces, provincia de Los Ríos, de dos localidades diferentes, suelo S: 1°21'50.4"S 79°36'31.8"W y suelo R: 1°20'46.0"S 79°35'19.1"W.

Siembra de plantas de arroz

Se inocularon cinco semillas de arroz variedad ELITE por en vasos de siembra para cada uno de los suelos S y R, se realizaron cinco repeticiones. Para el control absoluto negativo se inocularon semillas de la misma variedad en suelo proporcionado por el INIAP LITORAL SUR.

Evaluación de infección de las plantas de arroz

Después de 25 días de la siembra, algunas plantas empezaron a presentar síntomas como necrosis en el tallo y limbo, banda clorótica en el limbo, separación de macollas desde la base, pérdida de la masa del sistema radicular y entorchamiento de las hojas, por lo que se procedió a elegir los individuos más afectados para el estudio.

Caracterización molecular

Para la caracterización molecular, se llevó a cabo la extracción y purificación de ADN para posterior amplificación del vector *Polymyxa graminis* con dos pares de primers específicos, a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final y finalmente la secuenciación Sanger que permitió realizar el análisis bioinformático del amplicón obtenido.

Preparación de las raíces de Oryza sativa L.

Se realizaron tres lavados con agua destilada para retirar la tierra de las raíces y otras impurezas. Se dejaron secar a temperatura ambiente.

Extracción ADN de raíces de Oryza sativa L.

Para la extracción de ADN, se empleó el protocolo establecido previamente por el Laboratorio de Fitopatología con modificaciones. Se pesó 30 g de muestra fresca, se maceró el tejido en presencia de nitrógeno líquido y se agregó 800 μ L del buffer de extracción CTAB (Tris HCl 100 mM, EDTA 25 mM, NaCl 1.4 M CTAB 2%, PVP 2% Y 2- β -mercaptoetanol 2%) se mezcló y se transfirió a un tubo eppendorf. Luego se incubó la muestra a 65°C por una hora mezclando por inversión cada 20 min, se agitó y se agregó 800 μ L de la solución cloroformo- alcohol isoamílico, después se centrifugó a 14000 rpm por 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se agregó 0.6 volúmenes de isopropanol helado. La muestra fue incubada a -20 °C por 30 min y luego se centrifugó a 14000 rpm por 10 min. Para el lavado del pellet, se usó etanol al 70%

centrifugando a 14000 rpm por 5 min. Finalmente, el ADN fue resuspendido en agua ultra pura y almacenada a -20°C.

Extracción de ADN de suelo

Se realizó la extracción de ADN de suelo en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, a cargo del PhD. Andrés Izquierdo, en colaboración con Nicole Soria. Se extrajo el ADN de muestras de suelo siguiendo el protocolo del kit PowerSoil DNA Isolation.

Cuantificación de ADN

La cuantificación de ADN obtenido a partir de raíces de *Oryza sativa* L. se realizó mediante espectrofotometría cuyo blanco fue el agua ultra pura donde fue resuspendido el ADN, mientras que el ADN de suelo se cuantificó a través del equipo NanoDrop (ThermoFisher) del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad, cuyo blanco fue el buffer de elución del Kit. Para ambas cuantificaciones se midió la concentración de DNA y los ratios 260/280.

Electroforesis para evaluar integridad

Para la observación de la presencia o ausencia de DNA luego de las extracciones, se llevó a cabo la electroforesis. Se utilizaron geles de agarosa al 1.7% (v/w) los cuales se prepararon empleando ciclos de agitación-calentamiento.

Para el caso de extracción de DNA, se emplearon 2µL de azul de bromofenol en 3 µL de muestra como marcador de avance. Finalmente, para la visualización del gel se añadió el reactivo Diamond en una dilución 1:10000 con TBE 1X en agitación por 35 min y se visualizó las bandas en el transiluminador.

PCR punto final para la amplificación de los fragmentos de Polymyxa graminis

Para la PCR se empleó el kit GoTaq Flexi Polymerase (Promega). En las siguientes tablas 1, 2 y 3, se detalla la concentración inicial y final de cada componente necesario para la realizar la PCR con un volumen final de 25 μL tomando como base la información otorgada por (Promega, 2018).

Tabla 1

Componentes de la PCR con primer Psp1-Psp2 rev

Componente	Concentración		Volumen (μL)
	inicial	Concentración final	
5X Green GoTaq FlexiBuffer	5 X	1 X	5
MgCl ₂	25 mM	2,5 Mm	2,5
dNTPs	10 mM	0,3 Mm	0,75
Primer Psp1	40 μM	0,4 μM	0,25
Primer Psp2 rev	40 μM	0,4 μM	0,25
GoTaq Polymerase	5 u/ μL	0,125 u/ μl	0,125
DNA	20 ng/ μL	10 ng/ μL	2,5
Agua			13,625
Vf			25

Tabla 2*Componentes para la PCR con primer ITS5- Pxrev7*

Componente	Concentración		Volumen (μ L)
	inicial	Concentración final	
5X Green GoTaq FlexiBuffer	5 X	1 X	5
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	2,5
dNTPs	10 mM	0,3 mM	0,75
Primer ITS5	40 μ M	0,4 μ M	0,25
Primer Pxrev7	40 μ M	0,4 μ M	0,25
GoTaq Polymerase	5 u/uL	1,25 u/ μ l	0,125
DNA	20 ng/uL	1 ng/ μ L	2
Agua			14,125
Vf			25

Para la estandarización del programa se siguieron los parámetros establecidos por Legrevé (2003) y se modificaron en dependencia del par de cebadores.

Tabla 3*Programa PCR para Psp1-Psp2rev*

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	94	2 min	1
Denaturación	94	30 s	
Annealing	60	1 min	35
Extensión	72	35 s	
Extensión final	72	7 min	1

Tabla 4*Programa PCR para ITS- Pxrev*

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	94	2 min	1
Denaturación	94	30 s	
Annealing	52	1 min	35
Extensión	72	30 s	
Extensión final	72	7 min	1

La presencia de los fragmentos amplificados se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa 2%, la corrida se realizó empleando 3 µL del producto amplificado, por 90 min a 90 voltios. El fotodocumentador empleado fue AÑADIR.

Purificación de productos de PCR.

Aquellas muestras que presentaron bandas claras y sin inespecificidades fueron sometidas al proceso de purificación con el Kit de Invitrogen: PureLink® PCR Purification Kit™. Para esto, por cada 10 µL de muestra, se colocaron 40 µL de Binding Buffer B3 con isopropanol prelavado previamente como lo indica el kit y se homogenizó bien. Se cargó las muestras en el centro de una columna de purificación dentro de un tubo colector y rotulada. Se centrifugó a 10000 g por 1 min. Se descartó el remanente presente en el tubo colector.

Se colocó 650 µL de Wash Buffer (W1) con etanol preparado previamente en cada columna, se centrifugó a 10000 g por 1 min, y se descartó el residuo del tubo colector. Se centrifugó a 21000 g por 3 min para remover el residuo del buffer en la columna. En un tubo eppendorf de 1.5 mL debidamente etiquetado, se colocó la columna y se añadieron 50 µL de Elution Buffer y se incubó por 1 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 21000 g por 2 min. El ADN purificado se encontraba en el tubo de elución. Las muestras se almacenaron a 4°C para uso inmediato o a -20° para almacenamiento a largo tiempo (Life technologies, 2011).

Secuenciación Sanger de los productos de PCR

La secuenciación Sanger de los amplicones obtenidos de dos muestras para Psp1-Psp2rev e ITS5-Pxrevy7 se realizó en el exterior mediante convenio con el laboratorio IDGen, a las cuales se las denominó EcuGQ y EcuGQITS5 respectivamente.

Análisis Bioinformático

Curación de secuencias

Empleando los archivos obtenidos en formato. ab1, se emplearon los softwares Geneious Prime 2020.0.4 y SnapGene para realizar la curación de las secuencias. Se eliminaron los extremos utilizando la herramienta “Trim Ends” con un límite de probabilidad de error de

0.05, es decir se eliminaron las regiones con más de 5% de probabilidad de tener un error por base.

Secuencias consenso

En el programa Geneious Prime 2020.0.4, en la pestaña “Chromatogram”, se pudo visualizar los extremos que tenían exceso de error por base, en “sequence view” se seleccionó los extremos a borrar, se dio clic derecho “delete select bases” y finalmente “save” para exportar la nueva secuencia consenso. Esto se realizó para cada una de las secuencias crudas.

Identificación de las secuencias consenso

El número de accesión correspondiente a cada secuencia se obtuvo comparando la misma con la base de datos The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) disponible en National Center for Biotechnology Information (NCBI) donde se pudo identificar el porcentaje de identidad con otras secuencias reportadas. Luego de este paso, se descargaron los números de accesiones en la base de datos y usando el software Geneious Prime 2020.0.4 se los alinearon con las secuencias de la muestra mediante la herramienta MUSCLE ALIGNMENT, de tal manera se confirmó la identidad de las secuencias y los nucleótidos divergentes. Además, se emplearon dos secuencias del ribotipo V y una secuencia por cada clase de ribotipo.

Análisis filogenético

Para la filogenia del estudio, se emplearon las secuencias obtenidas por cada par de cebador, además de las secuencias con un alto nivel de porcentaje de identidad y secuencias pertenecientes a ribotipos diferentes, además de un grupo externo con el fin de alinearlos mediante la herramienta MUSCLE en MEGA-X. Seguidamente, se empleó la herramienta MODELS para determinar el mejor modelo de sustitución nucleotídica para cada caso y se

crearon ocho árboles en total con el método estadístico de máxima verosimilitud (ML) y 10000 Bootstraps (Cox, Luo, & Jones, 2014) .

Capítulo 4: Resultados

Raíces de *Oryza sativa* L. infectadas con *Polymyxa graminis* L.

Las raíces de plantas que presentaron síntomas relacionados al entorchamiento tuvieron una apariencia de necrosis por el color amarillo característico en comparación con las raíces de las plantas control (*Figura 2*).

Figura 2.

Raíces de Oryza sativa L.



Nota: C: planta control, 1,2,3,4 y 5 son las plantas que presentan algún síntoma relacionado a la enfermedad del entorchamiento del arroz.

Extracción de ADN de raíces de *Oryza sativa* L.

Los valores de concentración en $\mu\text{g/mL}$, los radios 260/280 de las muestras empleadas y sus duplicados se presentan en la *Tabla 5*.

Tabla 5.

Valores de cuantificación obtenidos luego de la extracción de ADN de raíces de *Oryza sativa* L.

	Muestras	260/280	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
SUELO S	1	1,9	311,6
	2	1,7	854,3
	3	2,2	221,1
	4	1,6	371,8
	5	1,9	683,4
	6	1,8	804,0
SUELO R	1	2,0	301,5
	2	1,9	371,8
	3	1,7	260,8
	4	1,8	280,9
	5	1,8	260,9
	6	1,9	271,4
CONTROL	1	2,1	220,4
	2	2,4	250,9
	3	2,2	290,8

Extracción de ADN de suelo

Los valores de concentración en $\text{ng}/\mu\text{L}$, los ratios 260/280 y 260/230 de las muestras de suelo con *P. graminis* y suelos control con sus duplicados se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6.

Valores de cuantificación obtenidos luego de la extracción de ADN de suelo.

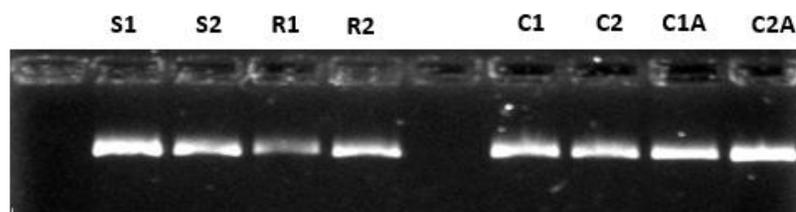
Muestra	Concentración (ng/μL)	260/280	260/230
C1	33,3	2,25	7,39
C2	31,0	2,20	9,06
S1	30,9	2,21	9,43
S2	31,5	2,17	4,54
R1	31,9	2,29	7,16
R2	32,7	2,17	3,94

Integridad del ADN extraído de muestras de suelo

Una vez cuantificado el ADN se procedió a realizar una electroforesis para observar la integridad del ADN.

Figura 3.

Integridad de ADN de muestras de suelo.



Nota: suelo S: 1°21'50.4''S 79°36'31.8''W, suelo R: 1°20'46.0''S 79°35'19.1''W y C suelo control

C: 2°15'15''S 79°30'40''W.

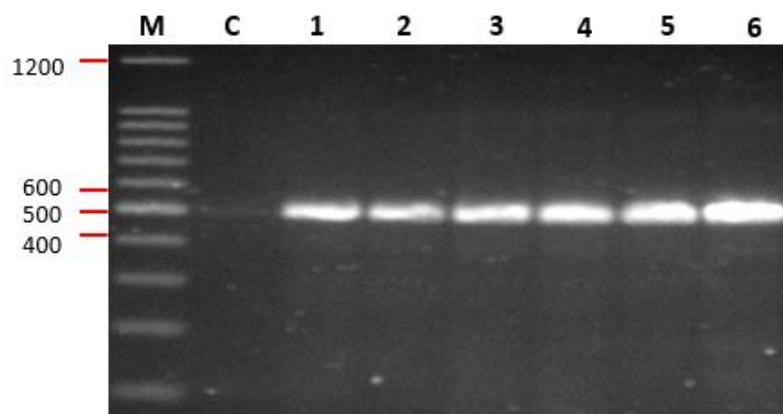
Amplificación de los fragmentos de *Polymyxa graminis* L.

Los fragmentos amplificados por PCR para cada tipo de muestra están en correspondencia al par de cebador utilizado Psp1-Psp2rev e ITS5-Pxrev7.

Resultados de la PCR

Figura 4.

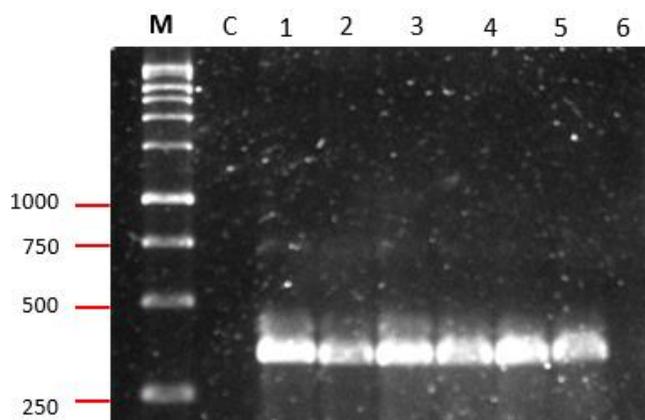
Amplicones obtenidos de muestras de raíces de Oryza sativa L. sembradas en suelos S para cebador Psp1-Psp2rev



Nota: PCR en gel de agarosa 2%. M*: Marcador molecular 100 pb ;1-6: Muestras; C-: Control negativo. Tamaño de los amplicones: 500 pb aproximadamente para el primer Psp1-Psp2rev.

Figura 5.

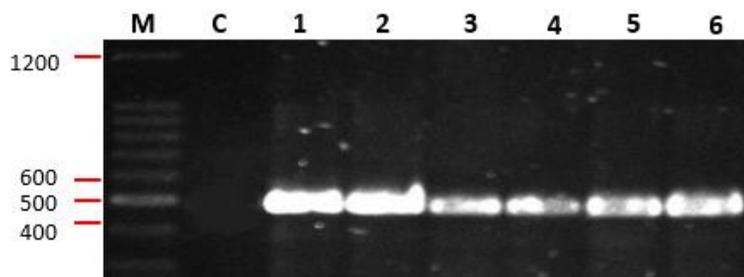
Amplicones obtenidos de muestras de raíces de Oryza sativa L. sembradas en suelos S para cebador ITS5-Pxrev7.



Nota: PCR en gel de agarosa 2%. M*: Marcador molecular 1 kb ;1-5: Muestras; C-: Control negativo. Tamaño de los amplicones 350 pb aproximadamente para primer ITS5-Pxrev7.

Figura 6.

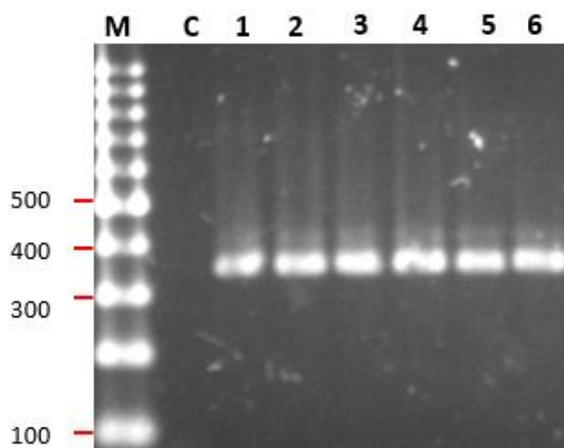
Amplicones obtenidos de muestras de raíces de Oryza sativa L. sembradas en suelos R para cebador Psp1-Psp2 rev7.



Nota: PCR en gel de agarosa 2%. M*: Marcador molecular 100 pb ;1-6: Muestras; C-: Control negativo. Tamaño de los amplicones 500 pb aproximadamente para primer Psps1-Psp2rev

Figura 7.

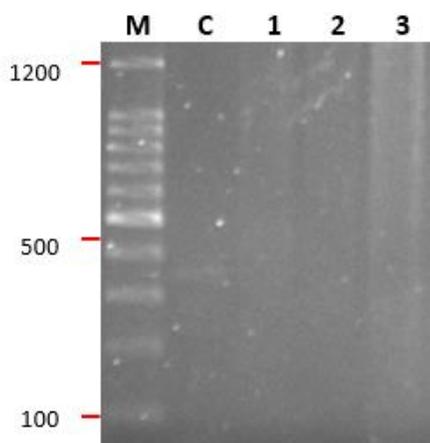
Amplicones obtenidos de muestras de raíces de Oryza sativa L. sembradas en suelos R para cebador ITS5-Pxrev7.



Nota: PCR en gel de agarosa 2%. M*: Marcador molecular 100 pb ;1-6: Muestras; C-: Control negativo. Tamaño de los amplicones 350 pb aproximadamente para primer ITS5-Pxrev7.

Figura 8.

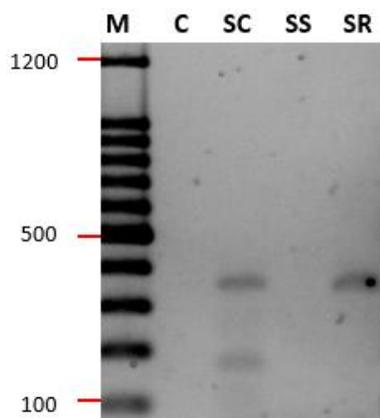
PCR de las raíces de las plantas control para cebador ITS5-Pxrev7.



Nota: PCR en gel de agarosa 2%. M*: Marcador molecular 100 pb ;1-3: Muestras; C-: Control negativo.

Figura 9.

Amplicones de muestras de suelo amplificadas con par de cebador ITS5-Pxrev7.



Nota: PCR en gel de agarosa 2%. M*: Marcador molecular 100 pb; C-: Control negativo; SC: suelo control; SS: suelo S; SR: suelo R.

Secuenciación Sanger

Las secuencias se obtuvieron en formato .ab1 y los cromatogramas de las mismas junto con sus valores de calidad se exportaron además como PDF para su análisis posterior.

Figura 10.

Secuencia obtenida de la muestra de raíz amplificada con Psp1-Psp2rev (EcuGQ)

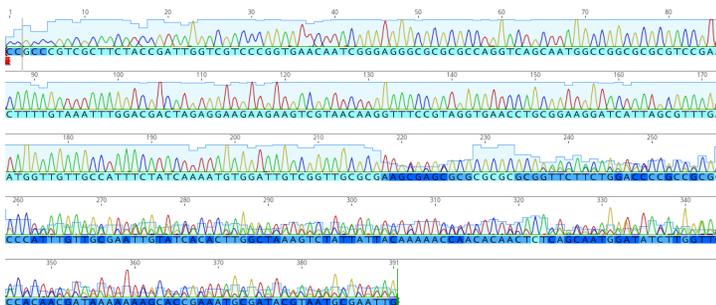
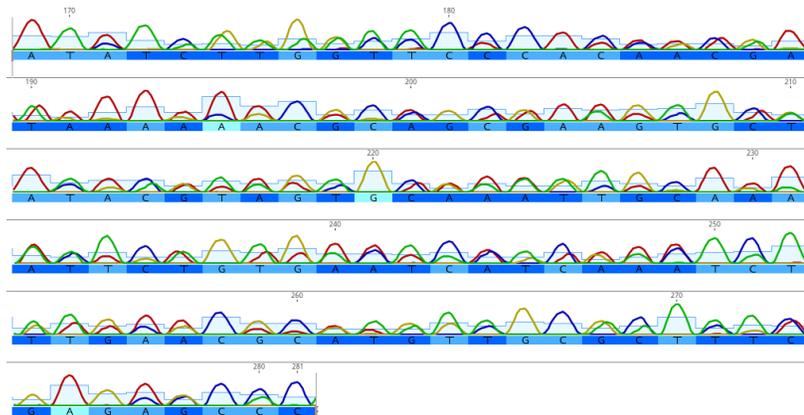


Figura 11.

Secuencia obtenida de la muestra de raíz amplificado con ITS5-Pxrev7 (EcuGQIT5)



Alineamiento

Las secuencias correspondientes al cebador Psp1-Psp2rev se alinearon en el programa Geneious Prime 2020.0.4 con las secuencias reportadas en la base de datos de aislados de arroz de Colombia (META) y Cote d' Ivoire (Afr2) cuyo número de accesoión es AJ010424 y AM075820 respectivamente.

Figura 12.

Alineamiento de la secuencia consenso EcuGQ con AJ010424 (Meta)

```

Consensus      TTGGTCGTCCCGGTGAACAATCGGGAGGGCGCGGCCAGGTCAGCAATGGCCGGCGCGCG 300
AJ010424.1     TTGGTCGTCCCGGTGAACAATCGGGAGGGCGCGGCCAGGTCAGCAATGGCCGGCGCGCG 300
GQ2RP_PSP1.abl TTGGTCGTCCCGGTGAACAATCGGGAGGGCGCGGCCAGGTCAGCAATGGCCGGCGCGCG 80

Consensus      TCCGAACCTTTTGTAATTTGGACGACTAGAGGAAGAAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTA 360
AJ010424.1     TCCGAACCTTTTGTAATTTGGACGACTAGAGGAAGAAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTA 360
GQ2RP_PSP1.abl TCCGAACCTTTTGTAATTTGGACGACTAGAGGAAGAAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTA 140

Consensus      GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGCGTTTGAATGGTTGTTGCCAITTCTATCAAAATGT 420
AJ010424.1     GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGCGTTTGAATGGTTGTTGCCAITTCTATCAAAATGT 420
GQ2RP_PSP1.abl GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGCGTTTGAATGGTTGTTGCCAITTCTATCAAAATGT 200

Consensus      GGATTGTCGGTTGCGCGANNAGCGAGCGCGCGCGCGGTTCTTCTGGACCCCGCGCGCG 480
AJ010424.1     GGATTGTCGGTTGCGCGAAGAGCGAGCGCGCGCGCGGTTCTTCTGGACCCCGCGCGCG 480
GQ2RP_PSP1.abl GGATTGTCGGTTGCGCGA--AGCGAGCGCGCGCGCGGTTCTTCTGGACCCCGCGCGCG 258

Consensus      CCCATTGTTGCGAATTGKATCACACTTGGCTAAAGTCKATTATTACAAAAACMAACACA 540
AJ010424.1     CCCATTGTTGCGAATTGATCACACTTGGCTAAAGTCKATTATTACAAAAACMAACACA 540
GQ2RP_PSP1.abl CCCATTGTTGCGAATTGATCACACTTGGCTAAAGTCKATTATTACAAAAACMAACACA 318

Consensus      ACTCTYAGCAATGGATAICTTGGTTCCCAACGATRAARAAMGCASCGAAATGCGATAC 600
AJ010424.1     ACTCTYAGCAATGGATAICTTGGTTCCCAACGATRAARAAMGCASCGAAATGCGATAC 600
GQ2RP_PSP1.abl ACTCTYAGCAATGGATAICTTGGTTCCCAACGATRAARAAMGCASCGAAATGCGATAC 378

Consensus      GTAATGCGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAAGTTGCGCTTTCG 660
AJ010424.1     GTAATGCGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAAGTTGCGCTTTCG 660
GQ2RP_PSP1.abl GTAATGCGAATTGCGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAAGTTGCGCTTTCG 438

```

Figura 13.

Alineamiento de la secuencia consenso EcuGQ con AM075820 (Afr2)

```

Consensus      TTGGTCGTCCCGGTGAACAATCGGGAGGGCGCGCCAGGTCAGCAATGGCCGGCGCGCG 300
AM075820.1    TTGGTCGTCCCGGTGAACAATCGGGAGGGCGCGCCAGGTCAGCAATGGCCGGCGCGCG 300
GQ2RP_PSP1.abl TTGGTCGTCCCGGTGAACAATCGGGAGGGCGCGCCAGGTCAGCAATGGCCGGCGCGCG 80

Consensus      TCCGAACTTTTGTAAATTTGGACGACTAGAGGAAGAAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTA 360
AM075820.1    TCCGAACTTTTGTAAATTTGGACGACTAGAGGAAGAAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTA 360
GQ2RP_PSP1.abl TCCGAACTTTTGTAAATTTGGACGACTAGAGGAAGAAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTA 140

Consensus      GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGCGTTTGAATGGTTGTTGCCATTTCTATCAAAATGT 420
AM075820.1    GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGCGTTTGAATGGTTGTTGCCATTTCTATCAAAATGT 420
GQ2RP_PSP1.abl GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGCGTTTGAATGGTTGTTGCCATTTCTATCAAAATGT 200

Consensus      GGATTGTCGGTTGCGCGAAGCGAGCGCGCGCGCGGTTCTTCTGGACCCCGCGCGCGCC 480
AM075820.1    GGATTGTCGGTTGCGCGAAGCGAGCGCGCGCGCGGTTCTTCTGGACCCCGCGCGCGCC 480
GQ2RP_PSP1.abl GGATTGTCGGTTGCGCGAAGCGAGCGCGCGCGCGGTTCTTCTGGACCCCGCGCGCGCC 260

Consensus      CATTGTTGCGAATTGKATCACACTTGGCTAAAAGTCKATTATTACAAAAACCAACACAAC 540
AM075820.1    CATTGTTGCGAATTGATCACACTTGGCTAAAAGTCKATTATTACAAAAACCAACACAAC 540
GQ2RP_PSP1.abl CATTGTTGCGAATTGATCACACTTGGCTAAAAGTCKATTATTACAAAAACCAACACAAC 320

Consensus      TCTYAGCAATGGATATCTTGGTTCCCACAACGATRAARAAMGYASCYAAATGCGATACGT 600
AM075820.1    TCTTAGCAATGGATATCTTGGTTCCCACAACGATGAAAGAACGTAACGAAATGCGATACGT 600
GQ2RP_PSP1.abl TCTTAGCAATGGATATCTTGGTTCCCACAACGATGAAAGAACGTAACGAAATGCGATACGT 380

Consensus      AATGCGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAAGTTGCGCTTTGAG 660
AM075820.1    AATGCGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAAGTTGCGCTTTGAG 660
GQ2RP_PSP1.abl AATGCGAATTGTTGAAATCTTGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAAGTTGCGCTTTGAG 440

```

Análisis filogenéticos

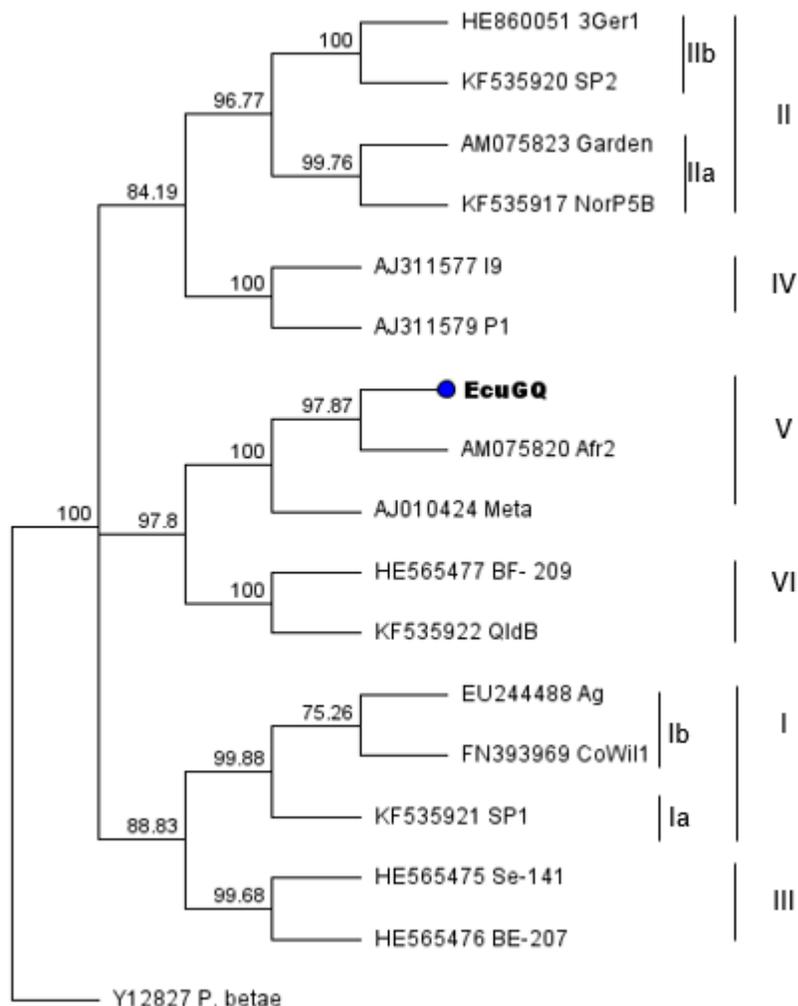
Con el fin de evaluar las relaciones filogenéticas entre todos los ribotipos o formas especiales, se analizaron las secuencias consenso de los fragmentos de PCR, para construir árboles filogenéticos se utilizó MEGA utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta. Las secuencias utilizadas para establecer identidades de secuencia y para análisis filogenético se detallan en la Tabla 7.

Tabla 7

Secuencias de ADNr de Polymyxa graminis L. utilizadas para establecer identidades de secuencia y para análisis filogenético.

Número de accesión	Nombre del aislado	Localización geográfica	Fuente del aislado
AJ311579	P1	Pakistan	Sorgo
AJ010424	Meta	Colombia	Arroz
AM075820	Afr2	Cote d'Ivoire	Arroz
AM075823	Garden	UK	Trigo
AJ311577	19	India	Sorgo
EU244488	Ag	Suiza	Desconocido
FN393969	CoWill	UK	Arabidopsis
HE565475	Se-141	Senegal	Desconocido
HE565476	BF-207	Burkina Faso	Sorgo
HE860051	3Gerl	Germania	Centeno
HE565477	BF-209	Burkina Faso	Sorgo
KF535917	NorP5B	Australia	Centeno
KF535919	NorP38	Australia	cebada
KF535920	SP2	Australia	Trigo
KF535921	SP1	Australia	Trigo
KF535922	QldB	Australia	Cebada
Y12827	F67 P. betae	Países bajos	Remolacha azucarera

Figura 14.

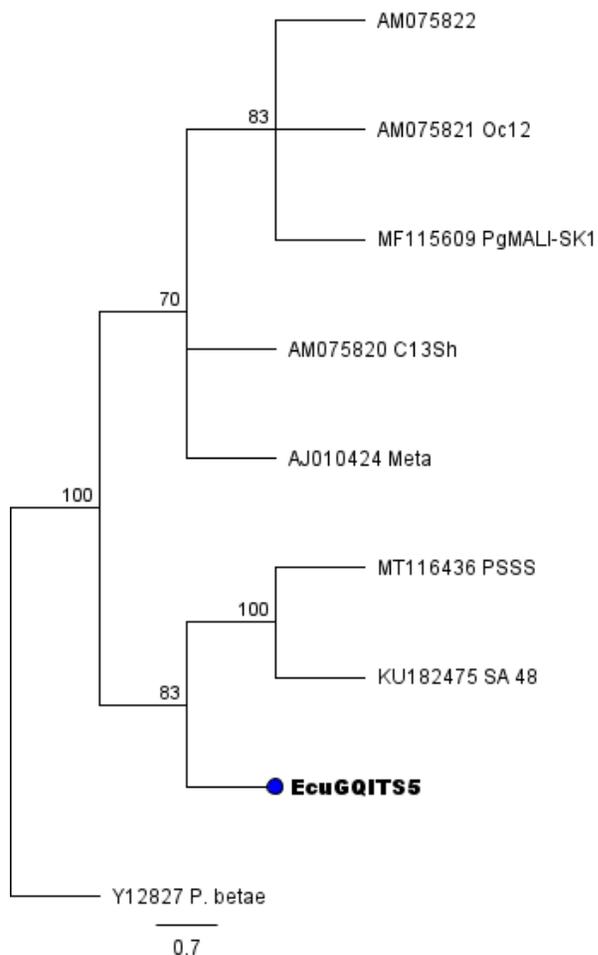
Árbol filogenético para *EcuGQ*

Nota: Árbol de relaciones de unión de vecinos para las secuencias de nucleótidos espaciadores transcritas internas del ADNr de 16 aislamientos de *Polymyxa graminis* L. de GenBank y una de este estudio (*EcuGQ*). Además, se incluye una secuencia de *Polymyxa betae* como grupo externo. Los detalles de las secuencias se dan en la Tabla 7. Las ramas de los árboles se arrancaron con 10.000 repeticiones (bootstraps). Los números en los nodos indican puntuaciones de arranque > 60%. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesto (Maximum Composite Likelihood) (Cox et al., 2014). La barra

de escala representa una distancia genética de 0.02 para la longitud de la rama horizontal. El árbol filogenético se generó utilizando el programa Geneious.

Figura 15.

Árbol filogenético para EcuGQITS5



Nota: Árbol de relaciones de unión de vecinos para las secuencias de nucleótidos espaciadores transcritas internas del ADNr de cinco aislamientos de *Polymyxa graminis* L., dos de *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* de GenBank y una del estudio (EcuGQITS5). Además, se incluye una secuencia de *Polymyxa betae* como grupo externo. Las ramas de los árboles se arrancaron con 10.000 repeticiones (bootstraps). Los números en los nodos indican

puntuaciones de arranque > 60%. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesto (Maximum Composite Likelihood) (Cox et al., 2014). La barra de escala representa una distancia genética de 0.7 para la longitud de la rama horizontal. El árbol filogenético se generó utilizando el programa Geneious.

Capítulo 5: Discusión

En este estudio se confirmó la presencia de *Polymyxa graminis* L. por primera vez en el Ecuador en la región Costa, provincia de los Ríos. Se detectó a *P. graminis* mediante PCR en raíces de 16 plantas de arroz cultivadas en suelos de dos localidades diferentes en condiciones de invernadero. La secuenciación del ADN ribosómico de las muestras de raíces reveló la presencia de aislado de *P. graminis* genéticamente distintos con una amplia diversidad de nucleótidos en sus regiones espaciadoras transcritas internas (Tyagi et al., 2016). El porcentaje de identidad es del 97.01% y 96.57% para las secuencias Afr2 y META respectivamente, correspondientes a aislados de arroz provenientes de Cote d'Ivoire y Colombia. El análisis filogenético con 14 secuencias del GenBank pertenecientes a otros ribotipos, más las dos secuencias propias del ribotipo V forma especial *colombiana*, produjeron árboles similares a los ya reportados por Cox et al., (2014), pero con la inclusión de la nueva secuencia que expone la diversidad de *P. graminis* dentro de un mismo ribotipo. En ambos árboles se pueden distinguir los clados con fuerte soporte de bootstrap, los clados del I a V corresponden a las cinco formas especiales reconocidas; el clado VI aún no reconocido, es el reportado por Cox et al., (2014). Los dos aislamientos con par de cebadores Psp1-Psp2rev e ITS5-Pxrev7 utilizados en investigaciones realizadas por Legreve et al., (2013) compartieron identidades de secuencia con los aislamientos de sp. *colombiana*. Sin embargo, la diferencia de nucleótidos entre la secuencia consenso (EcuGQ) y las reportadas en la base de datos con número de accesión AJ010424 y AM075820 es del 4% mostrando el alto grado de diversidad genética del *P. graminis*. Por otra parte, al realizar

el análisis filogenético para la secuencia del cebador ITS5-Pxrev7, aparte de *P. graminis* se incorpora *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* con un porcentaje de identidad del 91.4%. Esto se debe a que la secuenciación de la muestra se realizó para forward ITS5, el cual es un cebador no específico comúnmente utilizado en micología para estudiar el ADNr nuclear y en combinación con el cebador Pxrev7 híbrida con una parte del gen 5.8S específico para *Polymyxa* (Legrève et al., 2003). De tal manera se lo puede detectar con una longitud de fragmento amplificado entre 307 y 361 pb, como se visualiza en la electroforesis de la PCR (Figura 5 y Figura 7).

Capítulo 6: Conclusiones

Los productos amplificados de la PCR para Psp1-Psp2rev tienen un tamaño de banda entre 490 a 500 pb, mientras que para el cebador ITS5-Pxrev7 entre 307 a 361 pb.

Las secuencias de nucleótidos analizadas por bioinformática de los amplicones correspondieron a *Polymyxa graminis* L.

El análisis filogenético permitió determinar que las secuencias obtenidas difieren en nucleótidos con las secuencias reportadas de aislados de arroz en otras partes del mundo, por lo que se puede aseverar la diversidad genética de *Polymyxa graminis* L. dentro de un mismo ribotipo. La secuencia obtenida en el estudio se denominó EcuGQ que pertenece a la forma especial *colombiana* (ribotipo V).

Capítulo 7: Recomendaciones

Utilizar un mayor número de juego de cebadores para determinar la diversidad genética de *Polymyxa graminis* L. dentro de un mismo lugar geográfico.

Los análisis deben abarcar la distribución geográfica requerida para estudiar la diversidad genética de *Polymyxa graminis* L. dentro del país, debido a que solamente se estudió una provincia.

Bibliografía

- Beltramo, D., Berrío, V., Orozco, L., & Charry, R. (2010). Origen, taxonomía, anatomía y morfología de la planta de arroz (*Oryza sativa* L.). *International Center for Tropical Agriculture*.
- Bernis, J., & Pàmies, C. B. (2004). Variedades Y Mejora Del Arroz (*Oryza Sativa*, L.).
- Briones, G. (2014). Calidad de semilla de arroz en función de la incidencia y severidad de enfermedades en la zona de Daule. Obtenido de <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/4150/1/Tesis%20en%20arroz%20Guillermo%20Lupercio%20Briones%20Huac%C3%B3n.pdf>
- Cox, B., Luo, H., & Jones, R. (2014). *Polymyxa graminis* Isolates from Australia: Identification in Wheat Roots and Soil, Molecular Characterization, and Wide Genetic Diversity. *Plant Dis*, 98 (11): 1567-1575. doi: 10.1094 / PDIS-02-14-0128-RE.
- Díaz, F. (2018). Evaluación de cistosoros de *Polymyxa graminis* en el sistema radicular de cuatro genotipos de arroz. Obtenido de <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/29394/1/D%C3%ADaz%20Fiallos%20Fernando%20Alexander.pdf>
- Dieryck, B., Weyns, J., Doucet, D., Bragard, C., & Legrève, A. (2011). Acquisition and transmission of Peanut clump virus by *Polymyxa graminis* on cereal species. *Phytopathology*. doi:10.1094/PHYTO-12-10-0335.
- FAO. (2018). Seguimiento del mercado del arroz. Obtenido de <http://www.fao.org/economic/est/publicaciones/publicaciones-sobre-el-arroz/seguimiento-del-mercado-del-arroz-sma/es/>

- Fonseca, J., & Perez, E. (1997). Efecto de Aplicación de Estimulantes, Materia Orgánica y Fungicidas en el Daño Causado por el "Complejo Entorchamiento" del Arroz (*Oryza sativa* L.) Aguazu Casanare (Doctoral dissertation).
- INIAP. (2014). Arroz. Obtenido de <http://tecnologia.iniap.gob.ec/index.php/explore-2/mcereal/rarroz>
- Kanyuka, K., Ward, E., & Adams, M. (2003). *Polymyxa graminis* and the cereal viruses it transmits: a research challenge. *Molecular Plant Pathology*, 4 (5), 393-406.
- Ketta, H., Rysánek, P., & Zouhar, M. (2012). Detection of *Polymyxa graminis* in a Barley Crop in the Czech Republic. *Plant Protection Science*, (48), 65-71.
- Legréve, A., Delfosse, P., & Maraite, H. (2002). Phylogenetic analysis of *Polymyxa* species based on nuclear 5.8S and internal transcribed spacers ribosomal DNA sequences. *Mycological Society*. doi:10.1017/S0953756201005391
- Legréve, A., Delfosse, P., & Van Hese, V., Bragard, C., & Maraite, H. (2003). Broad-spectrum detection of *Polymyxa* specie and form species by polymerase chain reaction.
- Marys, E., & Carballo, O. (2007). Desarrollo de una herramienta de diagnóstico para el virus de la hoja blanca del arroz en Venezuela. *Interciencia*, 32(4), 262-265.
- Morales, F. (2001). El entorchamiento del arroz: un modelo para el manejo integrado de enfermedades virales. Obtenido de http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/flar/entorchamiento.pdf
- Paz, L. (2019). Entorchamiento del Arroz. INIAP.

Paz, L., Espinoza, A., & Amano, Y. (2009). El Virus del "Entorchamiento" del Arroz en el Ecuador.

Obtenido de [https://www.researchgate.net/profile/Lenin-Paz-](https://www.researchgate.net/profile/Lenin-Paz-2/publication/304123725_El_virus_del_entorchamiento_del_arroz_en_Ecuador/links/5767395708aedbc345f5f6c5/El-virus-del-entorchamiento-del-arroz-en-Ecuador.pdf)

[2/publication/304123725_El_virus_del_entorchamiento_del_arroz_en_Ecuador/links/5](https://www.researchgate.net/profile/Lenin-Paz-2/publication/304123725_El_virus_del_entorchamiento_del_arroz_en_Ecuador/links/5767395708aedbc345f5f6c5/El-virus-del-entorchamiento-del-arroz-en-Ecuador.pdf)

[767395708aedbc345f5f6c5/El-virus-del-entorchamiento-del-arroz-en-Ecuador.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Lenin-Paz-2/publication/304123725_El_virus_del_entorchamiento_del_arroz_en_Ecuador/links/5767395708aedbc345f5f6c5/El-virus-del-entorchamiento-del-arroz-en-Ecuador.pdf)

Pérez, H., & Rodríguez, I. (2019). Manejo integrado de los principales insectos-plaga que afectan al cultivo de arroz en el Ecuador.

Ramón, V., & Rodas, F. (2007). El control orgánico de plagas y enfermedades de los cultivos y la fertilización natural del suelo. Obtenido de

[https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/50791848/guia_contol_organico_plagas.pdf?148](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/50791848/guia_contol_organico_plagas.pdf?1481240375=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DEI_CONTROL_ORGANICO_DE_PLAGAS_Y_ENFERMEDAD.pdf&Expires=1621261270&Signature=I~CqBVdONfxRX7jsBl8-pzYpPXnLmkcFis7NdXGX)

[1240375=&response-content-](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/50791848/guia_contol_organico_plagas.pdf?1481240375=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DEI_CONTROL_ORGANICO_DE_PLAGAS_Y_ENFERMEDAD.pdf&Expires=1621261270&Signature=I~CqBVdONfxRX7jsBl8-pzYpPXnLmkcFis7NdXGX)

[disposition=inline%3B+filename%3DEI_CONTROL_ORGANICO_DE_PLAGAS_Y_ENFERME](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/50791848/guia_contol_organico_plagas.pdf?1481240375=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DEI_CONTROL_ORGANICO_DE_PLAGAS_Y_ENFERMEDAD.pdf&Expires=1621261270&Signature=I~CqBVdONfxRX7jsBl8-pzYpPXnLmkcFis7NdXGX)

[D.pdf&Expires=1621261270&Signature=I~CqBVdONfxRX7jsBl8-pzYpPXnLmkcFis7NdXGX](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/50791848/guia_contol_organico_plagas.pdf?1481240375=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DEI_CONTROL_ORGANICO_DE_PLAGAS_Y_ENFERMEDAD.pdf&Expires=1621261270&Signature=I~CqBVdONfxRX7jsBl8-pzYpPXnLmkcFis7NdXGX)

Ratti, C., Budge, G., Ward, L., Clover, G., Rubies-Autonell, C., & Henry, C. (2004). Detección y cuantificación relativa del virus del mosaico de cereales transmitidos por el suelo (SBCMV) y *Polymyxa graminis* en trigo de invierno mediante PCR en tiempo real (TaqMan®). *Revista de métodos virológicos*, 122 (1), 95-103.

Rodríguez, B. R. (2013). Efecto de la aplicación de siete niveles de extracto de algas marinas sobre las características agronómicas y rendimiento del cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.).

SIPA. (2020). Rendimientos de Arroz en cáscara. Obtenido de

http://sipa.agricultura.gob.ec/descargas/estudios/rendimientos/resultados_rendimientos_2020.pdf

- Smith, M., Adams, M., & Ward, E. (2013). Ribosomal DNA analyses reveal greater sequence variation in *Polymyxa* species than previously thought and indicate the possibility of new ribotype-host-virus associations. *Environ Microbiol*, 143-150.
doi:<https://doi.org/10.1111/1758-2229.12026>
- Solis, A. (2016). Alternativas biológicas para el manejo del complejo de manchado de grano en el cultivo de arroz en Babahoyo, provincia de los Ríos. Obtenido de <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/14862/1/TESIS%20JACQUELINE%20SOLIS.pdf>
- Thompson, J., Clewett, T., Jennings, R., Sheedy, J., Owen, K., & Persley, D. (2011). Detection of *Polymyxa graminis* in a barley crop in Australia. *Australasian Plant*, 40:66-75.
doi:10.1007/s13313-010-0015-9
- Tyagi, S., Sultana, R., Ju, H., Lee, W., Kim, K., Lee, B., & Lee, K. (2016). The Development of Simple Methods for the Maintenance and Quantification of *Polymyxa graminis*. *Revista india de microbiología*, 56 (4), 482–490. doi:<https://doi.org/10.1007/s12088-0>
- Vaïanopoulos, C., Bragard, C., Moreau, V., Maraite, H., & Legrève, A. (2007). Identification and Quantification of *Polymyxa graminis* f. sp. *temperata* and *P. graminis* f. sp. *tepida* on Barley and Wheat. *Plant Dis*. doi: 10.1094/PDIS-91-7-0857
- Ward, E., & Adams, M. (1998). Analysis of ribosomal DNA sequences of *Polymyxa* species and related fungi and the development of genus and species-specific PCR primers. *Mycol Res* 102:965–974. Obtenido de <https://doi.org/10.1017/S0953756297005881>
- Ward, E., Kanyuka, K., Motteram, J., Korniyukhin, D., & Adams, M. (2004). The use of conventional and quantitative real-time PCR assays for *Polymyxa graminis* to examine

host plant resistance, inoculum levels and intraspecific variation. *New Phytologist*.

doi:<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01291.x>

Xu, Y., Hu, L., Li, L., Zhang, Y., Sun, B., Meng, X., Chen, J. (2018). Ribotypes of *Polymyxa graminis* in Wheat Samples Infected with Soilborne Wheat Viruses in China. *Plant Dis*, 02(5):948-954. doi: 10.1094/PDIS-09-17-1394-R.