



Cebada
INIAP CAÑICAPA-2003

POTENCIAL IMPACTO DE LA ENFERMEDAD VIRAL DEL "ENTORCHAMIENTO" EN CEREALES EN ECUADOR

Boletín Técnico No. 192



EL NUEVO
ECUADOR

Instituto Nacional de
Investigaciones Agropecuarias



PRESIDENTE DE LA REPÚBLICA

Daniel Noboa Azín

MINISTRO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA

Danilo Palacio Márquez

DIRECTOR EJECUTIVO DEL INIAP

Raúl Jaramillo Velasteguí

DIRECTOR ESTACIÓN EXPERIMENTAL LITORAL SUR

Saúl Mestanza Velasco

AUTORES

Lenin Paz¹, Adeline Pinault², Nils Poulicard²

Eugénie Hébrard², Emma-Louise Jaffré², Roberto Celi¹

Anthony Valle¹, Carolina Panchana¹

1/ Investigadores de la Estación Experimental Litoral Sur (EELS) del INIAP

2/ Investigadores del Plant Health Institute Montpellier (PHIM) del Institut de Recherche pour le Développement (IRD)

COMITÉ DE PUBLICACIONES

Saúl Mestanza Velasco, Luis Peñaherrera Colina, Roberto Celi Herán

Byron Marín Arévalo, Lenin Paz Carrasco, Nils Poulicard

Eugénie Hébrard, Valeria Bolaños Zúñiga

FOTOGRAFÍAS

Banco Digital de Fotografías del Laboratorio de Fitopatología de la EELS del INIAP

DISEÑO

Unidad de Comunicación Social del INIAP

IMPRESIÓN

Gráfica S.I.J.A

Tiraje

1000 unidades

ISBN

Código 978-9942-22-601-3

CITA BIBLIOGRÁFICA DEL BOLETÍN TÉCNICO

Paz, L; Pinault, A; Poulicard, N; Hébrard, E; Jaffré, E-L; Celi, R; Valle, A; Panchana, C. 2024. Potencial impacto de la enfermedad viral del "entorchamiento" en cereales en Ecuador. Yaguachi, EC, Estación Experimental Litoral Sur. 10p. (Boletín Técnico No. 192)

PALABRAS CLAVES

Rice stripe necrosis virus, *Polymyxa graminis*, arroz, avena, cebada, trigo, región andina, análisis molecular, filogenia.

FIGURAS DE LA PORTADA

Síntoma de la enfermedad del "entorchamiento" en cebada

CRÉDITOS DE LAS FIGURAS

Figuras relacionadas a los síntomas de la enfermedad del entorchamiento en cereales / Laboratorio de Fitopatología de la Estación Experimental Litoral Sur del INIAP.

Figuras relacionadas de los componentes genómicos del RSNV, electroforesis y filogenia molecular en cereales / Plant Health Institute Montpellier (PHIM) del Institut de Recherche pour le Développement (IRD).

DISTRIBUCIÓN GRATUITA

PROHIBIDA SU VENTA

La reproducción parcial o total de esta publicación, en cualquier forma y por cualquier medio mecánico o electrónico, está permitida siempre y cuando sea autorizada por los editores y se cite correctamente a la fuente.



**EL NUEVO
ECUADOR**

Instituto Nacional de
Investigaciones Agropecuarias



AGRADECIMIENTO

Al Fondo de Investigación para la Agrobiodiversidad, Semillas y Agricultura Sustentable (FIASA) a través del proyecto FIASA-EELS-2022-009 por haber financiado la investigación en campo e invernadero de la enfermedad del “entorchamiento” e impresión de este Boletín Técnico de Divulgación Científica.

Al Proyecto DEVICE-in-CCC (ID 2202-216) financiado a través del Labex AGRO ANR-10-LABX-0001-01 en el marco de la University of Montpellier I - Site Framework, coordinado por AGROPOLIS FONDATION que financió la movilidad científica del investigador Lenin Paz Carrasco al Plant Health Institute Montpellier (PHIM) del Institut de Recherche pour le Développement (IRD) de la República de Francia y, la investigación relacionada a los aspectos moleculares y evolutivos de los virus en cereales de Ecuador en el contexto del cambio climático.

Al personal asistente del Programa de Arroz (Ing. Edison Mosquera) y del Laboratorio de Fitopatología (Sra. Mónica Puga y Sr. Lupercio Beltrán) de la Estación Experimental Litoral Sur por el apoyo a los trabajos de investigación que se ejecutaron en campo, invernadero y laboratorio.

ANTECEDENTES

El “entorchamiento” (retorcimiento) es una enfermedad causada por la especie viral *Rice stripe necrosis virus* (RSNV) del género *Benyvirus* transmitida biológicamente por el cercozo del suelo *Polymyxa graminis* (*P. graminis*) al cultivo del arroz.

En Ecuador, la enfermedad del “entorchamiento” fue reportada en el 2003 en plantaciones de arroz de la provincia de Los Ríos (Paz et al., 2009). En las Américas ha sido relatada en Colombia (Morales et al., 1999), Brasil (Maciel et al., 2006), Panamá (Lozano y Morales, 2009), Argentina (Maurino et al., 2018) y, en países del continente africano (Bagayoko et al., 2021) siendo en Costa de Marfil donde se dio el primer reporte a nivel mundial de esta enfermedad en el cultivo de arroz (Louvel y Bidaux, 1977).

Los genotipos de arroz evaluados en los ensayos experimentales en invernadero y campo por parte del Laboratorio de Fitopatología y por el Programa de Arroz de la Estación Experimental Litoral Sur (EELS) han expresado susceptibilidad genética al “entorchamiento”.

La incidencia de la enfermedad en condición de campo e invernadero es variable (Figura 1); una situación probable puede ser por la heterogénea presencia del *P. graminis* en el suelo para transmitir al RSNV a las plantas de arroz sanas.

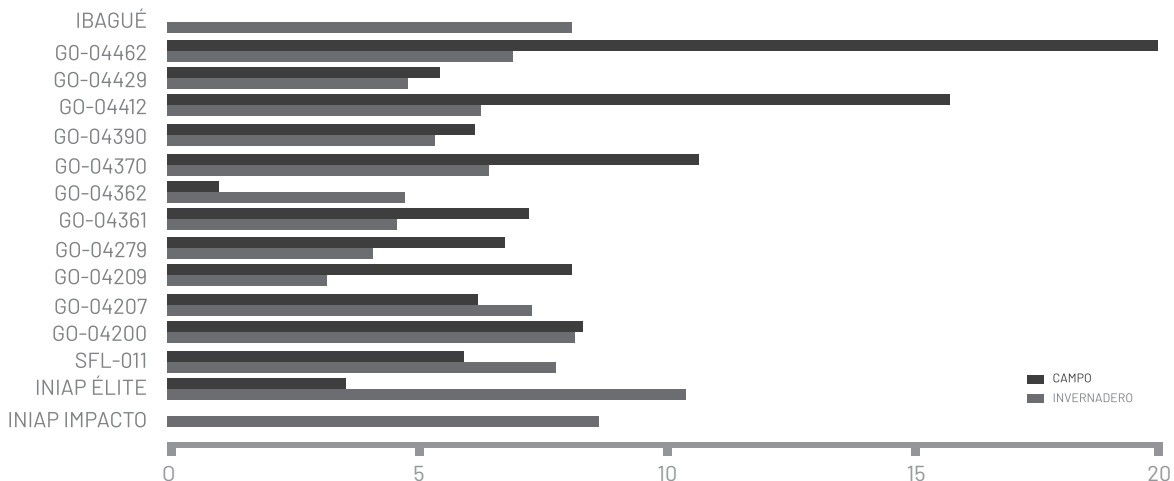


Figura 1. Incidencia (%) de la enfermedad del “entorchamiento” en genotipos de arroz evaluados en condiciones de campo e invernadero.

La pérdida de rendimiento por efecto de esta enfermedad puede fluctuar entre el 50 al 80 % (información interna del Laboratorio de Fitopatología de la EELS).

Dada la importancia económica de esta enfermedad, se ha propuesto estrategias para un adecuada gestión de manejo del *P. graminis* detallada en el Boletín Divulgativo No. 452 del INIAP (Paz y Celi, 2023) disponible en físico en la EELS y, en el repositorio institucional con acceso abierto en su plataforma digital (<http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/6052>).



Impacto del “entorchamiento” en los cereales

En la región andina del Ecuador los cereales como la avena (*Avena sativa* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.) y cebada (*Hordeum vulgare* L.) tienen amplia importancia social por ser cultivos básicos de la canasta familiar de los pequeños productores; además, por ser una fuente importante de nutrientes utilizados en la alimentación complementaria (Ponce et al., 2021).

De acuerdo con lo indicado, el Laboratorio de Fitopatología de la EELS realizó los experimentos exploratorios necesarios utilizando suelo natural de un ambiente donde se da la enfermedad del “entorchamiento” y ejecutados estos, en el invernadero.

El objetivo de esta investigación fue determinar la capacidad de la enfermedad del “entorchamiento” para afectar otros cereales como: la avena, cebada, y trigo. En el Cuadro 1 se detallan las diferentes especies y variedades que se utilizaron en este estudio.

Cuadro 1. Especies y variedades de cereales utilizados para evaluar la reacción genética a la enfermedad del “entorchamiento” en condiciones de invernadero.

Espece vegetal	Variedad
Arroz	INIAP - 14
Avena	INIAP - Fortaleza 2020 INIAP - 82
Cebada	INIAP - Alfa 2021 INIAP - Cañicapa 2003
Trigo	INIAP - Cojitambo 92 INIAP - Imbabura 2014

RESULTADOS

Se comprobó la susceptibilidad genética de los cereales a la enfermedad del “entorchamiento”. En el Cuadro 2 se especifica la información y datos de la enfermedad del “entorchamiento” para cada material genético que se evaluó.

Cuadro 2. Expresión fenotípica de la enfermedad del “entorchamiento” en especies y variedades de cereales.

Especie Vegetal	Variedad	Síntomas	Número de plantas con síntomas / Total de plantas evaluadas ^{1/}	% de incidencia de “entorchamiento”
Arroz	INIAP-14	Rayado clorótico de hoja, Abortamiento + Rayado clorótico de hoja, Deformidad de planta	6/66	9,09
Avena	INIAP-Fortaleza 2020	Reacción de hipersensibilidad ^{3/}	0/5	0,00
	INIAP-82	Reacción de hipersensibilidad ^{2/3/}	0/32	0,00
Cebada	INIAP-Alfa 2021	Abortamiento de hoja	2/72	2,78
	INIAP-Cañicapa 2023	Abortamiento de hoja	11/62	17,74
Trigo	INIAP-Cojitambo 92	Abortamiento + Rayado clorótico de hoja	1/42	2,38
	INIAP-Imbabura	Deformidad de planta	1/15	6,67

1/No hubo buena germinación de la semilla para los materiales considerados para esta investigación.

2/Positivo para RSNV por detección molecular.

3/La reacción de hipersensibilidad deberá ser investigada y su post expresión en las plantas con análisis moleculares que permitan determinar la infección por el RSNV.



Un material de arroz (en condición de invernadero) y una variedad comercial de arroz (en condición de campo) se los utilizaron como testigos susceptibles a esta enfermedad para la comparación de los síntomas con los otros cereales como se ilustran en la Figura 2 (a-i).



Figura 2. a: Arroz – GO 04370 (Testigo Susceptible Invernadero); b: Arroz (Testigo Susceptible Campo); c: Avena - INIAP 82; d: Avena - INIAP Fortaleza 2020; e: Cebada - Alfa 2021; f: Cebada - INIAP Nusta 2016; g: Cebada - INIAP Cañicapa 2003 h: Trigo - INIAP Cojitambo 92; i: Trigo - INIAP Imbabura 2014.

Identificación Molecular

Posteriormente, investigaciones que se llevaron en el PHIM del IRD se corroboró que la infección era causada por el RSNV. Para esto, se utilizaron procedimientos moleculares mediante la amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa); previo, a una retrotranscripción (RT-PCR) de los fragmentos genómicos pertenecientes al marco de lectura abierta [Open Reading Frame (ORF)] de la helicasa (Hel)[presente en el componente ARN 1] y de la proteína 1 del Triple Bloque Genético (TGB-p1)[presente en el componente ARN 2](Figura 3).

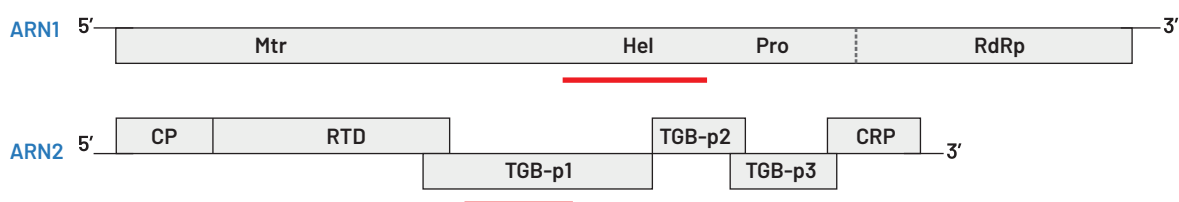


Figura 3. Organización del genoma de los ARN 1 y 2 del RSNV [Mtr: metil transferasa; Hel: Helicasa; Pro: Proteasa; RdRp: ARN polimerasa dependiente del ARN; CP: Cápsido; RTD: dominio de translectura; TGB-p1,2,3: proteína de triple bloque genético; CRP: proteína rica en cisteína]. Los fragmentos genómicos amplificados por RT-PCR se encuentran señalados con línea roja.

En la Figura 4 se demuestra la amplificación específica por RT-PCR de 652 pb del componente ARN 2 del RSNV previo a una RT-PCR (los productos amplificados fueron validados por secuenciación Sanger).

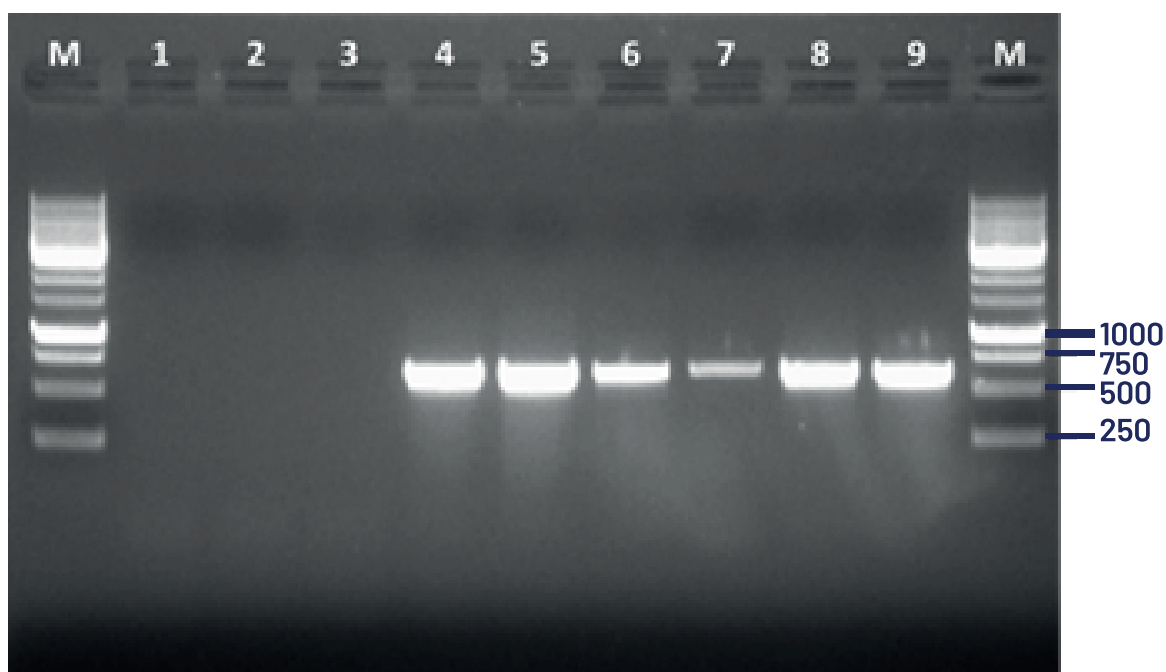


Figura 4. Fragmentos amplificados del RSNV por PCR migrados en gel de agarosa al 1%, usando la siguiente plantilla de ADNc: 1. Control Negativo de PCR; 2: Control Negativo de RT-PCR; 3: Arroz Sano; 4: Arroz con "entorchamiento" campo; 5: Arroz G04370 con "entorchamiento" invernadero; 6: Arroz Oryzica 1 con "entorchamiento" invernadero; 7: Avena - INIAP 82; 8: Cebada - INIAP Guaranga; 9: Trigo-INIAP Imbabura; M: Marcador Molecular 1kb.



Filogenia Molecular

Mediante comparación con las secuencias genéticas de los aislados del RSNV de diferentes áreas geográficas donde ha sido reportado la enfermedad del “entorchamiento” (Argentina, Benín, Brasil, Burkina Faso, Colombia, Mali); la filogenia molecular (Figura 5) determinó que los aislados del RSNV de Ecuador de arroz y de los otros cereales se relacionaron genéticamente entre ellos y con el aislado del RSNV de Colombia.

En el Cuadro 3 se detalla el origen de la secuencia genética que se utilizaron para la corrida del árbol filogenético molecular.

Cuadro 3. Secuencias genómicas de RSNV de diferentes regiones geográficas utilizados para construir el árbol filogenético.

País	Fecha*	Código del Aislado	Número de Acceso de Genbank
Argentina	2017	Cor4	MG792545
Argentina	2017	STFe5	MG792546
Argentina	2017	STFe10.1	MG792544
Brasil	2019	UFT/2019	MT027255
Benin	2013	Be1	KP099623.1
Burkina Faso	2016	BF-VK1	MF115599.1
Burkina Faso	2016	BF-K1	MF115600
Colombia	2007	Col	EU099845
Colombia	2008	Col	NC038775.1
Mali	2016	M2-1	MK170453
Mali	2016	M1-1	MK170452
Mali	2016	Mali-SK1	MF115602
Mali	2016	Mali-l1	MF115603
Mali	2016	Mali-B1	MF115601
Sierra Leona	2019	SL254	MW187592

*Fecha de registro en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

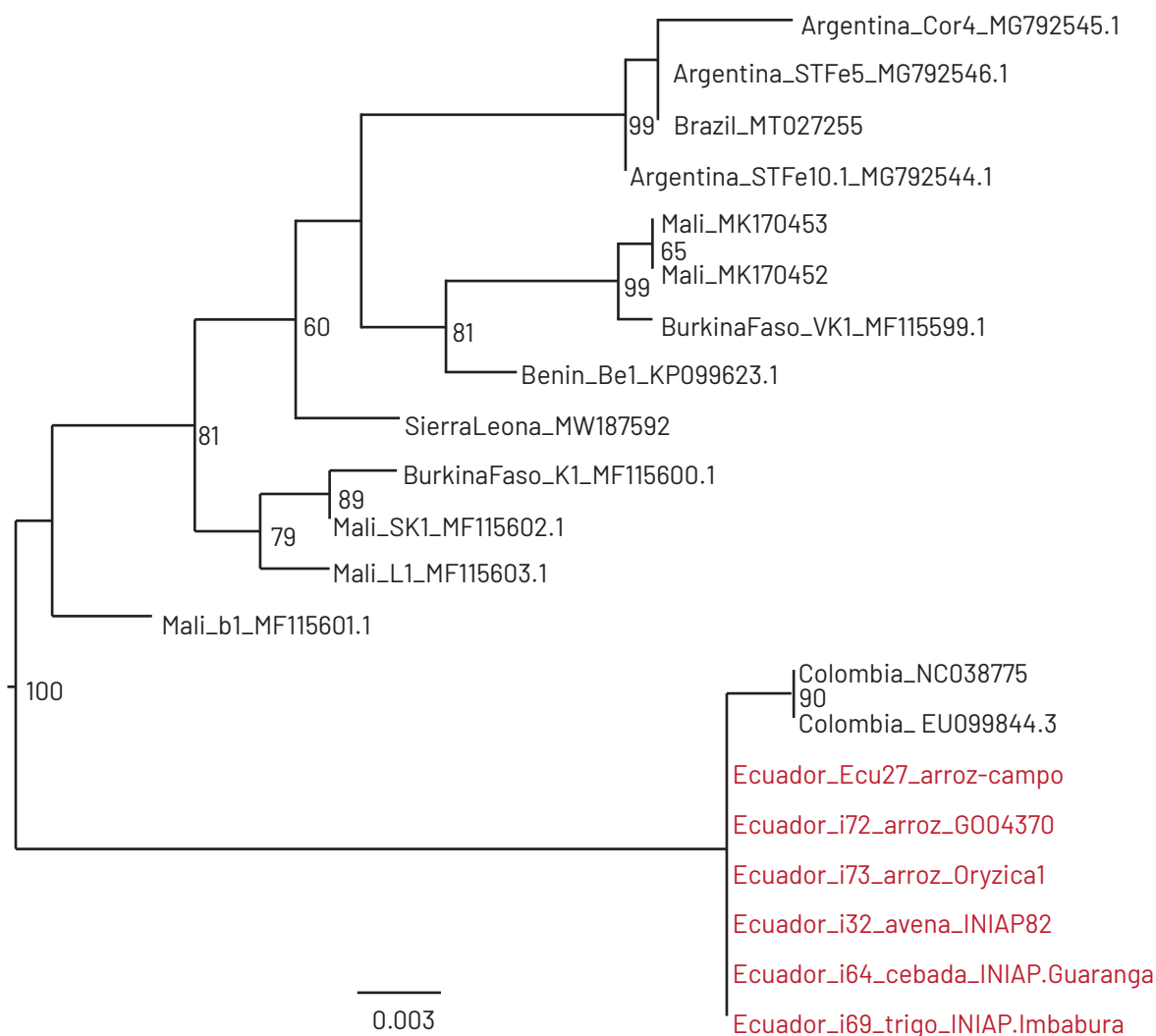


Figura 5. Árbol filogenético molecular reconstruido con las secuencias del gen de la helicasa (Hel, ARN 1) de los aislados del RSNV de Ecuador obtenidos de arroz, avena, cebada y trigo (en rojo) y los aislados de otras regiones geográficas donde se presenta la enfermedad del “entorchamiento”. PHIM-IRD; EELS-INIAP, 2024.



CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados evidencian la capacidad que tiene el RSNV para afectar otros cereales comestibles de importancia social y económica después del arroz. Ante esta situación, el personal de investigadores del Laboratorio de Fitopatología, Programa de Arroz de la EELS, Programa de Cereales de la Estación Experimental Santa Catalina (EESC) del INIAP y del PHIM-IRD iniciarán los estudios pertinentes para esclarecer la interacción del RSNV sobre las otras especies de cereales. Así mismo, identificar genotipos de cereales resistentes al RSNV en condiciones controladas de infección.

En otro aspecto, la enfermedad del “entorchamiento” deberá ser monitoreada en todos los ámbitos geográficos donde se da la siembra de cereales en Ecuador; tomando como guía de reconocimiento de síntomas los que se describen en este Boletín Técnico y, en otras informaciones técnicas disponibles en el repositorio institucional del INIAP.

De igual manera, la infección del RSNV en plantas de cereales sospechosas con esta enfermedad del “entorchamiento” debe ser corroborada por procedimientos moleculares como se lo ha descrito en este documento técnico.

LITERATURA CITADA

Bagayoko, I; Celli, MG; Romay, G; Poulicard, N; Pinel-Galzi, A; Julian, C; Filloux, D; Roumagnac, P; Sérémé, D; Bragard, C; Hébrard, E. 2021. Genetic diversity of *Rice stripe necrosis virus* and new insights into evolution of the genus *Benyvirus*. *Viruses* 13:737

Louvel, D; Bidaux, J-M. 1977. Observation de nouveaux symptômes pathologiques sur des variétés précoces de riz en Côte-d'Ivoire. 32:257-265

Lozano, I; Morales, F. 2009. Molecular characterisation of *Rice stripe necrosis virus* as a new species of the genus *Benyvirus*. *European Journal of Plant Pathology* 124:673-680

Maciel, JLN; de Moraes, MG; Almança, MAK; Matsumura, ATS; Falcade, JH. 2006. Ocorrência do vírus *Rice stripe necrosis virus* em lavouras de arroz do Rio Grande do Sul. *Fitopatologia Brasileira* 31(2):209

Maurino, MF; Giménez, M d.I.P; Kruger, RD; Cúndom, MA; Gutierrez, SA; Celli, MG. 2018. First report of *Rice stripe necrosis virus* in Argentina. *Crop Protection* 114:143-147

Morales, FJ; Ward, E; Castaño, M; Arroyave, JA; Lozano, I; Adams, MJ. 1999. Emergence and partial characterization of rice stripe necrosis virus and its fungus in South America. *European Journal of Plant Pathology* 105:643-650

Paz, L; Espinoza, A; Amano, Y. 2009. El Virus del "Entorchamiento" del Arroz en Ecuador. Yaguachi, EC, Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental del Litoral Sur "Dr. Enrique Ampuero Pareja". 8 p. (Boletín Divulgativo No. 363)

Paz, L; Celi, R. 2023. *Polymyxa graminis*, vector del *Rice stripe necrosis virus*: su impacto y estrategia de manejo en el cultivo de arroz. Yaguachi, EC, Estación Experimental Litoral Sur. p. 10 (Boletín Divulgativo No. 452)

Ponce-Molina, L; Garófalo, J; Noroña, P; Campaña, D. 2021. Actividades de investigación en cereales año 2020. Boletín Técnico No. 181. INIAP. Quito, Ecuador. 74 p.

Zaha, A; Bunselmeyer Ferreira, H; Passaglia, LMP. 2012. *Biología Molecular Básica*. 4ta. Edición. Porto Alegre. Artmed Editora Ltda. Brasil. 403 p.



GLOSARIO DE TÉRMINOS

ADN (Ácido Desoxirribonucleico): Polímero compuesto por unidades de desoxirribonucleótidos.

ADN complementario (ADNc): ADN sintetizado a partir de una plantilla o molde del ARN mediante una reacción catalizada por la enzima transcriptasa reversa.

Amplicón: Secuencia del ADN generada como resultado de la amplificación durante la PCR.

Amplificación: Proceso mediante el cual se incrementa la cantidad del ADN a partir de una pequeña cantidad de material genético.

ARN (Ácido Ribonucleico): Molécula que contiene la información genética necesaria para la síntesis de proteínas en los virus y organismos vivos.

Control positivo y negativo de la PCR: En los ensayos de retrotranscripción y PCR, se utilizan controles positivos para confirmar que la reacción funciona correctamente y controles negativos para asegurar que no haya contaminación.

Genoma viral: Conjunto completo de material genético (ADN o ARN) de un virus, que contiene la información necesaria para la replicación y la producción de nuevas partículas virales.

Genotipo: Conjunto de genes o variantes genéticas que determinan las características específicas de un organismo o individuo.

Marco de lectura abierta o "Open Reading Frame" (ORF): Secuencia del ADN que tiene el potencial de ser transcrita y traducida en una proteína.

Polimerasa: Enzima que cataliza la síntesis de nuevas cadenas del ADN. En PCR, se utiliza una polimerasa termoestable, como la Taq polimerasa, que puede soportar las altas temperaturas del ciclo de amplificación.

Primers (oligonucleótido iniciador, iniciador o cebador): Secuencias cortas del ADN (15 a 30 nucleótidos) que se unen a regiones específicas del ADNc durante la PCR. Sirve como iniciador para la reacción de la polimerización de una cadena del ADN.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Técnica utilizada para amplificar segmentos específicos del ADN. En combinación con la retrotranscripción, permite la detección del ARN viral.

Secuencia genómica: Es la secuencia lineal de nucleótidos que constituye el genoma de un organismo, ya sea en forma de ADN o ARN.

Secuenciación: Técnica que determina la secuencia exacta de nucleótidos en un fragmento del ADN. Ayuda a identificar al virus y sus variantes a nivel molecular al comparar con la base de datos públicos.

Transcriptasa reversa: Enzimas con función de ADN polimerasa ARN dependiente que son codificadas por genes de retrovirus o de retrotransposones. El proceso de síntesis mediado por la transcriptasa reversa es el inverso del proceso de la transcripción normal, en la cual, el ARN es sintetizado a partir de un molde del ADN.

ISBN: 978-9942-22-601-3



F^lASA

FONDO DE INVESTIGACIÓN PARA LA
AGROBIODIVERSIDAD, SEMILLAS Y
AGRICULTURA SUSTENTABLE



EL NUEVO
ECUADOR

Instituto Nacional de
Investigaciones Agropecuarias



@iniapecuador



@iniapec



@iniapecuador

www.iniap.gov.ec