

***Escuela Superior Politécnica del Litoral***



***Facultad de Ciencias de la Vida***

*Título del trabajo*

***Diagnóstico y variabilidad genética del virus de la hoja blanca en  
plantaciones arroceras de la provincia del Guayas***

***VIDA-458***

***Proyecto Integrador***

*Previo a la obtención del Título de:*

***Ingeniero Agrícola y Biológico***

*Presentado por:*

*Pedro Andrés Toscano Gómez*

*Guayaquil - Ecuador*

*Año: 2025*

## Dedicatoria

---

Dedico el presente proyecto a mis padres, quienes han sido los pilares fundamentales de mi vida. Su paciencia, esfuerzo y consejos constantes me han permitido alcanzar este sueño académico.

A mi hermana, por ser mi apoyo emocional incondicional durante esta etapa y acompañarme en los momentos más difíciles.

A mi hermano Andrés Paúl y a mi tía Alexandra Gómez, quienes, aunque ya no están físicamente conmigo, han sido una presencia permanente desde el cielo y una fuente constante de fortaleza y motivación.

## Agradecimiento

---

Agradezco profundamente a mi madre, Nelly Gómez, y a mi padre, Pedro Toscano, por su apoyo incondicional y confianza, que me permitieron llegar hasta donde estoy hoy. A mi hermana, Ericka Toscano, por su apoyo constante y por estar presente en cada momento difícil de este proceso.

A Stefhanny Suárez, por su amistad, acompañamiento y apoyo durante esta etapa.

A la Escuela Superior Politécnica del Litoral, por las oportunidades académicas brindadas a lo largo de mi formación profesional. Al equipo de Agrocalidad, por la colaboración y apoyo técnico que hicieron posible la ejecución de este proyecto.

De manera especial, a mi tutor, Ph.D. Diego Quito, por su guía, enseñanzas y valiosos consejos durante el desarrollo de este trabajo.

Asimismo, agradezco a todo el equipo del Laboratorio de Virología Molecular por su apoyo y disposición a lo largo de todo el proceso experimental.

## Declaración Expresa

---

Yo Pedro Andrés Toscano Gómez acuerdo y reconozco que:

La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor o autores, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor o autores.

La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por mí/nosotros durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me/nos corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi/nuestra innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique al/los autor/es que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 17 de octubre del 2025.

Pedro Andrés Toscano Gómez

## **Evaluadores**

---

**PhD. María Isabelita Jiménez Feijoó**

Profesor de Materia

---

**PhD. Diego Fernando Quito Avila**

Tutor de proyecto

## Resumen

El virus de la hoja blanca del arroz (RHBV) representa una de las principales amenazas fitosanitarias para la producción arroceras del Ecuador, afectando el rendimiento y la calidad del cultivo. El presente proyecto tuvo como objetivo realizar un protocolo de diagnóstico molecular para el RHBV y analizar su variabilidad genética al igual que su distribución geográfica, en respuesta a la creciente presencia del insecto vector responsable de su transmisión. El estudio se desarrolló mediante la recolección de muestras foliares, extracción de ARN, amplificación de fragmentos específicos del virus por medio de RT-PCR y secuenciación Sanger.

Los resultados evidenciaron una distribución heterogénea del RHBV entre los diferentes cantones muestreados, así como una baja variabilidad genética entre los aislados nacionales y las secuencias internacionales. En conclusión, el protocolo de diagnóstico resultó ser eficiente debido a su amplificación por los fragmentos genómicos conservados, siendo una herramienta eficaz y precisa para su detección temprana.

**Palabras Clave:** diagnóstico molecular, RT-PCR, filogenia, arroz.

## ***Abstract***

*The rice hoja blanca virus (RHBV) represents one of the main phytosanitary threats to rice production in Ecuador, affecting both crop yield and quality. This project aimed to develop a molecular diagnostic protocol for RHBV and to analyze its genetic variability as well as its geographic distribution, in response to the increasing presence of the insect vector responsible for its transmission. The study was conducted through the collection of leaf samples, RNA extraction, amplification of specific viral fragments by RT-PCR, and Sanger sequencing. The results revealed a heterogeneous distribution of RHBV among the different sampled cantons, as well as low genetic variability between national isolates and international sequences. In conclusion, the diagnostic protocol proved to be efficient due to the amplification of conserved genomic fragments, making it an effective and accurate tool for early detection.*

***Keywords:*** *molecular diagnosis, RT-PCR, phylogeny, rice.*

## Índice General

Resumen.....	I
<i>Abstract</i> .....	II
Índice General.....	III
Abreviaturas.....	V
Simbología.....	VI
Índice de figuras.....	VII
Índice de tablas.....	VII
Capítulo 1.....	1
1.1 Introducción.....	2
1.2 Descripción del Problema.....	4
1.3 Justificación del Problema.....	5
1.4 Objetivos.....	6
1.4.1 <i>Objetivo general</i> .....	6
1.4.2 <i>Objetivos específicos</i> .....	6
1.5 Marco teórico.....	6
1.5.1 <i>Bases biológicas del cultivo de arroz</i> .....	6
1.5.2 <i>Virus de la hoja blanca (RHBV)</i> .....	7
1.5.3 <i>Métodos de detección</i> .....	8
1.5.4 <i>Detección de RHBV</i> .....	10
1.5.5 <i>Secuenciación Sanger</i> .....	11
1.5.6 <i>Filogenia en virus</i> .....	12
Capítulo 2.....	13
2. Metodología.....	14
2.1 Distribución espacial.....	15
2.2 Desarrollo de protocolo.....	16
2.2.1 <i>Extracción de ARN</i> .....	16

2.2.2 RT-PCR protocolo.....	17
2.3 Análisis filogenético.....	19
2.3.1 PCR RHBV.....	19
2.3.2 Purificación de las bandas .....	19
2.3.3 Análisis bioinformático .....	21
Capítulo 3.....	23
3. Resultados y análisis.....	24
3.1 Distribución espacial .....	24
3.2 Validación del protocolo.....	26
3.3 Análisis filogenético.....	29
3.3.1 Segmento 4.....	29
3.3.2 Segmento 3.....	32
Capítulo 4.....	34
4.1 Conclusiones y recomendaciones.....	35
4.1.1 Conclusiones.....	35
4.1.2 Recomendaciones.....	36
Referencias.....	37

## Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
BLASTn	Basic Local Alignment Search Tool (nucleótidos)
DDS	Días después de la siembra
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
GC	Guanina – Citosina
HBD	Hoja Blanca Disease
ML	Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NS3	Proteína no estructural 3
NS4	Proteína no estructural 4
PCR	Polymerase Chain Reaction
RPM	Revoluciones por minuto
RHBV	Rice Hoja Blanca Virus
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

## Simbología

%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
bp / pb	Pares de bases
kb	Kilobase
kg	Kilogramo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
t/ha	Toneladas por hectárea
µg	Microgramo

## Índice de figuras

Figura 1 <i>Flujograma de la metodología.</i> .....	14
Figura 2 <i>PCR con muestras duplicadas.</i> .....	20
Figura 3 <i>Electroforesis en gel de agarosa de los segmentos purificados.</i> .....	21
Figura 4 <i>Distancias filogenéticas de los distintos aislados.</i> .....	22
Figura 5 <i>Distribución espacial de los cantones muestreados en las provincias de Guayas y Los Ríos</i> .....	24
Figura 6 <i>Resultados de validación en gel de electroforesis.</i> .....	27
Figura 7 <i>Muestras asintomáticas de RHBV.</i> .....	28
Figura 8 <i>Comparación de los resultados de amplificación por RT-PCR de los segmentos ARN3 y ARN4 del RHBV</i> .....	29
Figura 9 <i>Árbol filogenético de secuencia 4 de RHBV.</i> .....	31
Figura 10 <i>Árbol filogenético de secuencia 3 de RHBV.</i> .....	32

## Índice de tablas

Tabla 1 <i>Sitios muestreados en la provincia de Guayas y Los Ríos</i> .....	15
Tabla 2 <i>Resultados del nanodrop</i> .....	26
Tabla 3 <i>Aislados de ARN3 y ARN4 utilizados para este trabajo.</i> .....	33

# Capítulo 1

## 1.1 Introducción

El arroz es un cultivo estratégico para la seguridad alimentaria del Ecuador, asimismo es parte de la dieta para millones de familias y es el pilar económico para miles de agricultores de la región costa, siendo uno de los cinco cultivos con mayor relevancia en Ecuador, donde aproximadamente el 95 % de la producción nacional proviene de las provincias del Guayas (76%) y Los Ríos (19%) con 225.001 y 80.169 hectáreas de superficie sembrada, con una producción de 5,76 y 4,14 t/ha respectivamente en el año 2021 (Lombeida García et al., 2022).

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Ecuador se encuentra en el puesto 26 a nivel mundial en producción de arroz, siendo además de los países con mayor consumo de este cereal dentro de la Comunidad Andina, contando con un consumo per cápita de aproximadamente 48 kg por persona (Pérez et al., 2018).

El arroz es un pilar económico para el Ecuador, ya que en 2021 contribuyó con 3,9 % al Valor Agregado Bruto agropecuario y generó exportaciones por 10 millones de dólares, desempeñándose como un producto estratégico para la economía nacional. Además de generar empleo para más de 70 000 personas, de las cuales el 71 % son personas productoras, evidenciándose su importancia a nivel rural (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2021).

El arroz es una gramínea que crece en climas húmedos y cálidos, siendo ambientes idóneos para la propagación de agentes bióticos responsables de enfermedades -virus, bacterias y hongos-, influyendo en el rendimiento del cultivo, causando pérdidas de rendimiento que superan el 34 %. Entre las principales enfermedades se encuentran: el manchado del grano causado por bacterias *Pseudomonas fuscovaginae*, la pudrición de la vaina asociado con el hongo *Sarocladium oryzae* y el virus de la hoja blanca (Pérez et al., 2018).

Además de estos patógenos se encuentra la sogata (*Tagosodes orizicolus*), un insecto de la familia Delphacidae que se ha convertido en una amenaza latente para los productores de arroz, al ser transmisor del virus de la hoja blanca del arroz (RHBV, por su abreviación en

inglés). Su expansión a las provincias de Los Ríos y Guayas ha llevado al Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP), la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario (Agrocalidad) y el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) a considerarlo una amenaza seria para la producción nacional (Rivera, 2025).

Para controlar su incidencia, las autoridades nacionales, a través de sus agencias competentes, entregaron 4.683 paquetes tecnológicos con insumos fitosanitarios y de nutrición a productores de arroz en Guayas y Los Ríos. Los insecticidas de los paquetes tecnológicos ayudan a reducir y a controlar la sogata, además de eso, los productores de arroz recibieron 11.733 asistencias técnicas entre los meses de enero y agosto, beneficiando a 2.972 productores de arroz; manteniendo presencia en el territorio brindando capacitaciones enfocadas en causas y manejo de la plaga, buenas prácticas agrícolas, uso de semillas certificadas y manejo responsable de plaguicidas (Redacción Enfoque, 2025).

Sin embargo, el *RHBV* continúa afectando el rendimiento del cultivo a pesar de las medidas tomadas. Siendo esta una enfermedad cíclica, que puede ocasionar pérdidas de rendimiento entre el 25% y 75% dependiendo de la variedad de arroz y la etapa fenológica en la que ocurre la infección (Pedrozo et al., 2025).

Debido a esto, son necesarias las medidas de detección previa, en la cual una de las más seguras y necesarias son las de diagnóstico molecular y análisis genético del *RHBV*, siendo un método que identifica su presencia de manera confiable y permite conocer las variantes genómicas que circulan en el país. Al momento, la falta de información actualizada sobre este patógeno y sus variantes representa una limitante para el desarrollo de estrategias efectivas y sostenibles.

Por ello, este estudio presenta un protocolo para diagnóstico y caracterización molecular del *RHBV* en plantaciones arroceras de la provincia del Guayas, con el fin de generar

información que contribuya a la sanidad vegetal, incremento en la productividad y a la seguridad alimentaria del país.

## **1.2 Descripción del Problema**

Según datos del Banco Central del Ecuador, el arroz aporta aproximadamente 2% al Valor Agregado Bruto Agropecuario, generando una fuente de empleo para más de 75.000 personas (González, 2025). En este contexto, la provincia del Guayas se posiciona como la principal zona productora de arroz del país. En el año 2024, considerando los tres ciclos productivos anuales, registró una superficie cultivada de 225.403 hectáreas, alcanzando un rendimiento promedio de 5.89 t/ha (SIPA, 2025).

Según datos oficiales, en la provincia de Los Ríos, en el cantón Babahoyo se realizó 176 visitas técnicas a productores de arroz (1.678,90 hectáreas) y se determinó la presencia de la plaga en 854,44 hectáreas. En la provincia del Guayas, se visitó 40 sitios de producción en los cantones de Alfredo Baquerizo Moreno, Daule, Naranjal, El Triunfo, Santa Lucía y Samborondón, cubriendo 1.115,53 hectáreas; de las cuales 1,41 hectáreas se detectó la presencia de la plaga. Esto habilita la posibilidad de que este año no exista excedente de grano para exportar; sin embargo, habría lo suficiente para consumo nacional (Zambrano, 2025).

El periodo promedio de incubación del virus en el insecto vector es de 20 a 22 días; una vez infectada, la planta de arroz tiene un periodo de incubación de 6 a 12 días, donde aparecen los primeros síntomas: las hojas tornan a un color amarillento, con estrías o rayas cloróticas que se fusionan y forman machas blancas o amarillas a lo largo de la lámina. En la panícula se forman glumas amarillentas o con manchas marrones, deformándose el raquis y los granos, otros síntomas también son enanismo, clorosis, esterilidad y menor macollamiento. En etapas tempranas de infección se observa muerte prematura de plántulas dentro de los 15 días después de la emergencia (Medina, 2021).

Debido a este problema, el MAGAP, Agrocalidad y el INIAP informaron sobre el plan de acción para combatir la plaga sogata (*Tagosodes orizicolus*) en los cultivos de arroz de Guayas y Los Ríos, debido a su rápida expansión y afectación, ya que este insecto se alimenta de la savia de las plantas y es el vector del virus de la hoja blanca (RHBV). Dichas instituciones remarcan que estas afectaciones se han dado por el uso de semillas no certificadas y el mal manejo de agroquímicos, incrementando la presencia de plagas. A pesar de esto, aún no se conocen cifras exactas sobre el nivel de los daños (Redacción La Hora, 2025).

### **1.3 Justificación del Problema**

La producción de arroz en la provincia del Guayas es un pilar fundamental para la economía y seguridad alimentaria del país. Sin embargo, en el último año se han reportado afectaciones importantes asociadas a la sogata (*Tagosodes orizicolus*) y al virus que transmite RHBV, lo que ha generado pérdidas de rendimiento y disminución en la calidad del grano. Aunque existen acciones por parte del MAGAP, Agrocalidad e INIAP, orientadas al control del vector, la información científica sobre la presencia y características genéticas del virus en la provincia es limitada.

El desarrollo de un protocolo para la detección del virus es primordial para identificar el virus con total seguridad, a pesar de que existen métodos de detección indirectos, las infecciones por parte de RHBV puede desarrollarse de forma asintomáticas o con baja expresión sintomática, hasta una enfermedad severa, llevando a la muerte de la planta (Morales & Jennings, 2010). Por ello resulta necesario un método para confirmar su presencia y caracterizar su variantes genéticas en la provincia de Guayas.

Este trabajo aporta al fortalecimiento de la vigilancia fitosanitaria mediante la implementación de un protocolo de diagnóstico y análisis molecular del RHBV, generando información que puede ser utilizada por instituciones y centros de investigación; además de otros

país que estén enfrentando problemas similares. De esta forma, los resultados servirán como base para mejorar las prácticas de prevención y manejo del cultivo.

## **1.4 Objetivos**

### ***1.4.1 Objetivo general***

- Determinar la presencia del virus de la hoja blanca en plantaciones arroceras del Guayas mediante técnicas moleculares, para su uso en la implementación de medidas de manejo.

### ***1.4.2 Objetivos específicos***

1. Determinar la distribución y prevalencia del virus de la hoja blanca (RHBV) en plantaciones arroceras de la provincia del Guayas mediante la georreferenciación de las muestras positivas.
2. Desarrollar un protocolo molecular basado en la técnica de RT-PCR para la detección del virus de la hoja blanca del arroz (RHBV) en muestras foliares.
3. Determinar la variabilidad genética del virus mediante secuenciación y filogenia de fragmentos genómicos del virus.

## **1.5 Marco teórico**

### ***1.5.1 Bases biológicas del cultivo de arroz***

Para determinar el estado fenológico del arroz se han diseñado diversos sistemas, entre los cuales, el número de hojas en el tallo es el más usado, siendo estos estados determinantes para realizar labores al cultivo con el fin de aumentar el rendimiento; para determinar el estado fenológico del cultivo en fase de crecimiento se divide en 3 etapas: la primera va desde la siembra hasta la emergencia de la plántula, la segunda es hasta la aparición de la hoja bandera - siendo está a partir de las 13 hojas verdaderas- y la última, desde la diferenciación de la panícula hasta la madurez fisiológica; identificando estas etapas por la terminología S, V y R, respectivamente (Velázquez et al., 2015).

El arroz necesita una temperatura entre 30 y 35°C para la germinación, después de esto requiere temperatura óptima de 23°C para el desarrollo de tallo, hojas y raíces. Las temperaturas extremas o temperaturas críticas causan perturbaciones a la planta lo que provoca que no pueda completarse su desarrollo. Estas temperaturas son por debajo de 20 °C y por encima de 30 °C, y el cultivo requiere precipitaciones anuales de 800 a 1.200 mm (Ruilova et al., 2022).

Las principales variedades de arroz cultivadas en Ecuador son INIAP 11, INIAP 14 (Filipino), INIAP 15 (Boliche), INIAP 16, INIAP 17, INIAP 18 e INIAP-FL-0. Dentro de ellas, INIAP 11, 14, 16, 17, 18 y FL-0 presentan moderada resistencia al virus de la hoja blanca, mientras que INIAP 15 solo muestra tolerancia (Quiroz Camacho, 2020).

### ***1.5.2 Virus de la hoja blanca (RHBV)***

La hoja blanca del arroz (HBD), es una enfermedad del arroz causada por el virus conocido como *Rice Hoja Blanca Virus* (RHBV), el cual es transmitido por el insecto *Tagosodes orizicolus* (Sogata). Durante la alimentación de una planta infectada los viriones ingresan por el estilete del insecto, para abrirse paso y atravesar la barrera intestinal hacia la hemolinfa, proceso tarda alrededor de 12 horas, tras lo cual el virus entra en un periodo de incubación de 20 a 25 días para llegar a las glándulas salivales, permitiendo su transmisión a nuevas plantas (Cruz-Gallego et al., 2018).

Los primeros síntomas suelen manifestarse después de la inoculación del virus con la presencia de áreas cloróticas en forma de mosaico, en el cual al hacerse más numerosas se fusionan entre sí, dando a lugar a hojas de un color amarillo pálido, que se extiende desde el ápice hasta la vaina. Las plantas afectadas presentan además un menor número de macollos y enanismo. Cuando la infección se produce en edades tempranas, en casos severos existe el riesgo de necrosis y muerte total. En infecciones tardías, el virus afecta a la panícula, reduciendo la calidad y cantidad de granos por panículas; mientras que al infectarse después de emergida la

panícula, solo se presenta una leve reducción en la calidad y el rendimiento (Pedrozo et al., 2025).

El RHBV pertenece al género *Tenuivirus*, estando estrechamente relacionado con el virus de la hoja blanca del pasto Echinochloa (*Echinochloa hoja blanca virus*) y el virus de la hoja blanca del pasto Urochloa (*Urochloa hoja blanca virus*). Al igual que otros *Tenuivirus*, posee un genoma multipartito monocatenario compuesto por cuatro segmentos de orientación negativa y ambisentido.

El ARN1 tiene aproximadamente 9 kb y codifica para la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), responsable de la replicación del genoma viral. El ARN2, contiene 3.6 kb se encarga de codificar en el sentido viral una glucoproteína de membrana, mientras que en el sentido complementario codifica para una proteína no estructural (NS2).

El ARN3, de 2.3 kb, codifica una proteína no estructural (NS3) y una proteína de la nucleocápside (NCP), la función de NS3 es ser un supresor viral de silenciamiento de ARN, bloqueando la incorporación al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), inhibiendo la respuesta inmune del hospedero. La NCP le otorga estabilidad al genoma viral, dándole resistencia frente a la degradación por las RNasas del hospedero.

El ARN4, cuyo tamaño es aproximadamente 2 kb, codifica una proteína no estructural principal en sentido viral, la cual se encuentra en plantas infectadas y una proteína no estructural (NS4) en el sentido complementario (Pedrozo et al., 2025). La función de la proteína NS4 aún se desconoce, sin embargo, para proteínas homologas a NS4 actúan como proteínas de movimiento, ayudando al virus a desplazarse de célula a célula como en otros *Tenuivirus* (Pereira et al., 2022).

### ***1.5.3 Métodos de detección***

El manejo de enfermedades virales en campo representa un desafío debido a su naturaleza y persistencia, a diferencia de otros patógenos, los virus vegetales son patógenos

intracelulares, por lo tanto, no pueden eliminarse mediante agroquímicos; de modo que las plantas infectadas deben ser removidas y destruidas para preservar la sanidad del cultivo. Por ello, para evitar pérdidas de rendimiento y controlar las enfermedades, es fundamental la detección y el diagnóstico, los cuales se dividen en dos métodos: directo e indirecto.

Los métodos directos se fundamentan en la detección de ADN, ARN o proteínas virales, siendo estos confiables y precisos; mientras que los métodos indirectos se basan en la evaluación visual y la indexación biológica. Dentro de los métodos de diagnósticos directos se distinguen dos grandes grupos: los serológicos y los basados en ácidos nucleicos.

Los métodos serológicos utilizan anticuerpos producidos por el sistema inmune de animales para la detección de virus en plantas. Los anticuerpos marcados con enzimas se unen a proteínas virales específicas; y esta unión puede observarse y cuantificarse por espectrofotometría. Entre las más comunes se encuentran el método DAS-ELISA, empleado para cuantificar la concentración viral en plantas, el dispositivo de flujo lateral (LFD, *Lateral Flow Device*), utilizado como una prueba rápida de campo y la inmunofluorescencia (IF), la cual usa anticuerpos marcados con colorantes fluorescentes, permitiendo observar los virus en tejidos vegetales a través de microscopías, proporcionando información sobre su distribución intracelular (Wang et al., 2022).

Los métodos basados en ácidos nucleicos están dirigidos en la detección de fragmentos específicos ADN o ARN viral. Entre ellos destaca la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), una técnica que puede amplificar una cadena de ADN hasta  $10^6$  veces, incrementando la eficacia de la detección, a través de esta técnica se han desarrollado variantes como la RT-PCR (*reverse transcription PCR*), qPCR (*quantitative PCR* o PCR en tiempo real) y LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*). Debido a que la mayoría de los virus en plantas pertenecen al tipo ARN, se utiliza la enzima de transcriptasa inversa, la cual convierta el ARN viral en ADN

complementario (ADNc), que posteriormente se amplifica mediante PCR para su detección mediante electroforesis en gel de agarosa (Wang et al., 2022).

#### ***1.5.4 Detección de RHBV***

Se han desarrollado diversas metodologías para la detección del RHBV en tejidos foliares y de insectos. En 1990, se realizó un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para detectar el RHBV en el vector *Tagosodes orizicolus*, con el cual virus se detectó 12 días después de que el insecto se alimentara de plantas infectadas, demostrando que el virus se replica dentro del vector, antes de poder transmitirse (Zeigler, 1990).

En 2007, Marys y Carballo desarrollaron un método de detección basado en la técnica DAS-ELISA, utilizando muestras foliares recolectadas en campo. Se analizaron 270 muestras de hojas (0.1 g), de las cuales el 11% resultaron positivas para RHBV, las muestras positivas presentaban franjas cloróticas y deformaciones en la panícula. A partir de dichas muestras se purificaron las partículas virales y se observaron filamentos típicos de Tenuivirus por medio de microscopía electrónica. Además, las proteínas virales fueron analizadas por SDS-PAGE (técnica utilizada para separar proteínas según su peso molecular) revelando una banda de 34 kDa correspondiente a la proteína de cápside del RHBV (Marys & Carballo, 2007).

El estudio más reciente se llevó a cabo en Texas (Estados Unidos) en 2025, donde detectó la presencia de plantas de arroz con síntomas de RHBV, las plantas presentaban hojas superiores decoloradas, crecimiento atrofiado y mal llenado de grano. Para su detección se utilizó un kit comercial de ELISA, para posteriormente confirmarla mediante secuenciación. Se utilizó el kit Quick-RNA miniprep plus para extraer ARN y se sintetizó ADNc del kit PrimeScript 1st strand cDNA synthesis; el cual sirvió como plantilla para amplificarlo mediante PCR usando los siguientes cebadores:

RHBV-R3-F: 5'-CCTTTCCAGTTTCATCTACCATC-3' y RHBV-R3-R: 5'-  
AACAAATGACGATGCCAGTTGCTGA-3'

RHBV-R4-F: 5'-CTCAGGCCTCAATCATTACC-3' y RHBV-R4-R: 5'-  
ACTTTCAGGATAATAGACAG-3'

Los amplicones (fragmentos genómicos amplificados) se sometieron a secuenciación Sanger, el análisis de la región RNA 3 y RNA 4 mostró similitud del 90 % y 95 %, respectivamente con aislados RHBV reportados en Colombia, Costa Rica y Perú; contribuyendo al primer reporte de la Hoja Blanca en Texas y la primera enfermedad viral que afecta al arroz en Estados Unidos (Khala & Zhou, 2025).

Hasta la fecha, existe poca evidencia de diversidad genética entre los aislados de RHBV. Un estudio en dos provincias de Perú, Utcubamba y Jaén se analizaron plantas de arroz, donde 4 de 200 plantas presentaban síntomas de HBD, mediante un ensayo de doble anticuerpo (DAS-ELISA) se detectó la presencia de RHBV en plantas sintomáticas; para confirmar se extrajo ARN de tejido foliar seco empleando Trizol y se sintetizó ADNc utilizando Random Hexamer Primer y la enzima M-MLV Reverse Transcriptase. La secuenciación del producto PCR evidenció una similitud del 96% y 99% con aislados de RHBV de Costa Rica y Colombia; lo que sugiere que un mismo linaje viral circula en toda la región andina (Bolaños et al., 2017).

### ***1.5.5 Secuenciación Sanger***

La secuenciación de ADN mediante el método de Sanger es uno de los más utilizados y confiable para la determinación de secuencias de ácidos nucleicos, tanto naturales como sintéticas. La secuenciación es una parte fundamental en el ámbito de la investigación molecular, ya que permite identificar patógenos emergentes o nuevos genotipos de patógenos previamente conocidos, al igual que reconocer cambios evolutivos en sus genomas (Crossley et al., 2020).

En el método de secuenciación Sanger, el ADN amplificado o el ADN complementario (ADNc) purificado y amplificado se hibrida con un oligonucleótido cebador y posteriormente se amplifica mediante la enzima ADN polimerasa, que incorpora dideoxinucleótidos marcados radiactivamente o nucleótidos terminadores de cadena (ddNTPs). Estos poseen un átomo de

hidrógeno (H) en lugar de un grupo hidroxilo (OH), lo que provoca que la reacción se detenga una vez que la polimerasa incorpora un dideoxinucleótido en la cadena de ADN molde, interrumpiendo la elongación de la hebra (Saini, Gaurav, Harish, Kumar, & Sanu, 2023).

Durante la secuenciación Sanger se producen múltiples fragmentos de ADN, los cuales se separan según su longitud mediante electroforesis en gel o capilar, lo que permite determinar la secuencia genómica a partir de los ddNTPs marcados. En la secuenciación en gel, cada banda observada corresponde a una base específica; mientras que la secuenciación capilar (CE), un láser excita los fluoróforos incorporado en los ddNTPs, y un sistema computarizado registra los picos fluorescentes que representan la secuencia del ADN (Schmerker, 2024).

#### ***1.5.6 Filogenia en virus***

Los organismos biológicos y los virus cambian a lo largo de las generaciones, dando lugar con el tiempo al proceso de evolución, los virus tienen un ritmo de evolución mucho más elevados y fluctuantes entre las regiones del genomas. Cuando los cambios en el genoma se mantienen a lo largo del tiempo, dan origen a linajes genéticos. La relación entre diferentes linajes biológicos que comparten un antepasado en común se denomina filogenia, la cual muestra como están emparentadas las especies entre sí.

Gracias al desarrollo de técnicas moleculares, se ha demostrado que es posible reconstruir la historia evolutiva de los virus mediante la comparación de sus secuencias genéticas, lo que permite identificar su grado de parentesco. Sin embargo, no es posible determinar la filogenia verdadera debido a la imposibilidad para reconstruir completamente su evolución (Gorbalenya & Lauber, 2017).

En este contexto, el análisis filogenético, además de permitir conocer el grado de parentesco entre los virus, también se utiliza para comparar secuencias actuales con aquellas registradas en bases de datos moleculares, como GenBank, el cual es un repositorio que contiene secuencias de ácidos nucleicos y proteínas.

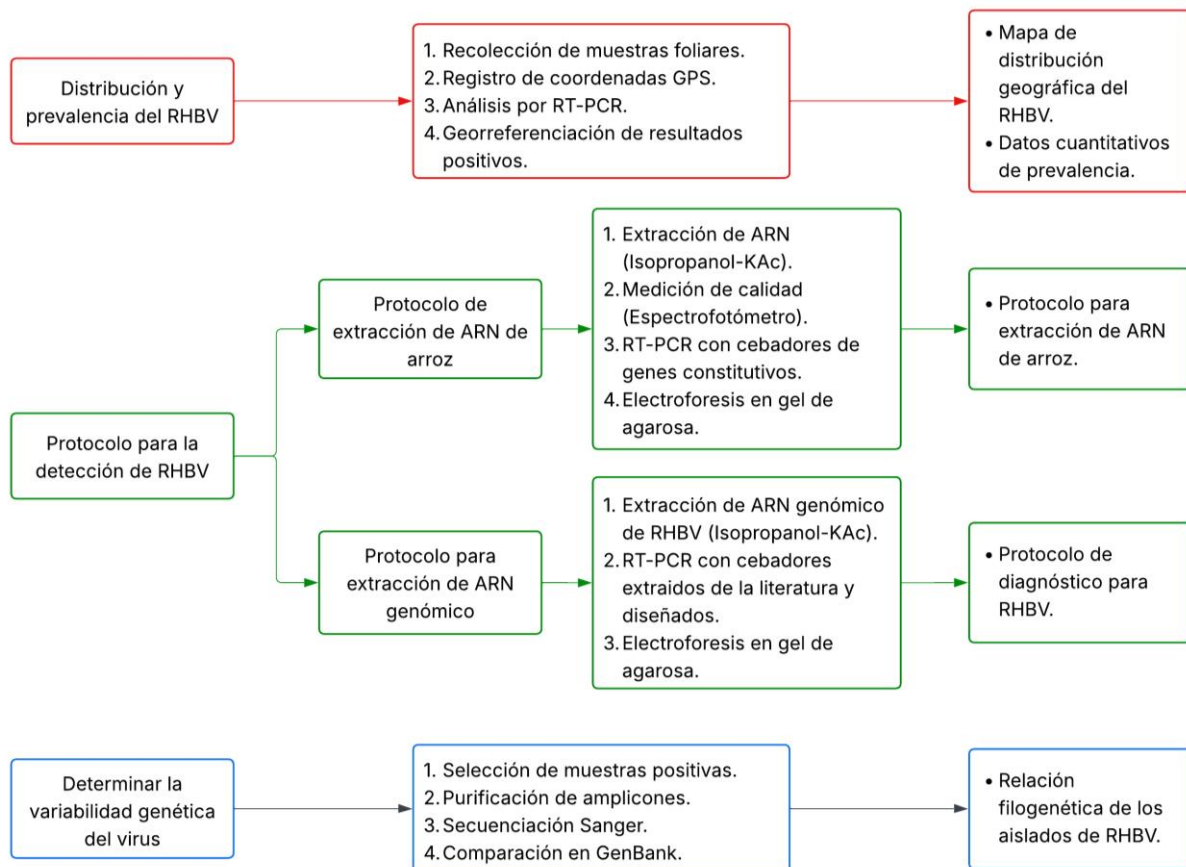
## **Capítulo 2**

## 2. Metodología.

Para la determinación de la prevalencia y análisis genético del virus de la hoja blanca (RHBV) en plantaciones arroceras de la provincia del Guayas, el estudio se desarrolló en tres etapas. La primera etapa consistió en la recolección de muestras foliares de arroz en diferentes cantones de la provincia del Guayas. En la segunda etapa, se evaluó la aplicabilidad del protocolo de extracción de ARN mediante isopropanol–acetato de potasio, el cual, una vez validado, se empleó para la extracción del ARN genómico del RHBV. Finalmente, en la tercera etapa, se realizó la secuenciación Sanger de las muestras positivas, seguida de la comparación de las secuencias obtenidas con la base de datos GenBank, con el fin de analizar la relación filogenética del virus con otros aislamientos reportados internacionalmente.

**Figura 1**

*Flujograma de la metodología.*



*Nota.* Pasos para el desarrollo del protocolo de detección de RHBV y analizar sus variantes genómicas que circulan en la provincia del Guayas.

## 2.1 Distribución espacial

El estudio se llevó a cabo en distintos cantones de la provincia del Guayas, que son Nobol, Daule, Guayaquil, Santa Lucía, Samborondón, Yaguachi y Alfredo Baquerizo Moreno; además de visitar la zona de Los Ríos, que fue Babahoyo [Tabla 1 *Sitios muestreados en la provincia de Guayas y Los Ríos*]. En cada cantón se visitaron varias fincas productoras de arroz, donde se recolectaron quince muestras foliares por finca. Las hojas seleccionadas correspondieron a plantas que presentaban síntomas de RHBV.

Durante la recolección se registró información complementaria, incluyendo la variedad de arroz cultivada, días de siembra y la ubicación georreferencia de cada finca, expresada en coordenadas decimales (latitud y longitud) obtenidas mediante la aplicación UTM Geo Map.

**Tabla 1**

*Sitios muestreados en la provincia de Guayas y Los Ríos*

<b>Puntos</b>	<b>Número de muestras</b>	<b>Días de siembra</b>	<b>Variedad</b>	<b>Cantón</b>
Punto 1	3	60	SFL-011	Nobol
Punto 2	3	60	SFL-011	
Punto 3	3	60	SFL-011	Daule
Punto 4	4	18	SFL-011	
Punto 5	4	60	SFL-011	Guayaquil
Punto 6	4	45	SFL-011	Santa Lucía
Punto 7	4	45	SFL-011	
Punto 8	2	60	SFL-011	
Punto 9	2	40	SFL-011	Samborondón
Punto 10	10	20	Butagenica	
Punto 11	10	45	Butagenica	
Punto 12	10	30	Butagenica	Babahoyo
Punto 13	10	60	Butagenica	
Punto 14	10	65	Butagenica	
Punto 15	10	45	Butagenica	Jujan
Punto 16	10	110	Portero	
Punto 17	10	45	SFL-011	Yaguachi

*Nota:* Los códigos de muestra fueron asignados durante el muestreo de campo para su identificación en los análisis de laboratorio.

Las muestras foliares fueron colocadas en bolsas de ziploc y conservadas en hieleras con geles refrigerantes para mantener su integridad durante el transporte hasta el laboratorio.

## **2.2 Desarrollo de protocolo**

### **2.2.1 Extracción de ARN**

Se realizaron pruebas para evaluar la eficacia del protocolo de extracción de ARN mediante isopropanol–acetato de potasio (KAc). Para ello, se sembraron y mantuvieron plantas de arroz bajo condiciones de invernadero. Tres semanas post-germinación, se colectó aproximadamente 80 mg de tejido foliar para probar el protocolo de extracción en función de la temperatura de trabajo: uso de reactivos y centrifugación en frío frente a temperatura ambiente, con el objetivo de determinar cuál permitía una mejor conservación y rendimiento del ARN. En cada condición se realizaron ensayos con dos cantidades de tejido vegetal: 60 mg y 80 mg de hoja.

Para evaluar la calidad y pureza de los ácidos nucleicos obtenidos (dsADN, ssADN y ARN), se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). En el cual se midió los valores absorbancia 260/280 y A260/A230, considerándose indicadores de pureza los valores cercanos a 2.0 para A260/A280 y entre 2.0 y 2.2 para A260/A230, ambos indicativos de muestras de buena pureza y libres de contaminantes, proteínas y fenoles.

Previamente a la extracción, se prepararon los buffers necesarios. El buffer de extracción de ARN se formuló disolviendo 24.23 g de Tris base (200 mM), 12.72 g de cloruro de litio (LiCl) (300 mM), 3.72 g de EDTA (10 mM), 15 g de lithium dodecyl sulfate (LiDS) (1.5% p/v), 20 g de polivinilpirrolidona (PVP) (2%), 10 g de deoxicolato de sodio (1%) y 10 mL de NP-40 (1%) en 800 mL de agua destilada/desionizada. Posteriormente, el pH se ajustó a 8.5 y el volumen se aforó hasta 1 L. El wash buffer se preparó disolviendo 1.21 g de Tris-HCl (20 mM),

0.19 g de EDTA (1 mM) y 2.92 g de cloruro de sodio (NaCl) (100 mM), ajustando el volumen final a 500 mL. Previo a su utilización, se añadió etanol (EtOH) para obtener la solución final de lavado.

La extracción del ARN total inició con la preparación del buffer de extracción, al cual se añadió 1% de 2-mercaptoetanol, para evitar la degradación del ARN. Añadiendo a morteros 80 mg de muestra foliar y 1 mL del buffer de extracción para iniciar el proceso de lisis mecánica.

El lisado resultante se centrifugó a 5000 RPM durante 2 minutos, y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo conteniendo 700  $\mu$ L de acetato de potasio (KAc 6M) cuyo objetivo es la precipitación de proteínas y polisacáridos. Luego de homogenizar por medio del vortex, se centrifugaron a 13 000 RPM durante 10 minutos.

Del sobrenadante limpio se recuperaron 700  $\mu$ L, los cuales se mezclaron con 700  $\mu$ L de isopropanol, para la precipitación de los ácidos nucleicos. La mezcla se homogenizó, para seguidamente una centrifugación a alta velocidad (~13 000 RPM). El sobrenadante se descartó cuidadosamente y el pellet se sometió a un proceso de purificación utilizando wash buffer (500  $\mu$ L por lavado) y dióxido de silicio (sílica) (25  $\mu$ L) -cuyo objetivo es unirse al ARN mediante interacciones electrostáticas y enlaces de hidrogeno; ayudando a proteger el ARN durante lavados-, realizando dos lavados consecutivos.

Luego del secado del pellet se procedió a la elución agregando 80  $\mu$ L de agua grado molecular, seguido de vortex para disolver completamente el pellet de sílica. Finalmente, las muestras se centrifugaron nuevamente y se recuperaron 60  $\mu$ L de eluido, correspondiente al ARN total, evitando tomar restos de sílica. El ARN se almacenó a  $-20$  °C hasta su uso.

### ***2.2.2 RT-PCR protocolo***

Las muestras de ARN obtenidas se sometieron a una reacción de transcripción inversa (RT) utilizando la enzima M-MLV (Promega, 200 U/ $\mu$ l) para la síntesis de ADN complementario (cDNA). El protocolo incluyó 3  $\mu$ l de M-MLV RT Buffer 5X, 0,6  $\mu$ l de M-

MLV *Reverse Transcriptase*, 0,5 µl de *dNTPs* (10 mM), 0,5 µl de *Random Primers* (40 µM), 0,4 µl de inhibidor de ribonucleasa, 9 µl de agua molecular y 1 µl del ARN extraído.

Las reacciones de RT se llevó a cabo en un *MiniAmp Plus Thermal Cycler* (*Thermo Fisher Scientific*), con los siguientes parámetros:

- Desnaturalización a 25° por 10 minutos
- Alineamiento a 42° por 1 hora
- Extensión a 80° por 10 min.

Finalmente, se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando los cebadores constitutivos NDHB, extraídos previamente de la literatura (Quito-Avila & Martin, 2012). Se utilizó el kit *GoTaq® Green Master Mix* (Promega). Para la reacción se añadieron 5 µl de *GoTaq Green Master Mix 2X*, 0,5 µl de cada cebador, 3 µl de agua molecular y 1 µl del producto de RT, con el fin de confirmar la integridad del material genético extraído.

- NDHB-F: 5'-AAGCAAAAGTTCCTAGATTCATGG-3'
- NDHB-R: 5'-TTGCGTATTCGTCCATAGGTC-3'

Las reacciones de PCR se realizaron en un *MiniAmp Plus Thermal Cycler* (*Thermo Fisher Scientific*) bajo los siguientes ciclos:

- Desnaturalización inicial a 94 °C por 4 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos.
- Alineamiento a 55 °C por 30 segundos
- Extensión a 72 °C por 45 segundos, finalizando con una extensión de 5 minutos a 72 °C.

Finalmente, los productos amplificados se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, utilizando un colorante *Thiazole Orange* (10%), y las bandas se observaron en el transiluminador .

## 2.3 Análisis filogenético

### 2.3.1 PCR RHBV

Una vez validado el protocolo de extracción, las muestras fueron sometidas al mismo procedimiento de extracción y a la reacción de retro-transcripción (RT) para la obtención del ADNc. Posteriormente, se realizó la amplificación mediante PCR utilizando los siguientes pares de cebadores específicos extraídos de Bolaños, c. 2017:

- RHBV-R3
  - RHBV-R3-F: 5'-CCTTTCCAGTTTCATCTACCATC-3'
  - RHBV-R3-R: 5'-AACAATGACGATGCCAGTTGCTGA-3'
- RHBV-R4
  - RHBV-R4-F: 5'-CTCAGGCCTCAATCATTACC-3'
  - RHBV-R4-R: 5'-ACTTTCAGGATAATAGACAG-3'

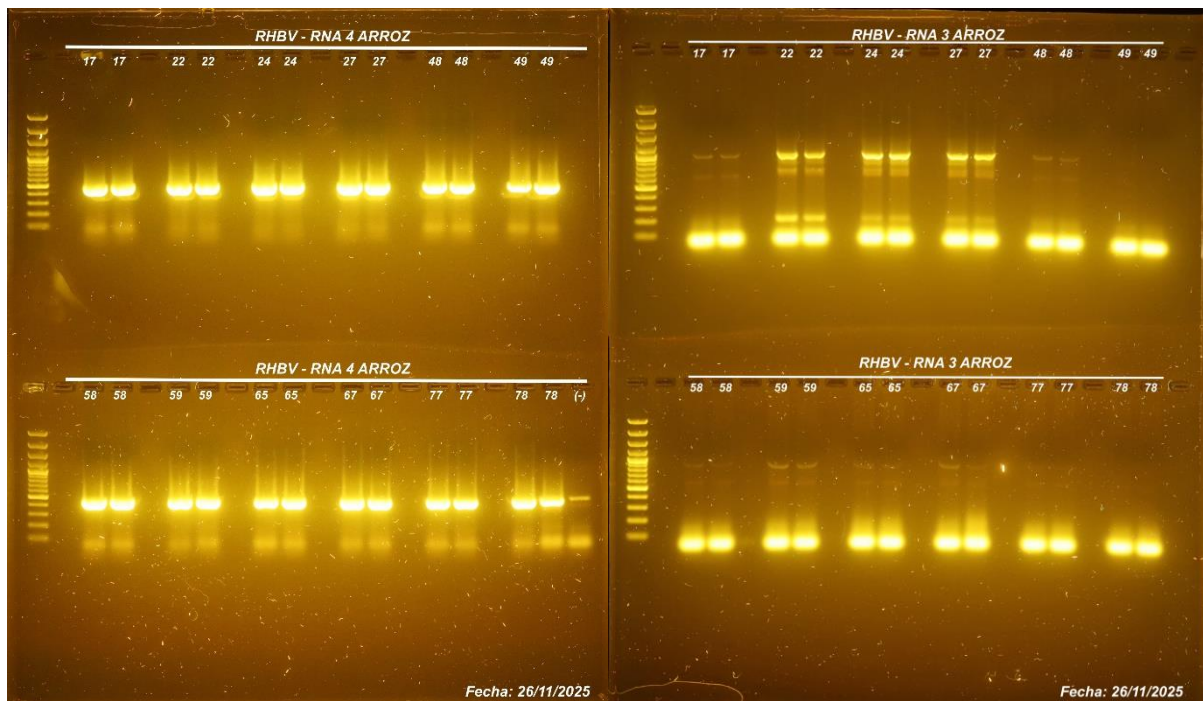
Donde el tamaño de los amplicones es: 980 bp y 466 bp respectivamente. La temperatura de alineamiento utilizada para los pares de cebadores RHBV-R3 y RHBV-R4 fue de 55 °C durante 1 minuto, manteniéndose iguales las demás condiciones térmicas del programa de amplificación.

### 2.3.2 Purificación de las bandas

La purificación de los productos amplificados se realizó utilizando el Quick PCR Purification Kit (Invitrogen), basado en métodos de captura por sílica y purificación mediante columnas. Para ello, se realizó una segunda PCR con muestras duplicadas, las cuales fueron reveladas en el transiluminador [Figura 2 *PCR con muestras duplicadas.*]; posteriormente, se cortaron las bandas de interés del gel de agarosa y se colocaron en tubos de 2ml.

## Figura 2

PCR con muestras duplicadas.



*Nota:* Los códigos de muestra fueron asignados durante el muestreo de campo y las bandas corresponden a productos amplificados por PCR.

A partir del peso del fragmento de gel, se calculó el volumen de *Gel Solubilization Buffer* (L3), adicionando un volumen equivalente a tres veces el peso del gel. La mezcla se incubó a 50 °C durante 10 minutos hasta la completa disolución del agarosa.

Una vez disuelto el gel, se añadió un volumen de isopropanol equivalente al peso del fragmento de gel y 15 µL de sílica, homogeneizando mediante vortex. La mezcla se centrifugó durante 1 minuto a 13 000 rpm, descartándose posteriormente el sobrenadante.

El pellet se lavó añadiendo 700 µL de wash buffer con 50% de etanol, seguido de vortex y centrifugación durante 1 minuto a 13 000 rpm. Posteriormente, los tubos se colocaron en un SpeedVac durante 10 minutos para eliminar residuos de etanol.

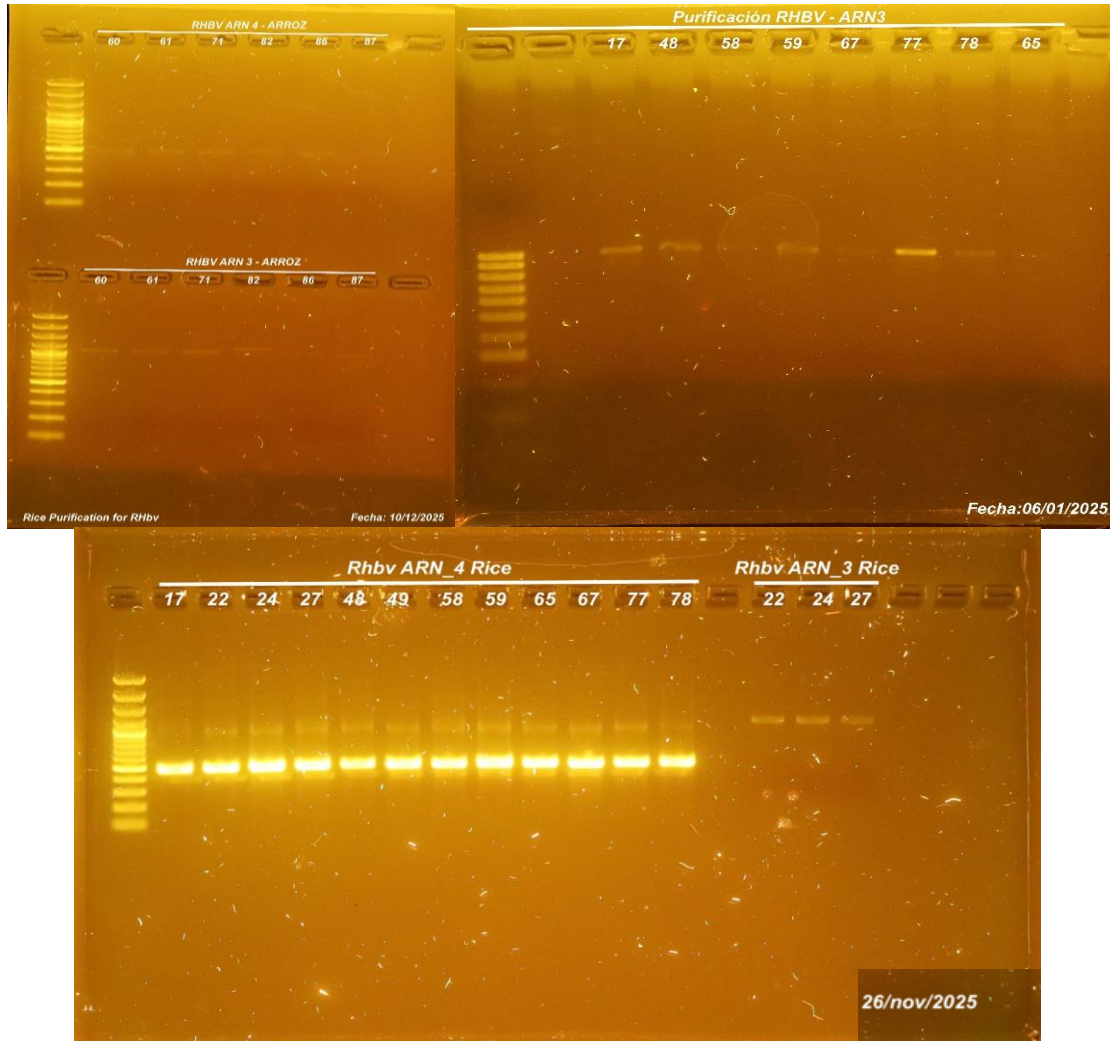
Finalmente, el ADN purificado se eluyó adicionando 50 µL de agua grado molecular, homogeneizando mediante vortex para re-suspender el pellet de sílica y centrifugando

nuevamente. Se recuperaron 40  $\mu$ L del eluido final, los cuales se transfirieron a tubos nuevos de 1.5 mL para su posterior revelación en gel de agarrosa en 2% [Figura 3

*Electroforesis en gel de agarosa de los segmentos purificados*] y secuenciación.

### Figura 3

*Electroforesis en gel de agarosa de los segmentos purificados*



*Nota:* Se observan los fragmentos purificados de ARN3 y ARN4 del RHBV.

### 2.3.3 Análisis bioinformático

El producto obtenido de la purificación secuenciado (Macrogen Inc.) en ambos sentidos utilizando los mismos cebadores que en la PCR. Las secuenciación Sanger fue analizado en el software *Geneious Prime*, en el cual se editaron las secuencias cortando los extremos de calidad deficiente mediante la herramienta *Trim Ends*, posteriormente se alinearon las secuencias

mediante *Novo assembly*, se vio la similitud entre las mismas secuencias [Figura 4

*Distancias filogenéticas de los distintos aislados.*] para posteriormente la secuencia consenso

con el fin de comparar su identidad con la base de datos GenBank del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) usando la herramienta del mismo software *BLASTn*. Con las secuencias nucleotídicas se recuperaron secuencias homologas de aislados internacional de GenBank.

### Figura 4

*Distancias filogenéticas de los distintos aislados.*

AF004658.1	Babahoyo...	Babahoyo...	Babahoyo...	Babahoyo...	Daule_17	Jujan_77	KY369921.1	L07940.1	MG566076	NC_036602.1	PQ560681...	PQ560682...	RHBV_RNA...	Santa_Lucia...	Santa_Luci...	Santa_Luci...		
Babahoyo_Las_Guajias...	97.69%	99.28%	99.28%	98.86%	98.88%	99.83%	99.50%	99.06%	98.48%	98.31%	98.01%	98.01%	98.41%	98.31%	97.42%	97.63%	97.75%	98.21%
Babahoyo_SDS_58	97.44%	99.28%		98.31%	99.16%	99.13%	99.45%	98.77%	98.20%	98.64%	98.64%	98.42%	98.42%	98.64%	98.96%	98.74%	99.16%	99.38%
Babahoyo_Volante_67 (...)	95.60%	98.86%	98.31%		97.02%	98.27%	98.66%	98.24%	96.43%	98.14%	98.14%	98.14%	98.14%	98.14%	98.88%	98.84%	98.54%	98.71%
Babahoyo_Volante_71	97.58%	98.88%	99.16%	97.02%		99.23%	99.26%	98.43%	98.14%	98.14%	98.14%	98.14%	98.14%	98.14%	98.88%	98.84%	99.07%	99.25%
Daule_17	97.91%	99.83%	99.13%	98.27%	99.23%		99.57%	99.13%	98.61%	99.13%	99.13%	98.78%	98.78%	99.30%	99.65%	99.83%	99.83%	99.83%
Jujan_77	97.97%	99.50%	99.45%	98.66%	99.26%	99.57%		99.01%	98.52%	98.96%	98.96%	98.74%	98.74%	99.29%	98.97%	99.38%	99.61%	99.61%
KY369921.1	98.48%	99.06%	98.77%	98.24%	98.43%	99.13%	99.01%		98.95%	99.65%	99.65%	99.18%	99.18%	98.83%	98.53%	98.95%	99.18%	99.18%
L07940.1	98.31%	98.46%	98.20%	96.43%	98.14%	98.61%	98.52%	98.95%		98.71%	98.71%	99.15%	99.15%	99.05%	98.31%	97.98%	98.43%	98.65%
MG566076	98.01%	98.90%	98.64%	97.25%	98.14%	99.13%	98.96%	99.65%	98.71%		100%	99.15%	99.05%	98.41%	98.45%	98.88%	99.10%	99.10%
NC_036602.1	98.01%	98.90%	98.64%	97.25%	98.14%	99.13%	98.96%	99.65%	98.71%	100%		99.15%	99.05%	98.41%	98.45%	98.88%	99.10%	99.10%
PQ560681.1 (reversed)	98.41%	98.68%	98.42%	97.64%	98.14%	98.78%	98.74%	99.18%	99.15%	99.15%	99.15%		99.89%	98.73%	98.21%	98.65%	98.88%	98.88%
PQ560682.1 (reversed)	98.31%	98.68%	98.42%	97.64%	98.14%	98.78%	98.74%	99.18%	99.05%	99.05%	99.05%	99.89%		98.62%	98.21%	98.65%	98.88%	98.88%
RHBV_RNA3_Ec_2013_C...	97.42%	99.23%	98.96%	97.25%	98.88%	99.30%	99.29%	98.83%	98.31%	98.41%	98.41%	98.73%	98.62%		99.02%	99.21%	99.44%	99.44%
Santa_Lucia_27	97.53%	99.02%	98.74%	98.16%	98.84%	99.65%	98.97%	98.53%	97.98%	98.45%	98.21%	98.21%	99.02%		99.02%	99.21%	99.14%	99.14%
Santa_Lucia_22_F	97.75%	99.44%	99.16%	98.54%	99.07%	99.83%	99.38%	98.95%	98.43%	98.88%	98.88%	98.65%	98.65%	99.21%	99.02%		99.55%	99.55%
Santa_Lucia_24	98.21%	99.66%	99.38%	98.71%	99.25%	99.83%	99.61%	99.18%	98.65%	99.10%	99.10%	98.88%	98.88%	99.44%	99.14%	99.55%		

AF004657	Babahoyo...	Babahoyo...	Babahoyo...	Babahoyo...	Babahoyo...	Babahoyo...	Babahoyo...	Babahoyo...	Daule_17	Jujan_77	Jujan_78	KY369922	L14952	NC_0366...	PQ56068...	PQ56068...	Santa_Lu...	Santa_Lu...	Santa_Lu...	Yaguachi...	Yaguachi...	
Babahoyo_El_Volante_65	96.57%	98.86%	99.31%	99.77%	98.62%	98.85%	97.94%	98.70%	99.42%	98.58%	96.79%	98.85%	96.73%	98.63%	97.48%	98.27%	98.27%	98.85%	97.48%	98.62%	99.31%	99.25%
Babahoyo_El_Volante_67	96.81%	98.86%	99.09%	99.08%	98.86%	99.54%	99.08%	98.98%	99.22%	99.19%	99.32%	100%	97.00%	98.63%	97.49%	99.42%	99.42%	98.62%	97.49%	98.40%	98.63%	98.76%
Babahoyo_Las_Guajias...	97.00%	99.31%	99.09%	99.54%	98.40%	99.08%	98.17%	99.50%	98.96%	99.65%	98.86%	99.08%	98.82%	98.71%	97.64%	98.55%	98.55%	99.08%	97.49%	98.86%	99.14%	99.04%
Babahoyo_Las_Guajias...	98.80%	99.77%	99.08%	99.54%	98.85%	99.08%	98.17%	100%	98.96%	99.65%	98.86%	99.08%	98.73%	98.63%	97.48%	98.55%	99.08%	97.48%	98.83%	99.08%	99.08%	99.08%
Babahoyo_SDS_58	96.35%	98.62%	98.86%	98.40%	98.85%	98.85%	97.94%	98.97%	98.70%	98.50%	98.63%	98.85%	96.01%	97.95%	98.80%	98.55%	98.55%	97.93%	98.80%	97.72%	97.55%	97.78%
Babahoyo_SDS_59	97.02%	98.85%	99.54%	99.08%	99.08%	98.85%	98.62%	98.97%	99.22%	99.19%	99.31%	99.54%	96.73%	98.62%	97.48%	99.13%	99.13%	98.27%	97.48%	98.39%	98.62%	98.51%
Babahoyo_SDS_60	96.11%	97.94%	99.08%	98.17%	98.17%	97.94%	98.62%	97.95%	98.18%	98.27%	98.40%	99.08%	95.99%	97.71%	96.57%	98.55%	98.55%	97.71%	96.57%	97.48%	97.71%	97.77%
Babahoyo_SDS_60_F	96.53%	99.74%	98.98%	99.50%	100%	98.97%	97.95%		98.93%	99.61%	98.72%	98.98%	96.31%	98.51%	97.28%	98.55%	98.55%	97.18%	97.18%	98.72%	97.01%	98.88%
Babahoyo_SDS_61_F	96.62%	98.70%	99.22%	98.96%	98.96%	98.70%	99.22%	98.18%	98.93%	99.09%	98.96%	99.22%	96.42%	98.44%	97.14%	98.84%	98.84%	98.44%	97.66%	98.18%	98.44%	98.74%
Daule_17	97.11%	99.42%	99.19%	99.65%	99.65%	98.50%	99.19%	98.27%	99.61%	99.09%	98.96%	99.19%	98.85%	98.73%	97.58%	98.70%	98.70%	99.19%	97.58%	98.96%	99.19%	99.13%
Jujan_77	96.58%	98.63%	99.32%	98.86%	98.86%	98.63%	99.31%	98.40%	98.72%	98.96%	98.96%		99.31%	96.50%	98.41%	97.27%	98.84%	98.84%	96.62%	97.26%	98.40%	98.86%
Jujan_78	96.79%	98.85%	100%	99.08%	99.08%	98.85%	99.54%	99.08%	98.98%	99.22%	99.19%	99.31%		96.98%	98.62%	97.48%	99.42%	99.42%	96.62%	97.47%	98.39%	98.62%
KY369922	96.09%	96.73%	97.00%	96.82%	96.73%	96.01%	96.73%	95.99%	96.31%	96.42%	96.85%	96.50%	96.98%	98.29%	99.51%	96.60%	96.60%	96.23%	96.60%	96.01%	96.58%	96.58%
L14952	97.85%	98.63%	98.63%	98.71%	98.63%	97.95%	98.62%	97.71%	98.51%	98.44%	98.73%	98.41%	98.62%	98.29%	98.93%	97.98%	97.98%	98.17%	98.86%	97.95%	98.50%	98.33%
NC_036609	96.78%	97.48%	97.45%	97.64%	97.48%	96.50%	97.48%	96.57%	97.26%	97.14%	97.58%	97.21%	97.48%	99.51%	98.93%	97.11%	97.11%	97.02%	99.09%	96.81%	97.42%	97.13%
PQ560685 (reversed)	98.24%	98.27%	99.42%	98.55%	98.55%	99.13%	98.55%	98.55%	98.84%	98.70%	98.84%	99.42%	96.60%	97.98%	97.11%	100%		97.98%	98.82%	97.69%	97.98%	98.17%
PQ560688 (reversed)	98.24%	98.27%	99.42%	98.55%	98.55%	99.13%	98.55%	98.55%	98.84%	98.70%	98.84%	99.42%	96.60%	97.98%	97.11%	100%		97.98%	98.82%	97.69%	97.98%	98.17%
Santa_Lucia_22	98.56%	98.85%	98.62%	99.08%	99.08%	97.93%	98.62%	97.71%	98.97%	98.44%	99.19%	98.62%	98.62%	96.23%	98.17%	97.02%	97.98%	97.98%	97.02%	99.77%	99.31%	99.25%
Santa_Lucia_24	98.80%	97.48%	97.45%	97.49%	97.48%	96.80%	97.48%	96.57%	97.18%	97.66%	97.58%	97.47%	98.50%	98.86%	99.09%	96.82%	96.82%	97.02%		96.80%	97.26%	97.03%
Santa_Lucia_27	96.58%	98.62%	98.40%	98.86%	98.85%	97.72%	98.39%	97.48%	97.18%	98.18%	98.96%	98.40%	98.39%	96.01%	97.95%	96.81%	97.69%	97.69%	99.77%	96.80%	99.09%	99.01%
Yaguachi_86	96.57%	99.31%	98.63%	99.14%	99.08%	97.95%	98.62%	97.71%	99.01%	98.44%	99.19%	98.86%	98.62%	96.58%	98.50%	97.42%	97.98%	97.98%	99.31%	97.26%	99.09%	100%
Yaguachi_87_R (reverse...	96.41%	99.25%	98.76%	99.04%	99.00%	97.78%	98.51%	97.77%	98.88%	98.37%	99.13%	98.76%	98.75%	96.58%	98.33%	97.13%	98.17%	98.17%	99.25%	97.03%	99.01%	100%

*Nota:* Distancias filogenéticas extraídas del Geneious Prime.

Con las secuencias internacionales del GenBank y las secuencias ensambladas con la función de *Novo Assembly*, se genera un alineamiento múltiple, que se exporto en formato FASTA para posteriormente realizar la construcción del árbol filogenético mediante el software MEGA11 para tener una comprensión visual de los aislados obtenidos en Ecuador y sus homólogos del GenBank, utilizando el método Máxima verosimilitud, usando 1000 réplicas *Bootstrap*.

## **Capítulo 3**

### 3. Resultados y análisis

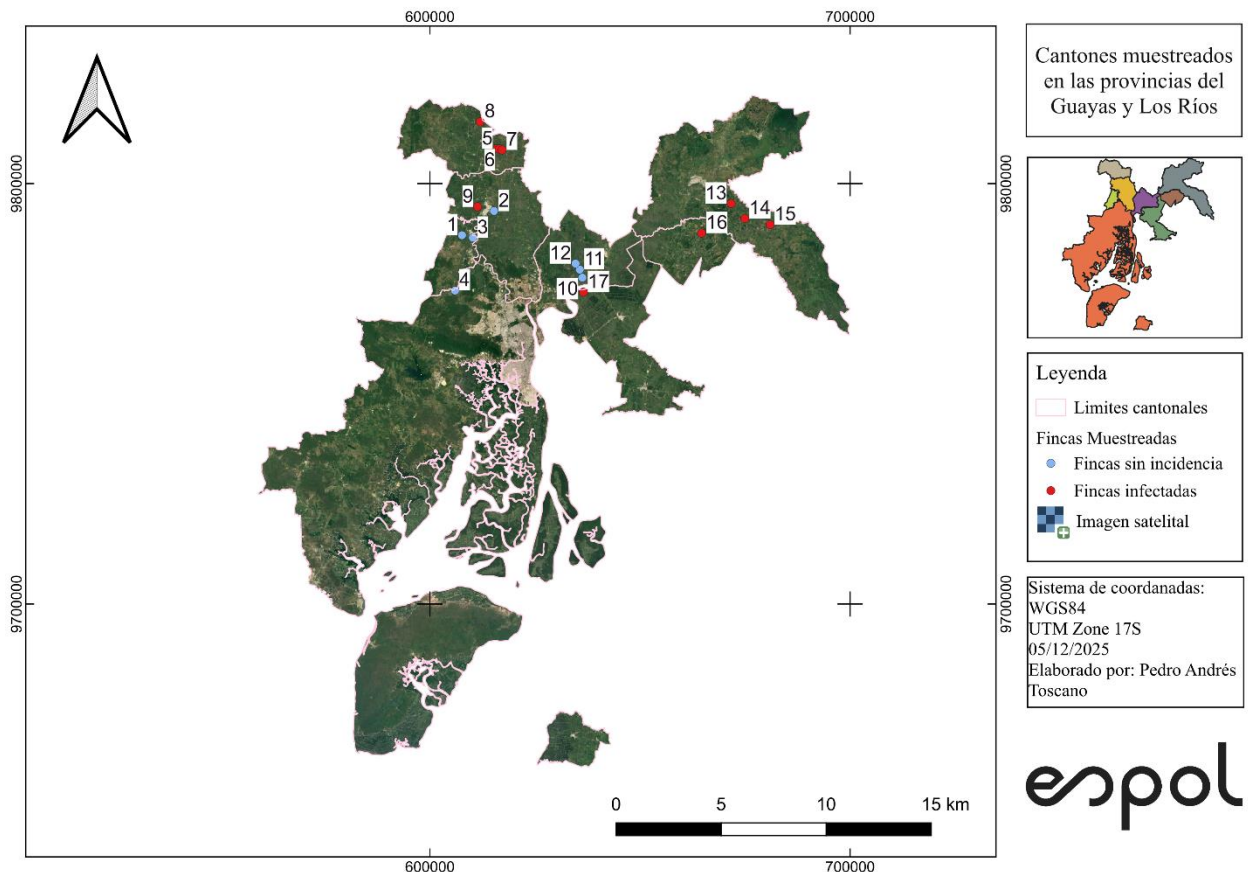
#### 3.1 Distribución espacial

Se muestrearon 17 localidades distribuidas en cantones de las provincias de Los Ríos y Guayas, que se visualizan en la Figura 5

*Distribución espacial de los cantones muestreados en las provincias de Guayas y Los Ríos,* donde se visualiza la cobertura geográfica del estudio. Cada punto representa un sitio de muestreo (finca), donde en total se analizaron 94 muestras, distribuidas en 17 puntos de muestreo.

#### Figura 5

*Distribución espacial de los cantones muestreados en las provincias de Guayas y Los Ríos*



*Nota:* Mapa realizado con QGIS Desktop 3.40.9 (<https://qgis.org/>)

La Tabla 1

*Sitios muestreados en la provincia de Guayas y Los Ríos; Error! No se encuentra el origen de la*

**referencia.** muestra la distribución de las muestras analizadas para la detección del RHBV organizadas por punto de muestreo y cantón correspondiente; además de información adicional como es la variedad cultivada y los días de siembra.

La mayor concentración de muestras positivas se registró en los cantones de Babahoyo, Alfredo Baquerizo Moreno y San Jacinto de Yaguachi, mientras que otros sitios presentaron una baja o nula detección del virus.

A nivel cantonal, la prevalencia del RHBV mostró variaciones entre las zonas evaluadas. El cantón Babahoyo y Alfredo Baquerizo Moreno presentó el mayor porcentaje de muestras positivas, con un 100 % de las muestras analizadas en dichos cantones, seguidos de San Jacinto de Yaguachi con 80 %. Por su parte, los cantones de Santa Lucía y Daule registraron porcentajes menores de positividad, con 57 % y 20 %, respectivamente, mientras que en los demás cantones evaluados no se detectaron muestras positivas.

El virus de la hoja blanca del arroz pudo visualizarse en un amplio rango de días después de la siembra, desde los 30 hasta los 65 DDS, siendo más evidente durante los estados fenológicos de alargamiento del tallo y espigado. En estas fases, el método de detección indirecto se basó en la presencia de manchas cloróticas en las hojas, siendo un síntoma relevante para la detección del virus en campo.

Asimismo, en el estudio se identificó el uso de semillas no certificadas de origen peruano, empleadas de manera local por los productores y conocidas comúnmente como “Butagénicas” y “Portero”. Al analizar la distribución de la infección, se evidenció una mayor proporción de plantas infectadas en las variedades peruanas, alcanzando un 62 %, en comparación con el 36 % registrado en la variedad certificada SFL-011, lo que sugiere una mayor susceptibilidad de los materiales no certificados frente al RHBV.

Se observó que los cantones más cercanos, donde se confirmó la presencia del vector *Tagosodes orizicolus* (sogata), presentaron mayor proporción de plantas infectadas, demostrando

que la diseminación del virus está relacionada con la dinámica local del vector, avanzando progresivamente hacia cantones de la provincia del Guayas, siendo Alfredo Baquerizo Moreno donde se registró como el segundo cantón con mayor prevalencia del RHBV.

No obstante, la detección del virus en cantones geográficamente distantes entre sí evidencia una distribución del patógeno en las áreas evaluadas, sin un patrón continuo ni asociado a la proximidad geográfica, reflejando una variabilidad en la incidencia de RHBV a nivel local, posiblemente influenciadas por movimiento de material vegetal, uso de semillas no certificadas y prácticas agronómicas.

### 3.2 Validación del protocolo

La calidad de los ácidos nucleicos obtenidos fue evaluada mediante NanoDrop [Tabla 2 *Resultados del nanodrop*], observándose concentraciones adecuadas y relaciones A260/A280 cercanas a 2,0, indicativas de alta pureza. Asimismo, los valores A260/A230 evidencian una baja presencia de contaminantes orgánicos e inorgánicos como sales o fenoles, confirmando la idoneidad de las muestras para los análisis moleculares posteriores.

**Tabla 2**

*Resultados del nanodrop*

Nombre de muestra	Ácido nucleico(ng/uL)	A260/A280	A260/A230	A260	A280
<b>Muestra 1</b>	120,418	2,188	6,323	3,010	1,376
<b>Muestra 2</b>	113,389	2,151	2,254	2,835	1,318
<b>Muestra 3</b>	102,603	2,146	2,165	2,565	1,195
<b>Muestra 4</b>	133,489	2,031	1,654	3,337	1,643

*Nota:* Resultados del absorbancia recolectada de las muestras.

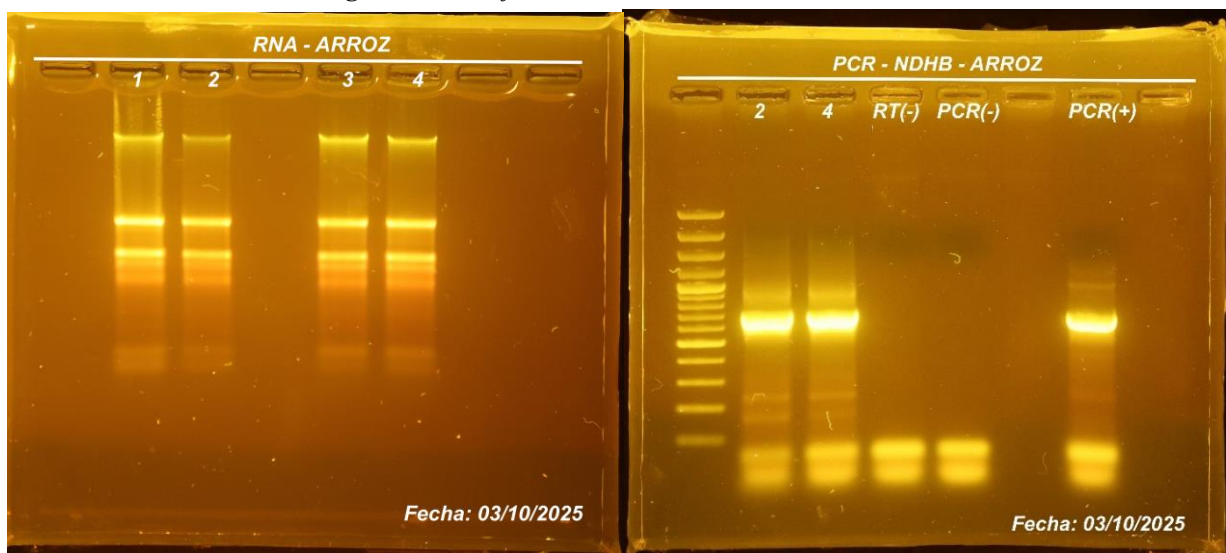
De igual manera, la validación mediante electroforesis en gel mostró resultados consistentes, evidenciándose dos bandas definidas. La banda superior corresponde al ADN genómico, el cual, debido a su mayor tamaño molecular, migra más lentamente, mientras que la banda inferior corresponde al ARN [Figura 6

*Resultados de validación en gel de electroforesis.*]. Adicionalmente, la verificación mediante

RT-PCR empleando el gen constitutivo NDHB arrojó resultados consistentes [Figura 6 *Resultados de validación en gel de electroforesis.*], obteniéndose un producto de amplificación con un tamaño aproximado de 721 bp. Estos resultados confirman que la temperatura utilizada durante la extracción de ARN genómico no influye de manera significativa en la calidad del material obtenido. Asimismo, se determinó que un rango de peso de tejido vegetal entre 60 y 80 mg es adecuado para la obtención de ARN de buena calidad.

### Figura 6

*Resultados de validación en gel de electroforesis.*



*Nota:* El gel de electroforesis muestra la integridad del ARN extraído y la amplificación por RT-PCR de muestras de arroz, incluyendo controles negativos y positivos, lo que permitió validar la calidad del material genético y la especificidad de la amplificación.

Durante la validación del protocolo se incluyeron muestras foliares sin síntomas visibles de la enfermedad, correspondientes a las muestras 18, 60, 84 y 74 [Figura 7 *Muestras asintomáticas de RHBV.*]. Algunas de estas muestras resultaron positivas mediante la RT-PCR, lo que evidencia que la detección molecular del RHBV no depende exclusivamente de la expresión sintomática, confirmando la utilidad del protocolo para identificar infecciones latentes o en etapas tempranas.

**Figura 7**

*Muestras asintomáticas de RHBV.*

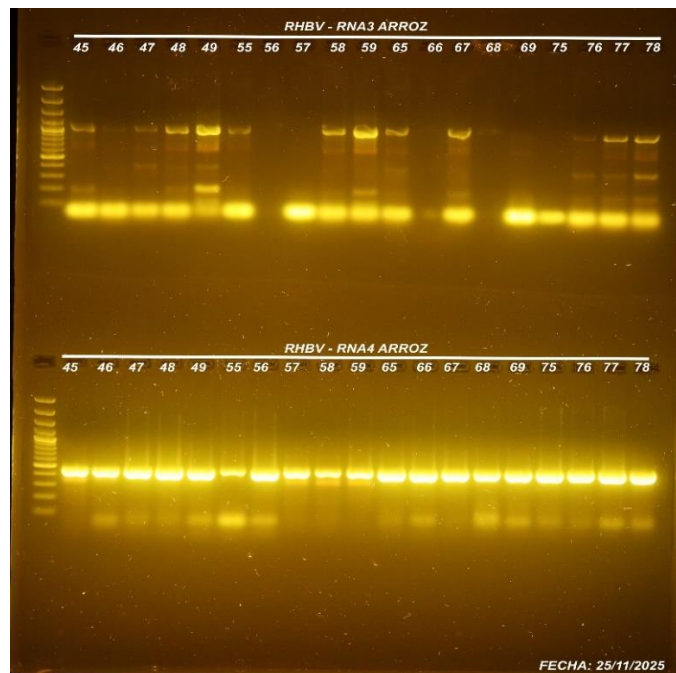


*Nota:* Las imágenes corresponden a hojas de arroz recolectadas en campo que no presentaron síntomas visibles característicos del virus de la hoja blanca al momento del muestreo.

A pesar de que los cebadores utilizados para amplificar los segmentos ARN3 y ARN4 corresponden al mismo virus, el segmento 3 presentó menor cantidad de resultados positivos en comparación con el segmento 4, incluso en muestras provenientes de los mismos sitios [Figura 8 *Comparación de los resultados de amplificación por RT-PCR de los segmentos ARN3 y ARN4 del RHBV*]. Asimismo, en las reacciones positivas del ARN3 se observaron bandas de baja intensidad en la revelación de PCR por gel de electroforesis, lo que sugiere una menor eficiencia de amplificación. Este comportamiento indica la posible existencia de divergencias nucleotídicas en las regiones de unión de los cebadores utilizados para el ARN3, lo que implica que este segmento no representa regiones altamente conservadas del genoma viral, afectando la eficiencia

de amplificación mediante PCR. A diferencia del segmento 4 el cual su función es codificar proteínas no constitutivas, asociadas al movimiento viral, siendo más conservadas evolutivamente; mientras que el segmento 3, al ser un supresor del sistema inmune del hospedero, está fuertemente enganchada a la presión de selección del hospedero.

**Figura 8** Comparación de los resultados de amplificación por RT-PCR de los segmentos ARN3 y ARN4 del RHBV



*Nota:* Todas las muestras evaluadas en esta reacción de PCR presentaron síntomas característicos del virus de la hoja blanca del arroz.

### 3.3 Análisis filogenético

#### 3.3.1 Segmento 4

Este estudio utilizó 24 secuencias del gen ARN4 del RHBV para el análisis filogenético de las cuales 17 secuencias corresponden a muestras recolectadas en campo, 6 secuencias extraídas del GenBank [Tabla 3

*Aislados de ARN3 y ARN4 utilizados para este trabajo.*] y una secuencia del 2013 recolectada en Daule. El tamaño de los amplicones oscilan entre los 330 a 465 pares de bases. Las secuencias de

referencia provenientes de GenBank corresponden a aislamientos reportados en Colombia, Costa Rica y Peru; fueron incluidas para evaluar la diversidad genética a escala global.

El árbol filogenético de máxima verosimilitud (ML) del segmento 4 del virus de la hoja blanca del arroz (RHBV) incorporo las longitudes de las ramas, reflejando el nivel de divergencia genética acumulada entre muestras, y los valores de soporte Bootstrap que indican la confiabilidad de los nodos del árbol [Figura 9

*Árbol filogenético de secuencia 4 de RHBV.*].

El árbol mostro que la mayoría de los aislamientos locales se agrupan en un clado principal, caracterizado por ramas cortas que oscilan de 0.000 a 0.009, dando alta similitud entre las secuencias y baja variabilidad genética entre los diferentes cantones. Dentro de este conjunto, se encuentra secuencias idénticas con divergencia mínima, ejemplos claros se encuentran en grupos cercanos como *Babahoyo Las Guaijas 48 – Babahoyo SDG 60 F y Santa Lucía 22 – Santa Lucía 27*, donde la longitud de las ramas es prácticamente cero.

Las secuencias internacionales (AF004657, L14952, KY369922 y NC036599, PQ560685 y PQ560688) se agrupan en clados filogenéticos diferenciados respecto a las secuencias nacionales, lo que evidencia una separación genética asociada al origen geográfico, con soporte *Bootstrap* altos (>69%), con buen soporte estadístico para las ubicaciones de los clados.

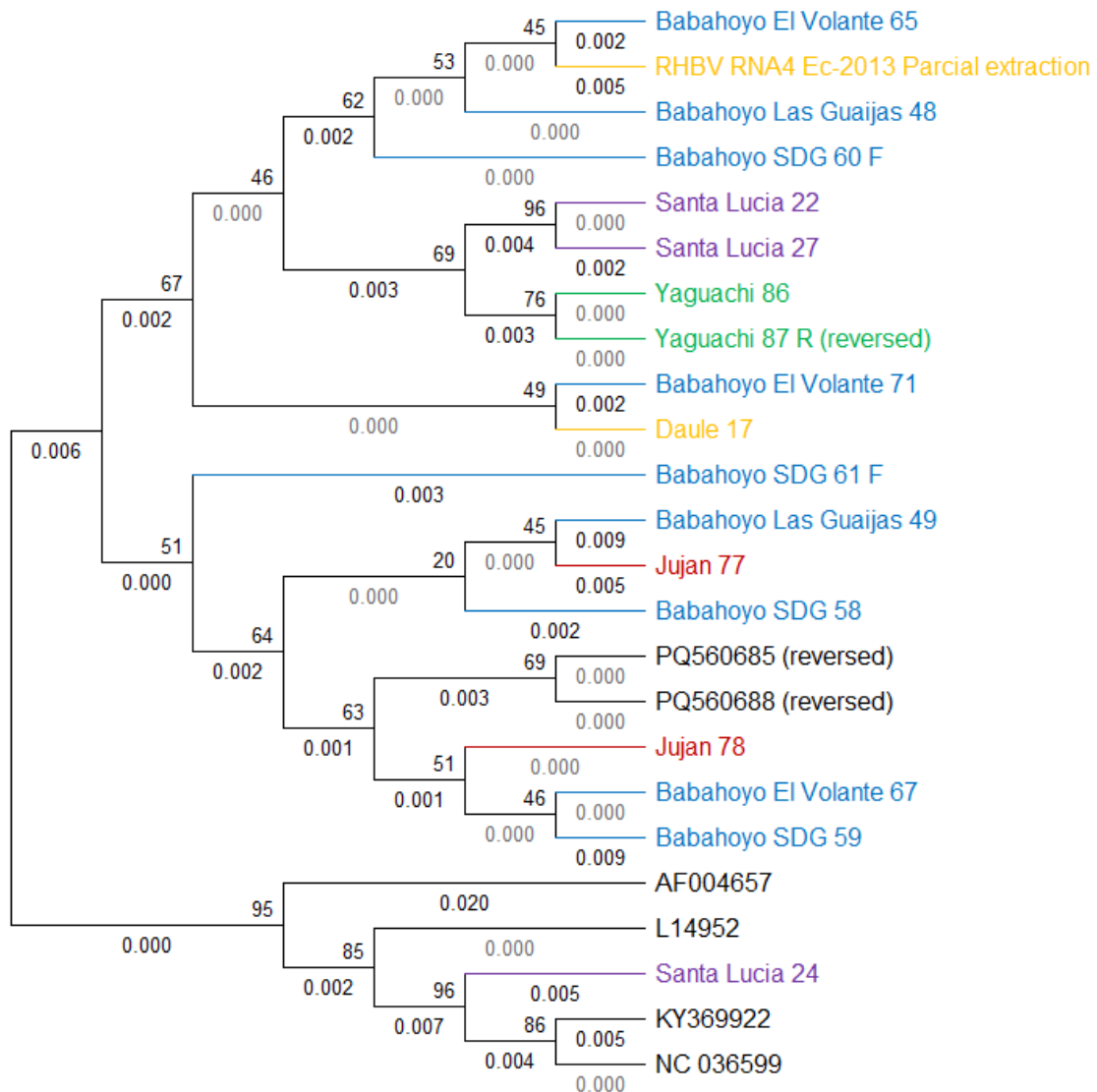
En contraste, las secuencias nacionales procedentes de distintas localidades (Babahoyo, Santa Lucía, Juján, Daule y Yaguachi) se agruparon en clados con valores *Bootstrap* bajos a moderados (<70%) y ramas cortas, lo que sugiere una alta similitud genética entre las cepas locales y una baja variabilidad dentro del grupo. Este patrón indica que las muestras nacionales probablemente pertenecen a un mismo linaje, con genes conservados lo que impide distinguirlos estadísticamente con alta confianza.

En general, la baja variabilidad genética observada en el segmento ARN4 se debe a que esta región se conserva considerablemente a lo largo del tiempo, debido a su función de codificar

la proteína no estructural NS4. Si bien la función específica de esta proteína en el RHBV aún se desconoce, para proteínas homólogas de NS4 en tenuivirus participa en el movimiento viral intercelular. Dado que esta proteína es esencial la eficiencia en la replicación del RHBV, mutaciones en esta región podrían comprometer la viabilidad viral, generando una fuerte presión selectiva que limita la acumulación de cambios genéticos.

**Figura 9**

*Árbol filogenético de secuencia 4 de RHBV.*



*Nota* El árbol filogenético fue construido a partir de secuencias del segmento ARN4 del RHBV, incluyendo aislamientos locales y secuencias de referencia. Los valores en los nodos

corresponden al soporte Bootstrap y las longitudes de rama representan la distancia genética entre las secuencias analizadas.

### 3.3.2 Segmento 3

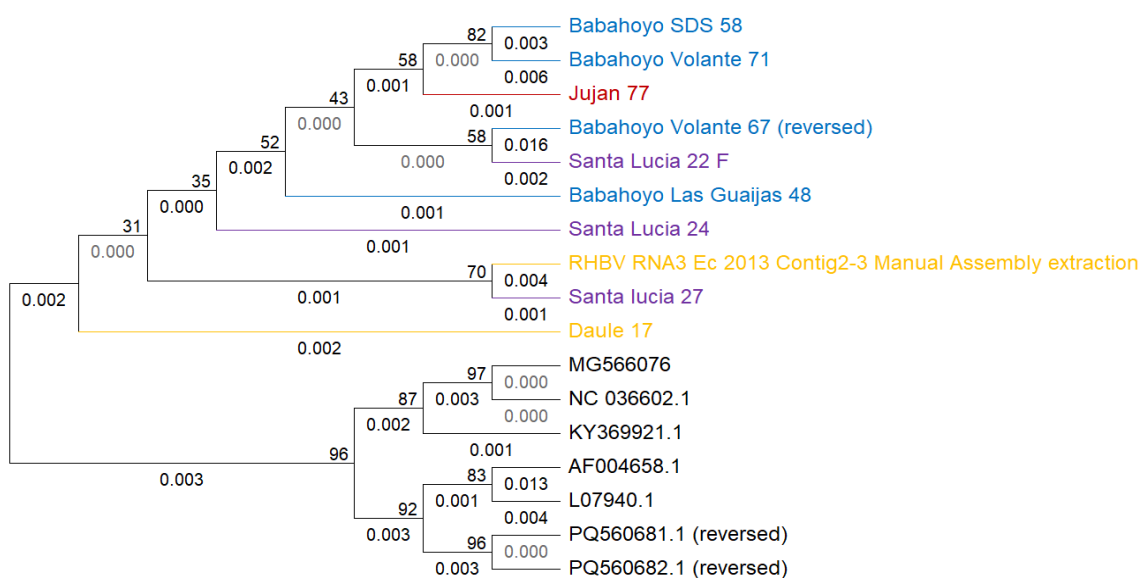
Para el análisis filogenético del segmento ARN3, solo se incluyeron las muestras que mostraron una amplificación exitosa de este segmento, destacando que no todas las muestras positivas para RHBV amplificaron el ARN3, ya que algunas muestras que dieron positivo para el segmento ARN4 no mostraron amplificación para el ARN3 y, por lo tanto, se excluyeron del análisis filogenético correspondiente.

A partir de dichas muestras el análisis filogenético de máxima verosimilitud (ML) del segmento ARN3 [Figura 10

*Árbol filogenético de secuencia 3 de RHBV.*] se construyó utilizando 17 secuencias, de las cuales 9 corresponden a aislamientos nacionales, incluyendo una secuencia recolectada en Daule en 2013, y 7 secuencias internacionales obtenidas de la base de datos GenBank [Tabla 3 *Aislados de ARN3 y ARN4 utilizados para este trabajo.*], donde el tamaño del amplicón varía entre los 575 y 1000 pares de base.

#### Figura 10

*Árbol filogenético de secuencia 3 de RHBV.*



*Nota* El árbol filogenético fue construido a partir de secuencias del segmento ARN4 del RHBV, incluyendo aislamientos locales y secuencias de referencia.

A partir del árbol se evidenció una baja variabilidad genética entre las secuencias nacionales, agrupándose en un único clado con longitudes de ramas cortas y valores *Bootstrap* bajos, indicando elevada similitud entre las secuencias analizadas.

Las secuencias internacionales (NC036602, MG566076, KY369921, L07940, PQ560681, PQ560682 y AF004658) se agruparon en un clado bien definido y separado de las secuencias nacionales, la combinación de ramas cortas y valores *Bootstrap* elevados (87–97%) indica una alta similitud genética entre dichos aislamiento, con una separación filogenética clara con el resto de las secuencias, dando un agrupamiento estable y soportado estadísticamente. La secuencia histórica RHBV RNA3 Ec 2013 se agrupó en el mismo clado con secuencias nacionales recientes, lo que sugiere la persistencia de un linaje viral en el tiempo, con cambios genéticos graduales en el segmento ARN3.

**Tabla 3**

*Aislados de ARN3 y ARN4 utilizados para este trabajo.*

<b>Segmento</b>	<b>No. De acceso a GenBank</b>	<b>País de Origen</b>	<b>Anfitrión</b>	<b>Fecha de recolección</b>	<b>Referencia</b>
<b>RNA4</b>	KY369922.1	Perú	<i>Tagosodes orizicolus</i>	2016	(Bolaños, et al., 2017)
	PQ560685.1	USA	<i>Oryza Sativa</i>	2024	(Khanal,S., et al., 2024)
	PQ560688.1	USA	<i>Oryza Sativa</i>	2024	(Khanal,S., et al., 2024)
	NC_036599.1	Colombia	<i>Oryza Sativa</i>	2017	(Jimenez et al., 2018)
	L14952.1	Colombia	<i>Oryza sativa</i>	1993	(Ramirez et al., 1993)
	AF004657.1	Costa Rica	NA	1997	(Miranda et al., 1997)
<b>RNA3</b>	KY369921.1	Peru	<i>Tagosodes orizicolus</i>	2016	(Bolaños, et al., 2017)
	NC_036602	Colombia	<i>Oryza Sativa</i>	2017	(Jimenez et al., 2018)
	MG566076	Colombia	<i>Oryza Sativa</i>	2017	
	L07940	Costa Rica	<i>Oryza Sativa</i>	2007	(Ramirez et al., 1993)
	AF004658	Colombia	NA	1997	(Miranda et al., 1997)
	PQ560681.1	USA	<i>Oryza Sativa</i>	2024	(Khanal,S., et al., 2024)
	PQ560682.1	USA	<i>Oryza Sativa</i>	2024	(Khanal,S., et al., 2024)

*Nota:* Tomado del NCBI Virus (<https://www.ncbi.nlm.nih>)

# Capítulo 4

## 4.1 Conclusiones y recomendaciones

### 4.1.1 Conclusiones

- La distribución espacial del RHBV en las provincias del Guayas y Los Ríos mostro una presencia heterogénea del patógeno, con variaciones marcadas entre cantones; donde los mayores porcentajes se mostraron en Babahoyo, Alfredo Baquerizo Moreno y Santa Lucía, mientras que otros cantones presentaron baja o nula detección; debido a la distribución geográfica distantes, sin patrón espacial continuo, sugiere que el RHBV no depende únicamente de la proximidad geográfica, sino que esta influencia por el movimiento del vector *Tagosodes orizicolus*, el uso de semillas no certificadas y prácticas agronómicas locales.
- El protocolo molecular para la detección del RHBV demostró ser eficiente, reproducible y confiable para el diagnóstico del virus en muestras foliares de arroz. El método de extracción por medio de isopropanol-acetato de potasio permitió obtener ácidos nucleicos de alta calidad y pureza. La comparación entre los segmentos ARN3 y ARN4 evidenció diferencias en la eficiencia de amplificación, observándose una mayor frecuencia de resultados positivos y bandas más definidas para el segmento 4, mientras que el segmento 3 presentó menor detectabilidad, lo que sugiere la presencia de divergencias nucleotídicas en las regiones de unión de los cebadores y una mayor variabilidad genética en este segmento, afectando su amplificación mediante PCR.
- El análisis filogenético de los segmentos ARN3 y ARN4 en general se evidencio una baja variabilidad genética entre los aislados nacionales e internacionales, reflejando la circulación de linajes virales altamente conservados en las arroceras.

#### **4.1.2 Recomendaciones**

Una vez culminado el estudio, se propone las siguientes recomendaciones:

- Para fortalecer el protocolo de diagnóstico molecular, se recomienda evaluar o de ser necesario, diseñar nuevos cebadores dirigidos a regiones genómicas sean altamente conservadas entre aislados, pero no constitutivas, con el fin de mantener la especificidad del diagnóstico y reducir el riesgo de amplificaciones inespecíficas o resultados falsos positivos.
- Se recomienda ampliar el muestreo espacial y temporal en las plantaciones arroceras de la provincia del Guayas, incorporando los tres ciclos productivos del cultivo, así como diferentes ciclos agrícolas y variedades de arroz, con el fin de evaluar de manera integral la prevalencia del virus de la hoja blanca y determinar los periodos en los que se registra una menor incidencia, información que permitirá orientar estrategias de manejo y prevención más eficientes.
- Se sugiere para futuros análisis filogenéticos adoptar otras regiones del virus no exploradas en este trabajo como el genoma responsable de la replicación viral (ARN 1) o el genoma de codificar proteínas de la membrana (ARN2), con el fin de analizar cuáles son los fragmentos más variables del virus.
- Se sugeriría ampliar las provincias de muestreo, con el fin de recopilar más información de los diferentes aislados del virus en provincias, con mayor potencialidad del cultivo como pueden ser El Oro, Loja o Manabí, además de ampliar el muestreo cantonal en la provincia de Los Ríos.

## Referencias

- Bolaños, C., Leiva, A. M., Saavedra, J., Bruzzone, C., Cruz, M., & Cuellar, W. J. (2017). Occurrence and Molecular Detection of Rice hoja blanca virus (Genus Tenuivirus) in Peru. *Plant Disease*, 101(6), 1070–1070. <https://doi.org/10.1094/pdis-12-16-1797-pdn>
- Crossley, B. M., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Killian, M. L., Clement, T., & Toohey-Kurth, K. (2020). Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 32(6), 767–775. <https://doi.org/10.1177/1040638720905833>
- Cruz-Gallego, M., Rebolledo, M. C., Cuasquer, J. B., Cruz-Galvis, D. F., Peña-Fernández, A. L., Quintero, C., Silva-Córdoba, E. A., Álvarez-V, M. F., Jojoa-Cruz, S., Lorieux, M., Stuart, J. J., & Correa-Victoria, F. J. (2018). Identification of new sources of resistance to RHBV- rice hoja blanca virus. *Acta Agronomica*, 67(2), 368–374. <https://doi.org/10.15446/acag.v67n2.61334>
- Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca. (2021). Boletín Situacional Arroz 2021. Coordinación General de Información Nacional Agropecuaria. [https://fliphtml5.com/ijia/qzlr/Bolet%C3%ADn\\_Situacional\\_Arroz\\_2021/](https://fliphtml5.com/ijia/qzlr/Bolet%C3%ADn_Situacional_Arroz_2021/)
- de Miranda, J. R., Ramirez, B. C., Muñoz, M., Lozano, I., Wu, R., Haenni, A. L., Espinoza, A. M., & Calvert, L. A. (1997). Comparison of Colombian and Costa Rican strains of rice hoja blanca tenuivirus. *Virus Genes*, 15(3), 191–193. <https://doi.org/10.1023/a:1007974728671>
- Redacción Enfoque. (2025, September 3). Así afecta la plaga de la sogata al cultivo de arroz: Ecuador está en alerta. EDITORIAL VISTAZO. <https://www.vistazo.com/enfoque/2025-09-03-plaga-sogata-cultivos-arroz-ecuador-alerta-DE10055372>

- González, E. G. (2025, August 25). Comercialización del arroz: eterna incertidumbre por la improvisación. <https://www.larepublica.ec/blog/2025/08/25/comercializacion-del-arroz-eterna-incertidumbre-por-la-improvisacion/>
- Gorbalenya, A. E., & Lauber, C. (2017). Phylogeny of viruses ☆. In Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier.
- Jimenez, J., Carvajal-Yepes, M., Leiva, A. M., Cruz, M., Romero, L. E., Bolaños, C. A., Lozano, I., & Cuellar, W. J. (2018). Complete Genome Sequence of Rice hoja blanca tenuivirus Isolated from a Susceptible Rice Cultivar in Colombia. *Genome Announcements*, 6(7). <https://doi.org/10.1128/genomeA.01490-17>
- La Hora, R. (2025, July 26). Virus de la Hoja Blanca y precios bajos afectan al sector arrocero. La Hora. <https://www.lahora.com.ec/losrios/Virus-de-la-Hoja-Blanca-y-precios-bajos-afectan-al-sector-arrocero-20250825-0080.html>
- Lombeida García, E. D., Medina Litardo, R., Uvidía Vélez, M., & Pazmiño Pérez, Á. (2022). Caracterización de un sistema de producción de arroz (*Oriza sativa* L.) en el cantón Babahoyo. *Revista Científica y Tecnológica UPSE*, 9(2), 39–47. <https://doi.org/10.26423/rctu.v9i2.686>
- Manoj Kumar Saini<sup>1</sup>, Gaurav<sup>2</sup>, Harish BM<sup>3</sup>, Jitendra Kumar <sup>3</sup> and Kumar Sanu. (2023). DNA Sequencing techniques: Sanger to Next Generation Sequencing. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.8376904>
- Marys, E., & Carballo, O. (2007a). Desarrollo de una herramienta de diagnóstico para el virus de la hoja blanca del arroz en Venezuela. *Scielo*, 32(4), 262–265. [https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442007000400011](https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442007000400011)
- Marys, E., & Carballo, O. (2007b). Desarrollo de una herramienta de diagnóstico para el virus de la hoja blanca del arroz en Venezuela. *Interciencia*, 32(4), 262–265. [https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442007000400011](https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442007000400011)

- Medina, A. C. (2021, February 9). Perdidas en rendimiento causadas por el virus de la hoja blanca (VHBA) en el cultivo del arroz en el Departamento Norte de Santander, Colombia. Engormix. [https://www.engormix.com/agricultura/cultivo-arroz/perdidas-rendimiento-causadas-virus\\_a46679/](https://www.engormix.com/agricultura/cultivo-arroz/perdidas-rendimiento-causadas-virus_a46679/)
- Pedrozo, R., de Paula, S., Flasco, M., Dalla Lana, F., Jia, Y., & Nicolli, C. (2025). New threats to rice production: Emerging pathogens and their impact. In *Rice Cultivation and Consumption - Advancements in Research and Technology [Working Title]*. IntechOpen.
- Pérez, H. I., Rodríguez, I., & García, R. M. (2018a). Principales enfermedades que afectan al cultivo del arroz en Ecuador y alternativas para su control. *Revista Científica Agroecosistemas*, 9(1). <https://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes>
- Pérez, H. I., Rodríguez, I., & García, R. M. (2018b). Principales enfermedades que afectan al cultivo del arroz en Ecuador y alternativas para su control. 6(1), 16–27. <https://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes>
- Quiroz Camacho, J. (2012). *Variedades de arroz generadas por INIAP*. Guayaquil, EC: INIAP, Estación Experimental Litoral Sur, 2012. <https://repositorio.iniap.gob.ec/items/8d05a603-3a39-488c-8b27-3c527af620c8>
- Quito-Avila, D. F., & Martin, R. R. (2012). Real-time RT-PCR for detection of Raspberry bushy dwarf virus, Raspberry leaf mottle virus and characterizing synergistic interactions in mixed infections. *Journal of Virological Methods*, 179(1), 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.09.016>
- Ramirez, B. C., Lozano, I., Constantino, L. M., Haenni, A. L., & Calvert, L. A. (1993). Complete nucleotide sequence and coding strategy of rice hoja blanca virus RNA4. *The Journal of General Virology*, 74 ( Pt 11)(11), 2463–2468. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-74-11-2463>

- Rivera, M. (2025, August 23). ¿Qué se está haciendo para frenar la plaga sogata en Los Ríos y Guayas? Expreso. <https://www.expreso.ec/actualidad/que-se-esta-haciendo-para-frenar-la-plaga-sogata-en-los-rios-y-guayas-254471.html>
- Ruilova, M. B., Cobos, F. J., & Gómez, J. C. (2022). Manejo en el cultivo de arroz. <https://libros.utb.edu.ec/index.php/utb/catalog/view/93/58/273>
- Saini, M. K., Gaurav, Harish, B. M., Kumar, J., & Sanu, K. (2023). DNA Sequencing techniques: Sanger to Next Generation Sequencing. *A Monthly e Magazine*, 2378–2393. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.8376904>
- Schmerker, J. (2024, April 23). What is Sanger sequencing and is it still relevant today? IDT. <https://www.idtdna.com/page/support-and-education/decoded-plus/what-is-sanger-sequencing-and-is-it-still-relevant-today/>
- SIPA. (2025, October 5). Rendimientos de arroz 2024 - Caracterización Producción. SIPA. <https://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/rendimientos-de-arroz-2024-cp>
- Velázquez, J., Rosales, A., Rodríguez, H., & Salas, R. (2015). Determinación de las etapas de inicio de macollamiento, inicio de primordio, floración y madurez en la planta de arroz , con el sistema s, v y r correlacionado con la sumatoria térmica. 39(2), 121–130. [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0377-94242015000200121&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0377-94242015000200121&lng=en&tlng=es).
- Wang, Y. M., Ostendorf, B., Gautam, D., Habili, N., & Pagay, V. (2022). Plant viral disease detection: From molecular diagnosis to optical sensing technology—A multidisciplinary review. *Remote Sensing*, 14(7), 1542. <https://doi.org/10.3390/rs14071542>
- Zambrano, L. (2025, August 31). Las plagas acechan al cultivo del arroz en Ecuador. Expreso. <https://www.expreso.ec/actualidad/economia/las-plagas-acechan-al-cultivo-del-arroz-en-ecuador-255291.html>

Zeigler, R. S. (1990). Genetic determination of replication of rice hoja Blanca virus within its planthopper vector, *Sogatodes oryzae*. *Phytopathology*, 80(6), 559.  
<https://doi.org/10.1094/phyto-80-559>