

**PRODUCCIÓN DE PLANTAS *IN VITRO* LIBRES DEL VIRUS  
CymMV EN UN HÍBRIDO COMERCIAL DE *CATTLEYA*  
(ORCHIDACEAE) UTILIZANDO RIBAVIRINA.**

**LORENA GUADALUPE FRANCO MEJÍA**

Práctica de Especialidad presentado a la Escuela de Agronomía  
como requisito parcial para optar al grado de  
Bachillerato en Ingeniería en Agronomía

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA  
SEDE REGIONAL SAN CARLOS**

**2006**

**PRODUCCIÓN DE PLANTAS *IN VITRO* LIBRES DEL VIRUS  
CymMV EN UN HÍBRIDO COMERCIAL DE *CATTLEYA*  
(ORCHIDACEAE) UTILIZANDO RIBAVIRINA.**

**LORENA GUADALUPE FRANCO MEJÍA**

Practica de Especialidad presentado a la Escuela de Agronomía  
para obtener el grado de  
Bachillerato en Ingeniería en Agronomía

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA  
SEDE REGIONAL SAN CARLOS**

**2006**

**PRODUCCIÓN DE PLANTAS *IN VITRO* LIBRES DEL VIRUS  
CymMV EN UN HÍBRIDO COMERCIAL DE *CATTLEYA*  
(ORCHIDACEAE) UTILIZANDO RIBAVIRINA.**

**LORENA GUADALUPE FRANCO MEJÍA**

**Aprobado por los miembros del Tribunal Evaluador:**

Ing. Agr. Sergio Torres Portuguez MSc.

---

Asesor

Ing. Biotec. Wayner Montero Carmona.

---

Jurado

Ing. Joaquín Durán Mora MSc.

---

Jurado

Ing. Agr. Fernando Gómez Sánchez MAE.

---

Coordinador  
Trabajos Finales de Graduación

Ing. Agr. Olger Murillo Bravo. MSc.

---

Director  
Escuela de Agronomía

## **DEDICATORIA**

El presente documento se lo dedico a mi madre, a mi hijo Francisco Javier, a mi compañero y amigo Tobías.

## **AGRADECIMIENTO**

A todos los funcionarios del Instituto Tecnológico de Costa Rica en San Carlos, por su sencillez y profesionalismo con que se desenvuelven en sus puestos de servicio hacia los estudiantes.

A los funcionarios y amigos que ya no están entre nosotros, pero si con nuestro Padre Celestial, y que conservamos en nuestros corazones.

Y el más sincero agradecimiento al personal del Laboratorio de Biotecnología (Sergio Torres, Wayner Montero y Jaime Soto) y al Laboratorio de Biología Molecular, a Omar Gatjens y Alejandro Arce por las pruebas de laboratorio, todos me enseñaron humildad, perseverancia, respeto y sobre todo amor a la investigación.

Mil gracias...

## Tabla de Contenido

1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1. Justificación del trabajo	3
1.2. Objetivos	3
1.3. Hipótesis	3
2.- REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Comercialización de orquídeas	5
2.2. Importancia de las técnicas de cultivo de tejidos en la reproducción de las orquídeas libres de virus	6
2.3. Propagación sexual de las orquídeas	7
2.4. Propagación clonal <i>in vitro</i> de las orquídeas	9
2.5. Virus en orquídeas	9
2.5.1. Virus del mosaico del <i>Cymbidium</i> (CymMV)	11
2.5.2. Síntomas que produce las infecciones del virus del mosaico del <i>Cymbidium</i> (CymMV)	12
2.5.3. Transmisión del virus del mosaico del <i>Cymbidium</i> (CymMV)	14
2.5.4. Virus del mosaico del <i>Cymbidium</i> (CymMV) en Costa Rica	15
2.5.5. Detección de virus del mosaico del <i>Cymbidium</i> (CymMV)	16
2.5.6. Limpieza viral	19
2.5.6.1. Cultivo de meristemos	20
2.5.6.2. Ingeniería genética	22
2.5.6.3. Termoterapia	23
2.5.6.4. Quimioterapia	25
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1. Localización del estudio	29
3.2. Determinación de la presencia del virus del mosaico del <i>Cymbidium</i> (CymMV).	29
3.3. Medio de cultivo	31
3.3.1. Establecimiento <i>in vitro</i> de un híbrido comercial de <i>Cattleya</i> con	

CymMV.	31
3.3.2. Efecto de la Ribavirina en la limpieza viral de protocormos de un híbrido de <i>Cattleya</i> comercial positivo al virus CymMV.	31
3.3.3. Determinar la eliminación del virus del mosaico del <i>Cymbidium</i> (CymMV) mediante el proceso de RT-PCR en un híbrido de <i>Cattleya</i> .	32
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.1. Determinación de la presencia del virus del mosaico del <i>Cymbidium</i> (CymMV).	34
4.2. Establecimiento <i>in vitro</i> de un híbrido comercial de <i>Cattleya</i> con CymMV.	34
4.3. Efecto de la Ribavirina en la limpieza viral de protocormos de un híbrido de <i>Cattleya</i> comercial positivo al virus CymMV.	37
4.4. Determinar la eliminación del virus del mosaico del <i>Cymbidium</i> (CymMV) mediante el proceso de RT-PCR en un híbrido de <i>Cattleya</i> .	40
4.5. Determinación de la presencia del virus del mosaico del <i>Cymbidium</i> (CymMV).	42
4.6. Establecimiento <i>in vitro</i> de un híbrido comercial de <i>Cattleya</i> con CymMV	43
4.7. Efecto de la Ribavirina en la limpieza viral de protocormos de un híbrido de <i>Cattleya</i> comercial positivo al virus CymMV.	44
4.8. Determinar la eliminación del virus del mosaico del <i>Cymbidium</i> (CymMV) mediante el proceso de RT-PCR en un híbrido de <i>Cattleya</i> .	45
5.- CONCLUSIONES	48
6.- RECOMENDACIONES	50
7.- BIBLIOGRAFÍA	51
8.- APENDICE	57

## Lista de Cuadros

Cuadro	Página
1 Concentración de Ribavirina a utilizar para la eliminación del virus del mosaico del <i>Cymbidium</i> (CymMV). ITCR, San Carlos, Alajuela. Noviembre de 2006.	32

## Lista de Figuras

Figura		Página
1.	Brote joven de Blc. Blue Grotto 'Blue Lustre', infectado con el mosaico del <i>Cymbidium</i> (CymMV) utilizado para el establecimiento <i>in vitro</i> . Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos, Alajuela. Noviembre de 2006.	30
2.	Yemas laterales A, B y C a los 16 días; D, E y F a los 27 días después de la siembra de Blc. Blue Grotto 'Blue Lustre' (las flechas rojas indican donde se encuentran ubicadas), infectados con el virus del mosaico del <i>Cymbidium</i> (CymMV) establecidos <i>in vitro</i> . Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos, Alajuela. Noviembre de 2006.	35
3.	Formación de protocormos (PLB) a 100 días (A), formación de brotes (Br) laterales a los 100 días después del establecimiento <i>in vitro</i> (B), de una Blc. Blue Grotto 'Blue Lustre', infectados con el virus del mosaico del <i>Cymbidium</i> (CymMV). Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos, Alajuela. Noviembre de 2006.	36
4.	Regeneración de brotes a 238 días después del establecimiento <i>in vitro</i> a partir de PLBs, de Blc. Blue Grotto 'Blue Lustre', infectados con el virus del mosaico del <i>Cymbidium</i> (CymMV). Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos, Alajuela. Noviembre de 2006.	36
5.	Porcentaje de sobrevivencia de los PLBs de Blc. Grotto 'Blue Lustre', a tres diferentes dosis de Ribavirina (RBV). Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos, Alajuela. Noviembre de 2006.	37

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
<b>6.</b>	Protocormo de necrosis de los explantes de Blc. Grotto 'Blue Lustre', a tres diferentes dosis de Ribavirina (RBV). Plantas desarrolladas a partir de PLBs. Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos, Alajuela. Noviembre de 2006.	38
<b>7.</b>	Explantos de Blc. Blue Grotto 'Blue Lustre', infectados con el virus del mosaico del <i>Cymbidium</i> (CymMV), a los 43 días de estar expuesto a 40 mg/l de Ribavirina. Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos, Alajuela. Noviembre de 2006.	39
<b>8.</b>	Explanter expuestos a RBV, parcialmente necrosados y un PLB que sobrevive, de Blc. Blue Grotto 'Blue Lustre', a los 62 días. Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos, Alajuela. Noviembre de 2006.	39
<b>9.</b>	Electroforesis 1 y 2 de ADNc viral en geles al 1.7%, utilizando el proceso de Retrotranscripción y amplificación del ADN copia mediante PCR (RT-PCR), en la detección del virus del mosaico del <i>Cymbidium</i> (CymMV). Instituto Tecnológico de Costa Rica. San Carlos, Alajuela. Noviembre de 2006.	41

## Resumen

La propagación masiva de orquídeas, así como la importación y exportación de flor de corta y planta entera se ha incrementado en los últimos años, lo que pone en riesgo la producción comercial de material vegetal, si es infectado por uno o varios virus, que en muchos casos pasan desapercibidos en el intercambio de material, ya que algunos son asintomáticos, por lo que ha aumentado la dispersión a nivel mundial. En Costa Rica se ha realizados pocos trabajos en la identificación de virus, pero ninguno sobre la limpieza viral mediante la quimioterapia. El objetivo de este trabajo fue evaluar la concentración de Ribavirina (antiviral) para la eliminación del virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV), en protocormos (PLBs) de un híbrido comercial de *Cattleya*. Por medio de la prueba de ELISA se comprobó la presencia del CymMV en el híbrido, se probaron tres concentraciones de Ribavirina 30, 35 y 40 mg/l. Después de 62 días se evaluó la eficiencia de los tratamientos, mediante la prueba de RT-PCR, técnica muy sensible para la detección de bajan concentración de virus. Esta técnica de detección ayudó a evidenciar la presencia del CymMV y virus del anillado del *Odontoglossum* (ORSV), en las muestras analizadas. El 75% de los explantes tratados con 40 mg/l de Ribavirina resultó negativa para CymMV mediante la detección de RT-PCR.

**Palabras claves:** Ribavirina, Virazole, CymMV, 1-β-D-ribofurasosyl-1,2,4-triazole-3-carboxomide, Orquídea, *Cattleya*, *Brassolaeliocattleya*, RT-PCR

## 1.- INTRODUCCIÓN

La afición al cultivo de orquídeas, se debe a la diversidad en tamaño, forma, y colores, especialmente de sus flores y también considerada planta ornamental, lo que ha elevado sus precios, convirtiéndola en un producto de importancia económica a nivel mundial (Alvarado 2000).

Entre los principales países productores de orquídeas se encuentran: Brasil, China, Costa Rica, Estados Unidos, Filipinas, Indonesia, Países Bajos y Tailandia. El aumento de la demanda en los países industrializados ofrece una oportunidad para el desarrollo de mercados de exportación a otros países en desarrollo (Arias 2002, Procomer 2004).

En el 2004, PROCOMER (Promotora de Comercio Exterior de Costa Rica) indica que Costa Rica exportó a Canadá, El Salvador, Honduras, México, Nicaragua y Estados Unidos un total de 25 129 kg. de producto, siendo los Estados Unidos el principal comparador (Arias 2002, Procomer 2004).

En Costa Rica, como en muchos otros países tropicales, el cultivo y comercio de especies nativas e introducidas de orquídeas, como plantas de colección o flor de corta, ha tomado auge en años recientes. Sin embargo, no se ha identificado ni determinado la prevalencia de los virus que afectan tanto las orquídeas nativas como las introducidas ya sea en las plantaciones comerciales, colecciones o en sus hábitats naturales (Moreira *et al.* 1999).

Uno de los virus más importantes desde el punto de vista económico y de prevalencia es el mosaico del *Cymbidium* ("*Cymbidium* mosaic potexvirus", CymMV). Los síntomas foliares inducidos por CymMV van desde el estriado clorótico a puntos negros o patrones de líneas necróticas con parches hundidos. No se conoce de vectores naturales para este virus, sin embargo es dispersado a

través de herramientas contaminadas durante la división de plantas, la resiembra y la corta de flores (Chacón 2002).

En Costa Rica se han publicado tres estudios de virus de orquídeas (Velasco *et al.* 1986, Moreira *et al.* 1999 y Chacón 2002). Se estudiaron híbridos de *Cymbidium*, *Phaius tankervilleae* (especie de hábito terrestre), y orquídeas nativas cultivadas en invernaderos, en todo los casos las plantas fueron obtenidas de viveros en el Valle Central, identificando al CymMV como el más frecuentemente encontrado.

En la actualidad, uno de los métodos más utilizados para detectar virus en orquídeas, es la técnica de ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”), debido a la especificidad de sus resultados, costo económico relativamente bajo, rapidez de las pruebas (Lim *et al.* 1993, Hu *et al.* 1994, Seoh *et al.* 1998, Chacón 2002).

En la limpieza de virus es importante disponer de material vegetal por lo que la primera etapa es el establecimiento *in vitro*, se utilizan los brotes de crecimiento rápido que contiene ápices, laterales y apicales, también se puede utilizar la base de la hoja (Pierik 1990, Kuan y González 1993, Gutiérrez y Chen 1994, Alvarado 2000).

Para la tercera etapa, se aplicará la técnica de quimioterapia a protocormos regenerados a partir de los explantes que se utilizaron en el establecimiento *in vitro*, se utilizó Ribavirina en diferentes dosis 30, 35 y 40 mg/l por periodo de 8 semanas para inactivar el virus de CymMV (Francki 1970, Brunt *et al.* 1996, Chacón 2002).

## 1.1. Justificación del trabajo

Se necesita multiplicar masivamente híbridos comerciales de orquídeas, libres de virus mediante la propagación *in vitro* evitando la diseminación de virus, y reducir el riesgo de pérdidas económicas.

## 1.2. Objetivos

### Objetivo General

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de Ribavirina en la eliminación del virus del mosaico del *Cymbidium* en *Cattleya* (Orchidaceae).

### Objetivos Específicos

1. Determinar de la presencia de virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV) mediante prueba de ELISA en un híbrido comercial de *Cattleya*.
2. Establecer *in vitro* de un híbrido comercial de *Cattleya* que presente el virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV).
3. Analizar del efecto de diferentes concentraciones de Ribavirina para la limpieza viral en protocormos de un híbrido comercial de *Cattleya*.
4. Determinar la eliminación del virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV) mediante el proceso de RT-PCR en un híbrido comercial de *Cattleya*.

## 1.3. Hipótesis

El uso de Ribavirina eliminaría la concentración de virus del CymMV aplicado a un híbrido comercial de *Cattleya*.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

En Costa Rica, como en muchos otros países tropicales, el cultivo y comercio de especies nativas e introducidas de orquídeas, como plantas de colección o flor de corta, ha tomado auge en años recientes (Moreira *et al.* 1999).

Según los datos reportados por la Promotora de Comercio Exterior de Costa Rica (PROCOMER), las exportaciones de orquídeas de nuestro país han venido incrementándose desde 1999 a la fecha (Arias 2002, Procomer 2004).

No hay datos exactos sobre las exportaciones desde Costa Rica de plantas de orquídeas, ya que PROCOMER las contabiliza en conjunto con otro tipo de plantas bajo la denominación “exportaciones de esquejes e injertos productores de flores y follajes”. Para el 2005, las ventas al exterior de este rubro fueron de \$16,4 millones, para un crecimiento del 4%. Diez compañías son las que realizan estas exportaciones (Cabezas 2006).

En cuanto al destino de las exportaciones, se tiene que los principales mercados para las orquídeas costarricenses son Estados Unidos, México y Canadá. Es importante anotar que la tendencia de las exportaciones a países como Estados Unidos es muy constante desde 1999. Tanto en México como en Canadá, si bien es cierto el volumen exportado no es tan alto como hacia Estados Unidos, la tendencia es creciente (Arias 2002, PROCOMER 2004, Cabezas 2006).

El mercado para las orquídeas ha ido creciendo. Las orquídeas reproducidas artificialmente se comercian en enormes cantidades, constituyendo probablemente más del 90% del volumen total de orquídeas comercializadas internacionalmente, según datos de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES). Obsequiar una orquídea o lucirla es símbolo de exclusividad y gusto.

Actualmente, es toda una moda que se regalen estas flores en lugares como Nueva York (Cabezas 2006).

## **2.1. Comercialización de orquídeas**

Las orquídeas para corta, a diferencia de numerosas plantas productoras de flores, han probado su cualidad de “no pasar de moda”. En otras especies es frecuente observar cambios en la preferencia de los mercados, posiblemente por el menor margen de diversidad que poseen y por la poca plasticidad genética presente en esas familias. Ejemplos de modas periódicas de consumo se ha dado en flores como clavel (*Dianthus* sp.), crisantemo (*Chrysanthemum* sp.), gerberas (*Gerbera* sp.), girasoles (*Helianthus* sp.), etc., según sean las caprichosas corrientes mercantiles. En orquídeas la preferencia por *Cattleya* spp., *Dendrobium* spp., *Vanda* spp., *Cymbidium* spp., y otras, se mantiene constante con ligeras variaciones. Este rasgo parece proyectarse a futuro, pues siempre habrá nuevas variantes de exquisita belleza lanzadas al mercado mundial, sin agotar el potencial existente en esta familia (Rivera 1998, Cabezas 2006).

En lo relativo a la flor en planta, también la orquídea mantiene una buena posición a través del tiempo, esto sucede al no tratarse de una “planta de maquila”, que se ensambla en un vivero y se desecha después de cierto tiempo. Situación usual en plantas como el geranio (*Geranium* sp.), fucsias (*Fuchsia* sp.), chinas (*Impatiens* sp.), pomos (*Chrysanthemum* sp.), etc., plantas que por manipulación cultural o sus propias características, tienen una vida útil corta y no son capaces de sobrevivir como lo hacen las ornamentales perennes. Las especies de orquídeas más comercializadas como plantas con flor, al no ser desechables, se convierten por lo general en una especie de mascota con una serie de ventajas sobre las especies animales, entre las cuales se pueden citar la facilidad y bajo costo de darles mantenimiento, la no contaminación del medio con excretas y la demanda de poco espacio. Razones que las hacen llevar mucho de

los requisitos necesarios para convivir con las generaciones del futuro (Rivera 1998).

Las flores cortadas más importantes tanto en la producción como en su uso en diversas partes del mundo son los claveles, las rosas de invernaderos, los crisantemos, los lirios, las gerberas, los gladiolos y las orquídeas. Éstas últimas son generalmente de los géneros *Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium* y *Paphiopedilium*, aunque las orquídeas 'araña' (*Aeris*, *Aerides*, *Oncidium* y *Renanthera*) son exportadas en constante aumento desde Malasia y Tailandia (Salinger 1991, citado por Arias 2002).

## **2.2. Importancia de las técnicas de cultivo de tejidos en la reproducción de las orquídeas libres de virus**

La aplicación de técnicas de cultivo de tejidos para la multiplicación clonal de plantas seleccionadas fue originalmente desarrollada para el género *Cymbidium*. Se inició con Morel en 1960, quien cultivó los meristemos apicales de *Cymbidium* para obtener plantas libres de virus y observó que a partir de un explante inicial era posible obtener cientos de plantas idénticas a la planta madre (clones) y en poco tiempo. El clonado de orquídeas a partir de meristemo se convirtió de esa forma en la primera aplicación comercial de la propagación vegetativa *in vitro* (Pierik, 1990, Gutiérrez y Chen 1994, Rivera 1998).

Esta investigación fue de gran utilidad para la propagación clonal de las orquídeas, más tarde se utilizó también en *Cattleya* y en muchos géneros más. Hoy en día es una de las técnicas más utilizada a gran escala, para la obtención de plantas libres de virus, reproducción de híbridos valiosos y mejoramiento de la calidad comercial de las orquídeas (Gutiérrez y Chen 1994, Rivera 1998).

Lawson y Hsu (1995), citados por Chacón (2002), proponen que el desarrollo de las técnicas de micropropagación de mericlones (clones

meristemáticos) y el cultivo *in vitro* de semillas redujeron considerablemente el precio de las orquídeas, contribuyendo a la popularización de su cultivo. La intensidad de la producción ha favorecido el intercambio de plantas, muchas veces sin los debidos cuidados, con el consiguiente aumento de los virus que las afectan, los cuales en muchas ocasiones no desarrollan síntomas visibles.

En la propagación vegetativa por medio del cultivo de meristemo, se forman cuerpos protocórmicos (PLBs –protocorm-like bodies), lo que significa que el ápice del vástago de una planta adulta se rejuvenece (pasa de la fase adulta a la juvenil) ya que los protocormos obtenidos por germinación de semillas tienen muchas semejanzas con los producidos a partir de ápices aislados del vástago, se ha introducido el término de cuerpo protocórmico, cuando se clonan orquídeas por cultivo de meristemas (Lim *et al.* 1993, Pierik 1990).

La micropropagación de las orquídeas *in vitro* puede darse en forma vegetativa (clones) o por semilla (Gutiérrez y Chen 1994).

### **2.3. Propagación sexual de las orquídeas**

Las semillas de las orquídeas son extremadamente pequeñas y están constituidas básicamente por un embrión indiferenciado y esférico rodeado por un grupo de células (isodiamétricas y escasamente diferenciadas) cubiertas por una testa que las protege (Pierik 1990).

Los primeros intentos de geminación de semillas de orquídeas fueron realizados en Europa por Moore (1849) al sembrarlas en compost o sustratos que habían sido utilizados para cultivar plantas adultas, práctica que fue adoptada por los cultivadores comerciales de su época (Pierik 1990).

Posteriormente Noel Bernard (1909) realizó una serie de experimentos que le permitieron explicar el rol del hongo micorrítico en la germinación de semillas de orquídeas, demostrando la importancia de esta asociación simbiótica y germinando exitosamente distintas especies e híbridos de orquídeas terrestres y epífitas (Pierik 1990).

Las investigaciones de Bernard (1909) sugirieron a Lewis Knudson (1922) que la germinación de las semillas de las orquídeas podían germinar sin la necesidad de su asociación con el hongo micorrítico siempre que se asegurará que el embrión recibiera los nutrientes indispensables para su desarrollo. Por ello entre 1918 y 1957 Knudson, realizó un conjunto de experimentos que le permitieron desarrollar una metodología para la germinación asimbiótica de semillas de orquídeas (Pierik 1990, León 1995).

Por varias razones este descubrimiento fue uno de los más importantes eventos para la ciencia de las orquídeas hasta nuestros días. Las tasas de germinación se incrementaron exponencialmente y se volvieron más predecibles; en consecuencia la cantidad de híbridos y plantas de orquídeas en circulación aumentó súbitamente, disminuyendo los precios y reduciéndose la importación de plantas de los trópicos. Finalmente, esta metodología es el más práctico procedimiento para la preservación de cultivares deseables y de especies de orquídeas en proceso de extinción (Pierik 1990, Kuan y González 1993).

Las orquídeas son especies heterocigotas y las plantas obtenidas por semilla son genéticamente muy variables y de desarrollo muy lento (Gutiérrez y Chen 1994).

## **2.4. Propagación clonal *in vitro* de las orquídeas**

A partir de los resultados de Morel (1960), se logró obtener ápices de los cuales se obtuvieron unos cuerpos protocórmicos (PLBs) que eran extremadamente parecidos a los que se forman después de la germinación de la semilla. A veces este protocormo se divide de forma espontánea, pero generalmente esto se consigue cortando el protocormo en porciones, de esta forma Morel produjo millares de plantas en un año, a partir del único ápice del vástago (un meristemo con algunos primordios foliares). El clonado de orquídeas por cultivo de meristemas se convirtió así en la primera aplicación comercial de la propagación vegetativa *in vitro*. Este método, que originalmente se desarrolló para *Cymbidium*, se modificó más tarde, y se utilizó para *Cattleya* y otros géneros de orquídeas. El “meri-clonado de orquídeas” (propagación vegetativa por cultivo de meristemas), se realiza ahora a gran escala, en el mundo entero (Pierik 1990).

La propagación vegetativa de orquídeas, por cultivo de meristemas, se puede dividir en tres fases: transformación del meristemo en un cuerpo protocórmico o tipo protocormo, la propagación de los protocormos, dividiéndolos en fragmentos, y la conversión de estos protocormos en vástagos con raíces (Pierik 1990, Gutiérrez y Chen 1994).

## **2.5. Virus en orquídeas**

El trasiego internacional de plantas y las infecciones asintomáticas han generado la dispersión alrededor del mundo, permitiendo el desarrollo de investigaciones para determinar cuáles virus afectan a las orquídeas en el país, y no todos los productores y coleccionistas privados reconocen la importancia de determinar si estos patógenos se encuentran en sus colecciones, para poder limpiarlas de ellos. Por otra parte el sistema de protección fitosanitaria del país debe conocer este tipo de información para que las importaciones y exportaciones

se efectúen de acuerdo con las políticas de transparencia internacional y protección mutua (Pierik 1990, Seoh *et al.* 1998, Chacón 2002).

Los virus que infectan a las orquídeas pertenecen a grupos taxonómicos muy distintos, sin embargo presentan algunas características biológicas y físicas que permiten distinguirlos (Francki 1970, Brunt *et al.* 1996, Chacón 2002).

El primer caso documentado (Schelpe 1983, citado por Chacón 2002) de una orquídea infectada por virus data de 1900, cuando el padre de la orquideología moderna, Lucien Linden, publicó un dibujo de *Cattleya labiata*, que presentaba jaspeados en las flores, común en plantas infectas por *Odontoglossum ringspot tobamovirus* (ORSV). Llamó a esta especie *C. labiata* var. *alfrediana*. Aunque Linden creyó encontrar una nueva variedad, o más probable es que se tratara de una planta enferma, debido a que el síntoma que presentaba era muy similar a los jaspeados en tulipanes, que ya se conocían como una enfermedad viral importante en esa época.

Se considera, que los virus se encontraban en orquídeas silvestres, mucho antes de que el ser humano las cultivara (Kado 1964, Zettler *et al.* 1990, citados por Chacón 2002). Es posible que en algunos casos, las infecciones provinieran de otras especies portadoras o enfermas, que tuvieron contacto con las orquídeas en su hábitat natural o en cultivos. Sin embargo, son pocos los estudios publicados de virus en orquídeas silvestres. En algunas investigaciones realizadas en Florida, Ecuador, Puerto Rico y Florida (Elliot *et al.* 1996), y en Polinesia Francesa (Wisler *et al.* 1987), los autores no han podido detectar virus en poblaciones naturales.

Los dos virus más conocidos y de distribución cosmopolita son el *Cymbidium* mosaic potexvirus (CymMV) y el *Odontoglossum* ringspot tobamovirus (ORSV). Más de 50 virus han sido identificados en estas especies de los cuales ORSV y CymMV son los de mayor prevalencia e importancia en el mundo (Lim *et*

*al.* 1993, Seoh *et al.* 1998, Labrín *et al.* 2005). Aparte de éstos, se conocen al menos 28 virus más que pueden infectar orquídeas, de los cuales se cuenta con poca información, en especial sobre sintomatología y ámbito de hospederos en la familia Orchidaceae y en otras familias de plantas. En muchos casos, la presencia de algunas especies de virus en orquídeas, ha sido comunicada una sola vez, por lo que no se conoce su procedencia, ni sus vectores; o si pueden infectar otras especies de orquídeas distintas a la especie en que se determinó. Incluso, en algunos de estos casos, el cuerpo vegetativo, las flores o ambas partes de la planta se observaron asintomáticos. También es probable que haya aún virus sin determinar (Zettler *et al.* 1990; Lawson y Brannigan 1986 citados por Lim *et al.* 1993; Ortiz 2002; Geraci 1996, Lawson 1995, Lawson y Hsu 1995 citados por Chacón 2002)

### **2.5.1. Virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV)**

El mosaico del *Cymbidium* (*Cymbidium* mosaic virus – CymMV), pertenece al género de los Potyvirus y éste a la familia de los Flexiviridae. Los Potyvirus están formados por al menos 53 especies y serotipos de acuerdo con el Comité Internacional de Taxonomía Viral.

El CymMV y el anillado del *Odontoglossum* (*Odontoglossum* ringspot tobamovirus - ORSV), son los dos virus más conocidos y distribución a nivel mundial. De acuerdo a Zettler *et al.* (1990), Hsu *et al.* (1992), Seoh *et al.* (1998), Moreira *et al.* (1999), el CymMV fue descrito en 1943, por primera vez en Australia, por Magee, quien lo atribuyó a una etiología viral.

La literatura informa que el CymMV, afecta a los géneros e híbridos de orquídeas que son cultivadas comercialmente y se reporta su infección en *Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Epidendrum*, *Oncidium*, *Phalaenopsis*, *Phaius*, *Vanda*, *Vanilla* (Rivera 1998, Moreira *et al.* 1999, Leclercq *et al.* 2001).

En la mayoría de casos se presenta una infección mixta, entre el mosaico del *Cymbidium* (CymMV) y el anillado del *Odontoglossum* (ORS), lo cual agrava los síntomas (Zettler *et al.* 1990, Hsu *et al.* 1992, Hu *et al.* 1993, Hu *et al.* 1994, Tanaka *et al.* 1997, Moreira *et al.* 1999, Lawson 1995 citado por Chacón 2002).

### **2.5.2. Síntomas que produce las infecciones del virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV)**

Los síntomas varían en intensidad y forma entre géneros o especies de orquídeas, o dependiendo de las condiciones ambientales y edad del tejido enfermo (Jensen 1951, Jensen y Gold 1955, Murakishi 1958, Kado y Jensen 1964, Corbett 1967, Cybularz *et al.* 1967, citados por Chacón 2002).

Los síntomas foliares del CymMV pueden producir estrías cloróticas (amarillas) o necróticas y seguir patrones lineales, a veces son hundidas y pueden aparecer formando anillos; forman puntos o pequeñas manchas oscuras y hundidas en anillos, mosaicos son áreas o estrías donde se alternan diferentes tonos de amarillo y verde con bordes definidos; o moteados son áreas con tonos similares al mosaico pero formando parches de bordes indefinidos. La infección mixta de CymMV y ORSV, producen manchas cloróticas o ambas en las hojas en especies e híbridos de *Cattleya* y *Laeliocattleya* (Zettler *et al.* 1990, Toussaint *et al.* 1993, Hu *et al.* 1994, Brunt *et al.* 1996, Rivera 1998; Jensen 1951, Jensen y Gold 1955, Murakishi 1958, Kado y Jensen 1964, Corbett 1967, Cybularz *et al.* 1997 citados por Chacón 2002).

En las flores puede presentarse necrosis de pétalos y sépalos antes de la apertura de los botones o varios días después. Por lo general el daño se inicia con la aparición de estrías claras o cafés a lo largo de las venas principales de los sépalos y pétalos, luego se tornan más oscuras hasta necrosar áreas mayores o bien cubren toda la flor. En algunas especies puede manifestarse como un

corrugado de color claro y cuando la flor envejece se expresa la necrosis, la doble infección de CymMV y ORSV, pueden producir manchas necróticas, que producen mala calidad de la flor en *Cattleya*, lo que afecta tanto a la producción comercial, como a los coleccionistas (Zettler *et al.* 1990; Hsu *et al.* 1992; Hu *et al.* 1993; Toussaint *et al.* 1993; Lawson y Brannigan 1986, Pearson y Cole 1986 citados por Lim *et al.* 1993; Hu *et al.* 1994; Brunt *et al.* 1996; Tanaka *et al.* 1997; Rivera 1998; Moreira *et al.* 1999; Lawson 1995, citado por Chacón 2002; Labrín *et al.* 2005).

La ausencia de síntomas evidentes no es garantía de sanidad pues un porcentaje considerable de plantas infectadas son asintomáticas por algún tiempo (Zettler *et al.* 1990, Hsu *et al.* 1993, Rivera 1998, Moreira *et al.* 1999).

Frecuentemente las infecciones virales reducen el vigor de la planta y alteran la floración, disminuyen el tamaño y la calidad de la flor, lo que afecta el valor de exhibición o comercial de las plantas (Moreira *et al.* 1999). Además, estas infecciones impiden el libre tránsito de orquídeas en el mundo, por no cumplir con las especificaciones de los programas de certificación sanitaria. Sin embargo, no es raro detectar plantas infectadas asintomáticas, lo que ha favorecido la dispersión a nivel mundial de éstos y otros virus por el tráfico sin control de plantas enfermas asintomáticas, con fines de colección o mejoramiento (Zettler *et al.* 1990, Toussaint *et al.* 1993, Moreira *et al.* 1999).

### **2.5.3. Transmisión del virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV)**

El CymMV es el virus de mayor relevancia en las orquídeas, no se le conocen artrópodos vectores (insectos) que permitan la transmisión del virus (Francki 1970, Zettler *et al.* 1990, Hsu *et al.* 1992, Hu *et al.* 1994, Brunt *et al.* 1996, Rivera 1998, Moreira *et al.* 1999, Zettler 1987 citado por Chacón 2002).

Los virus de las orquídeas se transmiten por medio de la propagación vegetativa, división de plantas, resiembra y la corta de flores, permitiendo la transmisión mecánica y por contacto entre plantas al igual que los otros virus, el virus se encuentra principalmente en las hojas, en el citoplasma de las células, donde forma inclusiones como cuerpos bandeados que contienen a los viriones (Zettler *et al.* 1990; Hu *et al.* 1994; Brunt *et al.* 1996; Zettler *et al.* 1987, Cho *et al.* 1989, Lawson 1995 citados por Chacón 2002).

La transmisión por semilla no ha sido comunicada, a excepción de un caso de CymMV, en el que la contaminación de la semilla con tejido materno (placenta) durante su transplante a medios de germinación, puede ser la causa de la infección (Yuen *et al.* 1979, Porter *et al.* 1996, citados por Chacón 2002)

Debido a la forma en que se transmiten los virus hacia los cultivos establecidos, lo más recomendable es controlar los vectores potenciales, como áfidos o "trips", eliminar las plantas enfermas, flamear las herramientas de corte con alcohol 95%, o esterilizarlas con una solución al 1% de hidróxido de sodio (NaOH 1%), el CymMV, se inactiva entre los 60 y 70 °C, y puede permanecer infectivo hasta 25 días fuera de la planta hospedera (Zettler *et al.* 1990, Hu *et al.* 1994, Brunt *et al.* 1996, Lawson 1995 citado por Chacón 2002).

#### **2.5.4. Virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV) en Costa Rica**

En Costa Rica se le ha encontrado en los géneros *Cattleya*, *Cymbidium*, *Phaius*, *Encyclia*, *Epidendrum* y otras (Velasco *et al.* 1986, Rivera 1998, Moreira *et al.* 1999).

En el país, como muchos otros países tropicales, el cultivo y comercio de especies nativas e introducidas de orquídeas, como plantas de colección o flor de corta, ha tomado auge en años recientes. Sin embargo, no se ha identificado ni determinado la prevalencia de los virus que afectan tanto las orquídeas nativas como las introducidas ya sea en las plantaciones comerciales, colecciones o en sus hábitats naturales (Moreira *et al.* 1999).

En Costa Rica se han publicado dos estudios de virus de orquídeas. En el primero se evaluaron híbridos de *Cymbidium*, en los cuales encontraron CymMV y ORSV (Velasco *et al.* 1986). En el segundo se encontró CymMV en *Phaius tankervilleae*, una especie de hábito terrestre (Moreira *et al.* 1999). En ambos casos las plantas fueron obtenidas de viveros e invernaderos en el Valle Central (Chacón 2002).

De acuerdo a Chacón (2002) el CymMV y ORSV, es el virus más frecuentemente encontrado en la investigación realizada en diferentes viveros del Valle Central, lo cual coincide con lo informado por otros estudios a nivel mundial, debido a su amplia distribución geográfica como por sus efectos en las orquídeas (Zettler *et al.* 1990, Seoh *et al.* 1998).

### **2.5.5. Detección de virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV)**

Como ya se mencionó, los síntomas varían de una especie a otra, hay infecciones mixtas, e incluso infecciones asintomáticas. Además, algunas enfermedades fúngicas y bacterianas provocan síntomas similares, lo cual complica el diagnóstico a simple vista. Por tanto, la detección visual de síntomas no siempre es acertada o recomendable, por lo que se han desarrollado métodos más seguros y específicos. La detección pronta y segura de plantas infectadas, así como la eliminación de los vectores (cuando éstos se conocen), son prácticas imprescindibles para todos los cultivadores, a fin de evitar la diseminación de los virus (Chacón 2002).

Algunos métodos utilizados en la detección del virus (CymMV) son: Bioensayo (Brunt *et al.* 1996; Calle y Ariel 2001; Hollings *et al.* 1977, Lawson 1995, Lawson y Hsu 1995, citados por Chacón 2002; Labrín *et al.* 2005), Microscopia Electrónica (Hsu *et al.* 1992, Velasco *et al.* 1986, Moreira *et al.* 1999; Lawson y Hsu 1995 citado por Chacón 2002, Labrín *et al.* 2005), Microscopía de Luz (Chistie y Edwardson 1978 citado por Chacón 2002), Microscopía confocal del rastreo láser (Christie y Edwardson 1978, Wong 1995 citados por Chacón 2002).

Dentro los métodos de detección se encuentran los serológicos que poseen características que limitan su empleo cuando se dan determinadas condiciones. Los de más amplia aceptación son los de difusión en agar, de microprecipitación, de floculación de látex sensibilizado, y los inmunoenzimáticos (ELISA) (Nome 1991).

**Técnica de ELISA:** La prueba inmunoenzimática ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) es de gran sensibilidad y permite detectar cantidades pequeñas de antígeno, o de anticuerpos específicos contra las proteínas de las cubiertas virales. Además, permite el análisis simultáneo de un gran número de muestras. Fue desarrollada en 1971 para emplearla en medicina y adaptada en

1977 a la patología vegetal, en especial para la detección de virus en plantas (Nome 1991, Seoh *et al.* 1998, Webster *et al.* 2004).

El ELISA es un método cuantitativo, técnicamente todas las muestras que den una coloración más intensa que el control negativo debieran ser positivas; sin embargo, se considera también que hay variación en los valores de absorbancia de los controles negativos, y por ello se han hecho varias sugerencias para establecer el límite entre negativo y positivo (Nome 1991).

En la actualidad, uno de los métodos más utilizados para detectar virus en orquídeas, es la técnica de ELISA, debido a la especificidad de sus resultados, costo económico relativamente bajo, rapidez de las pruebas y a que permite analizar muchas muestras simultáneamente (Hu *et al.* 1993; Seoh *et al.* 1998; Robertson 1992, Lawson 1995, Geraci 1996 citados por Chacón 2002; Webster *et al.* 2004; Labrín *et al.* 2005). En Estados Unidos, varias compañías venden servicios de evaluación de orquídeas para CymMV y ORSV, y son recomendadas aquellas que utilizan el método de ELISA, por la certeza de los resultados (Robertson 1992, citado por Chacón 2002). Sin embargo, se considera que la interpretación de los datos obtenidos por ELISA no siempre es fácil. Se debe determinar el umbral de exclusión entre plantas positivas y negativas, por lo que se requiere de experiencia en el manejo de la técnica y el conocimiento del virus en estudio (Sutula *et al.* 1986, citado por Chacón 2002).

Dentro de los métodos inmunológicos: se encuentran El Ensayo rápido de papel inmunofiltro (rapad immunofilter paper assay - RIPA), Inmuno-ensayo de manchas de tejido (tissue-blot immunoassay - TBIA), Inmuno-ensayo de manchas de punto (dot blot immunoassay - DBIA) (Hsu *et al.* 1992, Tanaka *et al.* 1997).

Para CymMV y ORSV se han utilizado varias técnicas moleculares, entre ellas: Sondas de ADN marcadas con Digoxigenina® o radiactividad (Hu y Wong 1998 citado por Chacón 2002). En algunos casos de CymMV y ORSV se cuenta

con imprimadores específicos para realizar el diagnóstico, empleando la técnica de IC-RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con inmunocaptura y transcripción reversa) (Lim *et al.* 1993, Barry *et al.* 1996, Seoh *et al.* 1998, Eun y Wong 2000).

Lim *et al.* (1993) utilizaron técnica de ELISA indirecta para determinar la presencia de CymMV y ORSV, en Mokara Char Kuan 'Pink'.

Clark y Adams (1997) citados por Moreira *et al.* (1999), reportaron la identificación del virus CymMV, mediante la prueba de ELISA de "doble sándwich".

Otros métodos de detección de virus son las técnicas moleculares:

La técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction - Reacción en Cadena de la Polimerasa), es un procedimiento analítico de detección de patógenos a través de la amplificación de fragmentos de ADN o ARN presentes en una muestra hasta niveles detectables, mediante la repetición de ciclos en un equipo llamado termociclador. En cada uno de estos ciclos se duplica a una sección determinada (siempre la misma) del ADN total (Webster *et al.* 2004).

La combinación del PCR con otras técnicas moleculares (AFLP, RFLP, RAPD), incrementa su sensibilidad en el diagnóstico y detección de la variabilidad genética de fitopatógenos (Eun y Wong 2000, Webster *et al.* 2004).

Para la detección de virus y viroides se debe realizar una transcripción reversa (RT) del ARN a ADNc, antes de ser amplificado. La RT-PCR (Reverse Transcription-Polimerase Chain Reaction; Transcripción Reversa – Reacción en Cadena de la Polimerasa) permite la amplificación de una cantidad pequeña de moléculas de ARN (usualmente es de una sola hebra y es sensible al calor) con gran especificidad, mediante la transcripción reversa (RT) del ARN a ADNc (ADN complementario), que es estable al calor y puede ser amplificado por la

metodología de PCR (Ryu *et al.* 1995; Don *et al.* 1991, Roux 1995 citados por Seoh *et al.* 1998; Eun y Wong 2000, Webster *et al.* 2004).

En cada examen de PCR se realiza una reacción de amplificación del ADN del virus (o del ADN obtenido a partir del ARN) mediante una enzima polimerasa que hace múltiples copias de este ADN detectándose mediante electroforesis en geles de agar (Webster *et al.* 2004).

Mediante PCR ha sido posible detectar el virus del CymMV de acuerdo a Lim *et al.* 1993, Barry *et al.* 1996; Ryu y Park 1995 citados por Seoh *et al.* 1998. Sin embargo el uso de la técnica de RT-PCR utilizada por Seoh *et al.* (1998) permitió la detección del virus del CymMV y el ORSV simultáneamente (Eun y Wong 2000, Webster *et al.* 2004).

#### **2.5.6. Limpieza viral**

Desde 1960 cuando Morel tuvo éxito en la eliminación de CymMV en *Cymbidium* utilizando la técnica de cultivo de meristemos, ha sido ampliamente utilizada en horticultura y la agricultura para la eliminación del virus (Mori 1977, Mulin *et al.* 1974, Gama 1988, Kudell y Buchenauer 1989, citados por Lim *et al.* 1993). A veces, se utiliza conjuntamente con termoterapia (Watkins *et al.* 1990, Stein *et al.* 1991, citados por Lim *et al.* 1993). Sin embargo, es imposible eliminar CymMV y ORSV por termoterapia solamente (Jensen 1951, Stone 1982, citados por Lim *et al.* 1993). Un método alternativo es el uso de la quimioterapia (Streeter *et al.* 1973, Dawson 1984, Pierik 1990, Sidwell *et al.* 1972, citado por Lim *et al.* 1993).

Técnicas nuevas o modificaciones a las existentes permiten una producción de plantas más eficiente, permitiendo complementarse con el mejoramiento

genético de las orquídeas, ya sea por métodos tradicionales o de ingeniería genética (Rivera 1998).

La biotecnología ha hecho importantes aportes para el manejo de las enfermedades virosas, especialmente en las últimas décadas. En ellas se ha perfeccionado técnicas de cultivo *in vitro* y manipulación genética, tendientes a combatir los virus en muchos cultivos, incluyendo las orquídeas.

#### **2.5.6.1. Cultivo de meristemas**

Los ápices provistos de algunos primordios producen protocormos con rizoides, los cuales tienen la capacidad de producir nuevos protocormos, que rápidamente evoluciona hacia tallos con hojas o pueden fragmentarse y multiplicarse. Morel en 1974 logró la producción y multiplicación de protocormos en diversas orquidáceas especialmente en: *Cattleya*, *Phalaenopsis*, *Phaius*, *Miltonia*, *Odontoglossum*, *Odontioda*, *Ophrys vanda*. Algunos géneros presentan dificultad para reproducirse mediante el cultivo de meristemas, por lo cual se utilizan otros órganos para su propagación (Moreira *et al.* 1999, Rivera 1998).

Se puede decir que todas las orquídeas poseen la capacidad de formar protocormos adventicios aunque existen diferencias entre especies, la formación se ha observado a partir de diferentes órganos como lo es de la base de la hoja, raíces jóvenes, inflorescencias y brotes jóvenes de donde se pueden obtener yemas apicales y axilares (Pierik 1990, Kuan y González 1993, Rivera 1998).

En el cultivo de meristemas de *Cattleya* se produce muy rápidamente una coloración marrón (oxidación) en los tejidos lesionados; por esta razón se recomienda frecuentemente cortar el meristemo en líquido y cultivarlo después en un medio líquido, en el cual la coloración marrón difunde con más facilidad (Pierik 1990).

El aislamiento de meristemas generalmente tiene lugar en medios semi-sólidos, con la excepción de *Cattleya*; la propagación de protocormos generalmente tienen lugar en medios líquidos, y en el crecimiento de protocormos hasta plántulas, nuevamente en medios semi-sólidos. La composición de los medios, en tres etapas diferentes de la propagación de las orquídeas es frecuentemente diferente. Resulta llamativo el hecho de que los protocormos generalmente no se transforman en plántulas en un medio líquido (Pierik 1990).

En el caso de *Cattleya* generalmente se aísla una yema completa (3-5 mm) con muchos primordios foliares. El medio que se utiliza para *Cattleya* es más complicado que el que se usa para *Cymbidium*, añadiéndosele a veces auxinas, citoquininas, agua de coco y peptona. La formación de protocormos en *Cattleya* necesita bastante tiempo y generalmente empieza la regeneración en las bases de las hojas más viejas; aquí el meristemo apical no juega de hecho ningún papel y al final se pierde. Los primordios foliares de *Cattleya* aislados responden también de forma positiva formando protocormos (Pierik 1990, Kuan y González 1993).

En 1994, Gutiérrez y Chen presentaron una metodología para la propagación clonal *in vitro* de *Cattleya* utilizando meristemas apicales y laterales. Las cattleyas utilizadas fueron híbridos de *Laeliocattleya* (Lc). La aplicación de esta técnica permite la obtención de plantas libres de virus, producción de híbridos y mejoramiento de la calidad comercial de las plantas, permitiendo así lograr una alta reproducción de plantas con las mismas características que las plantas madres, en un lapso de tiempo no superior a un año.

Los propagadores comerciales tienen estandarizado el método de mantenimiento de un lote comercial de material madre *in vitro*, en donde, además de tener la ventaja de mantener este material, se considera el gran número que se puede mantener en un espacio reducido con las condiciones ambientales requeridas y la calidad y sanidad deseables. Esto es debido al potencial morfogénico que tienen los meristemas en la producción de brotes (Pierik 1990).

Actualmente la alternativa de más éxito es el cultivo de meristemas apicales, frecuentemente combinado con quimioterapia o termoterapia que es la aplicación de tratamientos de calor. Cuando estos métodos son usados, las plantas no sólo son liberadas del virus, sino también de hongos y otros patógenos (Pierik 1990).

El cultivo de meristemas ha permitido obtener plantas libres de algunos virus y en otros casos reducir considerablemente la incidencia en clones obtenidos por este método a partir de plantas con CymMV (Lim *et al.* 1993, Toussaint *et al.* 1993, Rivera 1998, Conci 2004).

Este virus puede eliminarse por el cultivo de meristemas, pero existen evidencias de que el método no es 100% seguro (Rivera 1998, Toussaint *et al.* 1993, Conci 2004).

#### **2.5.6.2. Ingeniería genética**

Los alcances del cultivo de meristemas no se ha quedado ahí, algunos especialistas han trabajado tratando de lograr plantas inmunes a virus mediante ingeniería genética. Lo que se pretende lograr es introducir el gen del virus que determina la formación de las cápsulas proteicas dentro del genoma de la planta. Con esto la planta transformada no sufre alteración alguna, toda vez que la parte proteica del virus es inocua y evita la multiplicación del patógeno cuando éste es introducido dentro de las células. La producción de plantas transgénicas ha tenido éxito en otros cultivos, pero aún no se ha logrado en orquídeas, lo cual no significa que es poco tiempo no puedan existir en el mercado de clones resistentes a CymMV y otros, obtenidos por esta vía (Rivera 1998).

Aparte de los métodos señalados, existen otros más tradicionales y antiguos que no dejan de ser eficientes, como la incorporación de resistencia genética o la protección cruzada (Rivera 1998).

#### *Incorporación de resistencia genética:*

Se buscan plantas con la capacidad de tolerar o resistir el virus y luego por cruza y retrocruza se fija esa característica en una planta para, finalmente, obtener un clon comercial (Rivera 1998).

#### *Protección cruzada*

Se emplean variantes poco agresivas del agente causal obtenido de la naturaleza o producidas mediante el uso de agentes mutagénicos. Estos tipos de virus se inoculan a la planta sana, estableciéndose en ella sin causarle daños de importancia, lo cual impide la infección posterior por las formas más agresivas del mismo virus. Esto ocurre debido a la supresión producida por la cubierta proteica del primer virus inoculado, sobre nuevas infecciones con variantes más patogénicas (Rivera 1998).

#### **2.5.6.3. Termoterapia**

La hipótesis de la inactivación de los virus por efecto de altas temperaturas, se basa en que, la síntesis de los virus y su degradación ocurren simultáneamente, y que las altas temperaturas cambian el balance de la síntesis hacia la degradación del virus, resultando una eventual erradicación. La síntesis del virus se detiene por las altas temperaturas, ya que el ARN viral compite desventajosamente con el ARNm del huésped por un limitado número de ribosomas “disponibles” para la síntesis de sus respectivas proteínas; en el interior de la planta es un proceso continuo el cual es alterado por efectos de cambios de

temperatura, la que al ser alta conduce a la descomposición de la proteína viral, por lo que las altas temperaturas dañan a la planta, liberando sustancias como los fenoles, los cuales interfieren en la síntesis de los virus (Villalobos 1979).

El tratamiento por calor ha sido eficiente contra virus y micoplasmas que se encuentran en frutales, caña de azúcar y mandioca, mediante la utilización de yemas axilares, después de haber crecido durante 20-40 días a una temperatura constante o alternante de 37-38 °C, se obtuvieron yemas potencialmente libre de virus. En el cultivo de vides se logró obtener plantas libres de virus, tratando los vástagos (no los meristemas), *in vitro*, durante 21 días a 35 °C, las plantas *in vivo* no podrían tolerar estas condiciones. Se ha demostrado que el virus del mosaico del pepino puede ser eliminado, por calor, de ápices del vástago de *Stellaria media*, cultivados *in vitro* (Pierik 1990).

Para aumentar las posibilidades de obtener plantas libre de virus y bacterias en los casos difíciles (en caso de la presencia de varios virus), se aplica frecuentemente un tratamiento con calor, al principio el cultivo de meristemas, disminuyendo la concentración de virus aumentando la zona libre de virus. La duración del tratamiento por calor (35-38 °C) es de 5 a 10 semanas. Este procedimiento ha sido utilizado con éxito en papa, crisantemo, manzano, clavel (*Dianthus caryophyllus*), uvas (*Vitis vinifera*), árboles frutales (rosaceae), ciruelo (*Prunus salicina*), frijol (*Phaseolus vulgaris*) y fresa (Villalobos 1979, Pierik 1990, Grum *et al.* 1998, Leonhardt *et al.* 1998, Knapp *et al.* 1998, Grasseau *et al.* 1999).

El punto de inactivación para el CymMV, es de 60–70 °C durante 10 minutos, e incluso puede permanecer activo durante 25 días a temperatura ambiente (Francki 1970, Brunt *et al.* 1996, Chacón 2002).

La termoterapia por si sola no resuelve el problema en la limpieza de virus, ya que en primer término se requiere que la planta tenga mayor tolerancia a las altas temperaturas que la partícula viral, no obstante se debe tener claro la

habilidad de los virus para infectar y multiplicarse en plantas a 36 °C, ya que no esta correlacionada con el punto de inactivación térmica, por ejemplo algunos virus de la papa tienen este punto a 80 °C pero no pueden infectar plantas a 36 °C (Villalobos 1979).

Algunos virus son más estables que otros, y esto causa diversos problemas en su erradicación, por lo que necesitan periodos más largos para unos y más cortos para otros, con diferentes tratamientos. Algunas especies son dañadas por las altas temperaturas continuas, por lo que se recomienda una alternancia de temperaturas altas (35-54 °C) y bajas (5-15 °C), disminuyéndose así los daños causados en los tejidos de las plantas (Villalobos 1979, Pierik 1990).

#### **2.5.6.4. Quimioterapia**

La eliminación de virus en orquídeas inicio en 1960 cuando Morel tuvo éxito en la eliminación del CymMV mediante el aislamiento de meristemas en *Cymbidium*, este procedimiento ayudó a controlar y prevenir las pérdidas de material contaminado, sustituyendo las plantas infectadas por plantas libres del virus. Este método se ha utilizado en la eliminación de otros virus conjuntamente con termoterapia (Watkins *et al.* 1990 citado por Lim *et al.* 1993), sin embargo ha sido imposible eliminar el CymMV y el ORSV solamente con termoterapia (Jensen y Stone 1982 citados por Lim *et al.* 1993). Un método alternativo es el uso de quimioterapia.

El uso de productos químicos antivirales tiene un enorme potencial en la agricultura, ya que los virus causan grandes pérdidas económicas. La utilización de antivirales para la obtener plantas libres de virus, se ha realizado desde hace muchos años. Sin embargo no se ha encontrado un producto que por si solo cumpla con esta función. Algunas sustancias químicas ocasionan una disminución en la concentración de virus existente en la planta y atenúan, o

suprimen, los síntomas típicos de los virus, pero, una vez suspendido el tratamiento se recupera la concentración original (Dawson 1984, Conci 2004).

Los antivirales reportados con actividad inhibitoria, son los utilizados contra los virus de animales, entre los que estan: Guanidine, Cordycepin, Tubercidin, Cycloleucine, 3-Deazauridine, 8-Azaguanine, 2-Thiouracil, Hypoxanthine arabinoside, Amantadine HCl, 5-Azacytidine, 5-Bromouracil, 5-Hydroxyuracil, DHAP, Uracil arabinoside, Benzimidazole-5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosyl, 2,3-Diaminopyridine, 2-(β-Hydroxybenzyl)-benzimidazole, 5-Nitrouracil, Cyclocytidine, Distamycin A, Rifampicin, Novobiocin, Ribavarin, Phosphonoacetic acid, Adenine arabinoside, Pentostatin, BMM Q, Acycloguanoside (Dawson 1984).

Se recomienda la combinación de los antivirales con el cultivo de meristemas. También han sido aplicados directamente a los meristemas *in vitro*. En este caso, el antiviral es colocado en medio del cultivo en concentraciones variables, que van desde 10 a 50 mg/l, y en algunos casos hasta 100 mg/l. Las plantas son mantenidas bajo la acción del antiviral por largos períodos que incluyen varios subcultivos (Lim *et al.* 1993, Conci 2004).

## **Ribavirina**

De acuerdo a la literatura los diferentes antivirales han sido evaluados durante mucho tiempo, pero el más utilizado es la Ribavirina o Virazole® (1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboximide).

Un problema importante con el Virazole® es su fitotoxicidad, que a su vez depende de la dosis empleada y de la especie de planta utilizada. El éxito del proceso en muchos casos requiere de varios meses de tratamiento y la fitotoxicidad del antiviral constituye una dificultad (Conci 2004).

La Ribavirina o Virazole® es un análogo purina que se parece a guanosina en el cual tanto la base como el residuo azucarado de ribosa son necesarios para la actividad antiviral. Su espectro antiviral incluye tanto virus ADN como ARN. El mecanismo de acción de la ribavirina se establece mediante una disminución de la concentración intracelular de guanosina fosfato GMP, lo cual actúa sobre el ARN mensajero inhibiendo la cadena de elongación tanto del ARN como del ADN. La capacidad de las células para captar para ribavirina y formar metabolitos activos son determinantes importantes de su actividad antiviral. La fosforilación intracelular a derivados mono, di, trifosfato está mediado por enzimas celulares del huésped (Streeter *et al.* 1973; Dawson 1984; Sidwell *et al.* 1972 citado por Lim *et al.* 1993; Lerch 1976, Kummer y Toussaint 1984, Witkowski *et al.* 1972 citados por Toussaint *et al.* 1993).

### **Uso de la Ribavirina en la eliminación de virus**

Desde 1976 se ha probado la actividad inhibitoria de la Ribavirina (RBV) en tabaco (*Nicotiana tabacum*), en 1977 la inhibición de la biosíntesis en el virus X de la papa (VXP) y la regeneración de plantas de tabaco provenientes de protoplastos infectados con VXP. En 1978 se evaluó el efecto en la multiplicación del virus del mosaico del pepino (CMV) y el virus del jaspeado del clavel (CarMV) y en 1984 la inhibición en la multiplicación del mosaico del tabaco (TMV) y el virus del moteado clorótico del caupí (CCMV) (Schuster 1976, Lerch 1977, Shepard y Kluge 1977 citados por Dawson 1984).

En 1982 se reportó la eliminación de los virus PVX, PVS, PVY y PVM de la papa utilizando Ribavirina; y en 1985 eliminaron con éxito el virus de la mancha clorótica de la hoja del manzano (ACLSV) (Cassels y Long 1982, Hansen y Lane 1985 citados por Lim *et al.* 1993).

De acuerdo a Toussaint *et al.* (1993), eliminaron el ORSV aplicando Ribavirina en *Cymbidium* Sw. Lim *et al.* (1993) eliminaron los virus CymMV y ORSV en *Mokara* Char Kuan 'Pink'.

Porter y Kuehnle (1997) reportaron el uso de Dithiouracilo y Ribavirina para la eliminación de CymMV, en el género *Dendrobium*.

O'Herlihy *et al.* (2003) determinaron la eficiencia de la Ribavirina en la eliminación de ACLSV y el virus de los anillos necróticos de los Prunus (PNRSV) en árboles frutales.

### **3.- MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Localización del estudio**

Esta práctica se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas Tropicales, de la Escuela de Agronomía del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede San Carlos, Alajuela, Costa Rica.

#### **3.2. Determinación de la presencia del virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV).**

El híbrido comercial de *Cattleya* utilizado en esta investigación es una *Brassolaeliocattleya* (Blc. Blue Grotto 'Blue Lustre'), tomada de un vivero comercial de San Ramón de Alajuela, destinado a la venta de diversas especies de orquídeas. Se tomó una muestra que consistió en una hoja madura del híbrido seleccionado, la cual fue enviada al laboratorio del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica (CIBCM-UCR), donde le realizaron el análisis ELISA para determinar la presencia del virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV).

Para tener un parámetro de comparación se envió al CIBCM-UCR, muestras de *Cattleya dowiana* y *Guarianthe skinneri in vitro* provenientes del Laboratorio de Biotecnología del ITCR de San Carlos.

Para el establecimiento *in vitro* se utilizó un brote joven de la planta (híbrido) con una longitud aproximada de 8 cm, tomado de la base del pseudobulbo (Figura 1). El brote se retiró de la planta adulta con la ayuda de un bisturí esterilizado con alcohol de 95 grados.

El explante (brote) fue lavado con jabón líquido, eliminando los restos del jabón con abundante agua. Con la ayuda de un bisturí se retiró, de abajo hacia

arriba, la primera y segunda hoja, para dejar expuesta las yemas laterales, antes de la primera desinfección.

En la cámara de flujo laminar se realizó la primera desinfección utilizando cloro comercial al 1% y tres gotas de Tween 20 (polyoxyethylene) agitando manualmente durante 10 minutos, pasado este tiempo se realizaron 3 lavados con agua destilada y esterilizada.

Después de la primera desinfección, se extrajeron las dos yemas laterales del explante, luego se continuó retirando las hojas restantes y exponiendo las yemas, desinfectando por segunda vez con cloro comercial al 0.5% más tres gotas de "Tween 20" agitando manualmente durante 10 minutos, pasado este tiempo se realizaron 3 lavados con agua destilada y esterilizada.

Se utilizó PVP (Polyvinylpyrrolidona - Sigma) en una concentración de 300 mg/l esterilizado, para sumergir las yemas que se iban aislando en contenedores individuales con el fin de evitar la oxidación, con ayuda de pinzas y bisturí se realizó la disección de las yemas hasta obtener los ápices.



**Figura 1.** Brote joven de Blc. Blue Grotto 'Blue Lustre', infectado con el mosaico del *Cymbidium* (CymMV) utilizado para el establecimiento *in vitro*. Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos, Alajuela. Noviembre de 2006.

### **3.3. Medio de cultivo**

#### **3.3.1. Establecimiento *in vitro* de un híbrido comercial de *Cattleya* con CymMV.**

Las 5 yemas se sembraron en 5 frascos erlenmeyer de 125 ml, utilizando 10 ml de medio de cultivo de Murashige & Skoog (1962); suplementado con 100 mg/l de Mio-inositol, 300 mg/l de PVP, 20 g/l de sacarosa, un pH ajustado a 5.5, y esterilizado en un autoclave a 121 °C a 1.5 kg/cm<sup>2</sup> de presión, durante 20 minutos.

Se colocaron los erlenmeyer en un agitador orbital, con una agitación constante a una velocidad de 120 rpm, las 24 horas del día, a una temperatura entre los 27 ± 1 °C, con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad y una intensidad lumínica de 5500 lux (66.55  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>·s), durante 10 días.

Se realizaron 5 subcultivos cada dos días, utilizando el mismo medio de cultivo líquido de introducción. Posteriormente se realizaron subcultivos cada 8 días utilizando el medio de cultivo de introducción en estado semisólido por un periodo de un mes a una temperatura entre los 27 ± 1 °C, con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad y una intensidad lumínica de 1560 lux (26.21  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>·s). Pasado este tiempo se realizaron los subcultivos cada 30 días, utilizando el medio líquido de introducción, sin adicionarle el PVP. Por último, para obtener el suficiente material se modificó el medio de cultivo líquido de introducción, adicionándose 0.5 mg/l de 2,4-D (ácido 2,4 Diclorofenoxiacético), en este periodo se realizaron 3 subcultivos cada 20 días.

#### **3.3.2. Efecto de la Ribavirina en la limpieza viral de protocormos de un híbrido de *Cattleya* comercial positivo al virus CymMV.**

Para la eliminación del virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV), se modificó el medio de cultivo líquido, para agregar luego tres concentraciones de Ribavirina (Cuadro 1). En la cámara de Flujo Laminar se preparó la Ribavirina,

esta solución se filtró (0.22  $\mu$ m) para esterilizarla. Se agregó a cada frasco 5 ml de medio de cultivo, las sales y vitaminas Murashige y Skoog (1962), se suplementaron con 100 mg/L de Mio-inositol, 20 g/l de sacarosa, 0.5 mg/l de 2,4-D y se ajustó el pH a 5.5, se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos.

Se colocaron 5 explantes formados por protocormos (PLBs) en cada frasco, se hicieron 5 repeticiones, por cada tratamiento. Los tratamientos se colocaron en el agitador orbital, en agitación constante de 120 rpm, las 24 horas del día, a una temperatura entre los  $27 \pm 1$  °C, con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad y una intensidad lumínica de 5500 lux ( $66.55 \mu\text{mol/m}^2\cdot\text{s}$ ). Se realizaron subcultivos cada 14 días, a partir del día 56.

**Cuadro 1.** Concentración de Ribavirina a utilizar para la eliminación del virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV). ITCR, San Carlos, Alajuela. Noviembre de 2006.

Tratamiento	Concentración Ribavirina (mg/l)
1	30
2	35
3	40

### **3.3.3. Determinar la eliminación del virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV) mediante el proceso de RT-PCR en un híbrido de Cattleya.**

Se tomaron 15 protocormos (PLBs) en total provenientes de los tratamientos, cinco PLBs del tratamiento que contenía 30, 35 y 40 mg/l de Ribavirina, estando en contacto con el antiviral por 62 días. Cada protocormo se aisló, y se separó del tejido necrótico al que estaba unido, procurando que se desprendiera y evitando separarlos con ayuda de bisturí, después de la separación cada PLB se dividió en dos partes iguales, una sección se colocó en

tubos de cultivo para que este continúe su crecimiento y la otra se colocaron en microtubos que contenían alcohol de 95 grados para su análisis.

Las 15 muestras que estaban en los microtubos fueron llevadas al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede San Carlos, donde le realizaron las pruebas de RT/PCR según Seoh *et al.* (1998) y determinar la presencia o no del virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV).

## **4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1. Determinación de la presencia del virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV).**

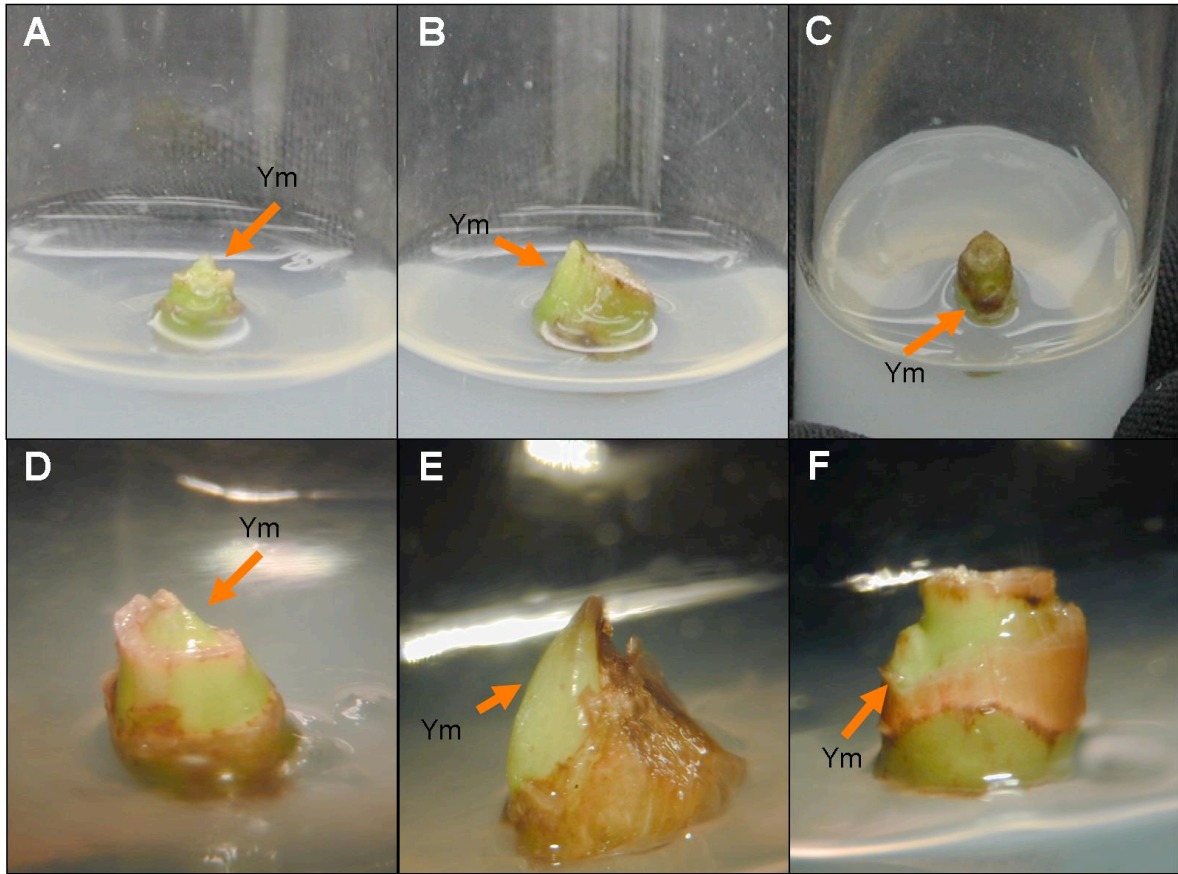
La prueba de ELISA realizada en los laboratorios del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica (CIBCM-UCR), confirmaron la presencia del CymMV en las muestras enviadas a analizar (Apéndice A). Además se descartó la presencia del virus CymMV, en un lote de plantas *in vitro* (Apéndice B) analizadas para mantener como patrón.

### **4.2. Establecimiento *in vitro* de un híbrido comercial de *Cattleya* con CymMV.**

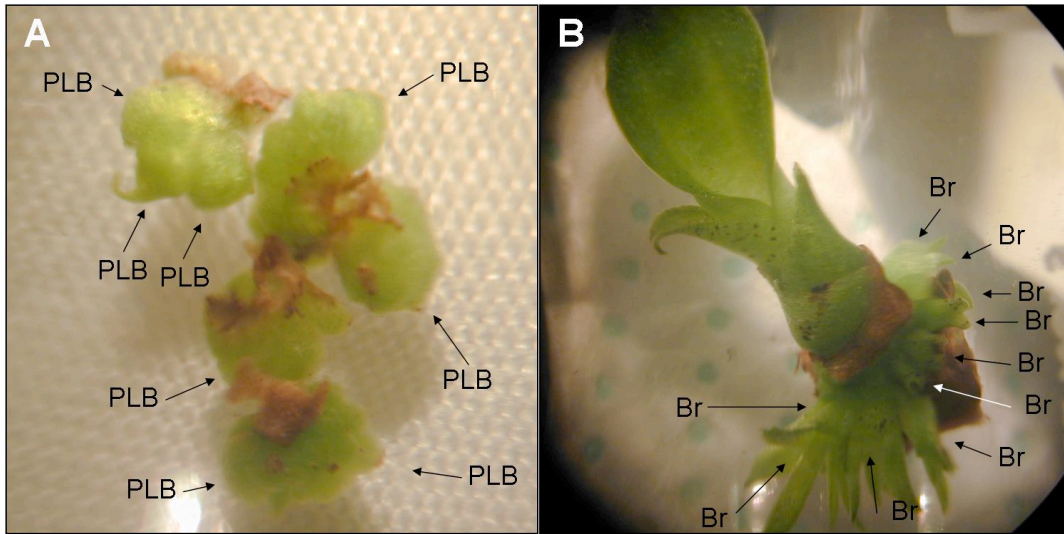
Se obtuvieron cuatro yemas axilares y una apical. A los dos días de la siembra se eliminó una yema axilar por contaminación de hongo alrededor de explante.

En la Figura 2, se pueden observar los explantes a los 16 y 27 días de edad después de la introducción (establecimiento *in vitro*), presentan una coloración verde, signo de que se encuentran en buen estado, se nota alrededor de ellos una leve oxidación.

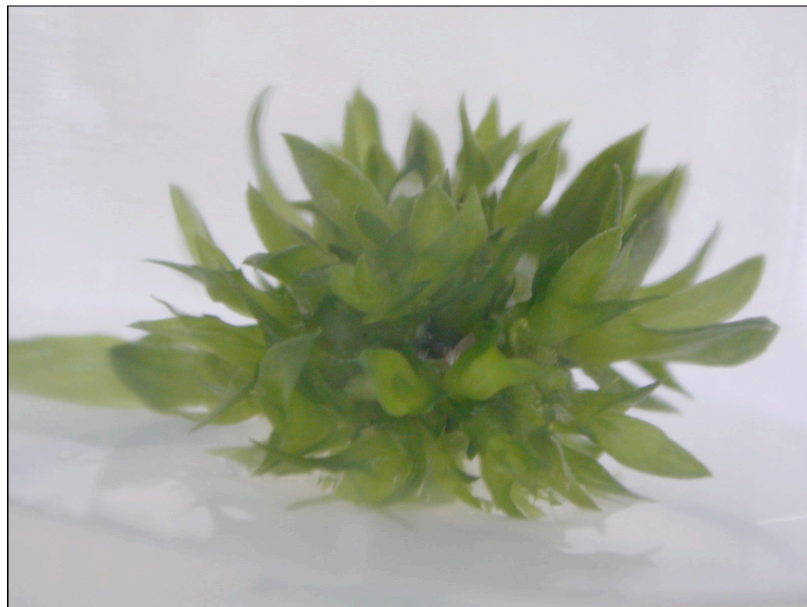
En la Figura 3 se observa la formación de protocormos (PLBs) a los 100 días después de la siembra a partir de una yema apical, mientras que de una yema lateral se dió la formación de brotes. En la Figura 4 se nota el desarrollo de brotes a partir de PLBs a los 238 días después de la siembra.



**Figura 2.** Yemas laterales A, B y C a los 16 días; D, E y F a los 27 días después de la siembra de Blc. Blue Grotto 'Blue Lustre' (las flechas rojas indican donde se encuentran ubicadas), infectados con el virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV) establecidos *in vitro*. Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos, Alajuela. Noviembre de 2006.



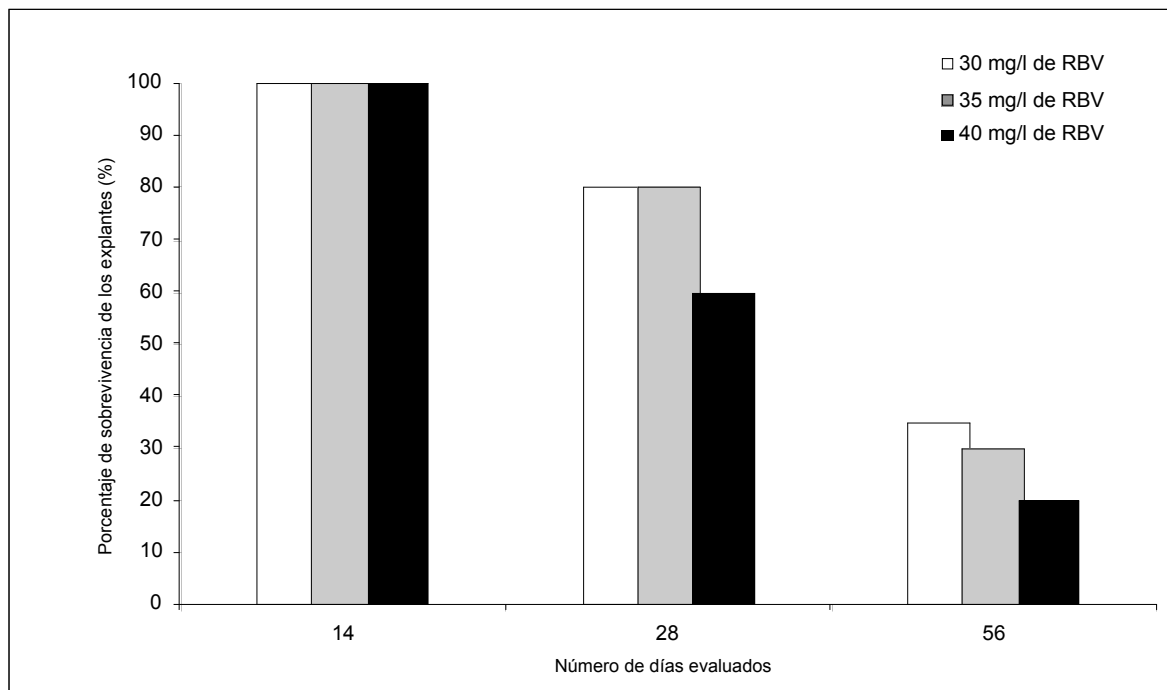
**Figura 3.** Formación de protocormos (PLB) a 100 días (A), formación de brotes (Br) laterales a los 100 días después del establecimiento *in vitro* (B), de una Blc. Blue Grotto 'Blue Lustre', infectados con el virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV). Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos, Alajuela. Noviembre de 2006.



**Figura 4.** Regeneración de brotes a 238 días después del establecimiento *in vitro* a partir de PLBs, de Blc. Blue Grotto 'Blue Lustre', infectados con el virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV). Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos, Alajuela. Noviembre de 2006.

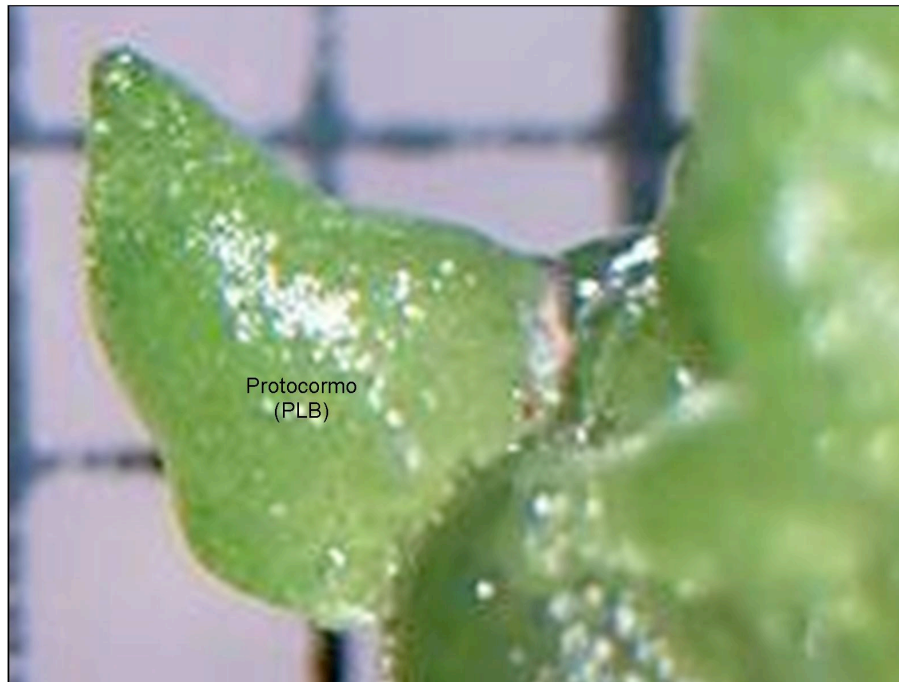
#### 4.3. Efecto de la Ribavirina en la limpieza viral de protocormos de un híbrido de *Cattleya* comercial positivo al virus CymMV.

Durante los primeros 8 días de estar en contacto con la Ribavirina, no se presentó contaminación por hongos, bacterias, levaduras ni la presencia de oxidación, pero si hubo necrosis en todos los tejidos y tratamientos a través de los 62 días que duró el ensayo. La necrosis fue principal razón por la cual disminuyó la sobrevivencia de los explantes (Figura 5).



**Figura 5.** Porcentaje de sobrevivencia de los PLBs de Blc. Grotto 'Blue Lustre', a tres diferentes dosis de Ribavirina (RBV). Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos, Alajuela. Noviembre de 2006.

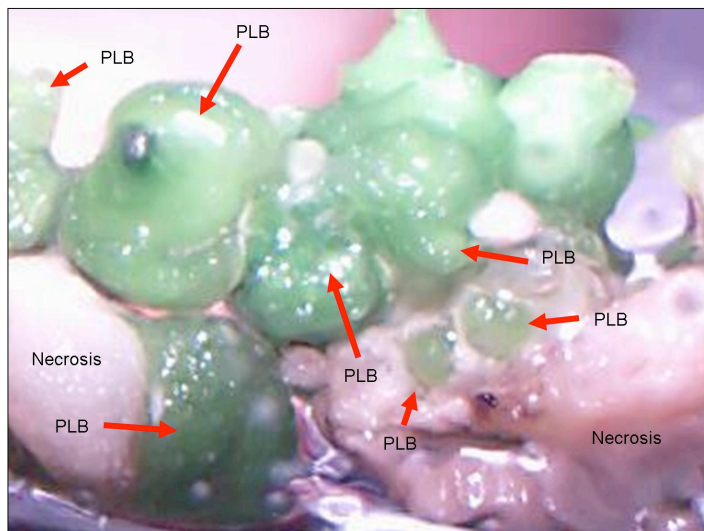
En la Figura 6, se muestra el tipo de explante que se utilizó para el ensayo, estos fueron seleccionados, por su coloración verde, y que no sobrepasara los 5 mm de longitud, además que mostraran secciones donde se esperaba que brotaran los protocormos jóvenes.



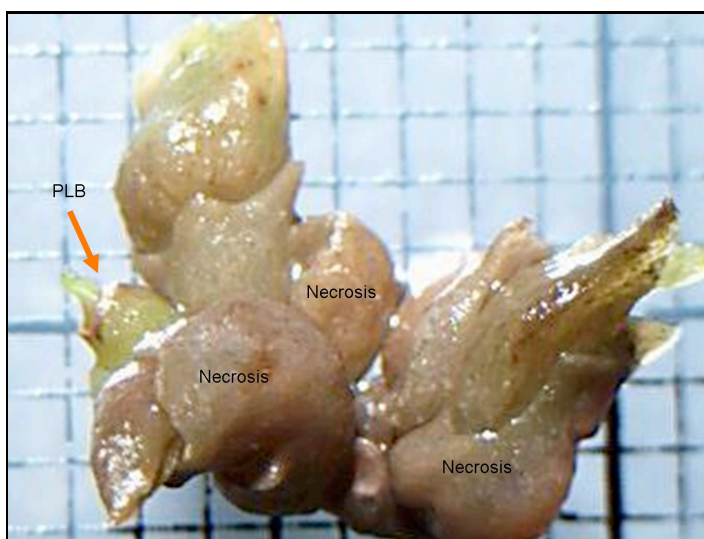
**Figura 6.** Protocormo de necrosis de los explantes de Blc. Grotto 'Blue Lustre', a tres diferentes dosis de Ribavirina (RBV). Plantas desarrolladas a partir de PLBs. Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos, Alajuela. Noviembre de 2006.

En la figura 7, se puede observar los explantes expuestos a Ribavirina (RBV), donde se nota la necrosis del tejido más viejo y la formación de nuevos PLBs, que son los que se van aislando en cada subcultivo

La Figura 8, muestra el explante parcialmente necrótico a los 62 días tiempo que duró el ensayo, en este sobresale un PLB verde entre el tejido necrótico, estos fueron aislados para la prueba de RT/PCR.



**Figura 7.** Explantes de Bc. Blue Grotto 'Blue Lustre', infectados con el virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV), a los 43 días de estar expuesto a 40 mg/l de Ribavirina. Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos, Alajuela. Noviembre de 2006.

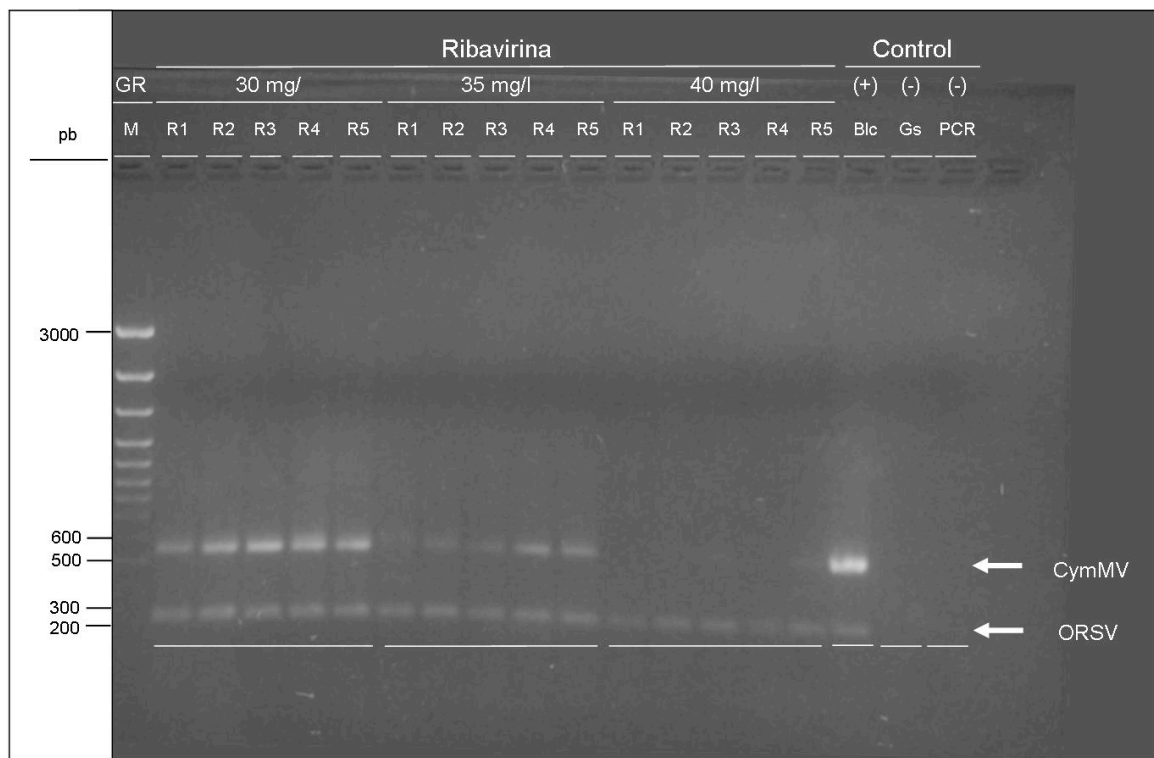
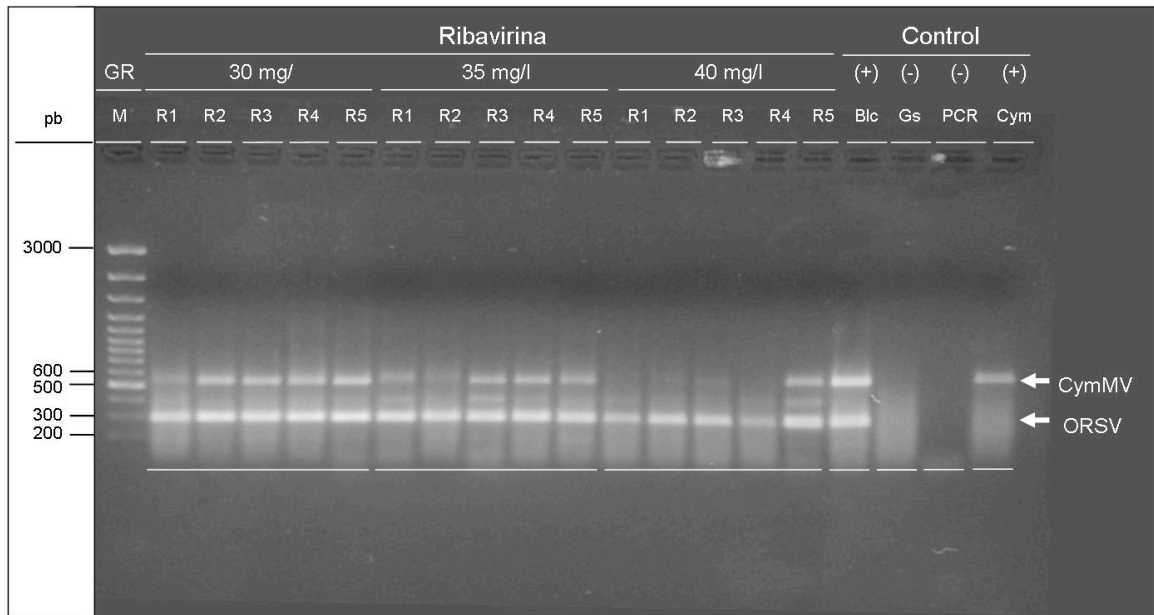


**Figura 8.** Explante expuestos a RBV, parcialmente necrosados y un PLB que sobrevive, de Bc. Blue Grotto 'Blue Lustre', a los 62 días. Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos, Alajuela. Noviembre de 2006.

#### **4.4. Determinar la eliminación del virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV) mediante el proceso de RT-PCR en un híbrido de *Cattleya*.**

Se realizaron dos pruebas de Electroforesis de ADNc viral en geles al 1.7% de Agarosa, utilizando el proceso de Retrotranscripción y amplificación del ADN copia, mediante la reacción en cadena de la polimerasa RT-PCR, para la detección del virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV).

En la Figura 9, se puede observar que en el tratamiento con 40 mg/l de Ribavirina (RBV), no se observa la banda indicadora de la presencia del CymMV en tres columnas (R1, R2, y R4). En dos muestras si se observa la presencia del virus (R3 y R5). Los tratamientos con 30 y 35 mg/l de RBV si presentan la banda del virus. Esta técnica permite observar las dos bandas, la del CymMV y la del virus del anillado del *Odontoglossum* (ORSV), en las dos pruebas. En los carriles de control, el control positivo a CymMV (Control (+) B1c) se observó claramente la infección a CymMV y ORSV; en el control negativo a CymMV (Control (-) Gs), no se observó ninguna banda de CymMV ni ORSV, para el control negativo de PCR, no se observa ninguna banda de contaminación. En el primer gel se agregó un carril más control positivo solo a CymMV (Control (+) Cym). El primer carril se colocó el marcador Gen Ruler™ (GR/M), para medir los pares de base (pb), entre 100 y 3000 pb de las bandas (Apéndice C).



**Figura 9.** Electroforesis 1 y 2 de ADNc viral en geles al 1.7%, utilizando el proceso de Retrotranscripción y amplificación del ADN copia mediante PCR (RT-PCR), en la detección del virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV). Instituto Tecnológico de Costa Rica. San Carlos, Alajuela. Noviembre de 2006.

#### **4.5. Determinación de la presencia del virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV).**

En el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica (CIBCM-UCR) se realizó la detección del virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV) mediante la prueba de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). El híbrido de *Cattleya* (Blc. Blue Grotto 'Blue Lustre') resulto positivo al virus del CymMV, y las plantas de *Guarianthe skinneri* resultaron negativas mediante esta técnica. La muestra del híbrido de *Cattleya*, fue obtenida de una planta adulta proveniente de un híbrido comercial el cual se dedica al desarrollo y comercialización de las mismas. La importación de este tipo de plantas se realiza en forma *in vitro*, para garantizar que venga libres de patógenos, contaminándose al estar en contacto con el agua de riego, poda o el contacto entre ellas. Las plantas de *Guarianthe in vitro* que se evaluaron se tomaron de el Laboratorio de Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica de la Sede San Carlos.

Se utilizó la técnica de ELISA para la detección del virus del CymMV, debido a que la literatura la recomienda por ser un método preciso, simple y de bajo costo de acuerdo a Clark y Adams 1977 citados por Hu *et al.* (1993), Lim *et al.* (1993), Eun y Wong (2000) y Webster *et al.* (2004).

#### **4.6. Establecimiento *in vitro* de un híbrido comercial de *Cattleya* con CymMV**

La desinfección utilizada en el establecimiento *in vitro* de la Blc. Blue Grotto 'Blue Lustre', se realizó de acuerdo a Gutiérrez y Chen-Han (1994), logrando un 100% de sobrevivencia en el establecimiento.

El medio de cultivo de establecimiento que se utilizó fue un medio del cultivo MS (1962); suplementado con 100 mg/l de Mio-inositol, 300 mg/L de PVP, 20.0 g/l de sacarosa, un pH ajustado a 5.5, variando con respecto a la literatura, Lim *et al.* (1993) recomienda el uso del medio de cultivo de Vacin y Went semi-sólido (VW) suplementado con 150 ml/l de agua de coco, más 0.1 mg/l de ANA (VW1) y un pH 5.2. Sin embargo, dicha modificación no afectó el desarrollo de los explantes en el establecimiento *in vitro*, los explantes se observaron con una buena coloración, se desarrollaron protocormos y brotes laterales.

Los explantes que se aislaron tenían una longitud promedio de 5 mm, en el establecimiento las pérdidas de los explantes fue de un 20% por contaminación de hongo. No hubo pérdidas por clorosis o necrosis del tejido. Según Ishii (1974), Kartha y Gamborg (1975), Dale (1975), Stone (1982), Stein *et al.* (1991) citados por Lim *et al.* (1993), se obtiene mayor sobrevivencia de los explantes en el establecimiento *in vitro* cuando se utilizan explantes de 5 mm, que cuando se utilizan a un menor tamaño, donde se presentan más pérdidas.

De los explantes establecidos *in vitro*, solo uno formó protocormos (PLBs) a las 16 semanas. No se realizó ninguna prueba para determinar si los PLBs obtenidos estaban limpios del CymMV. De acuerdo a Lim *et al.* (1993), era muy posible que estuvieran contaminados ya que los PLBs obtenidos de explantes mayores a 5 mm, aún contienen el virus del CymMV y ORSV. Estos autores recomiendan aislar explantes menores de 5 mm en el establecimiento para aumentar la efectiva limpieza viral mediante cultivo de meristemos.

El cultivo de meristemas no fue suficiente para obtener PLBs libres de virus, en estos se mantuvieron las partículas virales en las células del meristemas, disminuyendo la posibilidad de obtener explantes sanos (Toussaint *et al.* 1993).

#### **4.7. Efecto de la Ribavirina en la limpieza viral de protocormos de un híbrido de *Cattleya* comercial positivo al virus CymMV.**

Las concentraciones utilizadas fueron seleccionadas según la literatura consultada, ya que se obtuvieron PLBs libres de virus al CymMV y ORSV en concentraciones de 10 y 20 mg/l de Ribavirina (RBV) en *Mokara* (Lim *et al.* 1993), y una concentración de 35 mg/l de RBV en *Cymbidium* para la eliminación de ORSV (Toussaint *et al.* 1993). Las concentraciones utilizadas fueron de 30, 35 y 40 mg/l de RBV, en este documento.

De los resultados obtenidos mediante la técnica de RT-PCR, los explantes contenían el virus del CymMV y el ORSV y al multiplicar los PLBs la infección se mantuvo hasta que fueron expuestos a la 40 mg/l de Ribavirina donde disminuyó la concentración de CymMV (Lim *et al.* 1993).

Durante la segunda semana de evaluación se observó necrosis alrededor del explante, hasta la semana 4 se evidenció la necrosis en los tratamientos de 30, 35 y 40 mg/l del antiviral, con una reducción en sobrevivencia el 80%, para los dos primeros tratamientos y un 60% en el tercero. En cada subcultivo se eliminaba el tejido necrótico de los explantes y se volvía a sembrar en el medio de cultivo fresco.

Después de tercer subcultivo (8 semanas) los tratamientos con 30 y 35 mg/l mantuvieron un 60% de sobrevivencia. Dichos tratamientos presentaban tejido necrótico; pero más tejido verde, en comparación con el tratamiento de 40 mg/l (20% de sobrevivencia).

El efecto de necrosis se atribuye a que la Ribavirina tienen efecto citotóxico afectando la división celular utilizada por largos periodos (Apéndice D), este efecto se manifestó aun más por el aumento de las concentraciones utilizadas, el origen y tipo de células utilizadas (Toussaint *et al.* 1993).

#### **4.8. Determinar la eliminación del virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV) mediante el proceso de RT-PCR en un híbrido de *Cattleya*.**

La técnica de Retrotranscripción y PCR (RT-PCR), permitió confirmar la presencia del virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV), en los tratamientos uno y dos, en los cuales se observó la presencia del virus, este método ha sido utilizado para la detección del virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV) y el anillado del *Odontoglossum* (ORSV), aunque sean de diferente grupo taxonómico (Seoh *et al.* 1998).

El análisis por RT-PCR, confirmó la presencia del ORSV, demostrando la doble infección viral que se produce entre el CymMV y el ORSV, reportado en la literatura (Zettler *et al.* 1990, Hsu *et al.* 1992, Hu *et al.* 1993, Toussaint *et al.* 1993; Lawson y Brannigan 1986, Pearson y Cole 1986 citados por Lim *et al.* 1993; Hu *et al.* 1994; Brunt *et al.* 1996; Tanaka *et al.* 1997; Rivera 1998; Moreira *et al.* 1999; Lawson 1995, citado por Chacón 2002; Labrín *et al.* 2005). Los síntomas de esta doble infección y las plantas asintomáticas no permiten hacer un diagnóstico diferencial a simple vista (Velasco *et al.* 1986, Seoh *et al.* 1998, Toussaint *et al.* 1993, Barry *et al.* 1996, Eun y Wong 2000).

El uso de detección de virus del CymMV utilizado frecuentemente es el análisis de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (Lim *et al.* 1993, Barry *et al.* 1996, Toussaint *et al.* 1993, Ryu y Park 1995 citado por Seoh *et al.* 1998); sin embargo, para realizarlo es muy laborioso, menos sensible y requiere mayor

tiempo de reacción por los anticuerpos. Además, con la técnica de ELISA no se pueden detectar dos virus simultáneamente. La técnica de PCR, es un método más sensible, de rápida detección, y además, reduce los costos de indexación rutinario de estos dos virus, que son los más frecuentes en el la producción de las orquídeas (Seoh *et al.* 1998).

Los resultados muestran que las banda del CymMV se encuentra entre los 500 y 600 pares de base (bp) y las bandas del ORSV entre los 200 y 300 bp, lo que se puede confirmar con los reportados por Seoh *et al.* (1998) que indican que los virus pueden ser observados a 534 y 290 pb respectivamente.

La Ribavirina es un virustático, lo que significa que bloquea la replicación viral dependiendo de la concentración del virus en la planta, el género de la planta, el tipo de tejido y el virus que lo infecta; sin embargo, la eficiencia del antiviral depende del desarrollo de tejido (Toussaint *et al.* 1993).

Los factores que favorecieron la reducción del virus en el tratamiento con 40 mg/ de RBV, de acuerdo a Toussaint *et al.* (1993), se debe a la sensibilidad del tejido a la Ribavirina, la difusión y penetración del antiviral al utilizar medio líquido, al subcultivar y mantener los PLBs en contacto con la misma concentración de la Ribavirina, disminuyendo la concentración del virus por dilución, resultado de la actividad mitótica. Esto permitió la disminución de la concentración del virus; y al estar subcultivando se elimina la parte necrótica dejando solo los PLBs con coloración verde o viables; por lo que el control de estos dos virus puede ser difícil (Barry *et al.* 1996). Los factores que pueden afectar la disminución de la concentración del CymMV en los PLBs subcultivados, pudieron ser el tamaño del explante utilizado, y la velocidad de crecimiento de los brotes desarrollados. Se debe mencionar que la eficiencia de la Ribavirina se realizó en géneros diferentes, al híbrido de *Cattleya* y el desarrollo de PLBs es más lento que en otros géneros (Pierik 1990, Kuan y González 1993).

Los resultados muestran que las repeticiones 1, 2 y 4 de la concentración de 40 mg/l, después de 8 semanas en contacto con la RBV, resultaron negativas a CymMV pero no eliminó el ORSV, lo que no concuerda con Lim *et al.* (1993) que reportan una eliminación del CymMV y el ORSV con 10 y 20 mg/l después de un mes de haber sido expuesto los PLBs en RBV, la prueba la hicieron mediante ELISA para cada virus. Tampoco se concuerda con Toussaint *et al.* (1993), que concluyen que después de 4 semanas lograron eliminar el ORSV con una concentración de 35 mg/l de Ribavirina, confirmándolo con una prueba de ELISA.

Respecto a las repeticiones 3 y 5 del tratamiento 3, los cuales resultaron positivas al CymMV, esto posiblemente se debió al tamaño de los PLBs utilizado en el análisis de RT-PCR. De acuerdo a Lim *et al.* (1993), si los explantes eran mayores a 5 mm la presencia del virus, podría mantenerse. En el momento de la selección de los PLBs no fue posible seleccionar solo los menores a 5 mm debido, a la necrosis que presentaban los explantes de donde fueron extraídos.

La presencia del CymMV en estos explantes se puede relacionar con la velocidad de crecimiento de los PLBs superiores a 5 mm; la cual no fue suficiente para que el virus no se multiplicara en ellos. La velocidad de replicación que tienen los virus en los tejidos y su transporte, mediante tejido vascular o por contacto célula a célula, les permite invadir con gran rapidez los tejidos de gran tamaño; no así a las estructuras de crecimiento de dimensiones pequeñas (Carrington *et al.* 1996, Agrios 1998, Ajjikuttira *et al.* 2005).

## 5.- CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en que se realizó este ensayo se concluye que:

La prueba de ELISA dio positivo para la detección de CymMV en un híbrido comercial de Cattleya.

El establecimiento *in vitro* del híbrido comercial de Cattleya, infectado con CymMV se logró exitosamente mediante la introducción de yemas.

Las concentraciones de Ribavirina afectaron a los tejidos de todos los tratamientos, presentándose una necrosis del tejido más viejo, sin embargo solo la dosis de 40 mg/l dió negativa a la presencia del CymMV.

La prueba de RT/PCR determinó la presencia conjunta de los virus del CymMV y la del ORSV.

El 75 % de los explantes tratados con 40 mg/l de Ribavirina resultó negativa para CymMV mediante la detección de RT-PCR.

## 6.- RECOMENDACIONES

Al disponer de poca información para la limpieza del virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV) en protocormos de orquídeas, se sugiere que se tome en cuenta las siguientes recomendaciones:

1. Repetir el ensayo utilizando las concentraciones de 35, 40 y 45 mg/l de Ribavirina.
2. Aumentar el tiempo de exposición a la Ribavirina en las concentraciones 30, 35, 40 y 45 mg/l.
3. Utilizar esta metodología de limpieza de virus del CymMV en PLBs o protocormos de otros géneros de orquídeas.
4. Someter los protocormos a Termoterapia en conjunto con 30, 35, 40 mg/l de Ribavirina.
5. Utilizar diferentes concentraciones de Dithiouracilo.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Agrios G. 1998. Fitopatología. New York. Academic Press. 838 p.

Ajjikuttira, P; Loh, CS; Wong, SM. 2005. Reciprocal function of movement proteins and complementation of long-distance movement of *Cymbidium* mosaic virus RNA by *Odontoglossum* ringspot virus coat protein. *Journal of General Virology* 86:1543-1553.

Alvarado, C. 2000. Micropropagación de *Cattleya skinneri* y *Cattleya skinneri* x *Cattleya maxima* por cultivo de ápices. Jardín Botánico Lankester (UCR). Informe de práctica de Especialidad. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago. 81 p.

Arias, K. 2002. Orquídeas. Subgerencia de Desarrollo Agropecuario. Dirección de Mercadeo y Agroindustria. Servicio de Información de Mercados. San José, Costa Rica. Año 1. Informe 1. 2 de octubre. 5 p.

Barry, K; Hu, JS; Kuehnle, AR; Sughii. 1996. Sequence analysis and detection using immunocapture-PCR of *Cymbidium* mosaic virus and *Odontoglossum* ringspot virus in Hawaiian orchids. *J. Phytopathology* 144:179-186.

Brunt, AA; Crabtree, K; Dallwitz, MJ; Gibbs, AJ; Watson, L; Zurcher, EJ (eds). 1996. Plant viruses: Descriptions and Lists from the VIDE Database (en línea). Consultado 6 nov. 2005. Disponible en <http://image.fs.uidaho.edu/vode/descr274.htm>

Cabezas B., S. 2006. Exportando belleza natural al mundo. *Revista Actualidad Económica* 19(341):16. Disponible en: <http://www.actualidad.co.cr/341/16.empresas.htm>

Calle, A; Ariel, C. 2001. Reconocimiento del virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV - Potexvirus) y del virus de la mancha anular del *Odontoglossum* (ORSV - Tobamovirus) en *Cattleya* spp. Lindl. (Orchidaceae). Fitopatología Colombiana 24(2):83-94.

Carrington, JC; Kasschau, KD; Mahajan, SK; Schaad, MC. 1996. Cell to cell and long distance transport of viruses in plants. The Plant Cell 8: 1669-1681.

Chacón Jiménez, JG. 2002. Identificación de los virus que afectan orquídeas nativas en dos viveros del Valle Central de Costa Rica. Tesis Facultad de Ciencias, Escuela de Biología. Universidad de Costa Rica. 78 p.

Conci, V. 2004. Obtención de plantas libres de virus. En Echenique, V; Rubinstein, C; Mroginski, L. (Eds.). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal 8(5):303-312. Ediciones INTA, Buenos Aires, Argentina.

Dawson, WO. 1984. Effects of animal antiviral chemicals on plant viruses. Phytopathology 74(2): 211-213.

Elliot, MS; Zettler, FW; Zimmerman, MT; Barnett, OW; LeGrande, MD. 1996. Problems with interpretation of serological assay in a virus survey of orchids species from Puerto Rico, Ecuador, and Florida. Plant Disease 80(10):1160-1164.

Eun, AJC; Wong, SM. 2000. Molecular beacons: a new approach to plant virus detection. Phytopathology 90(3):269-275.

Francki, RIB. 1970. *Cymbidium* mosaic virus. In Harrison, B.D. & A.F. Murant (eds.). Descriptions of Plant Viruses. Commonwealth Mycological Institute and Association of Applied Biologists. Slough, Inglaterra. No.27. (en línea). Consultado 6 nov. 2005. Disponible en <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=27>

Grasseau, N; Macquaire, G; Boyé R; Cornaggia, D; Desvignes, JC. 1999. Peach red marbling and peach sooty ringspot, two new virus like degenerative diseases of *Prunus*. *Plant Pathology* 48:395-401.

Grum, M; Camloh, M; Rudolph, K; Ravnikar, M. 1998. Elimination of bean seed-borne bacteria by thermotherapy and meristem culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 52:79-82.

Gutiérrez, C; Chen-Han, J. 1994. Propagación clonal *in vitro* de *Cattleya* por medio de meristemo. San José, Costa Rica. Instituto Nacional de Aprendizaje. 13 p.

Hsu, HT; Vongsasitorn, D; Lawson, RH. 1992. An Improved method for serological detection of *Cymbidium* mosaic potexvirus infection in Orchids. *Phytopathology* 82(4):491-495.

Hu, JS; Ferreira, S; Wang, M; Xu, MQ. 1993. Detection of *Cymbidium* mosaic virus, *Odontoglossum* ringspot virus, Tomato spotted wilt virus, Potyviruses infecting orchids in Hawaii. *Plant Disease*. 77(5):464-468.

Hu, JS; Ferreira, S; Xu, MQ; Lu, M; Iha, M; Phlum, E; Wang, M. 1994. Transmission, movement and inactivation of *Cymbidium* mosaic and *Odontoglossum* ringspot viruses. *Plant Disease*. 78(6): 633-636.

Knapp, E; Hanzer, V; Mendonca, D; Camara, A; Katinger, H; Laimer, M. 1998. Improved virus detection in rosaceous fruit trees *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 52:3-6.

Kuan, C. y González, L. 1993. Introducción al cultivo y manejo de las orquídeas. San José, Costa Rica. Instituto Nacional de Aprendizaje. p 121.

Labrín, N; Rangel, E; Schmidt, A; Centeno, F; Campos, A. 2005. Virus del mosaico del *Cymbidium* y de la mancha anillada del *Odontoglossum* identificado en un híbrido de *Cattleya* proveniente del municipio de Revenga, Estado Aragua, Venezuela. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:57-61.

Leclercq Le Quillec, F; Riviere, C; Lagorce, A. 2001. Spread of *Cymbidium* mosaic potexvirus and potyviruses in vanilla plants grown in shade houses in Reunion Island. *Fruits* 56(4):249-260.

León, M. 1995. Conservación de especies peruanas de orquídeas utilizando técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*. Tesis. UNALM. Perú. 14-15 p. Sólo resumen.

Leonhardt, W; Wawrosch, Ch; Auer, A; Kopp, B. 1998. Monitoring of virus diseases in Austrian grapevine varieties and virus elimination using *in vitro* thermotherapy. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 52:71-74.

Lim, ST; Wong, SM; Goh, CJ. 1993. Elimination of *Cymbidium* mosaic virus and *Odontoglossum* ringspot virus from orchids by meristem culture and thin section culture with chemotherapy. *Ann.appl. Biol.* 122(2):289-297.

Moreira, L; Villalobos, W; Rodríguez, E; Rivera, C. 1999. Infección de la orquídea terrestre *Phaius tankervilleae* (Orchidaceae) con el potexvirus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV) en Costa Rica. *Revista Biología Tropical* 47(3):281-286.

Murashige T; Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473 – 497.

Nome, SF. 1991. Pruebas de detección de virus, tiroides y organismos fitopatógenos sistémicos aplicadas al cultivo de tejidos. In Roca W., Mroginski L. A. eds. *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. CIAT – Cali, Colombia. Cap. 30, p. 633-695.

O'Herlihy, EA; Croke, JT; Cassells, AC. 2003. Influence of *in vitro* factors on titre and elimination of model fruit tree viruses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72(1):33-42

Ortiz, B. 2002. Identificación de tres especies de potyvirus en orquídeas nativas. *Práctica de Especialidad Bach. Ing. Biotecnología*. Cartago, CR. ITCR. 69 p.

Pierik, LM. 1990. *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Madrid: Mundi-Prensa. 326 p.

Porter, KG; Kuehnle, AR. 1997. Using Dithiouracil and Ribavirin to eliminate *Cymbidium* mosaic virus during micropropagation of 'Uniwai mist' *Dendrobium* orchid. *HortTechnology* 7:161-164. Sólo resumen.

Promotora de Comercio Exterior de Costa Rica (PROCOMER). 2004. Exportación de orquídea en el año 2004. Estadísticas de exportación. Centro de Documentación. Comunicación personal: Grettel Rivera Ch.

Rivera C, G. 1998. *Orquídeas: Generalidades y cultivo*. Primera edición. Heredia, Costa Rica. EFUNA. 266 p.

Ryu, KH; Yoon, KE; Park, WM. 1995. Detection by RT-PCR of *Cymbidium* Mosaic virus in Orchids. *J. Phytopathology* 143:643-646.

Seoh, ML; Wong, SM; Zhang, L. 1998. Simultaneous TD/RT-PCR detection of *Cymbidium* mosaic potexvirus and *Odontoglossum* ringspot tobamovirus with a single pair of primer. *Journal of Virological Methods* 72: 197-204.

Streeter, DG; Witkowski, JT; Khare, GP; Sidwell, RW; Bauer, RJ; Robins, RK; Simon, LN. 1973. Mechanism of action of 1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (Virazole), a new broad-spectrum antiviral agent. Proceedings of the National Academy of Science, USA 70(4):1174-1178.

Tanaka, S; Nishii, H; Ito, S; Kameya-Iwaki, M; Sommartya, P. 1997. Detection of *Cymbidium* Mosaic Potexvirus and *Odontoglossum* Ringspot Tobamovirus from Thai Orchids by Rapid Immunofilter Paper Assay. Plant Disease 81(2):167-170.

Toussaint, A; Kummert, J; Maroquin, C; Lebrun, A; Roggemans, J. 1993. Use of Virazole® to eradicate *Odontoglossum* ringspot virus from *in vitro* cultures of *Cymbidium* Sw. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 32(3):303-309.

Velasco, AC., Hernández, F., Gámez, R. 1986. Una doble infección viral en orquídeas del género *Cymbidium*. Rev. Biol. Trop. 34. 171-179.

Villalobos, VM. 1979. Obtención de plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus*) libres de virus por cultivo *in vitro* de meristemas y ápices vegetativos. Colegio de Posgraduados. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Chapingo, México 94 p.

Webster, CG; Wylie, SJ; Jones, MG. 2004. Diagnosis of plant viral pathogens. Current Science 86(12):1604-1607.

Wisler, GC; Zettler, FW; Mu, L. 1987. Virus Infections of *Vanilla* and other orchids in French Polynesia. Plant Disease 71(12):1125-1129.

Zettler, FW; Ko, NJ; Wisler, GC; Elliot, MS; Wong, SM. 1990. Viruses of orchids and their control. Plant Disease 74(9):621-626.

## 8. APENDICE

## **APENDICE A**

Certificado de la presencia del virus del mosaico en *Cymbidium* (CymMV), en híbridos de interés comercial, recibido del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica (CIBCM-UCR).

## APENDICE B

Certificado de la ausencia del virus del mosaico en *Cymbidium* (CymMV), en *Cattleya dowiana* y *Guarianthe skinneri*, recibido del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica (CIBCM-UCR).

## **APENDICE C**

Marcador utilizado en la prueba de Electroforesis (Gener Ruler™).

## **APENDICE D**

Datos de seguridad de Ribavirina (Sigma).