

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA
CELULAR Y MOLECULAR,
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**

**PROGRAMA DE CARACTERIZACIÓN Y DIAGNÓSTICO DE
VIRUS, VIROIDES Y FITOPLASMAS EN CULTIVOS DE
IMPORTANCIA ECONÓMICA Y ALIMENTARIA (PCDV-CIBCM)**

**“Identificación de tres especies de potyvirus
en orquídeas nativas”**

BEATRIZ ORTIZ ARIAS

CARTAGO, 2002

DEDICATORIA

A Dios, creador de mi intelecto y dador de fortaleza en los duros momentos.

A mis padres y hermanos, pero en especial, a los que insistieron en apoyarme en todo momento y que hoy comparten conmigo esta gran dicha.

AGRADECIMIENTOS

Quiero manifestar mi agradecimiento a todos aquellos que a través del largo camino al éxito depositaron su confianza en mí, impulsándome a continuar día a día hasta completar el reto.

A mis tutoras, Msc. Carmen Rivera, Msc. Lisela Moreira y Msc. Dora María Flores, quienes con su ejemplo de dedicación, persistencia y esmero, motivaron cada uno de mis pasos.

A todo el personal del vivero donde se realizó la práctica, por abrirme sus puertas permitiendo el desempeño de cada una de las labores necesarias.

A toda mi familia, por mantenerse junto a mí en la lucha, y a quienes debo mi perseverancia en el estudio pues con su apoyo y esfuerzo lograron incentivar lo que hoy cosecho.

A mis amigos, compañeros de laboratorio y demás personas que estuvieron a mi lado incansablemente esperando mi éxito.

Este proyecto se llevó a cabo gracias al financiamiento brindado por el Fondo de Incentivos MICIT – CONICIT, y la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.

A todos, mil gracias.....

“ Identificación de tres especies de potyvirus en orquídeas nativas”.

Informe de práctica de especialidad sometido a consideración ante la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica por Beatriz Ortiz Arias como requisito parcial para optar por el título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.

Msc. Dora María Flores Mora
Instituto Tecnológico de Costa Rica
Asesora

Msc. Carmen Rivera Herrero
Centro de Investigación en
Biología Celular y Molecular
Universidad de Costa Rica
Coasesora

Msc. Lisela Moreira Carmona
Centro de Investigación en
Biología Celular y Molecular
Universidad de Costa Rica
Miembro del Tribunal

TABLA DE CONTENIDOS

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Justificación	5
Objetivos	8
Objetivo general.....	8
Objetivos específicos	8
Revisión de literatura	9
Familia Orquidaceae	9
Virus	10
Familia Potyviridae.....	11
Género Potyvirus.....	12
Virus en orquídeas	12
<i>Bean common mosaic potyvirus</i> (BCMV)	13
<i>Bean yellow mosaic potyvirus</i> (BYMV)	14
<i>Turnip mosaic potyvirus</i> (TuMV)	14
Familia Bunyaviridae	15
Género <i>Tospovirus</i>	15
Serología.....	16
Metodología	19
Capacitación	19
Toma de la muestra para la detección de potyvirus	19
Pruebas serológicas aplicadas en la detección de potyvirus específicamente las especies BYMV, BCMV y TuMV.....	21
Detección de potyvirus	21
Detección del <i>Bean common mosaic potyvirus</i>	23
Detección del <i>Turnip mosaic potyvirus</i> y <i>Bean yellow mosaic potyvirus</i>	23
Toma de la muestra para la detección de INSV	25
Pruebas serológicas utilizadas en la detección del tospovirus <i>Impatiens necrotic spot virus</i>	26
Electroforesis en geles de poliacrilamida para proteínas (SDS-PAGE)	27
Ensayo inmuno específico de blot electrotransferido “western blot”	27

Resultados	29
Detección de potyvirus	29
Comprobación mediante “western blot “	33
Detección del <i>Impatiens necrotic spot tospovirus</i>	36
Discusión	39
Conclusiones	46
Recomendaciones	47
Literatura citada	48
APÉNDICE 1	56
Colección de orquídeas nativas de Costa Rica evaluadas para la identificación de potyvirus	56
APÉNDICE 2	59
Colección de orquídeas nativas de Costa Rica evaluadas para la identificación del tospovirus <i>Impatiens necrotic spot virus (INSV)</i>	59
ANEXO 1	62
EVALUACIÓN DE ORQUÍDEAS	62
ANEXO 2	64
Soluciones amortiguadoras utilizadas en pruebas ELISA	64
ANEXO 3	66
Geles de poliacrilamida (15%) para proteínas	66
ANEXO 4	68
Ensayo inmunoespecífico de blot electrotransferido “western blot”	68
Soluciones utilizadas en el “western blot”	68

TABLA DE CUADROS

Cuadro N°	Título	Página
Cuadro 1.	Cantidad de muestras de orquídea por género evaluadas para potyvirus.....	20
Cuadro 2.	Cantidad de muestras por género de orquídeas evaluadas para INSV.....	26
Cuadro 3.	Síntomas foliares más comunes mostrados por plantas evaluadas para determinar la presencia de potyvirus.....	29
Cuadro 4.	Determinación de tres especies de potyvirus en muestras positivas para éste género viral.....	32
Cuadro 5.	Frecuencia de síntomas foliares presentes en las plantas evaluadas para determinar la presencia del <i>Impatiens necrotic spot tospovirus</i> (INSV).....	37
Cuadro 1.1.	Orquídeas nativas de Costa Rica con resultados positivos para potyvirus en investigaciones anteriores y evaluadas nuevamente.....	56
Cuadro 1.2.	Síntomas de posible etiología viral presentados por algunas de las plantas evaluadas para determinar la posible infección por potyvirus.....	58
Cuadro 2.1.	Orquídeas nativas de Costa Rica que en investigaciones anteriores presentaron resultados negativos para algunos virus y evaluadas nuevamente para INSV.....	59
Cuadro 2.2.	Síntomas de posible etiología viral presentados por algunas de las plantas evaluadas para determinar la posible infección por <i>Impatiens necrotic spot tospovirus</i> (INSV).....	60

TABLA DE FIGURAS

Figura N°	Título	Página
Figura 1.	Hoja de <i>Vanilla tahitensis</i> infectada con <i>Vanilla potyvirus</i> (A). Flor de <i>Dendrobium lamarckianum</i> infectada con <i>Ceratobium mosaic potyvirus</i> (B).....	12
Figura 2.	Moteado clorótico presenten plantas de <i>Mesospinidium warszewiczii</i> , <i>Maxillaria criptobulbom</i> y <i>Encyclia pigmeae</i>	30
Figura 3.	Bandeados observados en algunas muestras de evaluadas mediante la técnica de ELISA para la detección de potyvirus.....	30
Figura 4.	Amarillamiento severo en la región apical y márgenes de hojas de <i>Encyclia pigmeae</i> (A) y <i>Maxillaria ramonensis</i> (B).....	31
Figura 5.	Síntomas foliares presentes en una hoja de <i>Maxillaria</i> sp.....	31
Figura 6.	Muestras positivas y negativas para potyvirus de las 33 orquídeas nativas evaluadas.....	32
Figura 7.	Total de muestras positivas para cada una de las especies del género <i>Potyvirus</i> evaluadas.....	33
Figura 8.	Gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) teñido con azul Coomasie (A). (B) Transferencia a papel de nitrocelulosa del gel par mostrado en A y revelado con anticuerpo específico para el virus BCMV.....	34
Figura 9.	Gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) teñido con azul Coomasie (A). (B) Transferencia a papel de nitrocelulosa del gel par mostrado en A y revelado con anticuerpo específico para el virus TuMV.....	35
Figura 10.	Gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) teñido con azul Coomasie (A). (B) Transferencia a papel de nitrocelulosa del gel par mostrado en A y revelado con anticuerpo específico para el virus BYMV.....	36

Figura N°	Título	Página
Figura 11.	Síntomas más comunes observados en las plantas de orquídeas evaluadas para la detección del virus INSV.....	37
Figura 12.	Muestras positivas y negativas para INSV de las 31 orquídeas nativas evaluadas.....	38
Figura 1.1.	Orden de montaje de las partes que componen el "sandwich" requerido para llevar a cabo la transferencia.....	68

Resumen

En una colección de orquídeas nativas de un vivero de interés ubicado en el Valle Central de Costa Rica, se detectó mediante la técnica de ELISA, la presencia de virus del género *Potyvirus* en cinco muestras. Las muestras positivas se evaluaron nuevamente mediante ELISA para las especies *Bean common mosaic potyvirus* (BCMV), *Bean yellow mosaic potyvirus* (BYMV) y *Turnip mosaic potyvirus* (TuMV). Tres de las muestras presentaron infección simple con las especies BCMV y BYMV. Una presentó infección mixta con TuMV y BCMV, y la restante no mostró reacción positiva para los virus evaluados. Los principales síntomas de posible etiología viral encontrados fueron moteados, bandeados cloróticos, amarillamientos y deformaciones foliares. Sólo una de las muestras positivas a los virus evaluados fue asintomática.

Mediante el ensayo inmunoespecífico de blot electrotrotransferido se evidenció que únicamente los anticuerpos específicos del BCMV y TuMV reconocieron algunas de las muestras que previamente fueron positivas por ELISA, corroborando la presencia de estas especies en el vivero.

En la investigación también se evaluó mediante ELISA para el *Impatiens necrotic spot tospovirus*, otro grupo de orquídeas de esta colección, resultados iniciales indicaron la presencia de este virus, sin embargo, al repetir la técnica los resultados no fueron consistentes.

Palabras claves: Orquídeas, potyvirus, BCMV, BYMV, TuMV, INSV, ELISA, "Western blot"

Abstract

In a native orchid collection in a nursery at the Central Valley of Costa Rica viruses of genus Potyvirus were detected by ELISA test, only five samples of 33 evaluated were positive. The infected plants were also tested by ELISA to detect the potyviruses *Bean common mosaic* (BCMV), *Bean yellow mosaic* (BYMV) and *Turnip mosaic* (TuMV). Two samples were positive for BCMV and other for BYMV. One of them presented a mixed infection with TuMV and BCMV, the last one was negative for the viruses tested. Symptoms associated with viruses infections (chlorotic mottle and streaks, color break and leaf distortion) were found in several sampled plants. One of the asymptomatic plants were positive for the tested viruses.

The comprobatation of ELISA's results were carried on using Western Blot. Positive reaction were found using the antibodies to BCMV and TuMV in some of the samples positive by ELISA.

Another group of orchids of the nursery were evaluated by ELISA to detect the Impatiens necrotic spot tospovirus (INSV). Initial results showed positive reaction in some of those samples however posterior evaluation using the same method no showed the same results. That was the reason to reject the initial results to INSV considering those as an artifact.

Key words: orchids, potyvirus, BCMV, BYMV, TuMV, INSV, ELISA, "Western blot"

Introducción

A pesar de que las rosas, los claveles y los crisantemos aún dominan la preferencia mundial y representan cerca del 70% de la demanda de flores, las flores tropicales exóticas tales como orquídeas, anturios y heliconias, han ganado terreno en la preferencia de los consumidores, especialmente los europeos. El mercado mundial de flores actualmente, está valorado en US\$49 mil millones anuales (PROCOMER 2001).

En los últimos años, en Costa Rica, las exportaciones de plantas ornamentales y flores cortadas, se sitúan en las principales posiciones dentro de los productos no tradicionales. Con respecto a los destinos de estos productos se ha presentado un aumento considerable durante el transcurso de dicha actividad.

En Costa Rica las orquídeas ocupan un papel importante debido a la belleza y gran diversidad de forma, tamaño, fragancia y color. Son empleadas en la decoración de jardines, en exhibiciones y comercializadas precios a muy altos. Por estas razones su cultivo se ha intensificado por parte de particulares e industriales, los cuales deben tener presente la calidad fitosanitaria del material, con el fin de evitar la aparición de enfermedades fungosas, bacterianas y virales, así como plagas que amenacen su desarrollo y calidad.

Las orquídeas presentan muchos problemas por enfermedades virales, al menos 30 virus infectan a sus especies e híbridos, teniendo como consecuencia la disminución considerable de su valor comercial debido a la reducción del vigor de la planta, alteraciones en la floración (tamaño y calidad de la flor), presencia de síntomas foliares y malformaciones, entre otros.

Sin embargo, no es raro detectar plantas infectadas asintomáticas, lo que ha favorecido la dispersión a nivel mundial de virus, por el tráfico sin control de plantas con fines de colección o mejoramiento (Zettler *et al.* 1990, Hsu *et al.* 1992).

Para la detección de virus es recomendable seguir un orden de complejidad, desde la simple observación de síntomas, su forma de transmisión y el empleo de hospederos alternos, hasta la aplicación de técnicas más sofisticadas de diagnóstico, como la serología, visualización y medición del patógeno en el microscopio electrónico, utilización de técnicas moleculares como la hibridación con sondas marcadas y la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El empleo de una u otra técnica de diagnóstico dependerá de las posibilidades de cada laboratorio, del tipo de patógeno y del número de plantas que sea necesario estudiar (Roca y Mroginski 1991).

Entre las técnicas serológicas de más amplia aceptación se encuentran las inmunoenzimáticas, como el ensayo inmunoabsorbente con enzima ligada (ELISA, “enzyme-linked immunosorbent assay”), debido a la especificidad de sus resultados, bajo costo, además de adaptarse fácilmente a mediciones cuantitativas.

Justificación

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' (*Aeres*, *Aerides*, *Oncidium* y *Renanthera*) son exportadas en constante aumento desde Malasia y Tailandia (Salinger 1991).

García (1995), describe que lo más extraordinario de esta familia es su gran diversidad en cuanto a forma, tamaño, fragancia, hábitos, zonas de crecimiento y color. Su color va desde el blanco puro hasta tonos muy oscuros. Presentan tamaños que varían desde los pequeños y poco conocidos como *Homalopetalum*, hasta las gigantescas *Myrmecophilas*, cuyos tallos con sus escapos florales pueden alcanzar varios metros.

En la mayoría de las ocasiones, el cultivo de orquídeas tiene como finalidad comercializarlas como planta ornamental o flor cortada. Esta actividad ha aumentado durante los últimos años. Se calcula que en el mundo, hoy en día, casi nueve millones de orquídeas y flores provenientes de bosques tropicales son vendidas a cultivadores y coleccionistas en miles de dólares.

Según datos proporcionados por la Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica (PROCOMER 2001), recientemente nuestro país exportó US\$141,7 millones en flores cortadas y plantas de follaje. Un 60% se dirigió a la Unión Europea (UE), uno de los principales mercados a nivel mundial y donde Holanda destaca como el principal comprador, con un 65% del total de las importaciones, seguido por Alemania con un 21%. Es relevante mencionar que

la venta de flores en este mercado creció en forma continua en años recientes y se estima que para el 2003 el consumo será cercano a los US\$14,5 billones.

Las flores tropicales que se exportan, tales como las orquídeas, los anturios y las heliconias, son distribuidas por importadores especializados que constituyen un nicho de mercado en crecimiento. Sin embargo, deben considerarse los altos costos de transporte que tienen las flores tropicales debido a su tamaño. Además, dada la variedad de colores y formas inusuales de estas flores, se requiere de inversión para mejorar la calidad y hacerlas cada día más competitivas en este mercado.

Un aspecto muy importante que debe atenderse son las infecciones virales, las cuales provocan reducción del vigor, alteraciones en la floración y disminución en el tamaño y la calidad de la flor, en las plantas que infectan. Además, pueden producir malformaciones o cambios de color en las flores y hojas, lo que afecta directamente el valor de exhibición o comercial de las plantas (Hu *et al.* 1993). Sin embargo, infecciones asintomáticas han dispersado los virus a nivel mundial. Es importante indicar que la presencia de infecciones virales impide el libre tránsito de orquídeas en el mundo, ya que no cumplen con las especificaciones de los programas de certificación sanitaria.

Zettler *et al.* (1990) han indicado que las orquídeas pueden ser infectadas por un número alto de virus diferentes y que su valor comercial puede reducirse considerablemente cuando ocurre la enfermedad, por lo cual estos patógenos son temidos por cultivadores y productores.

Al menos 30 virus se han informado que infectan orquídeas, de esos el *Cymbidium mosaic potexvirus* (CymMV) y el *Odontoglossum ringspot*

tobamovirus (ORSV), antes conocido como raza O del *Tobacco mosaic tobamovirus*, son los que han recibido la mayor atención a nivel mundial (Zettler *et al.* 1990). Otros virus que infectan diversos cultivos también se han informado en orquídeas, entre ellos se encuentran ocho potyvirus.

El BCMV, BYMV y TuMV, son especies del género *Potyvirus* que se encuentran distribuidas alrededor del mundo (Brunt *et al.* 1996). En Costa Rica se han identificado el BCMV y BYMV en frijol (Gámez *et al.* 1970), seis de los virus informados a nivel mundial, que afectan orquídeas y el género *Potyvirus*, en orquídeas nativas de dos viveros de interés (Chacón 2002), por lo que es de relevancia determinar cuales potyvirus están presentes en el vivero en estudio.

Además, la detección del *Impatiens necrotic spot tospovirus* (INSV) se incluyó para así determinar si la presencia de síntomas con apariencia de infección viral en plantas que en evaluaciones anteriores fueron negativas para diversos virus, se debía a causa de la presencia de dicho virus.

Considerando que las infecciones virales en orquídeas deterioran la calidad y afectan directamente la comercialización del producto, es necesario el conocimiento del estado fitosanitario de las plantas por quienes están a cargo de los viveros, con el fin de producir material de buena calidad, evitar la diseminación de enfermedades y conservar material vegetal sano.

Objetivos

Objetivo general

Identificar mediante la técnica de ELISA si las especies del género *Potyvirus*: *Bean common mosaic potyvirus*, *Bean yellow mosaic potyvirus* y *Turnip mosaic potyvirus* se encuentran presentes en una colección de orquídeas nativas de Costa Rica.

Objetivos específicos

1. Recibir una tutoría sobre las bases de virología vegetal.
2. Recibir un entrenamiento aplicado al reconocimiento de síntomas inducidos por virus en orquídeas.
3. Desarrollar destrezas en la técnica ELISA (DAS-ELISA y ELISA indirecto).
4. Determinar si los virus: *Bean common mosaic potyvirus*, *Bean yellow mosaic potyvirus* y *Turnip mosaic potyvirus* se relacionan con las infecciones detectadas previamente en una colección de orquídeas nativas ubicada en el Valle Central.
5. Evaluar una colección de orquídeas nativas para determinar si se encuentran infectadas con el *Impatiens necrotic spot tospovirus*.
6. Comprobar los hallazgos de la técnica de ELISA mediante el inmunoensayo de blot electrotransferido (“western blot”).

Revisión de literatura

Familia Orquidaceae

La familia Orquidaceae es la familia de plantas con flor más grande del Reino Vegetal. Se estima que existen de 17 000 a 35 000 especies agrupadas en 900 géneros. A esto se deben agregar más de 70 000 híbridos artificiales inscritos (Rivera 1998). Actualmente, en nuestro país, existen naturalmente alrededor de 1 360 especies (180 géneros), de las cuales 356 son nativas de Costa Rica (Pupulin, 2002).

Las orquídeas son plantas herbáceas, perennes, cuyo tamaño oscila de 3 a 4 mm, hasta varios metros de longitud. Presentan varios hábitos de crecimiento debido a su gran variabilidad morfológica. Crecen sobre los árboles (epífitas), sobre las rocas (litófitas) y en el suelo (terrestres), pero gran parte de la familia es epífita (Abdelnour y Muñoz 1997).

La familia de las orquídeas es extraordinaria no solamente por presentar el mayor número de plantas del Reino Vegetal, sino también por presentar la mayor variedad de tamaños, formas, texturas y colores de flor y planta. Las flores van desde tamaños microscópicos hasta 33 cm de diámetro.

Algunas plantas producen una sola flor, mientras otras, son capaces de dar lugar a miles de flores. Estas poseen los más variados colores, siendo algunas de un solo color, otras moteadas, veteadas, rayadas o manchadas. Algunas especies florecen sólo una vez al año; otras lo hacen varias veces al año. Unos géneros de orquídeas tienen flores que emanan diversas fragancias, pero algunas son inodoras o producen malos olores para el ser humano (Orquídeas en el Alto...; s.f.).

En los trópicos se concentra el mayor número de especies y es precisamente en estas regiones, donde se ha producido el mayor impacto ecológico provocado por el hombre en los últimos años. Lo anterior obedece a modelos de desarrollo, que pretenden beneficios económicos en un corto plazo, a expensas de los recursos naturales. Esta corriente ha puesto en peligro muchas especies de la flora y fauna nativa, particularmente aquellas adaptadas a ecosistemas muy específicos, como es el caso de las orquídeas (Rivera 1998).

Virus

Los virus son entes infecciosos submicroscópicos, patógenos obligados, capaces de organizar su propia multiplicación dentro de las células de un hospedante adecuado. Las partículas virales están constituidas por ácido nucleico rodeado por una cubierta proteica. La replicación de los virus se organiza con base en la información genética contenida en su ácido nucleico, y se lleva a cabo a partir de materiales presentes en la célula del hospedante, utilizando las enzimas y estructuras de ésta para la síntesis de proteína (Arauz 1998).

Los virus perturban las funciones normales de las plantas, utilizando los recursos estructurales de éstas, para fabricar más partículas virales. Normalmente los virus no provocan la muerte de las plantas, pero si provocan cambios que reducen su productividad, y en el caso de las orquídeas reducen su valor ornamental.

Los virus cuando infectan las plantas causan gran variedad de síntomas, algunos de ellos son característicos; muchos de ellos son similares a los causados por desórdenes nutricionales, daños por insectos, bacterias y hongos. El síntoma más característico producido por los virus es la pérdida de vigor. También se producen otros como variaciones de color en las hojas, tales como,

mosaicos o rayas, clorosis en o cerca de las venas, clorosis generalizada, manchas anulares, venas necróticas, deformaciones; brotes abultados y malformaciones, reducciones de tamaño y cambios en el color de las flores (Infoagro s.f.).

Familia Potyviridae

Es la familia más grande de virus de plantas. Abarca aproximadamente 400 especies o sea una cuarta parte de todos los virus de plantas descritos (Gibbs *et al.* 2000). De acuerdo con el Comité Internacional de Taxonomía Viral (sus siglas en inglés I.C.T.V.) está compuesta por seis géneros: *Potyvirus*, *Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Tritimovirus* y *Rymovirus* (van Regenmortel *et al.* 2000).

Los miembros de esta familia tienen en común la morfología de los viriones. Estos son filamentos flexuosos de aproximadamente 11 a 15 nm de grosor y de 650 a 950 nm de longitud. Otra característica común que presentan es la de inducir la formación de inclusiones cilíndricas en el citoplasma de las células infectadas, dicha presencia se acepta como criterio de importancia en la clasificación taxonómica (Brunt *et al.* 1994).

El genoma de los virus de la familia Potyviridae está formado por un único ARN de cadena simple, de polaridad positiva y de alrededor de 10 kb, con excepción de los bymovirus, que tienen un genoma separado en dos fragmentos. Aunque se dispone de la secuencia de nucleótidos de genomas completos de bymovirus, y de partes de genomas de rymovirus, la mayor información de los potyviridae corresponde a miembros del género *Potyvirus* (García y García 1996).

Género *Potyvirus*

El género *Potyvirus* representa uno de los seis géneros que conforman la familia *Potyviridae*. Es de los cinco géneros más amplios, con 179 especies (91 aceptadas oficialmente por el ICTV y 88 especies tentativas) (van Regenmortel *et al.* 2000). Los virus de este género presentan partículas filamentosas y flexuosas de aproximadamente 680-900 nm de longitud y 11-13 nm de grosor. Están constituidos por un genoma de una sola cadena de ARN en sentido positivo y una proteína de cápside de un peso molecular de alrededor de 30-47 kDa.



Figura 1. A. Hoja de *Vanilla tahitensis* infectada con *Vanilla potyvirus*. B. Flor de *Dendrobium lamarckianum* infectada con *Ceratobium mosaic potyvirus* (Tomado de Zettler *et al.* 1990 (A), Gibbs *et al.* 2000 (B)).

Algunos de los síntomas foliares que induce este género viral en las orquídeas son deformaciones (Fig. 1A), parches cloróticos hundidos, mosaicos y senescencia (Pearson *et al.* 1993, Gibbs *et al.* 2000), además, frecuentes cambios de color y deformación de flores (Fig.1B).

Naturalmente se transmiten por áfidos en forma no persistente y algunos por semilla. Experimentalmente se transmiten por inoculación mecánica. (Gibbs *et al.* 2000).

Virus en orquídeas

Al menos ocho géneros de virus han sido encontrados en orquídeas en el mundo (*Cucumovirus*, *Nepovirus*, *Potexvirus*, *Potyvirus*, *Rhabdovirus*, *Tobamovirus*, *Tombusvirus* y *Tospovirus*). Sin embargo, la mayoría de las publicaciones sobre este tema se han concentrado en solo dos virus,

Cymbidium mosaic potexvirus (CyMV) y *Odontoglossum ringspot tobamovirus* (ORSV) (Gibbs *et al.* 2000).

Según Gibbs *et al.* (2000), alrededor de ocho virus del género *Potyvirus* han sido informados infectando orquídeas: *Bean yellow mosaic virus* (BYMV), *Clover yellow vein virus* (CIYVV), *Turnip mosaic virus* (TuMV), *Dendrobium mosaic virus* (DeMV), *Vanilla mosaic virus* (VanMV) (Zettler *et al.* 1990), *Calanthe mild mosaic virus* (CaIMMV) (Gara *et al.* 1998), *Ceratobium mosaic virus* (CerMV) (Mackenzie *et al.* 1998, van Regenmortel *et al.* 2000) y *Habenaria mosaic virus* (HaMV) (Gara *et al.* 1997). Cabe mencionar que tanto el VaMV como el HaMV son especies tentativas del género *Potyvirus* aún no aprobadas por el ICTV y el *Dendrobium mosaic virus* (DeMV) un miembro del subgrupo de *Bean common mosaic virus* (BCMV) (Gibbs *et al.* 2000, van Regenmortel *et al.* 2000).

Zettler *et al.* (1990), informaron que los virus BYMV, CIYVV y TuMV, infectan los géneros *Calanthe*, *Masdevallia*, y algunas otras orquídeas en Alemania, Japón y Estados Unidos, respectivamente. Además, se han encontrado potyvirus afectando los géneros *Cypripedium*, *Dendrobium*, *Spiranthes* y *Vanilla* en Europa, Japón, Korea y la Polinesia Francesa, respectivamente.

Bean common mosaic potyvirus (BCMV)

El DeMV, raza del *Bean common mosaic potyvirus* (BCMV), en orquídeas induce clorosis, mosaicos, deformación de las hojas y cambios en el color, así como, deformación de las flores (Murakishi, 1952). El BCMV como miembro del género *Potyvirus*, posee partículas filamentosas y flexuosas de 12-15 nm de grosor y 847-886 nm de largo (Brunt *et al.* 1996). Se transmite

mecánicamente y por el áfido *Myzus persicae* en forma no persistente (Hu *et al.* 1995).

Bean yellow mosaic potyvirus (BYMV)

La infección por este virus en orquídeas induce la formación de manchas cloróticas e irregularidades en la superficie de las hojas (Lesemann y Koenig 1985). Sus partículas poseen un diámetro de 12-15 nm y una longitud de 750 nm (Brunt *et al.* 1996). La transmisión es mecánica o por áfidos de manera no persistente (Kennedy *et al.* 1962), por al menos 20 especies. *Acyrtosiphon pisum*, *Macrosiphum euphorbiae* y *Myzus persicae*, entre otras son vectores del BYMV (Bos 1970). Este virus se transmite en algunas especies de plantas por semilla y polen. En orquídeas no se ha informado su transmisión por semilla.

De acuerdo con Lesemann y Koenig (1985) y Zettler *et al.* (1990), este virus se ha detectado en más de 20 especies del género *Masdevallia* exportadas desde Estados Unidos con rumbo a Alemania y en especies del género *Calanthe* en Alemania. Se aisló de varias especies de orquídeas australianas como *Duris* y *Pterostylis* (Gibbs *et al.* 2000).

Turnip mosaic potyvirus (TuMV)

La especie *Turnip mosaic potyvirus* (TuMV) es transmitida por alrededor de 40 a 50 especies de áfidos, especialmente *Myzus persicae* (Kennedy *et al.* 1962). Se sabe que no es transmitido por semilla, como si ocurre en las especies de potyvirus anteriores (Tomlinson 1970). Probablemente está distribuido por todo el mundo (Brunt *et al.* 1996).

Se ha informado en muchas especies de plantas, en varios países y aislado en Alemania específicamente de orquídeas de la especie *O. militaris*, que mostraban mosaicos en sus hojas (Leseman y Vetten 1985). En el extracto de dichas hojas se determinó la presencia de partículas filamentosas con una longitud de 745 nm e inclusiones intracelulares cilíndricas, características del TuMV. Este virus fue secuenciado junto a otras dos especies más de potyvirus *Clover yellow vein virus* (CIYVV) y *Cypripedium virus Y* (CypVY), éste último presentó similitud, pero muy poca; con el TuMV (Gibbs *et al.* 2000).

Familia Bunyaviridae

Su nombre proviene de la localidad llamada Buyamwera (Uganda), donde fueron aislados por primera vez estos virus. Abarca cerca de 350 especies agrupadas en cinco géneros con base en sus características serológicas y moleculares: *Bunyavirus*, *Hantavirus*, *Phlebovirus*, *Nairovirus* y *Tospovirus*. Sólo el último género contiene especies que infectan plantas (Roggero 1995).

Presentan generalmente partículas esféricas de 80-120 nm de diámetro, constituidos por ARN en sentido negativo y además de la cubierta proteica están envueltos por una membrana (van Regenmortel *et al.* 2000).

Género Tospovirus

A este género pertenecen ocho especies reconocidas por el ICTV, *Groundnut bud necrosis virus* (GBNV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Ground yellow spot virus* (GYSV), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Watermelon*

silver mottle virus (MSMoV), *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) y cinco especies tentativas (van Regenmortel *et al.* 2000).

El INSV fue el primer virus de este género que se describió e informó en Estados Unidos y varios países europeos, la mayoría de los casos infectando ornamentales (Roggero 1996), causando pérdidas significantes (OEPP 1999).

El virus se encuentra en nuestro país (OEPP 1999), sin embargo no existen aún informes de su presencia en orquídeas. Algunos miembros del género *Tospovirus* cuando infectan estas plantas provocan una sintomatología que va desde anillos cloróticos a lesiones necróticas de 1-2 cm de diámetro (Hu *et al.* 1993).

Serología

Los métodos serológicos se basan en la alta especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo, en la cual un anticuerpo reconoce al antígeno que le dió origen o a otro muy semejante, produciendo reacciones que se pueden visualizar de diferentes maneras (Roca y Mroginski 1991).

De acuerdo a Matthews (1992) éstos son métodos muy ventajosos en su utilización por diversas razones:

- la especificidad de la reacción en el reconocimiento del virus puede medirse en presencia de materiales de la planta hospedera u otras impurezas, aunque a veces éstos pueden interferir en las pruebas;
- los resultados pueden obtenerse en pocos horas o minutos comparado a los días que duran los ensayos de infectividad;
- los métodos dan un resultado directamente proporcional a la concentración del virus en un ámbito de concentraciones;
- el antisuero puede guardarse y compararlo con otras pruebas o el de otros virus por períodos prolongados.

Como describen Roca y Mroginski (1991), los métodos de más amplia aceptación son inmunodifusión en agar, microprecipitación, floculación de látex sensibilizado y técnicas inmunoenzimáticas como el ensayo inmunoabsorbente con enzimas ligadas (ELISA, “enzyme-linked immunosorbent assay”).

Según Matthews (1992), la técnica de ELISA puede aplicarse efectivamente para la detección y el ensayo de virus de plantas, actualmente es una de las técnicas más utilizadas. La técnica de ELISA puede aplicarse a preparaciones purificadas y extractos crudos. Se han descrito muchas variaciones en el procedimiento con el objetivo de optimizar la prueba para propósitos particulares. Es una técnica de costo relativamente bajo y muy económica en el uso de reactivos, además puede adaptarse para mediciones cuantitativas.

Las variantes de la técnica de ELISA más usadas en el diagnóstico de virus de plantas son el ELISA-indirecto y DAS-ELISA (Double antibody sandwich) (Brunt *et al.* 1994). En el ELISA-indirecto el antígeno es inmovilizado en una superficie inmunoabsorbente, luego se añaden los anticuerpos específicos del antígeno fijado y sobre ellos inmunoglobulinas anti-especie marcadas enzimáticamente.

El DAS-ELISA consiste en el acoplamiento de un anticuerpo específico a una matriz sólida, la posterior adición del antígeno y un último anticuerpo, el cual se encuentra marcado enzimáticamente y es específico para la proteína que se desea detectar (Alpizar 2001), la actividad de la enzima adherida al anticuerpo se determina añadiendo el sustrato para esta, el color que se forma (reacción sustrato - enzima), es proporcional a la cantidad de antígeno presente (Madigan *et al.* 1999).

La combinación de herramientas serológicas con métodos electroforéticos, ya sea para visualizar y estudiar la posición y/o cantidad

relativa de proteínas puede llevarse a cabo utilizando procedimientos inespecíficos como la tinción con azul brillante de Coomassie, e identificar el virus mediante el procedimiento específico del inmunoensayo de blot electrotransferido (frecuentemente llamado "western blot") (Matthews 1992).

El "western blot" se ha utilizado exitosamente en la detección y caracterización de muchos virus de plantas y sus productos génicos (Brunt *et al.* 1994). La detección se hace por medio de dos propiedades independientes de la cubierta proteica del virus, el peso molecular y la especificidad serológica (Matthews 1992). Es una técnica altamente sensible mediante ella se pueden detectar hasta 0.5 ng de proteína viral, y a la vez posee mayor especificidad que otras técnicas serológicas. Además, permite cuantificar proteínas si se utilizan marcadores cuantificados (Brunt *et al.* 1994).

Para la electroforesis primero se debe desnaturalizar por completo las proteínas de cubierta viral que se encuentren en la savia de plantas infectadas o en purificaciones (Brunt *et al.* 1994), luego fraccionarlas en una electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS PAGE), seguido de una transferencia electroforética de las bandas de proteína del gel a un papel activado (usualmente nitrocelulosa). Se bloquean con proteína los espacios libres del papel (frecuentemente se utiliza albúmina), y por último, se realiza la detección del complejo antígeno-anticuerpo utilizando anticuerpos conjugados con enzimas y sustratos precipitables (Matthews 1992).

Metodología

Capacitación

El proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio del Programa de Caracterización de Virus, Viroides y Fitoplasmas en Cultivos de Importancia Económica y Alimentaria (PCDV) del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), de la Universidad de Costa Rica (UCR).

Se recibió una capacitación teórico-práctica sobre conceptos de fitopatología, específicamente, virología vegetal. Se realizó un reconocimiento visual de la sintomatología que comúnmente se presenta en diferentes cultivos con infecciones virales. Además, se recibió un entrenamiento para desarrollar destrezas en la técnica inmunoenzimática más usada para el diagnóstico de virus en plantas, ELISA (tanto el DAS-ELISA como el ELISA-indirecto).

Toma de la muestra para la detección de potyvirus

Se tomaron en cuenta plantas de orquídeas detectadas positivas para este género viral de investigaciones anteriores. Con la finalidad de obtener un número mayor de ejemplares de estos géneros y especies, se recurrió al registro de especies del vivero de interés, en el cual aparecen todas las plantas que posee con su identificación taxonómica, su ubicación dentro del vivero, procedencia, numeración, y otros aspectos considerados como importantes.

Luego se hizo un reconocimiento físico de las plantas y se observaron con detenimiento para detectar alguna sintomatología. Las plantas

seleccionadas para el estudio se etiquetaron y enumeraron según su ubicación y área en el vivero (áreas 03 y 04) (apéndice 1); se describió visualmente cada planta y se inscribió en el registro del estudio (anexo 1).

Se realizó un registro fotográfico digital (Figs. 2, 3, 4 y 5) utilizando una cámara digital Sony Mavica, de algunos de los síntomas que se presentaron con mayor frecuencia (cuadro 3 y apéndice 1).

En total, se recolectaron y evaluaron muestras de 33 plantas de orquídeas pertenecientes a nueve géneros (cuadro 1). Todas las muestras se evaluaron para potyvirus. Dentro de las 33 muestras, tres habían sido evaluadas previamente y detectado positivas para potyvirus (PCDV A2: 03-003, 03-013 y 03-025) (apéndice 1).

Cuadro 1. Cantidad de muestras de orquídea por género evaluadas para potyvirus.

Género	Cantidad de muestras
<i>Amparoa</i>	01
<i>Ellanthus</i>	02
<i>Encyclia</i>	03
<i>Maxillaria</i>	11
<i>Mesospinidium</i>	03
<i>Octomeria</i>	02
<i>Prescottia</i>	02
<i>Scaphyglottis</i>	04
<i>Trichosalpinx</i>	05

Fuente: Datos de campo.

Para las muestras se tomaron hojas de cada planta, se colocaron en bolsas plásticas etiquetadas con el nombre del género (en algunas ocasiones

las especies) y se enumeraron según el PCDV y se transportaron al laboratorio para ser analizadas por ELISA para potyvirus.

Posteriormente todas las muestras que fueron positivas para potyvirus (PDCV-A2: 03-001, 03-008, 03-018, 03-026 y 04-003), se evaluaron mediante la técnica de ELISA para las especies BYMV, BCMV y TuMV.

Pruebas serológicas aplicadas en la detección de potyvirus específicamente las especies BYMV, BCMV y TuMV

Detección de potyvirus

Para la detección de potyvirus en las muestras recolectadas se realizaron pruebas de ELISA indirecto siguiendo el protocolo proporcionado por Agdia Inc., Indiana USA, como se describe a continuación.

Se utilizaron placas de fondo plano tipo Immunolon 2B (Dynex Technologies, Estados Unidos). Las muestras, los controles positivos (inóculo de PVY mantenido en *Nicotiana tabacum* en invernadero del CIBCM) y negativos (CymMV, Agdia Inc.), se colocaron por duplicado aplicando 100 µl por pozo siguiendo el diagrama de montaje respectivo. Las muestras fueron previamente maceradas usando la solución de extracción para pruebas indirectas con 1% de sulfito de sodio, como antioxidante, en una dilución de 1:10 (p/v). Se cubrió la placa con una tapa durante toda la noche en una cámara húmeda a 4° C.

Una vez terminado el tiempo de incubación, se lavó la placa tres veces en intervalos de tres minutos. Para los lavados se utilizó 1X de solución amortiguadora de fosfato sodio-potasio (0.01M, pH 7.4) conteniendo 0.05% de

polyoxietileno sorbitan monolaurato (Tween 20[®]) (PBST) (anexo 2). Después se envolvió en una toalla de papel, se volteó y golpeó varias veces para asegurar que no quedaran residuos líquidos.

Una de las modificaciones que se hizo fue incorporar un paso más a la prueba. Se llevó a cabo un “post-coating”, para así recubrir más las paredes de los pozos y evitar el “back ground” que pudieran llevar a falsos positivos en los resultados. Se utilizó solución amortiguadora de carbonato de sodio 0.01 M, pH 9.6, con 5% de proteína, en éste caso leche descremada. Se recubrió cada pozo con 100 µl de dicha dilución y se dejó incubando por una hora a 37° C. Pasado este tiempo se lavó y eliminó el exceso de líquido a la placa de la misma manera como se describió anteriormente.

Se preparó la dilución 1:200 (v/v) del anticuerpo anti-potyvirus (CAB 27 200) en la solución amortiguadora correspondiente (amortiguador ECI, pH 7.4) más un 2% de proteína extra (leche descremada deshidratada). Cada pozo donde se habían aplicado las muestras y los controles, se recubrieron con 100 µl de la dilución. La placa se tapó y dejó incubando en cámara húmeda por dos horas a 37°C.

Después se realizaron tres lavados más con la solución 1X PBST, se eliminó el exceso de líquido de la misma manera explicada anteriormente. Se recubrió cada pozo con 100 µl de la dilución 1:200 (v/v) del anticuerpo de conejo anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina (ECA 27 200), en la misma solución amortiguadora usada en el paso anterior y el 2% de proteína extra (leche descremada deshidratada), se incubó por dos horas a 37° C.

Se lavó y eliminó el exceso de líquido en la placa para luego recubrirla con 100 µl por pozo con la solución del sustrato. Se utilizó como sustrato y

blanco p-nitrofenil fosfato (PNP) a una concentración de 1mg/ml en la solución amortiguadora sustrato (dietanolamina 1M, pH 9.8).

Se utilizó el lector de placas MRX de Dynex Technologies para medir la absorbancia a 405 nm durante el desarrollo de la reacción (30, 60, 120 minutos después de colocado el sustrato).

Para cada muestra se calculó el promedio (\bar{X}) de los valores obtenidos en las diferentes lecturas; para los controles negativos, además de la media se calculó la desviación estándar (SD). Se consideraron como muestras positivas, todas aquellas cuyo valor de absorbancia a 405 nm fue mayor o igual a la media de la absorbancia de los controles negativos más tres desviaciones estándar ($\bar{X} + 3s$).

Detección del *Bean common mosaic potyvirus*

Para la detección del *Bean common mosaic potyvirus* (BCMV), se siguió el protocolo para ELISA indirecto suministrado por Agdia Inc. (descrito anteriormente) utilizando específicamente el anticuerpo anti-BCMV (1:200 v/v, Cab 46000) y el anticuerpo anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina producido en conejo (1:200 v/v, ECA 46000). Las muestras y los controles positivos (BCMV, Agdia Inc.) y negativos (CymMV, Agdia Inc.) se colocaron por duplicado.

Detección del *Turnip mosaic potyvirus* y *Bean yellow mosaic potyvirus*

Para la detección del *Turnip mosaic potyvirus* (TuMV) y el *Bean yellow mosaic potyvirus* (BYMV), se utilizó la técnica DAS ELISA suministrada por las casas comerciales Agdia Inc. y Bio-Rad Laboratories respectivamente y descritas a continuación.

Para estas pruebas se emplearon placas y tiras con pozos tipo Immunolon 1B (Dyner Technologies, Estados Unidos), éstas fueron recubiertas con 100 µl del anticuerpo anti-TuMV (CAB 18700) ó anti-BYMV, según fue el caso, diluido a 1:200 y 1:250 (v/v) respectivamente, en una solución amortiguadora de carbonato de sodio 0.01 M, pH 9.6. La placa se cubrió con una tapa o cinta adhesiva y se colocó en una cámara húmeda, se incubó durante toda la noche a 4 °C.

Al día siguiente se realizaron cuatro lavados de 3 minutos cada uno con 1X de solución amortiguadora de fosfato sodio-potasio (0.01 M, pH 7.4) conteniendo 0.05% de polyoxietileno sorbitan monolaurato (Tween 20) (PBST).

La placa se volteó varias veces envuelta en una toalla de papel, se golpeó suavemente para eliminar los excesos de líquido. Una vez lista se realizó un “post-coating” donde se utilizó solución amortiguadora de carbonato de sodio 0.01 M, pH 9.6, con 2% de proteína (leche descremada deshidratada). Se recubrió cada pozo con 100 µl de dicha dilución y se dejó incubando por dos horas a 37° C. Pasado este tiempo se lavó y eliminó el exceso de líquido a la placa de la misma manera como fue descrito anteriormente.

Posteriormente se colocaron 100 µl de cada una de las muestras a valorar, controles positivos (TuMV, Agdia Inc. y BYMV, Bio-Rad, según sea el caso) y negativos (CymMV, Agdia Inc.) por duplicado, siguiendo el respectivo diagrama de montaje. La placa se incubó por toda la noche a 4 °C en cámara húmeda.

Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron cuatro lavados (3 minutos cada uno) con 1X PBST, se eliminó el exceso de líquido y los pozos se recubrieron con 100 µl del conjugado anti-TuMV (ECA 18700) o anti-BYMV fosfatasa alcalina, diluido a 1:200 y 1:250 (v/v) respectivamente, en solución

amortiguadora para dilución del anticuerpo (amortiguador ECI) y un 2% de proteína extra (leche descremada deshidratada). La placa se tapó e incubó por dos horas en la cámara húmeda a 37 °C.

Antes de colocar el sustrato para que se revelara la reacción, se lavó la placa como se indicó anteriormente. Como sustrato y blanco de la prueba se utilizó p-nitrofenil fosfato (PNP), a una concentración de 1 mg/ml en solución amortiguadora de dietanolamina 1M, pH 9.8, se adicionó 100 µl de la dilución por pozo. La absorbancia de la reacción se midió de la misma forma como se realizó en las pruebas anteriores, lo mismo con la selección de las muestras positivas.

Toma de la muestra para la detección de INSV

En las pruebas de ELISA para detectar *Impatiens necrotic spot tospovirus* (INSV), se utilizaron plantas que en investigaciones anteriores presentaron resultados negativos para los virus *Cymbidium mosaic potexvirus*, CymMV; *Odontoglossum ringspot tobamovirus*, ORSV; *Tobacco rattle virus*, TRV; *Cymbidium ringspot potexvirus*, CymRSV; *Tomato spotted wilt tospovirus*, TSWV; *Cucumber mosaic cucumovirus*, CMV y el género *Potyvirus*. Se utilizó el registro de plantas del vivero de interés para ubicarlas y luego reconocerlas físicamente. Se observó cada planta con detenimiento con el fin de detectar alguna sintomatología. Se etiquetaron y enumeraron según ubicación y área en el vivero (áreas 03, 04, 05 y 06) (apéndice 2), se describió visualmente cada planta y se inscribió en el registro del estudio (anexo 1).

Se realizó un registro fotográfico digital (fig. 11) utilizando una cámara digital Sony Mavica, de algunos de los síntomas que se presentaron con mayor frecuencia (cuadro 5 y apéndice 2).

Se evaluaron 31 muestras de plantas de orquídeas, alrededor de 16 géneros (cuadro 2). Se colocaron en bolsas plásticas etiquetadas con el género y la especie, se enumeraron según el código designado por el PCDV. Luego fueron trasladadas al laboratorio para su posterior análisis por ELISA.

Cuadro 2. Cantidad de muestras de orquídea por género evaluadas para INSV.

Género	Cantidad de plantas
<i>Chondrorhyncha</i>	1
<i>Dracula</i>	1
<i>Encyclia</i>	1
<i>Epidendrum</i>	2
<i>Kefersteinia</i>	2
<i>Masdevallia</i>	3
<i>Maxillaria</i>	2
<i>Myoxanthus</i>	1
<i>Nidema</i>	1
<i>Notylia</i>	1
<i>Oncidium</i>	1
<i>Pleurothallis</i>	7
<i>Restrepia</i>	2
<i>Scaphyglottis</i>	1
<i>Stelis</i>	3
<i>Zootrophium</i>	2

Fuente: Datos de campo.

Pruebas serológicas utilizadas en la detección del tospovirus *Impatiens necrotic spot virus*

Para la detección del *Impatiens necrotic spot tospovirus* (INSV), se siguió el protocolo para DAS-ELISA suministrado por Agdia Inc. (descrito anteriormente) pero utilizando específicamente el anticuerpo anti-INSV (1:200 v/v, Cab 20500) y el conjugado anti-INSV con fosfatasa alcalina (1:200 v/v, ECA 20500). Tanto las muestras como los controles positivos (lote C402) y negativos (CymMV, Agdia Inc.), se colocaron por duplicado en placas con pozos tipo Immunolon 1B (Dynex Technologies).

Electroforesis en geles de poliacrilamida para proteínas (SDS-PAGE)

Los geles se prepararon con el protocolo descrito en el anexo 3. Las muestras, previamente maceradas en Tris-HCl 50mM y 0.5% de mercaptoetanol y los controles positivos de BCMV, TuMV (Agdia Inc.); BYMV (Bio-Rad), y de potyvirus (lote C780) y el control negativo CymMV (Agdia Inc.), se prepararon en solución amortiguadora para muestras de proteínas 4X (anexo 3) a una relación de 3:1 (v/v). Cada gel se cargó con 27 ul de cada muestra y sus respectivos controles.

Además, se utilizaron 5 ul del marcador de bajo peso molecular SDS-7, Sigma (Sigma-Aldrich, Inc.), con ámbito de 14,000 a 70,000 Daltons que contiene las proteínas: albúmina bovina (66,000), albúmina de huevo (45,000), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (36,000), anhidrasa carbónica (29,000), tripsinógeno (24,000), inhibidor de tripsina de soya (20,100) y lactoalbúmina (14,200).

Para cada prueba se montaron dos geles SDS PAGE 15% de acrilamida, se corrieron a 100 v y 80 mA, por dos horas.

Trascurrido el tiempo de corrida, uno de los geles se dejó tiñiendo con azul de Coomasie (anexo 3), a temperatura ambiente, luego se decoloró utilizando la solución decolorante para azul de Coomassie hasta que el gel aclarara lo suficiente para observar las bandas con buen contraste.

Ensayo inmunoespecífico de blot electrotransferido “western blot”

El otro gel se electrotransfirió a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif.), a 20V, 20 mA, durante toda la noche en solución amortiguadora para transferencia (anexo 4). Terminado este proceso se tomó la nitrocelulosa y se cortó para separar el carril que correspondía a los

marcadores de peso molecular, de los carriles de las muestras y sus controles. El trozo de nitrocelulosa que contenía el carril correspondiente a los marcadores se tiñó con amidoblack 1% y luego se decoloró con agua destilada.

Al otro trozo se le aplicó una prueba serológica con los anticuerpos específicos según correspondiera. Primero se dejó bloqueando por dos horas con 1X PBST con 5% de leche deshidratada (solución blasa). Se utilizaron como primeros anticuerpos el anti-BCMV (1:200 v/v, CAB 46000, Agdia Inc.), anti-TuMV (1:200 v/v, CAB 18700, Agdia Inc.) ó BYMV (1:250 v/v, Bio-Rad), dependiendo del virus que se fuera detectar.

Como segundo anticuerpo, se empleó el anticuerpo anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina producido en conejo (1:200 v/v, ECA 46000) en el caso del BCMV y el anticuerpo anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (1:2500 v/v, Sigma – Chemical Co., St. Louis, MO) para el TuMV y BYMV. Luego la membrana se lavó dos veces en intervalos de diez minutos con solución blasa, dos veces con solución amortiguadora de fosfato sodio-potasio con 0.05% de polyoxietileno sorbitan monolaurato (PBST) y un último lavado con la solución para sustrato de dietanolamina.

Para el revelado de la transferencia se emplearon como sustrato nitro blue tetrazolium (NBT), bromo-chloro-indolyl fosfato (BCIP) y cloruro de magnesio ($MgCl_2$), en amortiguador sustrato. La solución fue preparada minutos antes y protegida de la luz durante todo el proceso. La membrana se sumergió en ésta solución hasta que se visualizara cierta coloración para después pasarla a una solución detenedora de dicha reacción (anexo 4).

Resultados

Detección de potyvirus

Las 33 plantas de orquídea evaluadas para detectar potyvirus, correspondieron a nueve géneros (cuadro 1). De las 33 plantas, 29 presentaron síntomas de posible etiología viral (apéndice 1). El síntoma foliar observado con mayor frecuencia fue el moteado (Fig. 2) y el estriado fue el menos frecuente (cuadro 3). También se observaron plantas con bandeados (Fig. 3), clorosis y amarillamiento (Fig 4). En algunos casos se presentaron deformaciones, correspondiendo principalmente a un acucharamiento de la lámina foliar (Fig. 3B); no se observó pérdida del tejido de la lámina ni ningún otro tipo de malformación.

Cuadro 3. Síntomas foliares más comunes mostrados por plantas evaluadas para determinar la presencia de potyvirus.

Síntoma	Cantidad de plantas
Amarillamiento	4
Bandeado clorótico	5
Clorosis	4
Deformación	5
Estriado	1
Moteado	9

Fuente: Datos de campo.

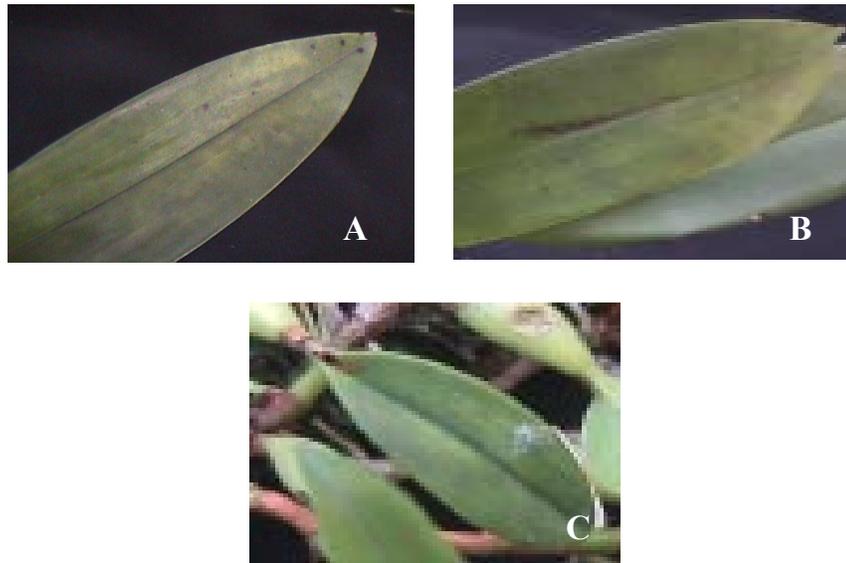


Figura 2. Moteado clorótico presente en plantas de *Mesospinidium warszewiczii* (A), *Maxillaria criptobulbom* (B) y *Encyclia pigmeae* (C).

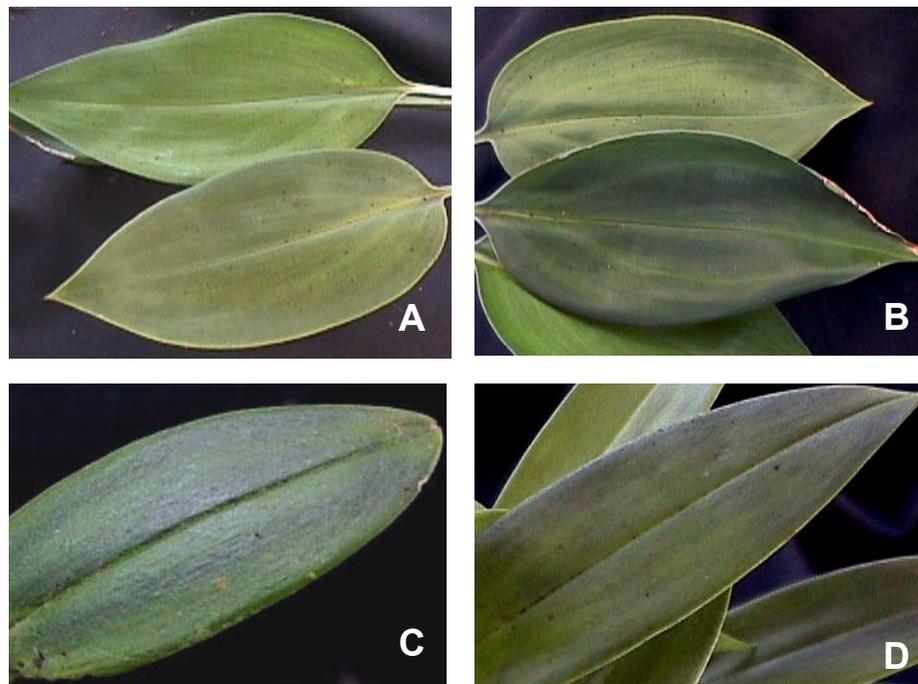


Figura 3. Bandeados observados en algunas muestras evaluadas mediante la técnica de ELISA para la detección de potyvirus. A y B. Bandeados cloróticos y aclaramiento de venas en *Prescottia stachyodes*. B. Deformación foliar (acucharamiento) en *P. stachyodes*. C. Bandedo clorótico entre las venas y en el margen de las hojas de *Encyclia pigmeae*. D. Bandedo clorótico en hojas de *Maxillaria ramonensis*.

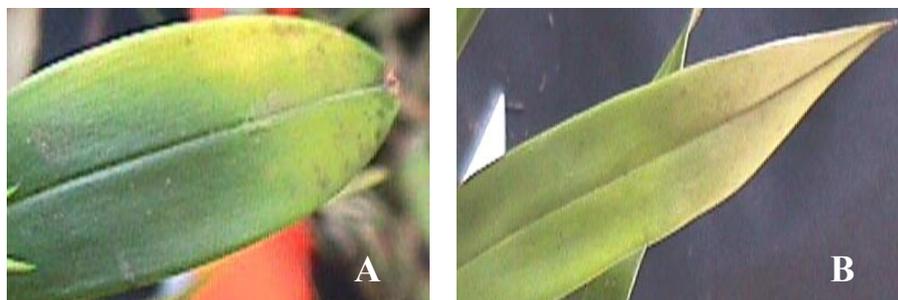


Figura 4. Amarillamiento severo en la región apical y márgenes de la hoja.
 A. *Encyclia pigmeae*, B. *Maxillaria ramonensis*.

De las 33 muestras evaluadas con el anticuerpo general para la detección de potyvirus, solamente cinco muestras presentaron resultados positivos según el análisis estadístico aplicado (Fig. 6). De estas plantas positivas para este género viral, cuatro presentaron síntomas de posible etiología viral (PCDV-A2: 03-001, 03-008, 03-018 y 03-026, apéndice 1), una además presentó zonas de necrosis con aparente infección por hongo (PCDV: A2-03-001, Fig. 5), y la quinta no mostró síntomas (PCDV: A2-04-003).

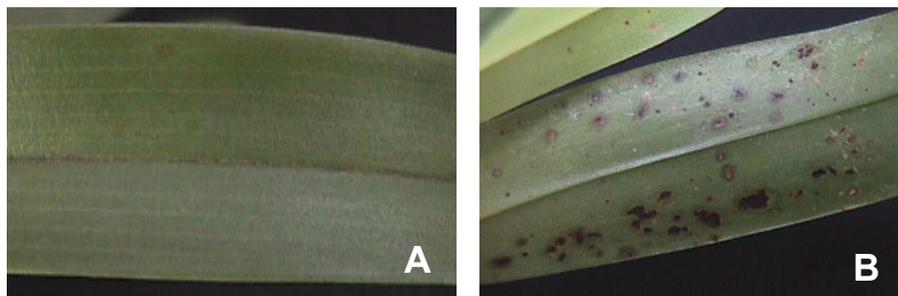


Figura 5. Síntomas foliares presentes en una planta de *Maxillaria sp.*
 A. Líneas cloróticas en toda la hoja.
 B. Zonas necróticas con apariencia a infección fungosa.

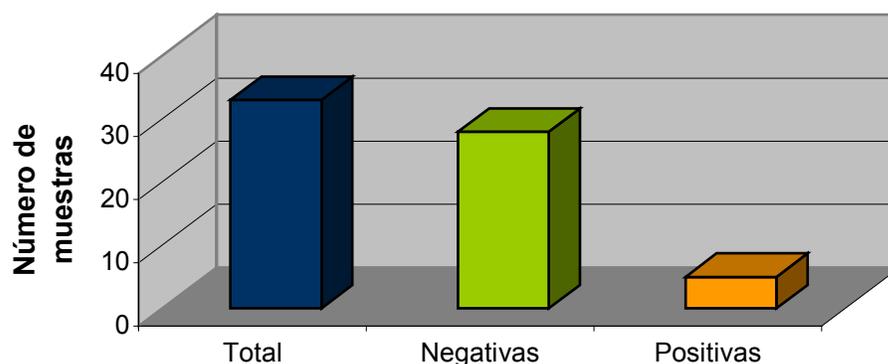


Figura 6. Muestras positivas y negativas para potyvirus de las 33 orquídeas nativas evaluadas

Al evaluar las cinco muestras positivas para cada una de las especies de potyvirus elegidas para esta práctica, se determinó que tres muestras fueron positivas para el BCMV, una para el BYMV y otra para el TuMV (Fig. 7). Esta última correspondió a una infección mixta con el BCMV (cuadro 4). Una de las plantas no presentó reacción con ninguno de los tres anticuerpos empleados.

Cuadro 4. Determinación de tres especies de potyvirus en muestras positivas para este género viral.

Especie	Código PDCV-A2-	Especie viral		
		BCMV	BYMV	TuMV
<i>Ellanthus caricoides</i>	03-018	-	-	-
<i>Encyclia pigmeae</i>	03-026	+	-	-
<i>Maxillaria</i> sp 1	03-001	+	-	+
<i>Maxillaria</i> sp. 2	04-003	-	+	-
<i>Mesospinidium warszewiczii</i>	03-008	+	-	-

+: Positivo, -: Negativo

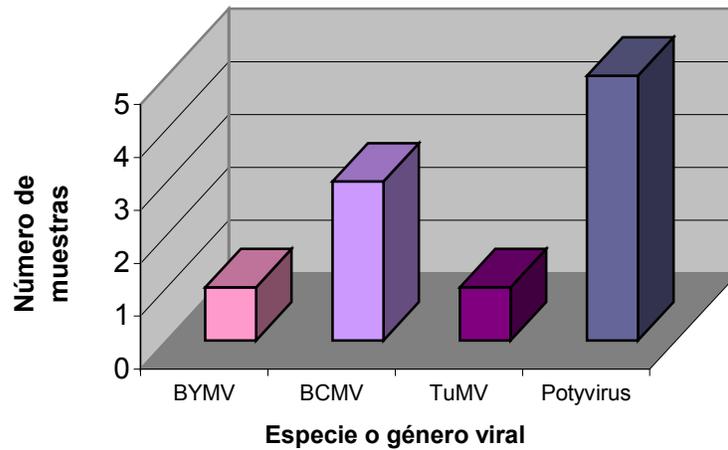


Figura 7: Total de muestras positivas para cada una de las especies evaluadas del género *Potyvirus*

Comprobación mediante “western blot “

El gel de poliacrilamida para el virus BCMV, evidenció tres bandas en los carriles correspondientes a las muestras PCDV: A2- 03-001, 03-026 (M1 y M3 respectivamente) y dos bandas en el carril correspondiente a la muestra PCDV- A2-03-008 (M2), las cuales previamente habían sido positivas mediante la prueba de ELISA para este virus. En el carril correspondiente al control positivo de BCMV (C+1, Fig. 8A) no se observaron bandas discretas en la zona en que debería bandear la proteína de cápside. En el carril correspondiente al control positivo de potyvirus (Agdia Inc., C+2) se observó una banda que no parece corresponder a la banda esperada para la proteína de cápside de potyvirus.

Por otro lado el "western blot" realizado al mismo virus, evidenció dos bandas en el carril correspondiente a la muestra PCDV: A2- 03-008. Éstas poseían pesos moleculares de aproximadamente 37 kDa y 38.7 kDa. El control positivo de BCMV (C+1, Agdia Inc.) fue reconocido fuertemente por el

anticuerpo específico para el BCMV. En el carril correspondiente a éste se observan dos bandas de 34 y 38 kDa (C+1, Fig. 8B).

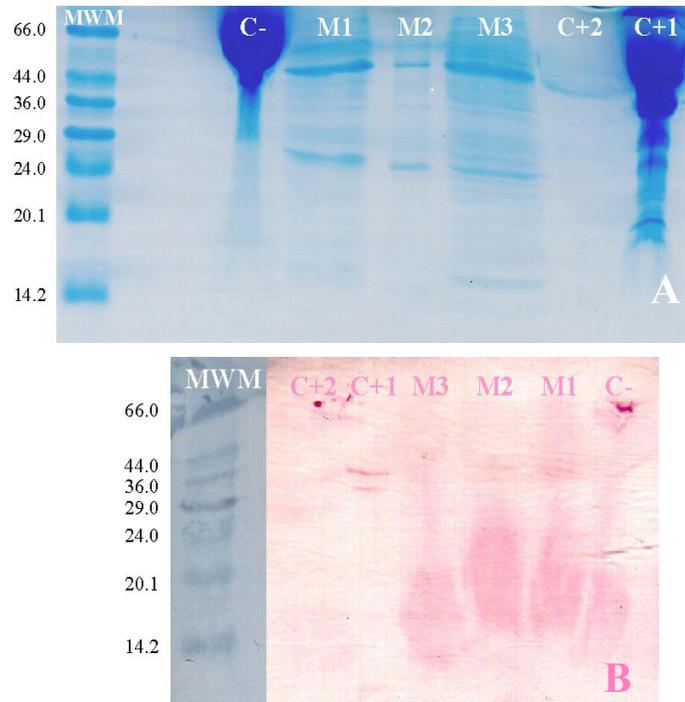


Figura 8. A. Gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomasie. B. Transferencia a papel de nitrocelulosa del gel par al mostrado en A y revelado con anticuerpo específico para el virus BCMV. MWM= marcadores de peso molecular kDa, C- = control negativo, M1= muestra 1, M2= muestra 2, M3= muestra 3, C+1 = control positivo BCMV, C+2 = control positivo potyvirus.

En el gel de poliacrilamida para el virus TuMV con la muestra que previamente había sido positiva mediante la prueba de ELISA para este virus (PDCV: A2-03-001), se evidenciaron tres bandas en el carril de la muestra (Fig. 9A). Además, en el carril que corresponde al control positivo de TuMV, se observaron varias bandas sin un contraste adecuado con el que se pueda determinar la cantidad exacta debido a que la solución de extracción general

utilizada para disolver los controles tanto positivos como negativos contenía compuestos salinos que interfirieron en la corrida del gel.

En el "western blot" para el virus TuMV, la muestra fue reconocida fuertemente por el anticuerpo específico para el TuMV, se evidenció una banda en el carril correspondiente de 43.2 kDa (Fig 9B). También el control positivo de TuMV (Agdia Inc, C+, Fig. 9B) fue reconocido por el mismo anticuerpo, observándose una banda con un peso molecular de 32.3 kDa.

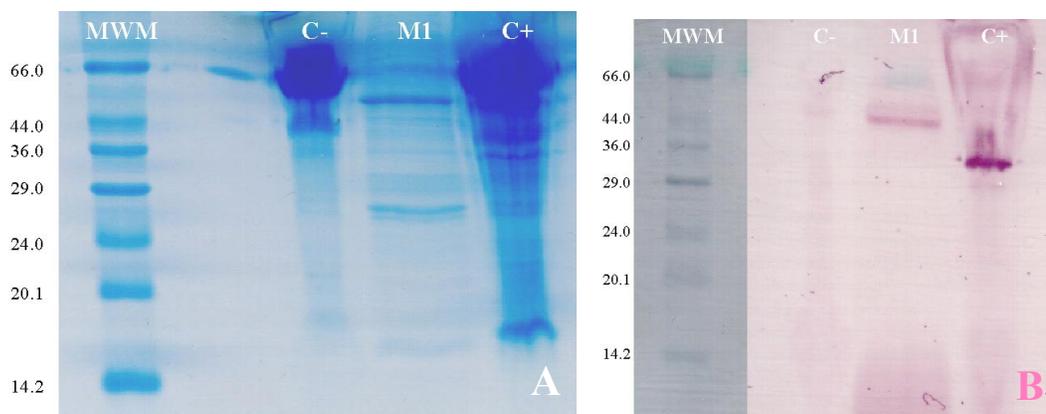


Figura 9. A. Gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomassie. B. Transferencia a papel de nitrocelulosa del gel par al mostrado en A y revelado con anticuerpo específico para el virus TuMV. MWM= marcadores de peso molecular kDa, C- = control negativo, M1= muestra 1, C+ = control positivo TuMV.

En el gel de poliacrilamida para el virus BYMV, se evidenció dos bandas en la muestra que previamente se determinó positiva mediante la prueba de ELISA para este virus (PDCV:A2-04-003, Fig. 10A). Además, en los carriles correspondientes a los controles, tanto positivo como negativo, no se detalló la presencia o ausencia de bandas correspondientes a las proteínas debido a que éstos fueron disueltos en solución de extracción general para ELISA impidiendo una adecuada resolución en caso de que las bandas estén presentes.

El "western blot" para el virus BYMV, no evidenció bandas en el carril correspondiente a la muestra. En el carril que correspondió al control positivo de BYMV (C+, Fig. 10B) se observó que éste fue reconocido por el anticuerpo específico para el virus, la banda posee un peso molecular de 34 kDa.

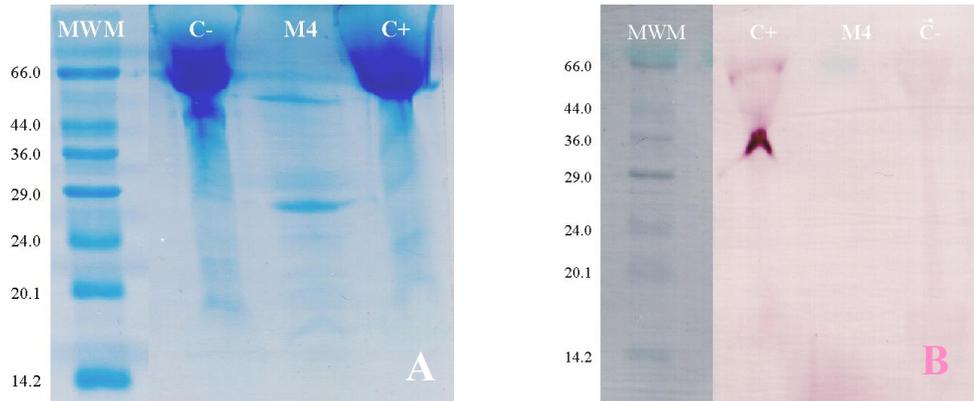


Figura 10. A. Gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomassie. B. Transferencia a papel de nitrocelulosa del gel par al mostrado en A y revelado con anticuerpo específico para el virus BYMV. MWM= marcadores de peso molecular kDa, C- = control negativo, M4= muestra 04-003, C+ = control positivo BYMV.

Detección del *Impatiens necrotic spot tospovirus*

De la evaluación realizada por Chacón (2002), un grupo considerable de plantas con posible etiología viral y negativos para los virus investigados por él, se incluyeron en este estudio para evaluarse la presencia del INSV. En total 31 plantas de orquídeas nativas, que correspondían a 16 géneros se evaluaron para el virus INSV (apéndice 2). Los síntomas foliares observados con mayor frecuencia fueron clorosis y amarillamiento (Fig. 11C). Los anillos rojos, bandeados cloróticos y necrosis fueron los menos frecuentes (cuadro 5). También se observaron plantas con aclarado de venas, moteados (Fig. 11B, 11D), estriados, que en algunas hojas eran severos, y deformaciones (no se observó pérdida del tejido de la lámina foliar).



Figura 11. Síntomas más comunes observados en las plantas de orquídeas evaluadas para la detección del virus INSV.

- A. Estriados severos presentes en *Epidendrum lacustre*.
- B. Aclarado de venas en *Pleurothallis rowleei*.
- C. Amarillamiento en hojas de *Kefersteinia parvilabris*.
- D. Moteado generalizados en hojas de *Pleurothallis fulgens*.

Cuadro 5. Frecuencia de síntomas foliares presentes en las plantas evaluadas para determinar la presencia del *Impatiens necrotic spot tospovirus* (INSV).

Síntoma	Cantidad de plantas
Aclarado de venas	05
Amarillamiento	09
Anillos rojizos	01
Bandeado clorótico	02
Clorosis	10
Deformación	03
Estriado	04
Moteado	08
Necrosis	02

Fuente: Datos de campo.

De las 31 muestras evaluadas con el anticuerpo específico para la detección del *Impatiens necrotic spot tospovirus*, trece muestras presentaron resultados positivos de acuerdo con el análisis estadístico aplicado (Fig. 12).

De las plantas positivas para este género viral, diez presentaron síntomas de posible etiología viral (PCDV-A2: 03-032, 03-38, 03-041, 03-042, 03-043, 03-044, 03-045, 03-049, 03-056 y 05-002, apéndice 2), una planta no mostró síntomas y otra presentó lesiones con apariencia de infección fungosa. Sin embargo, estos resultados no fueron consistentes en los dos análisis posteriores por lo que se consideraron resultados dudosos.

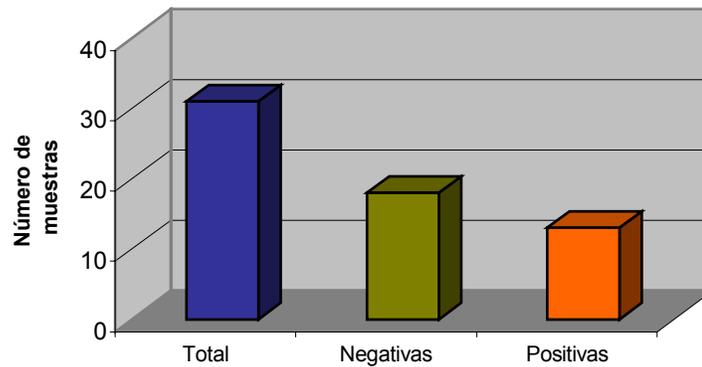


Figura 12. Muestras positivas y negativas para INSV de las 31 orquídeas nativas evaluadas

Discusión

Entre los síntomas más comunes presentes en plantas infectadas por virus se encuentran la clorosis, mosaicos, cambios de coloración, senescencia y deformación, tanto foliar como floral, lo cual también es válido en las infecciones causadas por potyvirus (Pearson *et al.* 1993, Gibbs *et al.* 2000).

Las plantas evaluadas presentaron algunos de los síntomas anteriormente mencionados lo cual contribuyó en la investigación, ya que brindó información que muchas se utiliza como dato inicial en las detecciones virales. En el caso de las evaluaciones para potyvirus, de las 33 plantas incluídas, la mayoría mostró síntomas de posible etiología viral sin embargo, sólo cinco plantas fueron positivas para potyvirus según la técnica de ELISA, de las cuales dos pertenecen al género *Maxillaria*.

Al evaluar las cinco plantas positivas para potyvirus con el fin de determinar si alguna de las tres especies virales BCMV, BYMV y TuMV, era la causante de las infecciones detectadas, se comprobó que las tres especies virales eran evidenciadas mediante la prueba de ELISA en cuatro de las muestras probadas. En tres de los casos se observó infección simple, dos con el BCMV y una con el BYMV. Una de las muestras presentó reacción mixta con BCMV y TuMV (cuadro 4). La quinta muestra (PCDV-A2-03-018) aunque presentó síntomas de posible origen viral y fue positiva para el género *Potyvirus* en este estudio, no se determinó por cual especie viral se encuentra infectada, por lo tanto, se considera positiva solamente para potyvirus, sin la identificación de la especie viral.

Las plantas con infección simple para BCMV (PCDV-A2: 03-008, 03-0026) mostraron síntomas de posible etiología viral, de igual manera la planta con infección mixta. La planta con infección simple de BYMV (PCDV-A2-04-

003), a diferencia de las otras plantas positivas para potyvirus, no mostró síntomas, sin embargo en orquídeas son frecuentes las infecciones virales asintomáticas (Zettler *et al.* 1990). Mackenzie *et al.* (1998), también comprobaron que algunas plantas infectadas por potyvirus muestran pocos o ningún síntoma, por lo tanto para llevar un mejor control fitosanitario es importante hacer evaluaciones mediante técnicas de diagnóstico confiables para detectar tempranamente infecciones virales.

Al realizar las pruebas de “western blot” para corroborar por otra técnica los hallazgos del ELISA, se encontraron resultados que indican posibles reacciones cruzadas.

En el caso de las tres muestras que fueron positivas para el BCMV, al realizarse el revelado de la membrana con el anticuerpo específico para este virus, sólo en un caso (PCDV-A2-03-008) se evidenciaron dos bandas con peso cercano a los 37 kDa y 38.7 kDa. De acuerdo con Hu *et al.* (1995) el *Dendrobium mosaic potyvirus*, raza del BCMV, en geles SDS PAGE muestra un peso molecular cercano a los 34 kDa.

Aunque la estimación del peso molecular de la proteína de cápside en este estudio presentó diferencias en la técnica con respecto al estudio informado por Hu *et al.* (1995), tales como las concentraciones de acrilamida empleadas en el gel espaciador y el separador, el porcentaje de cada uno (espaciador 75%, separador 25%), tiempo de corrida, y la forma en que se calculó el peso de cada una de las bandas observadas (Brunt *et al.* 1994), también existe la posibilidad de que en este caso se encontrara otra raza del BCMV y no necesariamente el *Dendrobium mosaic virus*. Este virus, de acuerdo con Hu *et al.* (1995) ha sido informado sólo en Hawaii y Japón. No se descarta la posibilidad de que el DeMV se encuentre en el país, ya que se conoce su existencia en Hawaii desde mitad del siglo pasado y es probable que

material contaminado haya sido desplazado alrededor del mundo, a causa del intercambio de material vegetal por coleccionistas y comerciantes.

En este estudio, al igual que en el realizado por Hu *et al.* (1995), se emplearon, como marcadores de peso molecular, el mismo tipo de proteínas. Es probable que en la presente investigación el tiempo de corrida fuera menor de lo requerido, ya que en los geles se observó poca separación entre las bandas del marcador molecular, lo cual pudo contribuir a las variaciones en los pesos calculados. El BCMV fue reconocido bien en los “western blot” evaluados con el anticuerpo específico de Agdia, en el carril correspondiente a este control positivo se observaron dos bandas de 33.5 y 38.4 kDa aproximadamente (C+1, Fig. 8B). De acuerdo con Brunt *et al.* (1994) la proteína de cápside del BCMV y la de BYMV, en geles de SDS PAGE, migran como dos bandas con pesos moleculares entre 32-34 kDa y 26-28 kDa respectivamente. En potyvirus una de las razones de la ocurrencia de múltiples bandas es la degradación parcial del polipéptido por enzimas proteolíticas provenientes del hospedero o del patógeno. La tendencia a la degradación de las proteínas virales varía dependiendo del virus y del hospedero del cual éstos fueron extraídos (Huttinga y Mosch 1974).

También se ha mencionado que en geles SDS PAGE, la presencia de dos o más bandas correspondientes a la cubierta proteica de los potyvirus se debe a la heterogeneidad presentada en este género viral (Brunt *et al.* 1994).

Con respecto a la muestra que presentó infección mixta de BCMV y TuMV en la prueba de ELISA (PCDV-A2-03-001), al evaluarla mediante la técnica de “western blot” para el BCMV, no se observó alguna banda que indicara reacción con el anticuerpo del BCMV. Por otro lado en el “western blot” para el virus TuMV, la muestra fue reconocida fuertemente por el anticuerpo específico de TuMV, evidenciándose una sola banda de aproximadamente 43.2

kDa (Fig. 10B), mientras que el control positivo de TuMV (Agdia Inc, C+, Fig. 10B) presentó una banda con un peso molecular de aproximadamente 32.3 kDa. Según Choi y Wakimoto (1979), el peso molecular de la proteína de cápside del TuMV en geles SDS PAGE, con 15% de acrilamida, es de aproximadamente 32 kDa, semejante al peso molecular calculado en este estudio para la proteína de cápside del control positivo de TuMV (32.3 kDa).

El TuMV se ha encontrado produciendo infecciones mixtas con otros virus, causando daños más severos que cualquier virus en infecciones simples (Stavolone *et al.* 1998). Además es relevante considerar la indicación presente en el catálogo de productos de Agdia (www.agdia.com), correspondiente a la prueba para BCMV, donde explica que dicha prueba puede además reaccionar con otras especies de potyvirus que se encuentren presentes, por lo que podría sospecharse que el resultado positivo obtenido en la prueba de ELISA puede deberse a reacción cruzada con otro potyvirus y no necesariamente a la detección del BCMV.

Los resultados obtenidos parecen indicar que la muestra PCDV-A2-03-001 podría encontrarse contaminada con algún otro potyvirus que pudo ser reconocido por el anticuerpo específico para el TuMV, y no precisamente sea éste, lo anterior se deduce debido a que en el carril de la muestra no se observó alguna banda a la altura de la banda presentada en el carril del control positivo, tampoco en el carril del control positivo se observó alguna banda de características similares a las evidenciadas en la muestra. La banda de la muestra parece corresponder a un tamaño mayor de las proteínas de inclusiones cilíndricas o a la proteína de cápside aún no fraccionada completamente de la poliproteína. Cabe mencionar, que esta muestra además de presentar síntomas de posible etiología viral, mostraba zonas necróticas de posible infección por hongo (Fig. 5), sin embargo esto no se comprobó.

En el "western blot" empleando el anticuerpo específico para BYMV, en el carril correspondiente a la planta que obtuvo resultado positivo para este virus por ELISA, no se visualizaron bandas, por lo que puede sugerirse que si existe una infección por potyvirus, el virus involucrado no corresponde al BYMV y lo que pudo haberse detectado fue otro potyvirus que presente reacción cruzada con este anticuerpo. Por el contrario, el control positivo si fue reconocido por este anticuerpo, la banda que se presentó posee un peso molecular de 34 kDa. Cabe mencionar que la proteína de la cápside de BYMV posee un peso molecular que corresponde a 31 kDa (Brunt *et al.* 1994).

Gibbs *et al.* (2000) informan que las pruebas serológicas con anticuerpos para potyvirus no determinan si es una o más especies las involucradas en infecciones por este género viral y solamente la evaluación de la secuenciación de éstos puede ayudar a determinar que tipo de potyvirus son los que se han identificado en estudios como el presente. Tal ha sido el caso de Australia donde a la fecha se han identificado 13 especies diferentes, aunque la mayoría de ellos aún no reconocidos por la ICTV, por lo tanto sería conveniente darle continuidad a este estudio para determinar la especie viral en las muestras positivas para el género *Potyvirus* mediante la secuenciación de los virus.

Es difícil saber cómo se inició la infección viral en el invernadero. Las plantas pudieron haber llegado a éste contaminadas, o bien que se contaminaran por contacto con otras plantas o manejo inadecuado de la colección. También pudo haber ocurrido transmisión debida a áfidos, los cuales son vectores de los potyvirus y tienen fácil ingreso al vivero, ya que éste no cuenta con malla antiáfidos. Los áfidos, bien pudieron iniciar la infección o transmitirla de plantas infectadas a plantas sanas dentro del vivero. Debe tomarse en cuenta que otro mecanismo de transmisión de estos virus es la inoculación mecánica, por lo tanto, al haber plantas infectadas en el vivero,

cabe la probabilidad de que en el momento de la división de las plantas para transplantarlas o en la corta de la flor, las herramientas utilizadas no se desinfectaran adecuadamente diseminando los virus por medio de la savia de las plantas enfermas.

Con respecto a la evaluación realizada para la detección del INSV mediante la prueba de ELISA, los resultados se consideraron no consistentes y dudosos debido a que al realizar la primera evaluación se obtuvieron algunos resultados positivos, pero al hacer las repeticiones para comprobarlos, éstos no fueron consistentes. El INSV, por ser un virus difícil de detectar y de manipular, el reconocimiento por el anticuerpo se hace cada vez más difícil cuando éste ha sufrido un proceso de congelación, por lo cual las muestras siempre debieron estar frescas, y así evitar que algunos compuestos oxidantes de la misma planta interfirieran. Cabe la posibilidad de que algún compuesto de las plantas, todavía no determinado, impidiera la detección del virus, debido a que cuando este se ha tratado de detectar en otras especies de plantas, sí se ha logrado.

Cabe aclarar que este grupo de plantas fue evaluado para el INSV como un trabajo extra al planteado originalmente en este estudio. Ya que no fue posible detectar plantas positivas, es recomendable que en la medida de lo posible se continúe evaluando este grupo de plantas para otros virus, pues la lista de virus informados en la literatura es bastante amplia. Existe el inconveniente de que para todos los virus informados, no existen a nivel comercial anticuerpos disponibles, por lo que podría plantearse el realizar minipurificaciones virales para determinar si hay partículas virales asociadas.

Por último, la sintomatología presente en las plantas que resultaron negativas para potyvirus e INSV, pudo deberse a la presencia de algún virus que no se haya detectado todavía, déficit nutritivo ó daños fisiológicos. Éstos últimos hacen a las plantas más vulnerables a infecciones de diverso origen,

como se observó en muchas de las plantas que además de presentar sintomatología por aparente infección viral, mostraban daños que podían deberse a infección por hongos que no se comprobó. Rivera (1998), menciona que cuando el balance de los factores ambientales y nutricionales se rompen por eventos naturales o la acción del hombre, comienzan a evidenciarse daños de origen biótico y abiótico, provocando la ruptura de la asociación entre la orquídea y otros organismos, quedando ésta expuesta a enemigos naturales y factores abióticos fuera de control.

Conclusiones

- Se comprobó la presencia tanto del BCMV como del TuMV en el vivero de interés por los dos métodos empleados.
- El BYMV sólo se detectó mediante la prueba de ELISA pero no pudo corroborarse por el método del “western blot”.
- Se requiere más información para determinar si lo detectado es otra raza del BCMV y no el DeMV.
- Una de las muestras en las que se detectó infección viral era asintomática lo que corroboró que las orquídeas pueden ser hospederos asintomáticos.

Recomendaciones

- Mantener un control fitosanitario tanto de las plantas presentes como de las que ingresen a los viveros.
- Evitar la diseminación, removiendo o separando plantas infectadas o con síntomas, desinfectando adecuadamente los instrumentos de corte, utilizando malla anti-áfidos en los viveros, entre otros.

Literatura citada

- Abdelnour, A. & A. Muñoz. 1997. Informe final: Rescate, establecimiento, multiplicación y conservación *in vitro* de germoplasma de orquídeas en vías de extinción. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 23p.
- Agdia. s.f. Agdia productos del catálogo (en línea). Consultado 20 nov. 2002. Disponible en: http://www.agdia.com/cgi_bin/catalog.cgi/46000, http://www.agdia.com/cgi_bin/catalog.cgi/46100, http://www.agdia.com/cgi_bin/catalog.cgi/27200, http://www.agdia.com/cgi_bin/catalog.cgi/18700
- Alpizar, K. 2001. Detección del "*Dasheen mosaic potyvirus*" (DsMV) en *Aglaonema* sp.; *Dieffenbachia* sp., y *Zantedeschia* sp.. mediante la técnica DAS-ELISA. Informe Final de Práctica de Especialidad para optar por el título de bachillerato en Ingeniería en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede Central Cartago. 57p.
- Arauz, L. 1998. Fitopatología: Un enfoque agroecológico. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 467p.
- Bos, L. 1970. Bean yellow mosaic virus. Commonwealth Mycological Institute/ Association of Applied Biologists (C.M.I./A.A.B.). Description of Plants Viruses. United Kingdom by Wm. Culross and Son Ltd., Coupar Angus, Perthshire, Scotland. No 40.
- Bos, L. 1971. Bean common mosaic virus. Commonwealth Mycological Institute/ Association of Applied Biologists (C.M.I./A.A.B.). Description of Plants Viruses. United Kingdom by Wm. Culross and Son Ltd., Coupar Angus, Perthshire, Scotland. No 73.
- Brunt, A., K. Cabtree; M. Dallwitz; A. Gibbs & L. Watson. 1996. Viruses of plants: Descriptions and list from the VIDE database. CAB INTERNATIONAL. Cambridge, Estados Unidos. 1484p.
- Brunt, A.; D. Shukla & C. Ward. 1994. The Potyviridae. CAB INTERNATIONAL. Cambridge, Estados Unidos. 516p.

- Chacón, G. 2002. Identificación de los virus que afectan orquídeas nativas en dos viveros del Valle Central de Costa Rica. Tesis sometida a la consideración de la Facultad de Ciencias, Escuela de Biología para optar por el grado de Licenciado en Biología. Universidad de Costa Rica, San José. 79p.
- Gámez, R, R. Moreno & L.C. González. 1970. El virus del mosaico común del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Costa Rica. Turrialba 20: 397-400.
- Gara, I., H. Kondo, T. Maeda, N. Inouye & T. Tamada. 1997. Stunt disease of *Habenaria radiata* caused by a strain of *Watermelon mosaic virus 2*. Phytopathology 63: 113-117.
- Gara, I. W., H. Kondo, T. Maeda, N. Inouye & T. Tamada. 1998. *Calanthe mild mosaic virus*, a new potyvirus causing a mild mosaic disease of *Calanthe* orchid in Japan. Phytopathology 146: 357-363.
- García, J. 1995. Orquídeas de Costa Rica y su cultivo. Asociación Costarricense de Orquideología (A.C.O.). San José, Costa Rica. 59p.
- García-Arenal, F & J.A. García. 1996. Estructura y expresión del genoma de los virus de plantas. *In*: Patología vegetal. Tomo I. Sociedad Española de Fitopatología. España. 695p.
- Gibbs, A.; A. Mackenzie, A. Blanchfield, P. Cross, C. Wilson, *et al.* 2000. Viruses of orchids in Australia; their identification, biology and control. The Australian Orchid Review, June/July: 10-21.
- Hu, J.S., S. Ferreira, M. Wang & M.Q. Xu. 1993. Detection of Cymbidium mosaic virus, Odontoglossum ringspot virus, Tomato spotted wilt virus, and potyviruses infecting orchids in Hawaii. Plant Disease 77: 464-468.
- Hu, J.S., S. Ferreira; M. Wang, W.B. Borth, G. Mink & R., Jordan. 1995. Purification, host range, serology and partial sequencing of *Dendrobium* mosaic potyvirus, a new member of the Bean common mosaic virus Subgroup. Phytopathology 85: 542-546.

Huttinga, H. & W.H.M. Mosch. 1974. Properties of viruses of the potyvirus group. 2. Bouyant density, S value, particle morphology, and molecular weight of the coat protein subunit of bean yellow mosaic virus, pea mosaic virus, lettuce mosaic virus and potato virus Y. *In*: Brunt, A; D. Shukla & C. Ward. 1994. The Potyviridae. CAB INTERNATIONAL. Cambridge, Estados Unidos. 516p.

Hsu, H.T, D. Vongsasitorn & R.H. Lawson. 1992. An improved method for serological detection of cymbidium mosaic potexvirus infection in orchids. *Phytopathology* 82: 491-495.

Infoagro. s.f. Principales virus en plantas ornamentales (en línea). Consultado 14 set. 2002. Disponible en:
http://www.infoagro.com/flores/plantas_ornamentales/virus_ornamentales.htm#4

Jordan, R. 1992. Potyviruses, monoclonal antibodies, and antigenic sites. *Arch. Virol.* 5: 81-95.

Kennedy, Day & Eastop. 1962. A conspectus of aphids as vectors of plant viruses. *In*: Bos, L. 1970. Bean yellow mosaic virus. Commonwealth Mycological Institute/Association of Applied Biologists (C.M.I./A.A.B.). Description of Plants Viruses. United Kingdom by Wm. Culross and Son Ltd., Coupar Angus, Perthshire, Scotland. No 40.

Kennedy, Day & Eastop. 1962. A conspectus of aphids as vectors of plant viruses. *In*: Tomlinson, J.A. 1970. Turnip mosaic virus. Commonwealth Mycological Institute/ Association of Applied Biologists (C.M.I./A.A.B.). Description of Plants Viruses. United Kingdom by Wm. Culross and Son Ltd., Coupar Angus, Perthshire, Scotland. No 8.

Lesemann, D.E. & R. Koenig. 1985. Identification of *Bean yellow mosaic virus* in *Masdevallia*. *Acta Hort (ISHS)* 164: 347-354. (en línea). Consultado 27 jun. 2002. Disponible en:
http://www.actahort.org/books/164/164_4.htm

- Lesemann, D.E. & H.J. Vetten. 1985. The Occurrence of Tobacco rattle and Turnip mosaic viruses in *Orchis* spp., and of an Unidentified Potyvirus in *Cypripedium calceolus*. Acta Hort (ISHS) 164: 45-54. (en línea). Consultado 26 jun. 2002. Disponible en: http://www.actahort.org/books/164/164_4.htm
- Mackenzie, A.M., M. Nolan, K.J. Wei, M.A. Clements, D. Gowanlock, B.J. Wallace & A.J. Gibbs. 1998. Ceratobium mosaic potyvirus: another virus from orchids. Arch Virol. 143: 903-914.
- Mandigan, M.T., J.M. Martinko & J. Parker. 1999. Biología de los microorganismos. Prentice Hall. Madrid, España. 1 064p.
- Matthews, R.E.F. 1992. Fundamentals of plant virology. Academic Press, Inc. Estados Unidos. 403p.
- Murakishi, H.R. 1952. Transmission of leaf mosaic associated with color break in the flowers of *Dendrobium superbum*. In: Hu *et al.* (Eds.). 1995. Purification, host range, serology and partial sequencing of *Dendrobium mosaic potyvirus*, a new member of the *Bean common mosaic virus* subgroup. Phytopathology. 5p.
- OEPP/EPPO. 1999. Data sheets on quarantine pests: *Impatiens necrotic spot tospovirus*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 29: 473-476.
- Orquídeas en el Alto Mayo y el mundo. s.f. (en línea). Consultado 03 set. 2002. Disponible en: <http://usuarios.lycos.es/mbba1/ORQUIDEAS.htm#>
- Pearson, M.N., G.V.H. Jackson, S.P. Pone & R.L.J. Howitt. 1993. *Vanilla* viruses in the South Pacific. Plant Pathology 42: 127-131.
- PROCOMER (Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica). Unión Europea: gran mercado para flores y follaje (en línea). Consultado 28 agosto 2002. Disponible en: http://www.procomer.com/publicaciones/enlace_mundial/julio_2001/index.cmf?queHace=loadPage&page=flores

- Pupulin, F. 2002. Catálogo revisado y anotado de las Orquídeas de Costa Rica. *Lankasteriana* 4: 1-88.
- Rivera, G. 1998. Orquídeas: Generalidades y cultivo. Editorial Fundación UNA. Heredia, Costa Rica. 266p.
- Roca, W. & L. Mroginski. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali, Colombia. 969p.
- Roggero P.; V. Lisa & E. Luisoni. 1995. I Fitovirus de genere Tospovirus (Bunyaviridae). *La Difesa delle Piante* 18: 163-187.
- Roggero P, G. Adam, R.G. Milna y V. Lisa. 1996. Purification and serology of virions of Impatiens necrotic spot tospovirus. *European Journal of Plant Pathology* 102: 563-568.
- Salinger, J. 1991. Producción comercial de flores. Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza, España. 371 p.
- Stavolone, L., D. Alioto, A. Ragozzino & J.F. Laliberté. 1998. Variability among turnip mosaic potyvirus isolates. *Phytopathology* 88: 1200-1204.
- Tomlinson, J.A. 1970. Turnip mosaic virus. Commonwealth Mycological Institute/ Association of Applied Biologists (C.M.I./A.A.B.). Description of Plants Viruses. United Kingdom by Wm. Culross and Son Ltd., Coupar Angus, Perthshire, Scotland. No 8.
- van Regenmortel, M.H.V., C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, *et al.* 2000. Virus taxonomy: Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press. San Diego, California, USA. 1162p.
- Zettler, F.W., N.J. Ko, G.C. Wisler, M.S. Elliot & S.M. Wong. 1990. Viruses of orchids and their control. *Plant Disease* 74:621-626.

APÉNDICES

APÉNDICE 1

Colección de orquídeas nativas de Costa Rica evaluadas para la identificación de potyvirus

Cuadro 1.1. Orquídeas nativas de Costa Rica con resultados positivos para potyvirus de investigaciones anteriores y evaluadas nuevamente.

Género (especie)	Código vivero	Código PCDV-A2-	Ubicación (Área)
<i>Amparoa costarricensis</i>	0022-1996-00 #00148	03- 017	03
<i>Ellanthus caricoides</i>	0429-1995-00 #01958	03- 018	03
	1771-0000-00 #0661	03- 019	03
<i>Encyclia pigmeae</i>	1157-0000-00 #00102	03- 025	03
	0234-1995-00 #00101	03- 026	03
	0042-1993-00 #00103	03- 027	03
<i>Maxillaria cryptobolbum</i>	1427-000-00 #01204	03- 004	03
	1426-000-00 #01192	03- 005	03
<i>Maxillaria ramonensis</i>	0119-1991-00 #01172	03- 003	03
	1856-000-00 #01973	03- 006	03
<i>Maxillaria</i> sp.	0208-1997-00 #1158	03- 001	03
<i>Maxillaria</i> sp.	0320-1995-00 #01206	03- 002	03
<i>Maxillaria</i> sp.	# 03362	04- 001	04
<i>Maxillaria</i> sp.	# 03363	04- 002	04
<i>Maxillaria</i> sp.	# 03376	04- 003	04
<i>Maxillaria</i> sp.	# 03393	04- 004	04
<i>Maxillaria</i> sp.	# 03413	04- 005	04
<i>Mesospinidium warszewiczii</i>	0052-1990-00 #01993	03- 007	03
	0053-1990-00 #02000	03- 008	03
	1850-0000-00 #01992	03- 009	03
<i>Octomeria valeroi</i>	1672-0000-00 #00580	03- 028	03
	1671-0000-00 #00566	03- 029	03

<i>Prescottia stachyodes</i>	0242-1998-00 #02035	03- 030	03
	Sin código	03- 031	03
<i>Scaphyglottis prolifera</i>	1127-0000-00 #0027	03- 020	03
	0027-1992-00 #00007	03- 022	03
	0059-1993-00 #00016	03- 023	03
	0058-1993-00 #00008	03- 024	03
<i>Trichosalpinx blaisdellie</i>	0036-0000-00 #0416	03- 012	03
	0039-0000-00 #00422	03- 013	03
	0034-0000-00 #0395	03- 014	03
	0025-0000-00 #00418	03- 015	03
	0038-0000-00 #00421	03- 016	03

Fuente: Datos de campo.

Cuadro 1.2. Síntomas de posible etiología viral presentados por algunas de las plantas evaluadas para determinar la posible infección por potyvirus.

Género (especie)	Código PDCV A2-	Síntomas
<i>Ellanthus caricoides</i>	03-018	Moteado clorótico en las hojas y estriados en las bases.
	03-019	Moteado clorótico en hojas.
<i>Encyclia pigmeae</i>	03-025	Moteado clorótico en hojas.
	03-026	Amarillamiento y bandeado en hojas.
<i>Maxillaria cryptobolbum</i>	03-004	Moteado y bandeado clorótico en el borde de la lámina de la hoja
<i>Maxillaria ramonensis</i>	03-006	Moteado, bandeado clorótico en las venas de las hojas.
<i>Maxillaria</i> sp.	03-001	Líneas cloróticas en las hojas.
<i>Maxillaria</i> sp.	04-001	Moteado leve en hojas jóvenes, venas saltadas en el haz de la hoja y clorosis en los bordes de las hojas.
<i>Maxillaria</i> sp.	04-005	Venas con coloración más clara.
<i>Mesospinidium warscewiczii</i>	03-007	Moteado, clorosis y malformación foliar.
	03-008	Moteado, malformación foliar (acucharamiento), puntos necróticos en bulbos.
	03-009	Moteado clorótico leve en hojas.
<i>Octomeria valeroi</i>	03-029	Bandeado leve en algunas hojas.
<i>Prescottia stachyodes</i>	03-030	Amarillamiento leve, clorosis y deformación foliar.
	03-031	Amarillamiento en algunas venas, clorosis entre venas, deformación foliar.
<i>Trichosalpinx blaisdellie</i>	03-012	Malformación foliar.
	03-014	Reducción tamaño.

Fuente: Datos de campo.

APÉNDICE 2

Colección de orquídeas nativas de Costa Rica evaluadas para la identificación del tospovirus *Impatiens necrotic spot virus* (INSV)

Cuadro 2.1. Orquídeas nativas de Costa Rica que en investigaciones anteriores presentaron resultados negativos para algunos virus y evaluadas nuevamente para INSV.

Género (especie)	Código proyecto anterior PCDV	Código nuevo PCDV A2-	Ubicación (Área)
<i>Chondrorhyncha lendyane</i>	03-059	03-048	03
<i>Dracula ripleyana</i>	03-028	03-037	03
<i>Encyclia baculus</i>	05-020	04-007	04
<i>Epidendrum lacustre</i>	04-017	06-001	06
<i>Epidendrum resectum</i>	03-006	03-033	03
<i>Kefersteinia parvilabris</i>	03-136	03-042	03
	Sin código	03-056	03
<i>Masdevallia chasei</i>	03-033	03-036	03
<i>Masdevallia reinchebachiana</i>	03-033	03-035	03
<i>Masdevallia rolfeana</i>	03-091	03-051	03
<i>Maxillaria bicallosa</i>	03-140	03-045	03
<i>Maxillaria cryptobulbon</i>	05-006	04-006	04
<i>Myoxanthus exasperatus</i>	03-041	03-038	03
<i>Nidema boothii</i>	03-012	03-034	03
<i>Notylia trisepala</i>	03-019	03-044	03
<i>Oncidium cheiroporum</i>	03-023	05-002	05
<i>Pleurothallis carpintera</i>	03-086	03-052	03
<i>Pleurothallis fulgens</i>	03-098	03-046	03
<i>Pleurothallis phyllocardia</i>	03-099	03-049	03
<i>Pleurothallis rowleei</i>	03-102	03-054	03
<i>Pleurothallis ruscifolia</i>	03-107	03-040	03
<i>Pleurothallis sclerophylla</i>	03-105	03-053	03
<i>Pleurothallis sp</i>	03-119	03-041	03
<i>Restrepia mucifera</i>	03-092	03-050	03
<i>Restrepiella ophioccephala</i>	03-045	03-039	03
<i>Scaphyglottis lindeniana</i>	03-007	03-032	03
<i>Stelis argentata</i>	03-130	03-043	03
<i>Stelis guatemalensis</i>	03-070	03-047	03
<i>Stelis sp.</i>	03-105	03-055	03
<i>Zootrophium endresianum</i>	03-040	05-001	05
<i>Zootrophium vulturiceps</i>	03-031	05-003	05

Fuente: Datos de campo.

Cuadro 2.2. Síntomas de posible etiología viral presentados por algunas de las plantas evaluadas para determinar la posible infección por *Impatiens necrotic spot tospovirus* (INSV).

Nombre especie	Código PCDV A2	Síntoma
<i>Scaphyglottis lindeniana</i>	03-032	Clorosis, aclaramiento intervenial.
<i>Chondrorhyncha lendyane</i>	03-048	Amarillamiento de la planta.
<i>Dracula ripleyana</i>	03-037	Malformación foliar.
<i>Encyclia baculus</i>	04-007	Estriados cloróticos y clorosis general en hojas.
<i>Epidendrum lacustre</i>	06-001	Amarillamiento y estriados severos en hojas.
<i>Kefersteinia parvilabris</i>	03-042	Reducción del tamaño y rizado de borde en hojas.
<i>Masdevallia chasei</i>	03-036	Clorosis y moteados cloróticos en hojas.
<i>Masdevallia rolfeana</i>	03-051	Necrosis en hojas.
<i>Maxillaria bicallosa</i>	03-045	Clorosis leve y estriados cloróticos.
<i>Maxillaria cryptobulbon</i>	04-006	Amarillamiento y clorosis en hojas.
<i>Myoxanthus exasperatus</i>	03-038	Moteado en hojas.
<i>Nidema boothii</i>	03-034	Moteado en hojas.
<i>Notylia trisejala</i>	03-044	Amarillamiento de planta.
<i>Oncidium cheiroporum</i>	05-002	Moteados en hojas.
<i>Pleurothallis carpintera</i>	03-052	Clorosis en hojas
<i>Pleurothallis fulgens</i>	03-046	Moteado generalizado en hojas.
<i>Pleurothallis phyllocardia</i>	03-049	Malformación foliar, necrosis y aclaramiento de venas.
<i>Pleurothallis rowleei</i>	03-054	Amarillamiento general en la planta, venas aclaradas y moteados en hojas.
<i>Pleurothallis sclerophylla</i>	03-053	Algunas hojas con clorosis general y otras con áreas cloróticas cerca de la vena central.
<i>Pleurothallis sp.</i>	03-041	Amarillamiento y cierta clorosis en hojas.
<i>Restrepia mucifera</i>	03-050	Hojas aclaradas con algunos anillos rojizos.
<i>Stelis argentata</i>	03-043	Amarillamiento en hojas, clorosis y ciertos bandeados cloróticos.
<i>Stelis guatemalensis</i>	03-047	Moteados en hojas.
<i>Stelis sp.</i>	03-055	Venas de hojas aclaradas.
<i>Zootrophium vulturiceps</i>	05-003	Clorosis y estriados cloróticos.

Fuente: Datos de campo

ANEXOS

ANEXO 1

EVALUACIÓN DE ORQUÍDEAS

Datos Generales:

Número de evaluación: ____

Fecha				
Colector				
Nombre de la compañía o vivero				
Localización geográfica				
# del vivero				
Linderos del vivero Norte Sur Este Oeste				
Características del vivero (tipo de malla, vidrio,etc)				
Código de planta # PCDV - A2				
Género (especie)				
Variedad				
Híbrido				
Descripción general Aspecto, Talla, Vigor, Estado fisiológico				
No total de plantas por variedad o híbrido				
Sanas				
Con síntomas virales				

Sintomatología:

HOJAS: Sistémicos (S), Lesión local (LL)				
Sistémicos: Mosaico (Ms), Moteado (Mt), Necrosis (N)				
Disminución de la lámina				
Malformación foliar				
Anillos: Concéntricos (RS), Cloróticos (cl), Necróticos (nc)				
Bandeados cloróticos (Bcl)				
Senescencia precoz (ST)				
Locales: Tamaño, Forma, Ubicación				
FLORES:				
Bulbos – Rizomas (B o R): Tipo de síntoma: Clorosis (Cl) Moteado (M) Necrosis (N) Anillos (RS)				
Malformación				
Disminución de Tamaño				
Presencia de vectores: Áfidos Ácaros Cicadelidos Cochinilla				
Observaciones:				
Material donado				
Procedencia				
Fecha de ingreso a vivero en UCR				

ANEXO 2

Soluciones amortiguadoras utilizadas en pruebas ELISA (Suministradas por la casa comercial AGDIA)

Solución Amortiguadora de Extracción General

Reactivo	Cantidad (g/L)
Sulfito de sodio (Na_2SO_3) anhidro	1.3
Poli Polivinilpirrolidona (PVP) MW 24– 40 000	20
Azida de sodio	0.2
Albú Albúmina de huevo en polvo (pollo) Grado II	2
Twe Tween 20	20

Disolver en 1000ml de PBST 1X. Ajustar el pH a 7.4. Almacenar a 4° C.

Solución Amortiguadora de Extracción General para ELISA- indirecto

Reactivo	Cantidad (g/L)
Carbonato de sodio (Na_2SO_3) anhidro	1.59
Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)	2.93
Azida de sodio	0.2
Polivinilpirrolidona (PVP) MW 24– 40 000	20

Disolver en 1000ml de agua destilada. Ajustar el pH a 9.6. Almacenar a 4° C. Adicionar Sulfito de sodio (Na_2SO_3) anhidro al 1% (modificación del PDCV-CIBCM).

Solución Amortiguadora de Recubrimiento (Amortiguador "Coating")

Reactivo	Cantidad (g/L)
Carbonato de sodio (Na_2CO_3) anhidro	1.59
Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)	2.93
Azida de sodio	0.2

Disolver en 1000 ml de agua destilada. Ajustar pH 9.6. Almacenar a 4° C.

Solución Amortiguadora de Lavado 1X (Amortiguador PBST 1X)

Reactivo	Cantidad (g/L)
Cloruro de sodio (NaCl)	8
Fosfato de sodio (Na ₂ PO ₄) dibásico anhidro	1.15
Fosfato de potasio (K ₂ PO ₄)	0.2
Cloruro de potasio (KCl)	0.2
Tween 20	0.5

Disolver en 1000 ml de agua destilada pH 7.4. Almacenar a temperatura ambiente.

Solución Amortiguadora de Dilución del Anticuerpo (Amortiguador ECI)

Reactivo	Cantidad (g/L)
Albúmina de suero bovino (BSA)	2
Polivinilpirrolidona (PVP) MW 24-40 000	20

Disolver en 1000 ml de PBST 1X. pH 7.4. Preparar antes de emplearse y no almacenar (modificación del PDCV-CIBCM)

Solución Amortiguadora PNP (Amortiguador Sustrato)

Reactivo	Cantidad
Azida de sodio	0.2 (g/L)
Dietanolamina (C ₄ H ₁₁ NO ₂)	97 ml

Disolver en 800 ml de agua destilada. pH: 9.8. Ajustar el volumen final con agua destilada. Almacenar a 4°C.

ANEXO 3

Geles de poliacrilamida (15%) para proteínas

EL gel se hace en dos partes, una de separación (parte inferior) y otra llamada gel espaciador (parte de arriba), para así lograr una mejor definición de las bandas durante la separación electroforética.

Mezcla para un Gel de Separación:

Reactivo	Volumen
Agua destilada	1.2 ml
Mezcla de acrilamida 30%	2.5ml
1.5 M Tris (pH 8.8) (buffer separador)	1.3ml
SDS 10%	50µl
Persulfato de amonio 10%	24µl
TEMED	6µl

Se agregan de último el Persulfato de amonio y el TEMED porque son los que inician la polimerización.

Al chorrear este gel en el aparato de electroforesis mini-PROTEAN® II (Bio-Rad Laboratories) se debe agregar una capa de butanol para formar una superficie homogénea. Cuando ya polimerizó el gel, se elimina el butanol, se lava con agua destilada y se seca con papel filtro.

Mezcla para un Gel Espaciador (arriba):

Reactivo	Volumen
Agua destilada	1.8 ml
Mezcla de acrilamida 30%	400µl
1M Tris (pH 6.8) (buffer espaciador)	760µl
SDS 10%	40µl
Persulfato de amonio 10%	20µl
TEMED	5µl

Solución Amortiguadora para Muestras de Proteínas 4X

Reactivo	Volumen (ml)
Tris 1M (pH 8)	1.24
SDS 20%	2
Glicerol	8
Mercaptoetanol	1

Para un volumen final de 20ml con agua destilada. Agregarle azul de bromofenol 0.001%.

Solución de Corrida 1X

Reactivo	Cantidad (g)
Trizma-Base	3.02
Glicina	14.4
SDS	1

Disolver en agua destilada para tener un volumen final de 1000ml. El pH se debe regular a 8.3.

Azul de Coomassie

Reactivo	Cantidad
Metanol	150ml
Ácido acético glacial	30ml
Coomassie Brilliant Blue-R	0.75g
Agua destilada	120ml

Para un volumen final de 300ml

Decolorante para geles teñidos con Azul de Coomassie

Reactivo	Volumen (ml)
Metanol	200ml
Ácido acético glacial	75ml
Etanol 95%	100ml
Agua destilada	625ml

ANEXO 4

Ensayo inmunoespecífico de blot electrotransferido “western blot”

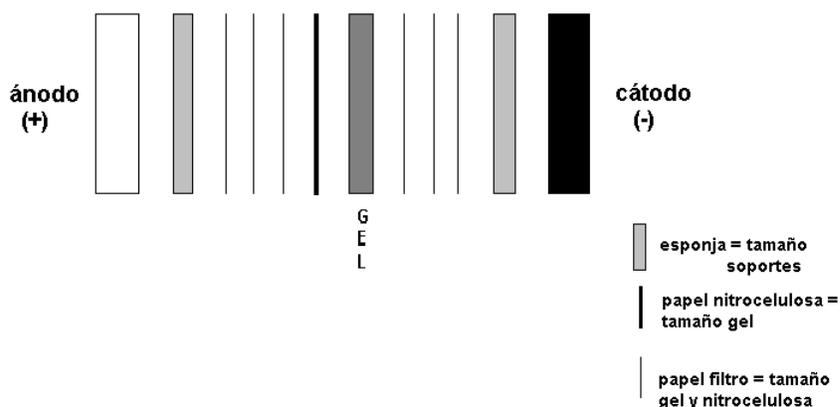


Figura 1.1. Orden de montaje de las partes que componen el “sandwich” requerido para llevar a cabo la transferencia.

Soluciones utilizadas en el “western blot”

Solución Amortiguadora de Transferencia 1X (debe ser fresco)

Reactivo	Cantidad (g)
Trizma base	3
Glicina	14.6

Disolver en 800ml de agua destilada, ajustar el pH a 8.3. Justo antes de usarlo, agregarle 200ml de metanol. La solución debe mantenerse en frío.

AMIDOBBLACK

Reactivo	Cantidad
Amidoblack	1g
Ácido acético	100ml
Metanol	450ml
Agua destilada	450ml

Solución Amortiguadora de Lavado 1X con 5% leche (Amortiguador Blasa)

Reactivo	Cantidad
Leche descremada deshidratada	5g
Tween-20	0.1ml
PBS 10X	10ml
Agua destilada	90ml

Para un volumen final de 100ml

Solución Reveladora de Transferencias

Reactivo	Cantidad
Amortiguador Sustrato	10ml
Nitro Blue Tetrazolium (NBT) 50 mg/ml	100 μ l
Bromo-chloro-indolyl fosfato (BCIP) 50 mg/ml	100 μ l
Cloruro de magnesio 1M (MgCl ₂)	33.3 μ l

Solución Detenedora de "Western blot"

Tris HCl 10mM + EDTA 1mM, pH 7.5.