

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA



**DETECCIÓN DEL VIRUS DEL MOSAICO DE *Cymbidium* Y EL VIRUS DE LA
MANCHA ANILLADA DE *Odontoglossum* MEDIANTE TD/RT-PCR EN
ORQUÍDEAS CULTIVADAS EN VIVERO**

Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial para optar al título de Bachiller con el grado académico de Ingeniero en Biotecnología.

Alejandro Arce Rodríguez

Cartago Diciembre, 2006

DETECCIÓN DEL VIRUS DEL MOSAICO DE *Cymbidium* Y EL VIRUS DE LA MANCHA ANILLADA DE *Odontoglossum* MEDIANTE TD/RT-PCR EN ORQUÍDEAS CULTIVADAS EN VIVERO

Alejandro Arce Rodríguez *

RESUMEN

El virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV) y el virus de la mancha anillada de *Odontoglossum* (ORSV) son los dos virus más problemáticos en el cultivo de orquídeas. Mediante la estandarización de un protocolo de Touchdown/RT-PCR utilizando oligonucleótidos degenerados se logró detectar simultáneamente la infección de ambos virus en algunas muestras de orquídeas de diferentes géneros procedentes de dos viveros de la provincia de Alajuela. En ambos invernaderos se detectó la contaminación viral en el 50% de las plantas evaluadas, siendo la infección por el CymMV más frecuente que el ORSV. Solamente el 5% del total de plantas se encontraron con infección mixta. Las plantas infectadas presentaban síntomas (80%) o podían ser asintomáticas (20%), siendo estas últimas una fuente potencial de inóculo para virus que son de transmisión mecánica. Al realizar un estudio comparativo entre el ELISA y la técnica estandarizada para la detección de ambos virus se determinó que la metodología de TD/RT-PCR permite una detección simultánea del CymMV y el ORSV en un menor tiempo, con mayor sencillez, sensibilidad y un menor costo que esta técnica serológica.

Palabras claves: Virus del mosaico de *Cymbidium*, Virus de la mancha anillada de *Odontoglossum*, Touchdown/RT-PCR, primers degenerados, Orquídeas, Alajuela.

* INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 2006.

DETECCIÓN DEL VIRUS DEL MOSAICO DE *Cymbidium* Y EL VIRUS DE LA MANCHA ANILLADA DE *Odontoglossum* MEDIANTE TD/RT-PCR EN ORQUÍDEAS CULTIVADAS EN VIVERO

ABSTRACT

The *Cymbidium* mosaic virus (CymMV) and the *Odontoglossum* ringspot virus (ORSV) are both the most problematic viruses in the orchid culture. By using the standardization of a Touchdown/RT-PCR protocol applying degenerate primers, it was managed to detect the infection of both virus in samples of different genera coming from two breeding grounds from Alajuela. In both greenhouses it was detected viral contamination in 50% of tested plants, being the infection by the CymMV more frequent than the ORSV. Only 5% of the total of plants were contaminated with mixed infection. The infected plants showed symptoms (80%) or could be asymptomatic (20%), being these last plants, potential source of inoculum for virus that are efficiently transmitted mechanically. A comparative study between ELISA and the standardized technique for the detection of both viruses was made determining that the TD/RT-PCR methodology allows a simultaneous detection of the CymMV and the ORSV in a smaller amount of time, with greater simplicity, sensitivity and a smaller cost than this serological technique.

Keywords: *Cymbidium* mosaic virus, *Odontoglossum* ringspot virus, Touchdown/RT-PCR, degenerate primers, Orchids, Alajuela.

**DETECCIÓN DEL VIRUS DEL MOSAICO DE *Cymbidium* Y EL VIRUS DE LA
MANCHA ANILLADA DE *Odontoglossum* MEDIANTE TD/RT-PCR EN
ORQUÍDEAS CULTIVADAS EN VIVERO**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

Miembros del tribunal

Ing. Wayner Montero Carmona
Profesor Asesor ITCR

Lic. Omar Gätjens Boniche
Lector de tesis

MSc. Vladimir Villalba Velásquez
Lector de tesis

DEDICATORIA

**Para mi familia y todas las personas
de las que recibí su apoyo y confianza**

**“Hay una especie de
victoria en todo
trabajo bien hecho,
por humilde que sea”**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a Dios (en sus múltiples formas y nombres) por el regalo de la vida y por colocarme en este camino, en el que hoy cumpla con una de sus numerosas metas. A mis padres por su apoyo, consejo y guía; sin ellos nunca hubiese alcanzado los logros, la educación y las metas que hoy me llenan de satisfacción. A mi familia y amigos, que han sabido brindar siempre la palabra precisa en todo momento.

A mi tutor y guía durante el presente trabajo Ing. Wayner Montero, así como al Lic. Omar Gätjens, al Ing. Sergio Torres, al Sr. Jaime Soto, a la Ing. Lorena Franco y al resto del personal del Laboratorio de Biotecnología de Cultivos Tropicales del ITCR-SSC, por su apoyo, ayuda y por haberme brindado la oportunidad de realizar esta investigación en sus instalaciones. También doy gracias al MSc. Vladimir Villalba por ayudarme con algunos conceptos de virología y con la lectura y revisión de este trabajo.

A José Raúl Cascante y su familia, por su colaboración y por permitirme abusar de su hospitalidad durante la visita a los viveros. A los dueños de los viveros analizados y los que de una u otra manera no se pudieron analizar por abrirme sus puertas y brindarme el material experimental para el análisis.

Y a todos aquellos que se interesen en leer, criticar y utilizar este trabajo en sus investigaciones. Espero les sea de gran ayuda.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Virus vegetales.....	4
2.2. Potexvirus del mosaico de <i>Cymbidium</i>	8
2.3. Tobamovirus de la mancha anillada de <i>Odontoglossum</i>	10
2.4. Transmisión viral	12
2.5. Métodos de detección viral	13
2.6. Estudios realizados en Costa Rica	17
3. OBJETIVOS	18
3.1. Objetivo general.....	18
3.2. Objetivos específicos	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS	19
4.1. Validación de la técnica TD/RT-PCR para la detección del CymMV y el ORSV ...	19
4.2. Interpretación de resultados	22
4.3. Recolección de muestras en los viveros	23
4.4. Análisis viral de las orquídeas provenientes de los viveros.....	24
4.5. Comparación de costos entre la prueba de ELISA y el TD/RT-PCR.....	24
5. RESULTADOS	25
5.1. Validación de la técnica TD/RT-PCR para el análisis viral.	25
5.2. Análisis viral de las orquídeas provenientes de los viveros.....	27
5.2.1 Vivero A	27
5.2.2 Análisis del vivero B.....	29
5.3. Comparación entre los dos viveros	30
5.4. Sintomatología ocasionada por la infección viral.....	31
5.5. Comparación de costos entre el ELISA y el TD/RT-PCR.....	37
6. DISCUSIÓN	39
6.1. Validación de la técnica TD/RT-PCR.	39
6.2. Análisis viral de los viveros.....	42
6.3. Sintomatología ocasionada por la infección de los virus.....	44
6.4. Comparación entre las técnicas de ELISA y RT-PCR para detección viral	46
7. CONCLUSIONES	48
8. RECOMENDACIONES	48
9. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	49
ANEXOS	53

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1	Síntomas y orígenes secundarios ocasionados por infecciones virales en plantas.	6
Cuadro 4.1	Perfil de las temperaturas implementadas en el TD/RT-PCR.....	21
Cuadro 5.1.	Tipo de infección viral que se encontró en las especies de orquídeas analizadas para el vivero A.....	28
Cuadro 5.2	Tipo de infección viral encontrada en las 10 especies de orquídeas analizadas para el vivero B.....	29
Cuadro 5.3	Sintomatología observada en las especies de orquídeas del vivero A y su relación con el CymMV y el ORSV.	32
Cuadro 5.4	Sintomatología observada en las especies de orquídeas del vivero B y su relación con el CymMV y el ORSV.	33
Cuadro 5.5	Comparación entre el precio de un ELISA y el precio relativo del TD/RT-PCR para el análisis del CymMV y el ORSV.	37
Cuadro 5.6	Costos de los equipos utilizados para los análisis por ELISA y TD/RT-PCR.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 5.1	Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los fragmentos de ADN viral amplificado mediante TD/RT-PCR con 100 U de Transcriptasa Reversa, aplicado a diferentes diluciones de ácidos nucleicos totales para tres muestras de orquídea.	26
Figura 5.2	Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los fragmentos de ADN viral amplificado mediante TD/RT-PCR utilizando 50 U de Transcriptasa Reversa para dos diluciones de ácidos nucleicos totales del material infectado y el material sano.	27
Figura 5.3	Electroforesis en gel de agarosa al 1,7% de los fragmentos de ADN viral correspondientes al CymMV y al ORSV amplificados mediante TD/RT-PCR para las 10 orquídeas del vivero A.	28
Figura 5.4	Electroforesis en gel de agarosa al 1,7% de los fragmentos de ADN viral correspondientes al CymMV y al ORSV amplificados mediante TD/RT-PCR para las 10 orquídeas del vivero B y para un espécimen de <i>Cymbidium</i> (Cym) con síntomas evidentes de infección viral.	30
Figura 5.5	Comparación del número de plantas infectadas y el tipo de infección viral entre el vivero A y el vivero B.	31
Figura 5.6.	Sintomatología ocasionada por infecciones simples del virus del mosaico de <i>Cymbidium</i> (CymMV). a. <i>Cattleya</i> híbrida; b. <i>Lycaste aromatica</i> ; c. <i>Enciclya alata</i> x <i>Enciclya cordigera</i> ; d. <i>Cymbidium</i> sp.	35
Figura 5.7	Sintomatología ocasionada por infecciones simples del virus de la mancha anillada de <i>Odontoglossum</i> (ORSV). a y b. Dos diferentes híbridos del género <i>Cattleya</i> ; c. <i>Cattleya forbessi</i>	36
Figura 5.8	Síntomas observados en <i>Laelia lobata</i> con infección mixta del CymMV y el ORSV.	36
Figura 6.1	Alineamiento de los primers degenerados U1,3 y L1 en las secuencias nucleotídicas del ADNc de los virus CymMV y ORSV.	40

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Certificación de la infección por el CymMV en la Blc. Blue Grotto ‘Blue Luste’ entregada por el CIBCM de la Universidad de Costa Rica.....	54
Anexo 2. Documento que certifica a la planta de <i>C. skinneri</i> como libre de virus entregado por el CIBCM de la Universidad de Costa Rica	55
Anexo 3. Composición de las soluciones empleadas en la extracción, TD/RT-PCR y electroforesis de las muestras.....	56
Anexo 4. Análisis de los costos aproximados del material desechable y los reactivos necesarios por muestra para realizar el análisis de los virus CymMV y ORSV mediante RT-PCR.	58
Anexo 5. Descripción de los virus que se han encontrado infectando especies de la familia orchidaceae.....	59

1. INTRODUCCIÓN

Las orquídeas son plantas herbáceas perennes pertenecientes a la familia Orquidaceae y a la clase Liliopsida (monocotiledóneas). Esta familia de plantas es la productora de flores más grande del Reino Vegetal. En la actualidad se estima que existen entre 17.000 a 35.000 ejemplares agrupados en 650-900 géneros, a los que deben sumarse los más de 70.000 híbridos artificiales producidos (Rivera, 1998).

Las orquídeas se han utilizado desde hace más de 3000 años en la preparación de tónicos con alto contenido calórico, para tratar males del hígado, pulmones, mal de gota y como vermífugo; sin embargo la explotación comercial de las orquídeas se basa principalmente en la producción de la vainilla y la comercialización de plantas y flores de uso ornamental (Rivera, 1998).

En Costa Rica, las primeras investigaciones por personas interesadas en las especies nativas de orquídeas se llevaron a cabo en los años 1840-1850 con la visita de botánicos y naturalistas como Oersted, Warscewisk y Wedland. Fue así como a partir de estos años se despertó el interés por la orquideología entre científicos y colectores nacionales e internacionales de la talla de Pittier, Biolley, Tonduz, Wercklé, Alfaro, Acosta, Lankester, Dressler y Populin (Ossenbach, 2003). Gracias a su aporte y al de otros investigadores, se han encontrado hasta el año 2002 dentro del territorio nacional aproximadamente 1364 especies de orquídeas distribuidas en unos 180 géneros diferentes (Populin, 2002, citado por Chacón, 2002).

A pesar de poseer el clima y las condiciones ideales de cultivo, el mercado interno de orquídeas y la industria de la producción de estas plantas para exportación, especialmente de algunas especies e híbridos de gran interés dentro de los géneros *Phalaenopsis*, *Dendrobium*, *Cattleya*, *Oncidium* y *Vanda*, no ha explotado todo su potencial (ACO, 2006). Esto lo confirman datos de la Promotora de Comercio Exterior de Costa Rica, que reporta para el año

2005 US\$ 401.967 como ingresos por esta actividad, que desarrollan tan solo alrededor de 10 empresas exportando principalmente a los Estados Unidos de América, México y Colombia (PROCOMER, 2005). No obstante, la llegada de empresas transnacionales ha permitido aumentar los ingresos en este rubro de exportación. Un ejemplo es Taisuco de Costa Rica, empresa subsidiaria de la compañía taiwanesa Taiwán Sugar Corporation que opera desde 1998 en la zona Franca BES en el Coyol de Alajuela y que se dedica a la producción y venta de híbridos de *Phalaenopsis*. Por año, en invernadero son producidas aproximadamente un millón de plantas destinadas principalmente al mercado norteamericano, produciendo ganancias de cerca de un millón de dólares (Cabezas, 2006).

A pesar de considerarse como plantas productoras de flores, la reproducción de las orquídeas suele llevarse a cabo de forma vegetativa, ya que sus semillas son muy pequeñas y generalmente sin endospermo, por lo que requieren de asociaciones con micorrizas para germinar (Rivera, 1998). Este tipo de reproducción, unido a la popularización de su cultivo y a las técnicas de cultivo de tejidos para propagar masivamente las orquídeas, han generado un importante problema de dispersión de las enfermedades virales a nivel mundial (Rivera, 1998). Este tipo de enfermedades se convierten en un verdadero problema para los productores, pues disminuye considerablemente el valor comercial y de colección de los especímenes (Chacón, 2002).

En orquídeas se ha determinado la infección por al menos 28 tipos de virus. De estos, los dos más importantes son el virus del mosaico del *Cymbidium* (*Cymbidium* mosaic potexvirus o CymMV) y el virus de la mancha anillada del *Odontoglossum* (*Odontoglossum* ringspot tobamovirus u ORSV), debido principalmente a que se encuentran distribuidos a nivel mundial generando grandes daños económicos a los productores (Zettler *et al.*, 1990). El CymMV provoca en las orquídeas síntomas que van desde estriados cloróticos a puntos negros o patrones de líneas necróticas con parches hundidos en las hojas y una acentuada disminución del tamaño de la planta. Así mismo, puede provocar alteración en el patrón de floración, disminuye el tamaño y la calidad de la flor, afectando su valor comercial y estético (Hsu *et al.*,

1992; Moreira *et al.*, 1999). Por su parte, el ORSV induce anillos concéntricos, clorosis, mosaicos o necrosis en las hojas y jaspeados en las flores, dependiendo de la especie que sea infectada. También puede provocar la disminución en el crecimiento individual de la planta. Sin embargo, se ha encontrado que en algunas especies pueden producirse infecciones asintomáticas del ORSV así como del CymMV (Chacón, 2002; Hu *et al.*, 1994).

En la actualidad, se han desarrollado varios métodos para la detección viral en organismos vegetales. Los procedimientos más modernos incluyen pruebas serológicas así como métodos con ácidos nucleicos (Jia, 2005). Entre estos últimos, destacan las técnicas de identificación de marcadores moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) dado que estos métodos se perfilan como más confiables, sensitivos y rápidos, permitiendo identificar inclusive pequeñas cantidades de partículas virales en muestras limitadas de material vegetal. (Seoh *et al.*, 1998).

El objetivo de esta investigación consistió en identificar el virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV) y el virus de la mancha anillada del *Odontoglossum* (ORSV) en orquídeas por medio de la técnica de TD/RT-PCR.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Virus vegetales

Los virus se clasifican como elementos genéticos formados básicamente por ácido nucleico (ADN o ARN) rodeado por una cubierta proteica, que pueden replicarse independientemente de los cromosomas de una célula, pero de manera dependiente de dicha célula. Para multiplicarse, deben entrar en una célula hospedadora en la cual puedan replicarse aprovechando la maquinaria metabólica celular. Dicha replicación destructiva es la causante de que algunos virus sean promotores de enfermedades en muchos organismos (Madigan *et al.*, 2004).

Los virus poseen dos etapas importantes en su ciclo de “vida”. La primera consiste en las partículas virales o viriones. En esta, los virus no se encuentran metabólicamente activos y cumple la función de dispersión cuando el virus es diseminado e infecta células hospederas sanas. La segunda etapa la constituye la fase reproductiva, en la cual el virus existe como un conjunto de moléculas virales que se integran, controlan y replican con la ayuda del sistema metabólico del hospedero. Durante esta etapa, los componentes individuales de los viriones son producidos y luego ensamblados apropiadamente para producir la progenie de viriones (Gibbs *et al.*, 2000).

En plantas existe una gran cantidad de virus que causan numerosos daños a los cultivos. De estos el 90% posee genoma ARN, mientras que el 10% restante es ADN; esta característica se debe posiblemente a que los virus ARN se replican en el citoplasma celular, mientras que los virus ADN pueden tener su replicación asociada al núcleo. De esta manera los mecanismos de regulación del virus ADN son muy similares a los de la planta huésped al contrario de los virus ARN, en los que generalmente estos son diferentes (Vega y Rivera, 2001).

Las enfermedades virales de las plantas se presentan de forma generalizada y persistente, llegando a ocasionar síntomas variables que no producen necesariamente la muerte de los tejidos y una infección que se extiende poco a poco por todos los órganos de la planta. Esta infección generalizada permite diferenciar este tipo de afecciones de las enfermedades bacterianas y criptogámicas, que se presentan a menudo en forma localizada. Los síntomas constituyen un grupo de cualidades originales y característicos de cada virus resultantes de la interacción entre el efecto depresivo producto de la multiplicación del parásito en la planta huésped y la reacción defensiva de la misma. Es probable que además de la competencia por aminoácidos y nucleótidos para la síntesis de las partículas virales, la replicación de los virus necesite de la ocupación de sitios importantes en las membranas celulares, lo cual bloquea funciones celulares importantes (Cornuet, 1992). Algunos de los síntomas más comunes que presentan las enfermedades virales, junto con su posible efecto causante se resumen en el Cuadro 2.1.

Cuadro 2.1 Síntomas y orígenes secundarios ocasionados por infecciones virales en plantas.

Síntomas	Origen
- Enanismo, raquitismo, acortamiento de los entrenudos y disminución de tamaño en las hojas	Competición entre el metabolismo del virus y del huésped, disminución del sistema radicular. Posible intervención a nivel de los intrones.
- Mosaico, clareado de nerviaciones o de la zona internervial, abigarrado.	Acción de los virus a nivel de cloroplastos (o cromoplastos en el abigarrado de los pétalos) con localización del efecto en ciertas zonas de la hoja
- Amarilleo general, enrollado y endurecimiento del limbo, marchitamiento	Los virus se multiplican en el liber y perturban sus funciones conductoras. Acumulación de callosa en el liber. Bloqueo del metabolismo de los azúcares y acumulación de almidón en la hoja.
- Rizado y reducción del limbo con modificaciones en la hoja	Bloqueo del alargamiento celular en ciertas masas de células y crecimiento anormal del resto del limbo
- Ramas aplastadas o proliferantes	Acción sobre la morfogénesis
- Excrecencias, tumores	Estimulación del crecimiento en ciertas masas celulares
- Manchas cloróticas, necróticas localizadas, líneas sinuosas necróticas o cloróticas sobre las hojas. Estrías cloróticas o necróticas sobre las hojas	Reacción de defensa del huésped, provocando la muerte de las células y a veces la localización del virus
- Disminución de las capacidades de reproducción sexual de la planta. Malformación del polen, esterilidad de los óvulos, aborto, inhibición de la germinación	Pueden deberse a la presencia específica del virus en los órganos reproductores, o ser el resultado de deficiencias metabólicas generales

Fuente: Cornuet (1992).

Las orquídeas tienen mayor cantidad de enfermedades virales que la mayoría de otros cultivos. Esta infección provoca que el valor estético y comercial de la orquídea se vea reducido considerablemente (Zettler *et al.*, 1990). El primer registro de una enfermedad viral data al año 1900, cuando el botánico Lucien Linden publicó el dibujo de una especie de *Cattleya labiata*

que presentaba jaspeados en su flor. A pesar de que Linden la identificó como una nueva variedad de *C. labiata*, es más probable que se tratara de una orquídea infectada por el ORSV que generalmente ocasiona estos síntomas en las flores de algunos géneros de orquídeas, o de otro tipo de virus (Shelpe, 1983 citado por Chacón, 2002). A pesar de esto, las estrategias para el manejo y control de virus se desarrollaron desde el momento en que se describió con detalle la primera enfermedad viral de orquídeas en el año 1943 (Lawson, 2002).

Actualmente, en las orquídeas se han descubierto la infección por alrededor de 28 tipos de virus (Anexo 5). De estos, los dos más importantes son el virus del mosaico del *Cymbidium* (*Cymbidium* mosaic potexvirus o CymMV) y el virus de la mancha anillada del *Odontoglossum* (*Odontoglossum* ringspot tobamovirus u ORSV) debido principalmente a que se encuentran distribuidos a nivel mundial, a su prevalencia y a los daños económicos que genera (Lawson, 2002; Zettler *et al.*, 1990; Chia y Chang, 1992).

Para Zettler *et al.* (1990) la alta incidencia de infecciones virales en orquídeas cultivadas se atribuye a su alta estabilidad y facilidad de transmisión debido a las prácticas de cultivo, especialmente a dos de ellas. La primera consiste en la propagación vegetativa tradicional de las especies de crecimiento monopodial y simpodial, y a la corta de las inflorescencias para el mercado de flores. Esto se presenta porque a través de los cortes y la savia adherida a manos de los agricultores y a las herramientas que no son propiamente desinfectadas, el virus se propaga entre las plantas (Chia y Chang, 1992). La segunda razón resulta de los avances en el uso de las técnicas de cultivo de tejidos para la propagación clonal masiva de las especies, que no sería posible producir por medio de las técnicas tradicionales de cultivo (Zettler *et al.*, 1990; Chia y Chang, 1992). Esto le genera a los invernaderos la pérdida de la calidad de sus accesiones de orquídeas y por lo tanto pérdidas económicas al no poder comercializar dichas colecciones.

2.2. Potexvirus del mosaico de *Cymbidium*

El virus del mosaico del *Cymbidium* pertenece al género de los potexvirus, denominados de esta manera debido al virus x de la papa (potato virus X) (Gibbs *et al.*, 2000). Este género comprende un extenso grupo de virus vegetales con partículas flexibles filamentosas de 450 a 550 nm de longitud, conteniendo de 6 a 7 kb de ARN genómico de banda simple, sentido positivo con una estructura tipo caperuza en el extremo 5' y poliadenilado en el extremo 3' (Forster *et al.*, 1988 citado por Ryu *et al.*, 1995). El genoma de ARN contiene 5 marcos abiertos de lectura (ORFs) que codifican para varias proteínas. Estas son una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) de 160 kDa encargada de la replicación del genoma viral (ORF1), tres proteínas de movimiento (Mp) de 26 kDa/ 13 kDa/ 10 kDa encargadas de el transporte viral de célula a célula (los ORFs traslapados del 2 al 4 en un bloque con tres genes) y la proteína de la cápside de 24 kDa (ORF5) (Forster *et al.*, 1988; Huisman *et al.*, 1988; Skryabin *et al.*, 1988; Sit *et al.*, 1989 citados por Kim *et al.*, 1998; Carrington *et al.*, 1996).

En forma general, las plantas infectadas con el CymMV pueden presentar entre sus síntomas moteados cloróticos, manchas alargadas y rayado con colores que van de café a negro que corresponden a tejidos muertos (necróticos) en ambas superficies de las hojas; estas a su vez tienden a secarse y a envejecer muy rápidamente. Inclusive, ocasionalmente el virus puede causar manchas anilladas en las hojas. (University of Illinois, 1990; Gibbs *et al.* 2000). Las flores son usualmente asintomáticas, pero puede suceder que estas se abran de una manera irregular o que se presenten en menor número y tamaño debido a las lesiones y muerte de los tejidos foliares. También puede ocurrir que estas muestren rayado necrótico y variegado (University of Illinois, 1990; Gibbs *et al.* 2000)

A pesar de que la caracterización del virus se realiza principalmente por los síntomas que causa, estos varían dependiendo del hospedero, condiciones ambientales, raza del virus y edad del tejido enfermo (Rivera, 1998). En plantas de *Cymbidium* por ejemplo, el CymMV causa mosaico y rayado clorótico en las hojas. En *Cattleya* el virus está asociado con necrosis floral

y manchas necróticas localizados en hojas, mientras que en *Dendrobium* ocasiona amarillamiento y mosaico de las hojas (Ryu *et al.*, 1995). En *Vanilla* sp. origina la presencia de un manchado fino clorótico o necrótico en las hojas (Grisoni *et al.* 2004); así mismo, se reporta que el virus induce necrosis conspicua del tallo y enanismo en plantas de *Vanilla tahitensis* en las Islas Reunión (Gourdel y Leclercq-Le Quillec, 2001). También se reporta afectando otros géneros, entre los que se incluyen *Aranthera*, *Cattleya*, *Coelogyne*, *Epidendrum*, *Laelia*, *Laeliocattleya*, *Oncidium*, *Phaius*, *Phalaenopsis*, *Vanda*, *Zigopetalum*, entre otros (Gibbs *et al.*, 2000).

El CymMV puede reducir de gran manera el tamaño y el crecimiento en algunos géneros de orquídeas infectadas. Pearson y Cole (1986) reportan que el crecimiento en plantas de *Cymbidium* se ve afectado en gran medida cuando se encuentra contaminado con este virus, y el problema se torna aún más severo cuando se encuentra en infecciones mixtas con el ORSV. La infección individual con alguno de estos dos virus o la infección mixta de ambos también pueden llegar a afectar el tamaño de las inflorescencias, el número de flores por inflorescencia y el tamaño individual de la flor. Esta reducción del crecimiento se atribuye a la reducción de la actividad fotosintética, pues las plantas contagiadas tienen mayor susceptibilidad a los fenómenos de fotoinhibición y fotooxidación que las plantas sanas. Esta reducción en el proceso de fotosíntesis puede deberse a su vez a un menor potencial en el transporte de electrones en la fotosíntesis y a los bajos niveles de clorofila contenidos en las plantas enfermas (He *et al.*, 2004).

Las orquídeas contaminadas con el CymMV desafortunadamente también pueden presentarse asintomáticas a la infección y por lo tanto su diagnóstico no puede realizarse a simple vista. Estas plantas conforman una importante fuente de inóculo, ya que los coleccionistas exponen sus plantas sanas con las infectadas, por lo que las primeras pueden contagiarse fácilmente (Zettler *et al.*, 1990; Lawson, 2002).

2.3. Tobamovirus de la mancha anillada de *Odontoglossum*

El virus de la mancha anillada de *Odontoglossum* pertenece a un género de unas 20 especies de virus denominado tobamovirus debido a su miembro más antiguamente conocido, el TMV o virus del mosaico del tabaco (tobacco mosaic virus); es por esta razón que al ORSV también se le conoce como TMV-O (Gibbs *et al.*, 2000; Lawson, 2002). Sus partículas virales poseen morfología de bastón rígido de al menos 300 nm que incluye una sola molécula de ARN genómico lineal de cadena simple y sentido positivo, que comprende más de 6600 nucleótidos con cuatro marcos abiertos de lectura (ORFs) diferentes (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2002; Chen *et al.*, 1996 citado por Wong *et al.*, 2004). Este genoma viral codifica para las proteínas ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) de 126 y 183 kDa que están relacionadas en la replicación del virus, y al parecer intervienen también en el movimiento de célula a célula y en el rango del hospedero. También codifica para la proteína de movimiento (Mp) de ~30 kDa que se encarga del movimiento a corta distancia entre célula y célula a través de los plasmodesmos, así como de la especificidad del virus en el hospedero. Finalmente codifica para la proteína de la cápside (Cp) de 17 kDa que se encarga del movimiento a larga distancia por los elementos conductores del floema permitiendo la infección sistémica de la planta (Wong *et al.*, 2004; Carrington *et al.*, 1996; Rabindran *et al.*, 2005).

Las partículas virales del ORSV son sumamente estables. Pueden sobrevivir en hojas secas por hasta 100 años y fuera del hospedero resisten temperaturas de hasta 96° o 100°C sin ser alterado; además, puede multiplicarse en grandes concentraciones en plantas infectadas inclusive llegando a ocupar más de 1% del peso seco de la savia (Gibbs *et al.*, 2000; Rivera, 1998).

Resulta interesante que la naturaleza del ORSV es en realidad un virus híbrido dentro de los tobamovirus. En un estudio realizado por Lartey *et al.* (1996) este género viral se clasificó en tres subgrupos: los que infectan solanáceas (subgrupo 1), los que infectan cucúrbitas y legumbres (subgrupo 2) y los que infectan crucíferas (subgrupo 3). Sin embargo, los análisis de secuenciación asocian las proteínas de movimiento y de la cápside del ORSV con el subgrupo 1, mientras que el resto del genoma se incluye dentro del subgrupo 3, sugiriendo que este es producto de la progenie de un virus recombinante.

Entre los síntomas foliares que se presentan en plantas contaminadas con el ORSV se pueden encontrar moteados amarillos, manchas cloróticas y necróticas, así como rayas y anillos cloróticos y necróticos (Lawson, 2002; Gibbs *et al.*, 2000). En flores, el síntoma más conocido es el variegado de la flor o "flower breaking". Este se presenta como manchas de pigmentación oscura e irregular que se observan en los botones florales cerrados y se acentúan más aún en los pétalos y sépalos de las flores abiertas. Este variegado usualmente difiere en intensidad entre una flor a otra del mismo ramo (Lawson, 2002; Rivera, 1998). Las flores afectadas pueden presentar también deformación severa en algunos casos (Rivera, 1998).

Sin embargo, al igual que el mosaico del *Cymbidium*, el ORSV induce una amplia gama de síntomas que varían entre un rango de géneros de orquídeas. En los cultivares de *Catleyas* de flor púrpura, los síntomas foliares incluyen manchas, o patrones lineales irregulares de tejido clorótico o pigmentado rojo o púrpura. Las hojas de *Oncidium* pueden mostrar una combinación de manchas cloróticas o necróticas hundidas en el tejido, mientras que especies de *Epidendrum* muestra solamente manchado clorótico (Lawson, 2002).

Al igual que el CymMV, la infección con el ORSV afecta el rango de crecimiento de algunos géneros de orquídeas; aún así, esta disminución no es tan severa como la causada por el CymMV (Pearson y Cole, 1986). De igual manera, su infección puede presentarse en plantas asintomáticas, por lo que puede pasar desapercibida entre las plantas sanas y contribuir con la infección del resto de la colección (Zettler *et al.*, 1990).

2.4. Transmisión viral

Tanto el CymMV como el ORSV se transmiten eficientemente de una planta a otra por inoculación mecánica. La savia adherida en las herramientas utilizadas para dividir las plantas y cosechar las flores, propaga los virus cuando no se desinfectan apropiadamente entre el manejo de plantas contaminadas y plantas sanas. Además sus partículas virales pueden transmitirse hacia plantas sanas por contacto con las superficies contaminadas de las macetas y el sustrato en que anteriormente se encontraban cultivadas plantas infectadas, y también a través del agua que se drena al realizar el riego de plantas enfermas (Lawson, 2002).

Hu *et al.* (1994) realizaron un ensayo de infección mecánica del CymMV y el ORSV en plantas de *Dendrobium*, encontrando que el CymMV es eficientemente inoculado mediante incisión de la tercera hoja con una navaja contaminada con el extracto de una planta virulenta (se infectaron 13 de 15 plantas) y mediante el corte de la inflorescencia con otra navaja igualmente contaminada (13 de 22 plantas). Unas semanas después el virus ya se encontraba infectando las raíces al transportarse por los tejidos vasculares y al cabo de un mes ya se encontraba disperso por toda la planta. Extrañamente, el ORSV no fue transmitido a la planta por ninguno de estos métodos, pero si que fue inoculado mediante el frote de las partículas virales en las hojas con carborundum. Esto demuestra que el ORSV también se transmite de manera sistémica por toda la planta en algunas especies de *Dendrobium*.

A pesar de la gran concentración de partículas virales en las plantas infectadas con el ORSV, ni este virus ni el CymMV son transmitidos por vectores naturales como artrópodos o nemátodos (Zettler *et al.*, 1990; Gibbs *et al.*, 2000). Aparentemente, ambos virus tampoco son transmitidos por la semilla sexual de padres infectados con estos dos virus (Wisler *et al.*, 1982). De 1375 plantas producidas a partir de semilla que fueron analizadas para el CymMV por Hu *et al.* (1993), ninguna mostró resultar infectada. Sin embargo, estos mismos investigadores reportan otro estudio anterior que demuestra la infección de una de 123 plantas

producidas a partir de semilla, por lo que la transmisión del CymMV por semilla sexual debe ser estudiada con más cuidado.

2.5. Métodos de detección viral

El diagnóstico de enfermedades virales por observación a simple vista es el método más sencillo del que se puede hacer uso; a pesar de esto, la variabilidad de los síntomas que ocasiona un virus en específico dependiendo del hospedero, las condiciones ambientales, la raza del virus y edad del tejido enfermo, así como la presencia de infecciones mixtas o asintomáticas, dificultan la detección precisa de los virus presentes en la infección (Rivera, 1998). Por esta razón, los investigadores se valen de otras técnicas que les permiten obtener resultados más concretos. Entre estos métodos de detección viral, los más utilizados son el bioensayo, la detección por microscopía electrónica, los métodos serológicos y mucho más recientemente, las pruebas basadas en ácidos nucleicos (Hsu *et al.*, 1992; Ryu *et al.*, 1995; Lawson, 2002; Webster *et al.*, 2004).

El bioensayo consiste en la transferencia del virus desde la orquídea que se quiere analizar a otra especie que muestre en las hojas síntomas distintivos y específicos para este virus. Esta prueba se realiza al aplicar el extracto de la orquídea sobre una hoja de la planta indicadora previamente tratada con un abrasivo como Carborundum, frotándolo gentilmente y posteriormente lavando el exceso con agua dos minutos después de la inoculación (Lawson, 2002). Algunas plantas que se utilizan como indicadoras para la infección por el CymMV son *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Datura stramonium* y *Tetragonia expansa*. Para la detección del ORSV se pueden utilizar plantas indicadoras de *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Gomphrena globosa* y *Tetragonia expansa* (Navalinskienė *et al.*, 2005).

La microscopía electrónica (EM) se utiliza desde 1950 como método para inspeccionar la savia de las plantas infectadas en busca de viriones. Mediante la forma y la concentración del virus, la técnica permite determinar el género viral al que pertenece; sin embargo, menos de la mitad de virus registrados pueden reconocerse por este método debido a que los viriones pueden no tener una única forma o porque estos pueden ser muy inestables o no encontrarse en suficiente cantidad en la savia como para ser detectados (Gibbs *et al.*, 2000).

La combinación de la EM con métodos serológicos permite una mayor eficiencia en la detección de partículas virales en la técnica conocida como inmuno-electromicroscopía o ISEM (Immunosorbent Electron Microscopy). En esta, las partículas virales son selectivamente atrapadas y concentradas en rejillas cubiertas de anticuerpos con pequeñas cantidades de material de la planta hospedera contaminada (Naidu y Hughes, s.f.); no obstante la técnica resulta muy cara y no se encuentra disponible en todos los centros de investigación o diagnóstico, además de que requiere de personal altamente calificado (Chacón, 2002).

Entre las técnicas serológicas, la más ampliamente usada debido a su precisión, simplicidad y bajo costo, es ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay). Esta técnica utiliza anticuerpos específicos contra el virus de interés que son fijados en placas de microtitulación y luego son cubiertos con extractos de plantas. Si el virus está presente, se unirá al anticuerpo permitiendo su detección mediante un segundo anticuerpo unido a una enzima u otra molécula reportera que reacciona ocasionando un cambio en la coloración de la muestra que es detectado por un lector de ELISA. Este método permite diagnosticar un virus en muchas plantas o de igual manera muchos tipos de virus en una planta con solo una placa. Sin embargo, la necesidad de anticuerpos específicos que no presenten reacciones cruzadas con otros virus es la principal limitante de esta técnica (Webster *et al.*, 2004).

Además del ELISA, otras pruebas serológicas que se han utilizado para la detección del CymMV y el ORSV en orquídeas se encuentran el RIPA (Rapid immunofilter paper assay), el TBIA (Tissue blot immunoassay), el DBIA (Dot blot immunoassay) y los inmunosensores

QCM (Quartz cristal microbalance) que consiste en dos discos de cristales de cuarzo cubiertos de anticuerpos específicos para el virus (Hsu *et al.*, 1992; Tanaka *et al.*, 1997, Webster *et al.*, 2004). No obstante, como demuestran Eun *et al.* (2005), estos biosensores también pueden recubrirse utilizando sondas de ácido nucleico, lo que las hace más específicas para el virus determinado.

Uno de los procedimientos basados en ácidos nucleicos más populares para la detección de virus de ADN y ARN son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el PCR acoplado con la retrotranscripción (RT-PCR) respectivamente (Webster *et al.*, 2004). El PCR consiste en la amplificación exponencial y rápida de pequeñas cantidades de moléculas de ADN realizada por enzimas ADN polimerasa recombinantes aisladas de microorganismos termófilos como *Thermus aquaticus*. La reacción consta de varios ciclos de reacción. Cada ciclo implica las etapas de: (1) desnaturalización del ADN por calor (94-95°C); (2) acoplamiento de los iniciadores, los cuales son oligonucleótidos de ADN que flanquean el segmentos de ADN a amplificar y permiten la unión de la ADN polimerasa para que inicie la amplificación; y finalmente la extensión de los iniciadores por la ADN polimerasa (Madigan *et al.*, 2004).

Debido a que el ácido nucleico viral consta de ARN, es necesaria una etapa previa a la amplificación por PCR para lograr obtener el ADN complementario (ADNc) a partir del ARN. Esto se logra mediante la reacción con la enzima transcriptasa reversa (RT). Esta es esencialmente una ADN polimerasa pero que en realidad lleva a cabo la síntesis de ADN bicatenario a partir de ARN, la síntesis de ADN con un molde de ADN y una actividad ribonucleasa H, que le permite degradar la cadena de ARN de un híbrido ARN:ADN (Madigan *et al.*, 2004). De esta manera es posible acoplar las dos técnicas (RT-PCR) para lograr obtener grandes cantidades de un segmento específico de ADN a partir de un molde de ARN.

Existen muchas variantes que se le han realizado a la técnica de PCR. Una de ellas es el touchdown PCR (TD/PCR). Este es un método en el cual se programa al termociclador de manera que la temperatura de hibridación de los primers o "annealing" disminuye subsecuentemente durante cada ciclo. Esta técnica permite resolver un problema que se presenta frecuentemente durante los PCR, el cual es la aparición de bandas falsas entre el producto de la reacción. Este problema usualmente se atribuye a la unión inespecífica entre uno o dos de los oligonucleótidos en el exterior o interior de la secuencia blanco. Los productos de estas amplificaciones incorrectas frecuentemente superan los productos de reacción, debido presuntamente a la ventaja estocástica que tienen los productos inespecíficos cortos de ser amplificados sobre los productos específicos (Don *et al.*, 1991).

Debido al carácter exponencial que posee intrínseca la técnica de PCR, la variante del touchdown permite que en los primeros ciclos de la reacción se generen muchas copias de ADN que son muy específicas para la secuencia que se desea amplificar. Estas a su vez van a funcionar de moldes para generar nuevas copias con la secuencia correcta (Don *et al.*, 1991). La técnica también se utiliza generalmente cuando se trabaja con cebadores degenerados porque es difícil calcular la temperatura de hibridación óptima o también cuando no se ha determinado exactamente el grado de complementariedad entre el molde de ADN y el cebador (García y Morillo, 1999).

Entre otros métodos para detección viral basados en ácidos nucleicos se pueden encontrar los polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), la utilización de sondas de ácidos nucleicos y los macro y microarreglos. También pueden utilizarse otras variantes del PCR, como por ejemplo RT-PCR Multiplex, RT-PCR fluorescente utilizando tecnología Taqman™, PCR nido, PCR con inmunocaptura, entre otros (Webster *et al.*, 2004).

2.6. Estudios realizados en Costa Rica

En nuestro país, son pocos los informes sobre la infección de virus en orquídeas. Entre estos están los trabajos realizados por Velasco *et al.* (1986) quienes trabajaron con híbridos de *Cymbidium* en los que mediante inmunomicroscopia electrónica determinaron la infección con el CymMV y el ORSV (Citado por Chacón, 2002). Moreira *et al.* (1999), lograron detectar el CymMV en plantas de *Phaius tankervilleae* de un pequeño vivero del Valle Central que presentan estriado clorótico en las hojas.

Chacón (2002), realizó su tesis en la identificación de seis virus y un género viral que afectan orquídeas nativas mediante ELISA y la detección de inclusiones virales por microscopía de luz. Finalmente, Ortiz (2002) realizó la detección de infecciones virales por potyvirus en orquídeas mediante Western Blot y ELISA. Sin embargo, en ninguna de estas investigaciones se han utilizado métodos basados en PCR.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar mediante pruebas moleculares la presencia del potexvirus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV) y el tobamovirus de la mancha anillada del *Odontoglossum* (ORSV) en orquídeas de dos viveros de la provincia de Alajuela durante el segundo periodo del año 2006.

3.2. Objetivos específicos

1. Estandarizar los protocolos para la detección del virus ORSV y CymMV mediante Retrotranscripción y Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).
2. Determinar mediante técnicas moleculares la infección viral (ORSV y CymMV) en algunas de las orquídeas cultivadas en los dos invernaderos.
3. Realizar un análisis comparativo entre el tiempo y los recursos requeridos para la detección viral en orquídeas mediante ELISA y RT-PCR.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular adscrito a la Escuela de Ciencias y Letras, ubicado en el Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede San Carlos (ITCR-SSC), durante los meses de agosto a noviembre del año 2006.

4.1. Validación de la técnica TD/RT-PCR para la detección del CymMV y el ORSV

Para validar la técnica de detección viral se realizaron extracciones de ácidos nucleicos totales para tres materiales experimentales siguiendo la metodología de Gibbs y Mackenzie (1997). La primera muestra fue una *Brassolaeliocattleya* Blue Grotto 'Blue Luste' en estado *in-vitro*, propagada a partir de una planta infectada con el virus del mosaico de *Cymbidium*. Para verificar la presencia del virus del mosaico del *Cymbidium*, dicha planta fue analizada mediante la técnica de ensayo enzimático inmunoabsorbente (ELISA) en el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica (ver resultado en el Anexo 1). El otro material experimental correspondió a una planta de *Cattleya skinneri* libre de virus, analizada también por ELISA en el CIBCM (ver resultado en el Anexo 2). Ambos materiales fueron donados por el Laboratorio de Biotecnología de Cultivos Tropicales del ITCR-SSC. Adicionalmente en la primera prueba se utilizó también material fresco de otra *Brassolaeliocattleya* que presentaba síntomas de infección viral.

Para la extracción de ácidos nucleicos totales se utilizó como base el procedimiento de extracción con buffer CTAB (Gibbs y Mackenzie, 1997). Para ello se tomaron entre 90-100 mg de tejido foliar y se colocaron en un tubo eppendorf de 1,5 ml. El material se maceró en la cámara de flujo laminar con ayuda de un pistilo de vidrio o de madera debidamente esterilizado, manteniendo la muestra siempre en hielo escarchado. A continuación se añadieron al tubo 600 µl de buffer de extracción CTAB con 0,5% de mercaptoetanol (Anexo

3), se continuó con la maceración y la muestra se incubó a 55°C por 30 minutos. Transcurrida la incubación, se añadieron a la mezcla 400 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y seguidamente se centrifugó a 14500 rpm por 10 minutos en una microcentrífuga Eppendorf (MiniSpinPlus).

En un tubo nuevo se rescató la fase acuosa (superior) y se mezcló con 0,1 volúmenes de acetato de amonio 7,5 M y un volumen de isopropanol. Esta mezcla se incubó en una cámara de enfriamiento a 4°C durante 10 minutos y posteriormente se centrifugó nuevamente a máxima velocidad (14500 rpm) durante otros 10 minutos, para luego descartar la fase acuosa con cuidado de no perder el precipitado. El botón de ácidos nucleicos se lavó con 1 ml de etanol 70% y se centrifugó durante 1 minuto a 14500 rpm. El etanol se decantó con cuidado de no perder el precipitado y se centrifugó nuevamente por 1 minuto a máxima velocidad. Con sumo cuidado y con ayuda de la micropipeta se descartó el exceso de etanol en el tubo y el precipitado se dejó secar en la cámara de flujo laminar. Finalmente, el precipitado de ácidos nucleicos totales fue suspendido nuevamente en 50 µl de agua destilada estéril y la muestra fue almacenada a -30°C en la cámara de congelación Thermo Electrón modelo 722.

La transcripción reversa del ARN viral y la amplificación del ADNc resultante se realizó en un termociclador Peltier Thermal Cycler (PTC-200) basados en el protocolo de TD/RT-PCR (“Touchdown/Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction”) implementado por Seoh *et al.* (1998). Se analizaron mediante esta técnica los ácidos nucleicos totales de las muestras sanas y enfermas descritas anteriormente.

Luego de varias pruebas modificando la cantidad de Unidades enzimáticas de la transcriptasa reversa RevertAid™ M-MuLV (Fermentas) y la cantidad de ácidos nucleicos totales, se logró adecuar el protocolo añadiendo por cada una de las muestras 1X de buffer de PCR con (NH₄)₂SO₄, 1X de buffer de reacción para la transcriptasa reversa (Anexo 3), 1,5 mM de MgCl₂, 30 pmol de los primers degenerados L1 [5'-(C,T)(A,G)T(A,C)TG(A,T)G(A,G)ACATCCTTT-3'] y U1,3 [5'-C(A,C)(A,T)AATCTTGACATTTCGC-3'] (Invitrogen) y 0,2 mM de la mezcla de

dNTP's (Fermentas). Finalmente, por cada tubo de reacción se añadieron 2U de *Taq* DNA Polimerasa (Fermentas), 20 U de la Transcriptasa Reversa, 5 µl de una dilución 1/15 de ácidos nucleicos totales, y se completaban los 25 µl totales de reacción por tubo de PCR con 2 µl de agua libre de nucleasas (Promega). Adicionalmente se montó un control negativo de las reacciones de transcripción reversa y PCR con 5 µl de agua libre de nucleasas sustituyendo los ácidos nucleicos. Para la preparación de la mezcla de reacción, cada tubo con las soluciones, enzimas y reactivos necesarios se mantenían a baja temperatura colocándolos en hielo escarchado preparado a partir de agua destilada en congelación.

Una vez realizada la mezcla de reacción, los tubos con las diferentes muestras fueron colocadas en el termociclador, bajo el perfil térmico con los ciclos señalados en el Cuadro 4.1.

Cuadro 4.1 Perfil de las temperaturas implementadas en el TD/RT-PCR.

Pasos	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)
A (retrotranscripción)	1	48	45
B (desnaturalización inicial)	1	94	2
C (desnaturalización-hibridación-extensión)	30	94-55*-68	1-1-1
D (extensión final)	1	68	5

* Debido a que se trata de un protocolo “touchdown” en el paso C el primer ciclo de hibridación se realizó a 55 °C y los ciclos posteriores se redujo la temperatura paulatinamente en 0,5 °C

4.2. Interpretación de resultados

Los productos de amplificación obtenidos fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% y al 1,7% teñidos con bromuro de etidio, colocados a diferentes voltajes y durante distintos períodos de tiempo. Finalmente se logró optimizar la concentración del gel en 1,7% de agarosa, así como los tiempos de electroforesis y la cantidad de voltaje requerido para la adecuada migración de los fragmentos de ADNc amplificados. Una vez gelificado, se colocó en la cámara de electroforesis y se cubrió completamente con buffer TAE 1X.

Para realizar la separación electroforética, cada muestra sometida a la amplificación por PCR se mezcló con 3 μ l de solución de carga 6X (Anexo 3) y de cada una de las muestras se cargaron 25 μ l en los pozos del gel. La electroforesis se realizó en una cámara de electroforesis BIO-RAD durante 75 minutos a 75 Voltios y 400 mA. La visualización de la electroforesis fue obtenida mediante la exposición de los geles a luz UV en el transiluminador. Para comparar el tamaño aproximado de las bandas generadas en el gel se utilizaron 6 μ l del marcador de peso molecular GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas). Los geles fueron analizados mediante el Sistema Edas 290 de captura digital (Kodak).

4.3. Recolección de muestras en los viveros

Las muestras de orquídeas se tomaron de dos viveros ubicados en el cantón de Alajuela, provincia de Alajuela. El vivero con el código A corresponde a una colección de orquídeas, compuesta predominantemente de híbridos de *Cattleya*, mientras que en el vivero B se encuentran orquídeas para colección y para comercialización, especialmente especies de *Cattleya* y *Phalaenopsis*.

Para la recolección de las muestras, se cortaron segmentos de hoja de plantas con síntomas de virulencia y plantas asintomáticas, tomadas mediante muestreo al azar de diferentes secciones de los viveros. Las muestras se colocaron posteriormente en bolsas de plástico con cierre hermético, se les asignó un código y se almacenaron en una hielera. Para la toma de cada muestra se procedió a desinfectar el cuchillo con el que se cortaron las hojas mediante flameo con etanol al 70%. Seguidamente se cerró la herida en la planta con la aplicación del sellador Agrofixer[®].

Simultáneamente, se le asignó un código para cada muestra en donde se indica el nombre de la especie y síntomas en las hojas, flores y bulbos o rizomas, así como otras características para la identificación de la planta correlacionando sus síntomas con el virus. Para el registro digital de las plantas las hojas fueron fotografiadas con una cámara Canon PowerShot A80.

Una vez en el laboratorio se colocaron las muestras en tubos de ensayo con etanol al 70%, en la cámara de congelación a -30 °C. El resto de las muestras se colocaron en bolsas herméticas en una cámara de enfriamiento Haier a aproximadamente -20°C.

4.4. Análisis viral de las orquídeas provenientes de los viveros

Para los dos viveros seleccionados, se analizaron un total de diez plantas muestreadas al azar para detectar la infección del CymMV y el ORSV mediante la técnica de TD/RT-PCR. Para el vivero A, las muestras escogidas fueron A2, A4, A5, A6, A8, A9, A10, A11, A12 y A13. Por su parte, del vivero B se analizaron las muestras B5, B6, B7, B10, B12, B13, B15, B17, B18 y B21. Se procedió con la extracción de ácidos nucleicos, la retrotranscripción y PCR y la interpretación de resultados de la misma forma que se detalla cuando se realizó la estandarización de la prueba. Adicionalmente, se analizó una planta de *Cymbidium* sp. con síntomas de infección viral con el fin de comparar su sintomatología característica con la presencia de uno o ambos virus, especialmente con el CymMV.

Como controles positivos de la infección viral se utilizaron las plantas de *Brassolaeliocattleya* Blue Grotto 'Blue Luste' [BLC (+)] analizadas mediante ELISA y como control negativo de la infección se utilizaron las plántulas *in-vitro* de *Cattleya skinneri* [CS (-)] analizadas también por la misma prueba.

4.5. Comparación de costos entre la prueba de ELISA y el TD/RT-PCR

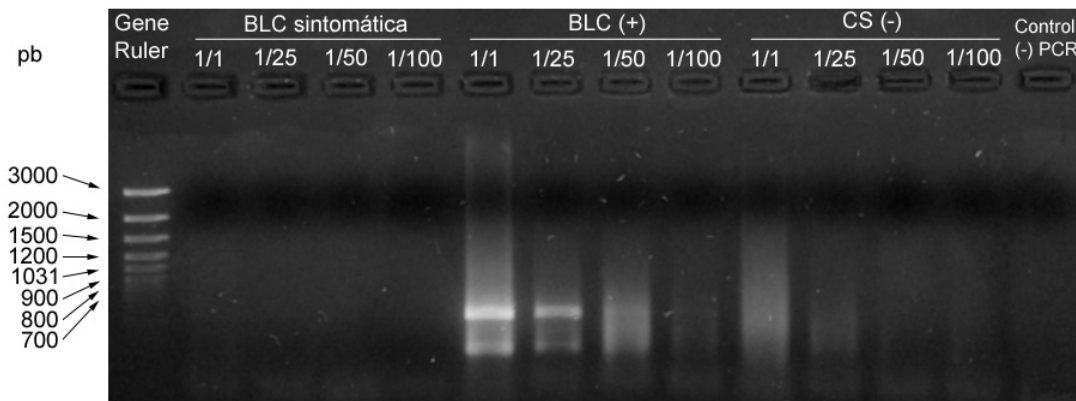
Se realizaron cotizaciones para obtener el precio de los reactivos y material dispensable como puntas para micropipeta y tubos eppendorf necesarios para llevar a cabo la comparación del costo del análisis viral de las muestras por ambos métodos. También se indagó el precio del equipo especializado utilizado para los análisis de ELISA y RT-PCR. Con esta información, se realizó una comparación entre ambos métodos tomando en cuenta que el CIBCM realiza la identificación viral, con un mínimo de 8 muestras, mediante ELISA por un valor de 12 US\$ la muestra (duplicada), incluyendo dos controles positivos y uno negativo.

5. RESULTADOS

5.1. Validación de la técnica TD/RT-PCR para el análisis viral.

Por medio de la implementación de la técnica TD/RT-PCR se amplificó una banda de aproximadamente 534 pb y otra de 290 pb que de acuerdo a lo descrito por Seoh *et al.* (1998) corresponden a los fragmentos amplificados a partir del CymMV el primero, y a partir del ORSV el segundo. De esta manera se logró estandarizar satisfactoriamente la prueba de detección viral mediante para ambos virus. Para ello fue necesario realizar varias pruebas (concretamente con la transcriptasa reversa y la cantidad de ácidos nucleicos por tubo) para comprobar la cantidad de reactivos necesarios para obtener bandas de buena calidad y específicas para ambos virus.

La Figura 5.1 muestra la amplificación de dos bandas por debajo de los 700 pb para la Blc. Blue Grotto 'Blue Luste'. Las bandas se observan con mayor claridad en las muestras más concentradas de ácidos nucleicos totales (1/1 y 1/25), mientras que en las diluciones de 1/50 y 1/100 estas no se aprecian. Por su parte, las muestras de *C. skinneri* y la de *Brassolaeliocattleya* adicional no muestran la aparición de ninguna banda. Sin embargo por la resolución del marcador de peso molecular GeneRuler™ 100 pb DNA Ladder Plus (3 µl) no es posible determinar el tamaño de ambas bandas para correlacionarlas con los tamaños en pb esperados para los virus.

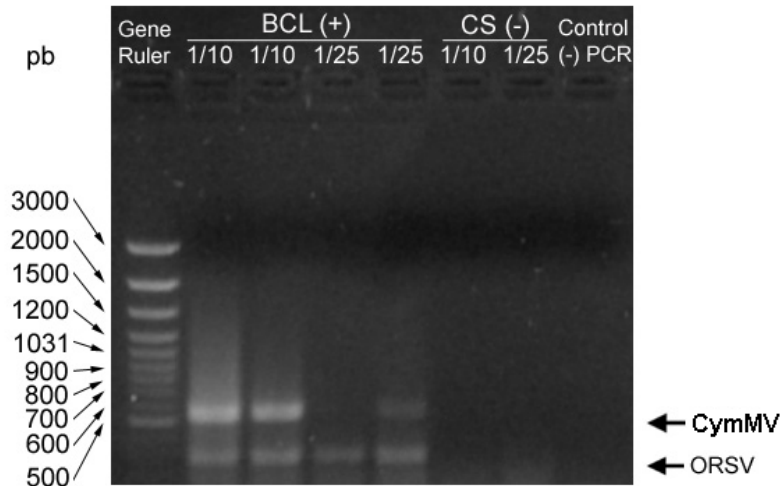


BLC (+): *Brassolaeliocattleya* Blue Grotto 'Blue Luste' infectada
 CS (-): *Cattleya skinneri* sana

Adobe Photoshop

Figura 5.1 Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los fragmentos de ADN viral amplificado mediante TD/RT-PCR con 100 U de Transcriptasa Reversa, aplicado a diferentes diluciones de ácidos nucleicos totales para tres muestras de orquídea.

En la Figura 5.2 se observa nuevamente la aparición de bandas fluorescentes para las diluciones de ácidos nucleicos totales de la Blc. Blue Grotto 'Blue Luste', mientras que para la *C. skinneri* no se observa la amplificación de estas para ninguna de las diluciones utilizadas. Al añadir en esta ocasión 5 µl del marcador de peso molecular se observa un primer fragmento que se encuentra entre los 500 y los 600 pb. Esta banda de aproximadamente 534 pb corresponde al CymMV, mientras que para el fragmento inferior, este debe rondar los 290 pb y pertenece al ORSV; sin embargo la resolución del marcador no permitió definir con claridad del tamaño aproximado de esta segunda banda.



Adobe Photoshop

Figura 5.2 Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los fragmentos de ADN viral amplificado mediante TD/RT-PCR utilizando 50 U de Transcriptasa Reversa para dos diluciones de ácidos nucleicos totales del material infectado y el material sano.

La dilución 1/10 es la que muestra una mejor definición de los fragmentos amplificados a partir del ADNc viral; a pesar de esto, aún se observa algún “ruido de fondo” que se arrastra por el carril en el que se separó la muestra inclusive utilizando la mitad de transcriptasa reversa comparativamente con la primera reacción que se realizó. Debido a esto se estandarizó el protocolo utilizando 20 U de transcriptasa reversa y una dilución 1/15 de ácidos nucleicos totales.

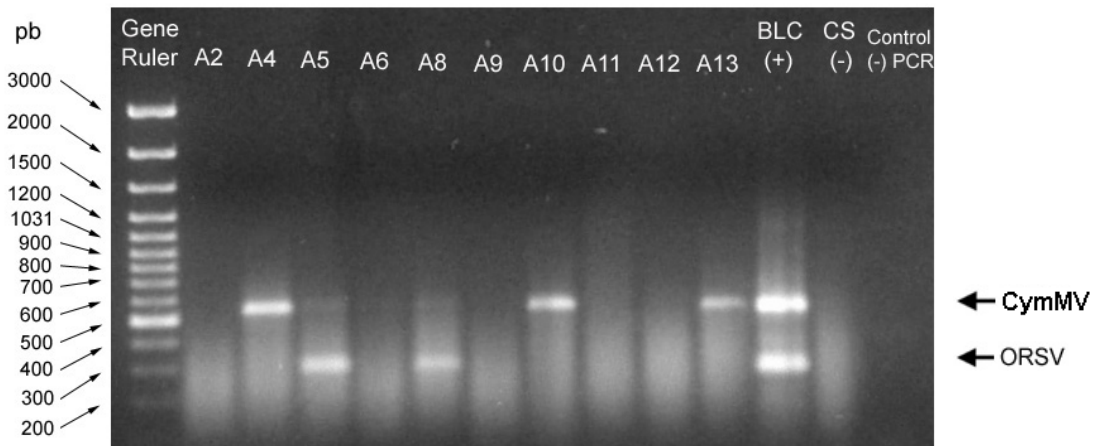
5.2. Análisis viral de las orquídeas provenientes de los viveros

5.2.1 Vivero A

De las diez plantas analizadas en el vivero A, el 50% presentó alguno de los dos tipos de infección viral, en tanto que el 50% restante resultó negativo para la prueba realizada (Cuadro 5.1). De estas, tres orquídeas resultaron infectadas solamente con el CymMV, mientras que solo dos presentaron infección con el ORSV (Figura 5.3). Por su parte, no se encontraron infecciones mixtas en ninguna de las plantas examinadas.

Cuadro 5.1. Tipo de infección viral que se encontró en las especies de orquídeas analizadas para el vivero A.

Código	Especie	CymMV	ORSV
A2	<i>Cattleya trianae</i>	-	-
A4	<i>Cattleya maxima</i>	+	-
A5	<i>Cattleya</i> híbrida	-	+
A6	<i>Cattleya</i> burana beauty	-	-
A8	<i>Cattleya</i> híbrida	-	+
A9	<i>Cattleya</i> tutankamon	-	-
A10	<i>Cattleya</i> yellow button	+	-
A11	<i>Oncidium fuscatum</i>	-	-
A12	<i>Prostechea tardiflora</i>	-	-
A13	<i>Cattleya</i> híbrida	+	-



Adobe Photoshop

Figura 5.3 Electroforesis en gel de agarosa al 1,7% de los fragmentos de ADN viral correspondientes al CymMV y al ORSV amplificados mediante TD/RT-PCR para las 10 orquídeas del vivero A.

Como se observa en el Cuadro 5.1, la mayoría de las plantas analizadas correspondieron a especies e híbridos de *Cattleya*. Solamente se incluyeron en los análisis dos plantas de géneros diferentes a este, encontrándose ambas libres de virus al aplicar la prueba de detección viral mediante TD/RT-PCR.

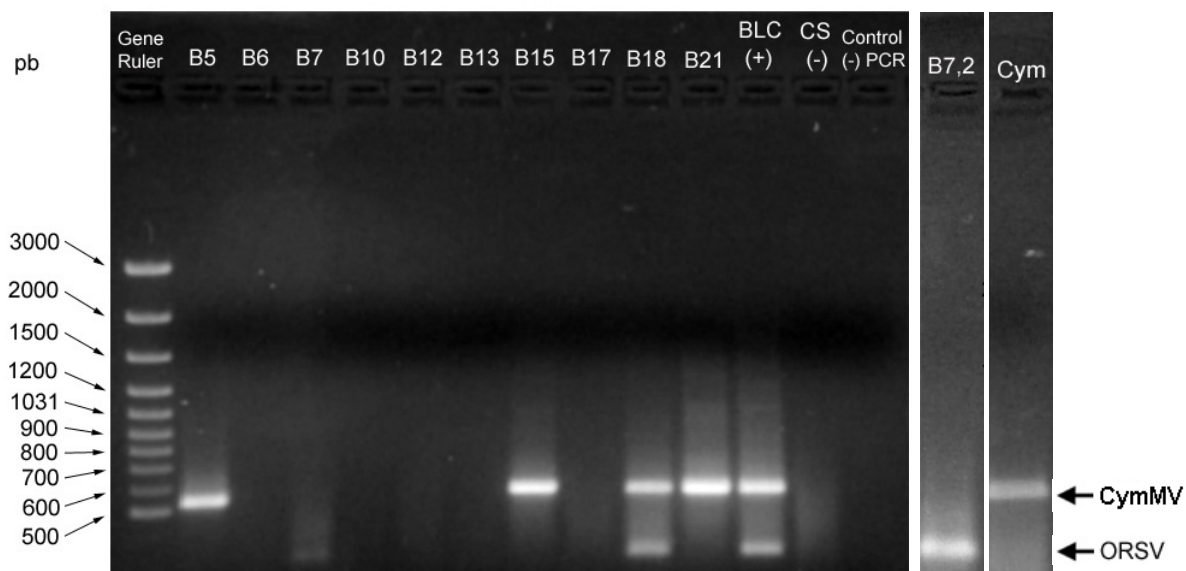
5.2.2 Análisis del vivero B

En el vivero B se determinó la infección por ambos virus en el 50% de las plantas evaluadas. De estas, tres resultaron contagiadas con el CymMV únicamente y solamente una orquídea presentó infección individual con el ORSV. De igual manera, tan solo una planta presentó contaminación mixta con ambos virus (Cuadro 5.2).

Cuadro 5.2 Tipo de infección viral encontrada en las 10 especies de orquídeas analizadas para el vivero B.

Código	Especie	CymMV	ORSV
B5	<i>Cattleya intermedia</i>	+	-
B6	<i>Laelia juvelis</i>	-	-
B7	<i>Cattleya forbesii</i>	-	+
B10	<i>Phalaenopsis</i> Pink Stripes	-	-
B12	<i>Phalaenopsis</i> Golden Peoker	-	-
B13	<i>Phalaenopsis</i> Little Fly	-	-
B15	<i>Lycaste aromatica</i>	+	-
B17	<i>Brassolaeliocattleya</i> tierra de amor	-	-
B18	<i>Laelia lobata</i>	+	+
B21	<i>Enciclya alata</i> x <i>Enciclya cordigera</i>	+	-

En la Figura 5.4 se observa, en la muestra B7, una ligera banda de igual tamaño a los fragmentos amplificados observados para el ORSV. Para corroborar la posible infección por dicho virus la muestra se analizó nuevamente en otro gel con las mismas condiciones y el resultado se presenta en el carril B7,2 observándose que esta orquídea estaba infectada por el virus de la mancha anillada de *Odontoglossum*. También se muestra el carril adicional que se corrió para una muestra de *Cymbidium* sp. sintomática con el fin de correlacionar la sintomatología del CymMV con la planta de donde se aisló y se nombró inicialmente dicho virus.



Adobe Photoshop

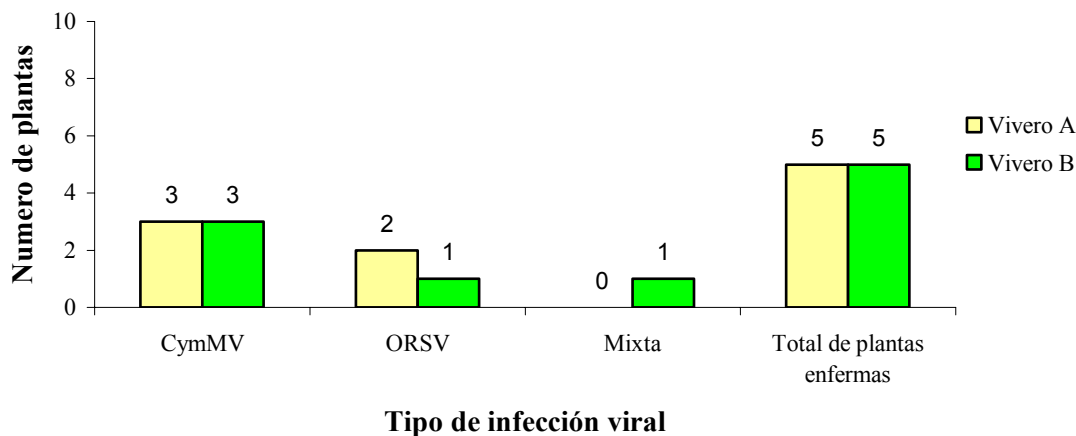
Figura 5.4 Electroforesis en gel de agarosa al 1,7% de los fragmentos de ADN viral correspondientes al CymMV y al ORSV amplificados mediante TD/RT-PCR para las 10 orquídeas del vivero B y para un espécimen de *Cymbidium* (Cym) con síntomas evidentes de infección viral.

Las plantas examinadas en el vivero B fueron en general de diversas especies, sin embargo predominaron los géneros *Phalaenopsis* y *Cattleya*. De este último, ambas muestras resultaron ser positivas para uno de los dos virus, mientras que las tres *Phalaenopsis* analizadas que se cultivan para la posterior venta se encontraron libres de ambos virus. El híbrido de *Enciclya alata* x *Enciclya cordigera* fue la única planta en todo el estudio infectada con el CymMV y el ORSV a la misma vez.

5.3. Comparación entre los dos viveros

Al realizar la comparación entre los dos viveros seleccionados, se observó que en ambos se encontraron plantas infectadas con el CymMV así como con el ORSV. Se determinó que tanto en el vivero A como en el vivero B el 50% de las muestras evaluadas se encontraron infectadas ya sea para uno o para ambos virus; no obstante, en el vivero B se encontró mayor

número de infecciones al presentar una de las muestras una infección mixta con el CymMV y el ORSV (Figura 5.5).



Microsoft Excel

Figura 5.5 Comparación del número de plantas infectadas y el tipo de infección viral entre el vivero A y el vivero B.

En los dos viveros se encontró que la mayoría de plantas enfermas con infección simple (6 en total) se encontraban contaminadas por el virus del mosaico del *Cymbidium*, mientras que solamente en tres plantas se determinó la presencia aislada del virus de la mancha anillada de *Odontoglossum*.

5.4. Sintomatología ocasionada por la infección viral.

Se observó que no todas las plantas que mostraron evidencia de síntomas en alguno de los órganos vegetales examinados, se encontraron necesariamente contagiadas con al menos uno de los dos tipos de virus analizados. También se hallaron algunas plantas que no mostraron sintomatología alguna; sin embargo, el análisis viral mediante TD/RT-PCR permitió determinar la infección por el CymMV o el ORSV al ser analizados por medio de TD/RT-PCR (Cuadros 5.3 y 5.4).

Cuadro 1.3 Sintomatología observada en las especies de orquídeas del vivero A y su relación con el CymMV y el ORSV.

Código y especie	Síntomas en la hoja	Síntomas en la Flor	Síntomas en bulbo o rizoma	Virus
A2 <i>Cattleya trianae</i>	Manchado necrótico.	Flor deforme y arrugada, con patrones de pigmentación diferentes	Manchado necrótico	-
A4 <i>Cattleya maxima</i>	Amarillamiento con puntos rojizos generalizados	Botones florales deformes. Patrones desordenados de pigmentación	S.S.	CymMV
A5 <i>Cattleya híbrida</i>	Amarillamiento. Parches necróticos	S.F.	S.S.	ORSV
A6 <i>Cattleya burana beauty</i>	Amarillamiento. Parches necróticos sobre todo en el envés	S.F.	S.S.	-
A8 <i>Cattleya híbrida</i>	Amarillamiento. Rayado y moteado necrótico. Venas engrosadas	S.F.	S.S.	ORSV
A9 <i>Cattleya tutankamon</i>	S.S.	S.F.	S.S.	-
A10 <i>Cattleya yellow button</i>	S.S.	S.F.	S.S.	CymMV
A11 <i>Oncidium fuscatum</i>	S.S.	S.F.	S.S.	-
A12 <i>Prostechea tardiflora</i>	Clorosis en las venas. Parches y moteado necróticos hundidos. Amarillamiento	S.F.	S.S.	-
A13 <i>Cattleya híbrida</i>	Deformación de la hoja. Manchas necróticas. Moteado clorótico. Amarillamiento.	S.F.	S.S.	CymMV

S.S.: Sin síntomas aparentes

S.F.: Sin flor

Cuadro 5.4 Sintomatología observada en las especies de orquídeas del vivero B y su relación con el CymMV y el ORSV.

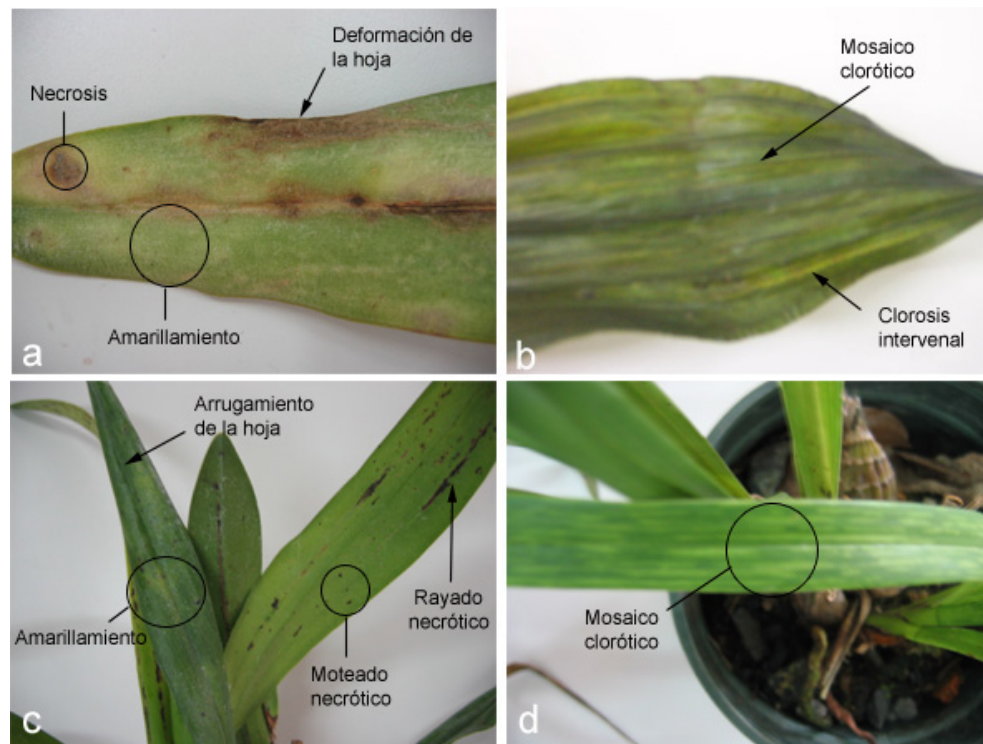
Código y especie	Síntomas en la hoja	Síntomas en la Flor	Síntomas en bulbo o rizoma	Virus
B5 <i>Cattleya intermedia</i>	S.S	S.F.	S.S.	CymMV
B6 <i>Laelia juvelis</i>	Hoja arrugada. Manchas anilladas cloróticas	S.F.	S.S.	-
B7 <i>Cattleya forbesii</i>	Amarillamiento y parches cloróticos	Flores deformes. Sépalos arrugados	S.S.	ORSV
B10 <i>Phalaenopsis</i> Pink Stripes	S.S	S.F.	S.S.	-
B12 <i>Phalaenopsis</i> Golden Peoker	S.S	S.S.	S.S.	-
B13 <i>Phalaenopsis</i> Little Fly	S.S	S.F.	S.S.	-
B15 <i>Lycaste aromatica</i>	Mosaico y clorosis intervenal	S.F.	S.S.	CymMV
B17 Blc tierra de amor	S.S	S.F.	S.S.	-
B18 <i>Laelia lobata</i>	Amarillamiento. Hoja arrugada y acucharada. Rayado necrótico y moteado clorótico. Manchas rojas con forma de anillo	S.F.	Estriado y moteado necrótico. Amarillamiento	CymMV/ ORSV
B21 <i>Enciclya alata x cordigera</i>	Hoja arrugada. Amarillamiento. Manchado y rayado necrótico. Anillos necróticos.	S.F.	S.S.	CymMV

S.S.: Sin síntomas aparentes
S.F.: Sin flores

De forma general, los síntomas que se presentaron más frecuentemente en las orquídeas infectadas con el CymMV fueron el amarillamiento, el manchado y rayado necrótico. En algunas ocasiones se pudo observar mosaico y moteado cloróticos; en la flor de *C. maxima* se notó la presencia de deformaciones del botón floral (Figura 5.6). De manera similar, el amarillamiento y la necrosis localizada de algunos tejidos fueron la sintomatología que más se presentó en infecciones individuales del ORSV (Figura 5.7). También se presentó en una ocasión el engrosamiento de las venas y arrugado de los sépalos de la flor de *C. forbesii*. Solamente para el CymMV se encontraron plantas asintomáticas.

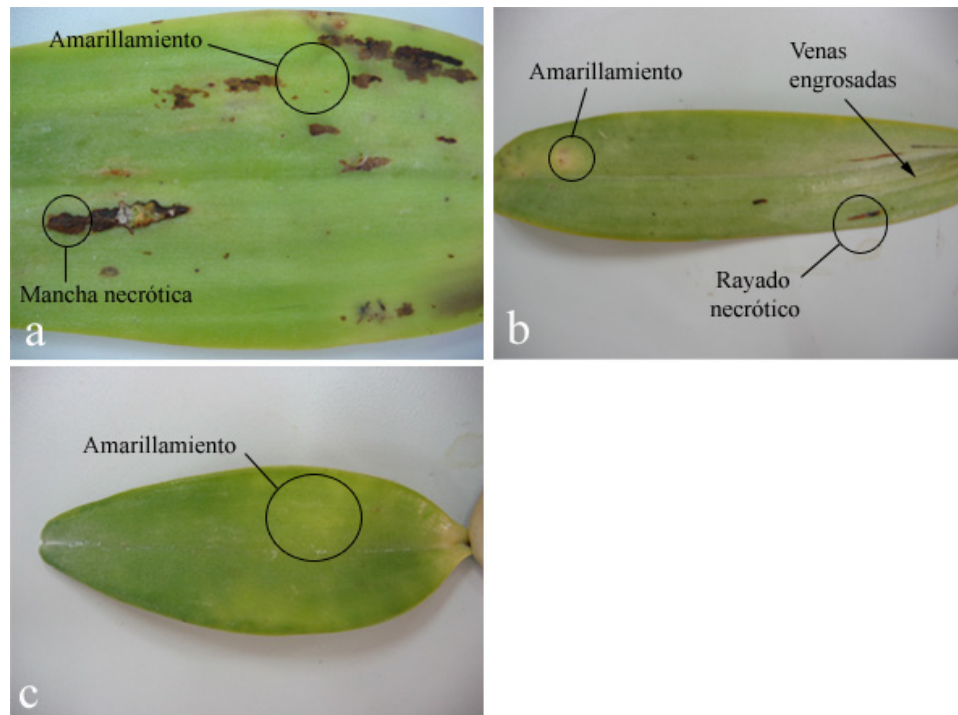
La muestra de *Cymbidium* sp. que resultó positiva para la infección con el CymMV, mostraba un mosaico clorótico evidente característico de esta enfermedad, así como la presencia de algunas manchas necróticas dispersas (Figura 5.6).

Finalmente, la muestra de *Laelia lobata* del vivero B que se encontró con infección mixta de ambos virus, presentó una combinación aparente de los síntomas de ambas enfermedades (Figura 5.8).



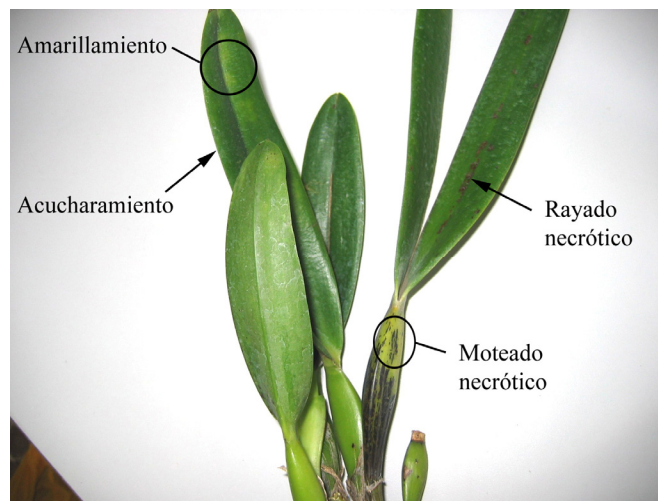
Adobe Photoshop

Figura 5.6. Sintomatología ocasionada por infecciones simples del virus del mosaico de *Cymbidium* (CymMV). a. *Cattleya* híbrida; b. *Lycaste aromatica*; c. *Enciclya alata* x *Enciclya cordigera*; d. *Cymbidium* sp.



Adobe Photoshop

Figura 5.7 Sintomatología ocasionada por infecciones simples del virus de la mancha anillada de *Odontoglossum* (ORSV). a y b. Dos diferentes híbridos del género *Cattleya*; c. *Cattleya forbesii*.



Adobe Photoshop

Figura 5.8 Síntomas observados en *Laelia lobata* con infección mixta del CymMV y el ORSV.

5.5. Comparación de costos entre el ELISA y el TD/RT-PCR

En el Cuadro 5.5 muestra la comparación entre el costo del análisis viral para el CymMV y el ORSV en una muestra de orquídea mediante las técnicas de ELISA y TD/RT-PCR. Ambas muestras incluyen dentro del precio sus respectivos controles positivos y negativos y las repeticiones por duplicado en el caso del ELISA y por triplicado en el caso del RT-PCR. Los precios individuales por reactivo para el análisis de una muestra se detallan en el Anexo 4.

Cuadro 5.5 Comparación entre el precio de un ELISA y el precio relativo del TD/RT-PCR para el análisis del CymMV y el ORSV.

Rubro	Costo ELISA (\$)	Costo RT-PCR (\$)
- Reactivos		7,31
- Material dispensable	24,00 ^a	0,36
- Costos por controles		1,27
- Mano de obra		3,44
Total	24,00	12,38

^a. El análisis individual de cada uno de los virus tiene un valor de 12 US\$

Se observa de manera evidente que el costo de análisis de ambos virus tiene un valor de casi la mitad para el RT-PCR en comparación con el ELISA, al poder la primera de estas técnicas detectar los virus de manera simultánea. El costo de la mano de obra se calculó para un total de las ocho horas de trabajo necesarias para llevar a cabo la extracción de ácidos nucleicos totales, el TD/RT-PCR y la electroforesis de 5 muestras de orquídeas. También se presenta una comparación entre el equipo y el precio por equipo, necesarios para montar una prueba de ELISA y un RT-PCR (Cuadro 5,6).

Cuadro 5.6 Costos de los equipos utilizados para los análisis por ELISA y TD/RT-PCR

ELISA		PCR	
Equipo	Precio (\$)	Equipo	Precio (\$)
Lector	8000	Termociclador	8000
Micropipetas (x 3)	540	Micropipetas (x 4)	720
		Microcentrífuga	1680
		Cámara de electroforesis y fuente de poder	950
		Transiluminador UV	1160
Total	8540	Total	12510

Nota: datos obtenidos de www.sigmaaldrich.com y www.fishersci.com.

Al realizar la comparación entre los precios de los equipos necesarios para llevar a cabo las pruebas de detección viral por ambas técnicas, equiparar un laboratorio de biotecnología ya establecido (con equipo básico como cristalería, autoclave, microondas, fregaderos, destilador de agua, etc.) para poder realizar las pruebas de ELISA resulta casi una tercera parte más barato que equiparlas con el equipo necesario para realizar las pruebas de extracción de ácidos nucleicos, PCR y electroforesis.

6. DISCUSIÓN

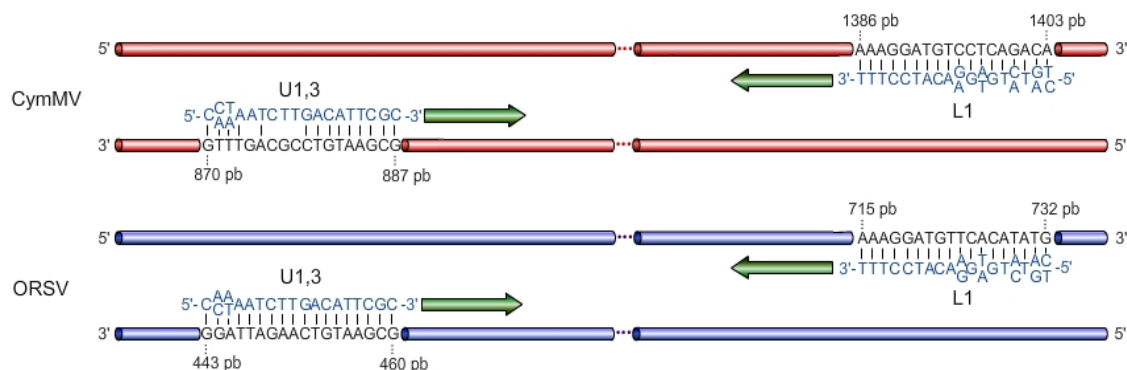
El control efectivo de las infecciones virales en orquídeas depende de la selección y propagación de plantas libres de virus y la erradicación de especímenes contaminados (Hsu *et al.*, 1992). La existencia de plantas asintomáticas y la facilidad de infección de los virus; por transmisión mecánica, vectores naturales o por semilla en las colecciones de orquídeas, hacen necesario que el manejo apropiado de las enfermedades virales deba basarse en un eficiente diagnóstico del tipo de infección. En este estudio se logró estandarizar un protocolo de detección simultánea del CymMV y ORSV basado en la técnica TD/RT-PCR propuesta por Seoh *et al.* (1998), y se logró aplicar para el análisis viral de los dos viveros estudiados.

6.1. Validación de la técnica TD/RT-PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica simple, rápida y altamente sensitiva para la detección del CymMV (Lim *et al.*, 1993). Mediante la variante de touchdown acoplada al RT-PCR desarrollada por Seoh *et al.* (1998) fue posible utilizar un solo par de oligonucleótidos degenerados en algunas bases específicas para detectar tanto el CymMV como el ORSV simultáneamente y de una manera igual de eficiente para los dos.

Mediante el protocolo de touchdown, la disminución en la temperatura de hibridación genera un rango que permite la unión de los oligonucleótidos en el ADNc retrotranscrito de ambos virus. Los sitios de unión de los primers U1,3 y L1 específicos con el CymMV poseen un mayor %GC (porcentaje de guaninas y citosinas) que los sitios de unión entre los mismos primers y la secuencia del ORSV. A mayores temperaturas de hibridación estos iniciadores se alinearán primero con el CymMV y por lo tanto las condiciones de PCR favorecerán la amplificación del segmento específico del CymMV por sobre el ORSV. Sin embargo, el hecho clave que resuelve este problema es que el oligo U1,3 es más específico para el ORSV que

para el CymMV, compensando este problema y permitiendo un buen rendimiento en la amplificación de ambos virus (Seoh *et al.*, 1998) (Figura 6.1).



Fuente: Seoh *et al.* (1998).

Adobe Photoshop

Figura 6.1 Alineamiento de los primers degenerados U1,3 y L1 en las secuencias nucleotídicas del ADNc de los virus CymMV y ORSV.

Dos de los parámetros clave que se analizaron y se modificaron fueron la concentración de ácidos nucleicos totales y la cantidad de enzima transcriptasa reversa necesaria para llevar a cabo la reacción. El primer gel obtenido (Figura 5.1), muestra que desde la primera prueba realizada se obtuvieron dos bandas muy claras en las diluciones 1/1 y 1/25 de ácidos nucleicos totales para el material vegetal infectado con el CymMV que fue analizado mediante ELISA. La aparición de la segunda banda permite sospechar que también el material fue infectado por el ORSV; aún así, la resolución del marcador no permitió afirmar este hecho con certeza al no poder estimar correctamente el tamaño de las bandas.

Tanto los carriles con las diluciones 1/1, 1/25 y 1/50 de ácidos nucleicos totales para la Blc infectada mostraron mucho ruido de fondo en forma de un parchón fluorescente que se extendió por el carril. Este rastro o mancha es debido usualmente a un exceso de ADN de diferentes tamaños que se cargan en el pozo (Ausubel *et al.*, 1995). Sin embargo, debido a que en la reacción de RT-PCR se agregaron ácidos nucleicos totales, la mancha puede

corresponder a una mezcla de ADN vegetal, ARN vegetal y viral y ADNc vegetal retrotranscrito producto de la gran cantidad de transcriptasa reversa que se cargó para la reacción.

Dada esta situación, para la segunda prueba se decidió trabajar con diluciones 1/10 y 1/25 y la mitad de transcriptasa reversa. Este segundo gel (Figura 5.2) mostró la primera banda entre los 500pb y los 600pb, por lo que se correlaciona con el segmento de 534pb esperado para la amplificación del ADNc del CymMV. El segundo fragmento en el gel, corresponde al segmento de aproximadamente 290pb producto del ORSV, aunque el marcador no permitió estimar su tamaño. Los controles negativos de reacción (CS (-)) y negativo de PCR no mostraron la formación de alguna banda tanto en el primer gel de la Figura 5.1 como en el de la Figura 5.2. Debido a esto se afirma que estos fragmentos en la matriz de agarosa son producto de la amplificación de segmentos de los ADNc de ambos virus.

En la primera repetición, la dilución 1/25 no evidenció una banda específica para el CymMV. Varios problemas en la reacción de PCR pueden causar que no se presente esta amplificación. Algunos de estos problemas son el uso de cantidades inadecuadas de $MgCl_2$, poca cantidad del molde de ADNc, la presencia de inhibidores enzimáticos presentes en la reacción, temperaturas de hibridación muy altas o muy bajas, degradación de los oligos e inclusive errores en el pozo específico del termociclador en el que se colocó la muestra (Roche Diagnostic Corporation, 2003).

A pesar de que las bandas de la dilución 1/10 se observaban con más claridad que las de la dilución 1/25 de ácidos nucleicos totales para la Blc (+), aún se observó mucho ruido de fondo. Por esta razón se decidió estandarizar la reacción con una dilución 1/15 y con aún menor cantidad de retrotranscriptasa. Debido a que la presentación en que esta enzima fue entregada por la casa matriz (Fermentas) fue una concentración de 200 U/ μ l, se decidió agregar 20 U de esta enzima para así evitar tener que utilizar mezclas de reacción muy grandes y para evitar pipetear cantidades muy pequeña de enzima (0.1 μ l) aumentando el error por

pipeteo. Así mismo, se decidió también aumentar la concentración del gel a 1,7% de agarosa, aumentar el tiempo de corrida y disminuir el voltaje de 75V a 65V para lograr aumentar la resolución de las bandas en las electroforesis.

6.2. Análisis viral de los viveros

Los resultados obtenidos con el total de muestras analizadas en los dos viveros, muestran que un 50% de las orquídeas analizadas presentaban infección por alguno de los dos virus, de los cuales el CymMV se encontró con más frecuencia sobre la infección por el ORSV (30% y 15% del total de plantas analizadas respectivamente). Esto concuerda con las investigaciones realizadas en Florida, Lousiana y Carolina del Sur (EUA) (Wisler *et al.*, 1982), en la Polinesia Francesa (Wisler *et al.*, 1987), Hawai (Hu *et al.*, 1993) y en Tailandia (Tanaka *et al.*, 1997) en donde, a pesar de que ambos virus se encuentran distribuidos a nivel mundial, el CymMV se encontró con mayor prevalencia que el ORSV. Sin embargo, en estos estudios se encontró también mayor prevalencia de infecciones mixtas de ambos virus que infecciones simples del ORSV, mientras que en esta investigación solamente se encontró una infección mixta.

El vivero B presentó una mayor cantidad de infecciones virales que el vivero A, ya que en este se encontró una infección mixta de ambos virus. Ambos viveros son de tipos distintos; mientras que el vivero A corresponde a una colección privada de orquídeas, el vivero B tiene varias secciones en donde se encuentran tanto orquídeas de colección como plantas para la comercialización.

La forma más común de transporte del virus a largas distancias es por tejidos enfermos intercambiados entre los viveros (Rivera, 1998). En este sentido, los coleccionistas de orquídeas tienden ocasionalmente a intercambiarse nuevos especímenes entre ellos por medio de la propagación vegetativa ayudando a dispersar los virus en plantas enfermas. Además, algunos coleccionistas suelen conservar las orquídeas infectadas a pesar de que estas muchas

veces presentan síntomas evidentes e inclusive a pesar de saber con certeza que la planta se encuentra infectada*. Algunas veces, por desconocimiento, confunden los síntomas virales en la flor de algunas plantas con características distintivas de la especie. Este hecho sucedió con el propietario del vivero A, quien comentaba que la flor de su *C. maxima* que presentaba un gran tamaño, pero con arrugado y patrones desordenados de pigmentación correspondía a la flor común que siempre producía esta especie.

Por otra parte las plantas para la comercialización del vivero B son cuidadosamente evaluadas para comprobar que no posean síntomas virales, y si se tiene sospecha que alguna planta se encuentra infectada, se elimina inmediatamente. Las orquídeas que se comercializan en este vivero son especialmente de los géneros *Phalaenopsis* y *Cattleya*. Debido a que las plantas sintomáticas son evaluadas previamente, esta es una razón por la que ninguna de las *Phalaenopsis* analizadas resultó positiva para la infección con el CymMV o el ORSV. Por otra parte, en las catleas analizadas, la *C. intermedia* y la *C. forbessi* resultaron estar infectadas con el CymMV y el ORSV respectivamente. La *C. forbessi* ya había sido identificada por el propietario del vivero, por lo que estaba por ser eliminada. Pero la *C. intermedia* (asintomática) si resultó ser una sorpresa pues los propietarios no la tenían identificada como enferma.

Solamente dos especies de las plantas analizadas son nativas de Costa Rica: la *Prosthechea tardiflora* del vivero A y la *Lycaste aromatica* del vivero B; esta última resultó con infección simple por el CymMV. El resto de plantas, son híbridos y especies traídas del extranjero directamente o que fueron insertadas en otros viveros. Es en este transcurso en donde las plantas se vieron posiblemente expuestas a la infección e igualmente pudieron servir de inóculo de las partículas para la infección de otras plantas.

* MOREIRA, L. Virus comúnmente encontrados en orquídeas. CIBCM. (Comunicación personal).

6.3. Sintomatología ocasionada por la infección de los virus

Los síntomas que puedan presentar las plantas, así como su nivel de expresión, dependen en gran medida de factores ambientales como la temperatura, la luz, el nivel de agua en la planta y la fertilización. De esta manera, estos factores de estrés abiótico unido al estrés biótico que genera la multiplicación del virus y la cantidad de carga viral presente en la planta, actuando conjuntamente y generando síntomas virales más severos (He *et al.*, 2004).

Respecto a la sintomatología de los virus, los síntomas más comunes que se observaron en infecciones individuales con el CymMV fueron amarillamiento y necrosis en forma de manchas y rayas localizadas. Además en algunas ocasiones se presentó mosaico y moteado clorótico localizado, así como deformación del botón floral. Los síntomas generales de las plantas enfermas resultan de la interacción entre el efecto depresivo producto de la multiplicación del virus en la planta huésped y la reacción defensiva de la misma (Cornuet, 1992). Este amarilleo en las plantas infectadas por virus en general se debe a que estos se multiplican en los tejidos vasculares y perturban las funciones conductoras de la planta. También pueden bloquear el metabolismo de los azúcares y ocasionar la acumulación de almidón en la hoja. Las manchas y el estriado clorótico y necrótico pueden ser ocasionados como una reacción de defensa del huésped, que provoca la muerte de las células y a veces la localización del virus. El mosaico clorótico fue ocasionado por la acción de los virus a nivel de cloroplastos y cromoplastos con localización del efecto en ciertas zonas de la hoja (Cornuet, 1992).

Por otra parte, en las plantas con infección por el ORSV la sintomatología más común observada fue el amarillamiento y la necrosis localizada. También, en una ocasión se presentó la deformación del botón de la flor y un engrosamiento en las venas. Este último síntoma es provocado en parte porque el virus genera un bloqueo localizado del alargamiento celular y por lo tanto ocasiona un crecimiento anormal del resto del limbo (Cornuet, 1992).

No se pudo determinar si alguna de las orquídeas infectadas presentaba un evidente enanismo y disminución en el crecimiento, pues no se contaban con orquídeas de la misma especie que pudieran servir como patrones de comparación. Entre las orquídeas infectadas con el CymMV se encontraron asintomáticas la *Cattleya yellow button* del vivero A y la *Cattleya intermedia* del vivero B. Dicha característica puede deberse a la cepa específica del virus que se encuentre infectándola, la tolerancia genética del hospedero específico o porque el medio ambiente no es propicio para el desarrollo de síntomas. Además, las orquídeas recién infectadas suelen presentar síntomas transcurrido un tiempo, por lo que es posible que la infección en estas fuera demasiado reciente como para detectarla (Lawson, 2002).

En cuanto a la planta de *Laelia lobata* con infección mixta, la sintomatología que presentaba tenía características del CymMV como el rayado necrótico muy marcado, así como el manchado color marrón con formas concéntricas propio del ORSV, que se mostraba ocasionalmente en el envés de la hoja. Esta diversidad de síntomas se debe a que en las plantas con infección simultánea, los virus provocan síntomas más severos y por tanto estas pueden presentar un mosaico de síntomas variables entre sí (University of Illinois, 1990; Zettler *et al.*, 1990).

Tanto en las plantas de *Cattleya trianae*, *Cattleya burana beauty* y *Prostechea tardiflora* de l vivero A, como en la *Laelia juvelis* del vivero B, no se logró relacionar sus sintomatología con ninguno de los virus incluidos en la investigación. Una razón de esto es que algunos síntomas similares a los observados, son muchas veces producidos por daños producidos por trips y áfidos cuando se alimentan de las hojas, así como por deficiencias nutricionales o enfermedades fúngicas (University of Illinois, 1990). También, cabe la posibilidad que tales plantas se encuentren infectadas por alguno de los otros tipos de virus que se encuentran infectando orquídeas (Lawson, 2002). Debido a esto resulta importante para el diagnóstico en orquídeas contar con un sistema de identificación viral que incluya una amplia gama de estos agentes fitopatógenos.

6.4. Comparación entre las técnicas de ELISA y RT-PCR para detección viral

Al realizar la comparación entre las técnicas de ELISA y el RT-PCR, ambas técnicas poseen sus ventajas y desventajas. El ELISA es una técnica muy utilizada en muchos casos de diagnóstico viral, especialmente para probar una gran cantidad de muestras en un período relativamente corto de tiempo debido a su adaptabilidad, sensibilidad y economía; no obstante, muchos factores pueden influenciar la sensibilidad y confiabilidad de la prueba, incluyendo la calidad de los anticuerpos, preparación y almacenamiento de los reactivos, el tiempo y la temperatura de incubación, la selección de la muestra y el uso de soluciones de extracción adecuadas (Naidu y Hughes, s.f.)

Los procedimientos basados en la reacción en cadena de la polimerasa se consideran también una técnica simple, rápida y altamente sensitiva para la detección de virus en orquídeas (Lim *et al.*, 1993). La prueba tarda menos en realizarse que el ELISA pero según Eun *et al.* (2002) tiene un costo por muestra analizada más alto que el costo del ELISA; aún así, el PCR ofrece algunas otras ventajas sobre los métodos serológicos. En primer lugar, las secuencias específicas de los virus se pueden detectar con una pequeña muestra de tejido, siendo 100 mg suficientes para llevar a cabo 10 reacciones. Además, el extracto crudo de ácidos nucleicos puede ser utilizado para RT-PCR sin necesidad de purificación. En tercer lugar, los productos de amplificación son potencialmente útiles para la secuenciación, construcción de sondas y para transformación genética (Ryu *et al.*, 1995).

La sensibilidad que posee la técnica de RT-PCR es uno de los factores clave que destaca sobre la prueba de ELISA. Mediante RT-PCR, es posible detectar inclusive 100 fg de virus por muestra, mientras que la resolución del ELISA solamente le permite detectar el virus hasta 2.5 ng (Eun *et al.*, 2002); sin embargo, esta técnica tiene la desventaja de necesitar de reactivos y equipo costoso, así como de ser una técnica laboriosa que requiere de personal instruido y un previo conocimiento de la secuencia de los virus para el diseño de los oligonucleótidos (Wylie *et al.*, 1993 citado por Jia, 2005).

Respecto a los costos, si la prueba de RT-PCR realizada solo pudiera comprobar la detección de uno solo de los virus, el análisis de una muestra mediante ELISA sería cerca de 0,4 US\$ más barato. A pesar de lo anterior, debido a que la metodología utilizada consta de un protocolo “touchdown/RT-PCR” que permite la detección simultánea del CymMV y el ORSV, la detección de ambos virus resultó mucho más barata por esta técnica que por ELISA.

Si bien el costo por muestra para la detección del CymMV y el ORSV fue menor mediante TD/RT-PCR, la inversión para poder equipar un laboratorio que ya cuente con el equipo básico para realizar este tipo de métodos moleculares es mayor que la inversión necesaria para adquirir el equipo de ELISA. Sin embargo, si el laboratorio ya cuenta con los equipos necesarios para extracción de ácidos nucleicos, PCR y electroforesis, el análisis molecular de estos dos virus mediante la prueba de TD/RT-PCR estandarizada presenta aparte de la ventaja de un menor precio, una mayor sensibilidad, un tiempo relativamente corto de análisis y un procedimiento sencillo al poder detectar simultáneamente los dos virus con la misma metodología. Además, puede diagnosticar un mínimo de 5 repeticiones por triplicado para así obtener una mayor seguridad de los resultados obtenidos.

7. CONCLUSIONES

Se estandarizó un protocolo eficiente para la identificación rápida y simultánea del CymMV y el ORSV mediante TD/RT/PCR.

Se lograron identificar orquídeas de varios géneros infectadas con el CymMV y el ORSV en ambos viveros.

La infección individual por el CymMV prevaleció sobre la infección con el ORSV entre el total de las orquídeas analizadas.

El diagnóstico del CymMV y el ORSV en orquídeas mediante TD/RT-PCR es más sensible, más rápido y cerca de un 48% más barato que el análisis de los mismos virus por ELISA.

8. RECOMENDACIONES

Para el análisis de cada una de las muestras recolectadas de los viveros se recomienda realizar tres repeticiones para aumentar la seguridad de los resultados.

Para llevar a cabo la retrotranscripción se recomienda utilizar una menor cantidad de unidades enzimáticas de transcriptasa reversa o bien solicitar al fabricante una presentación de la enzima más diluída y así ayudar a disminuir el costo por muestra.

9. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- ACO. (Asociación Costarricense de Orquideología) <orquid@racsa.co.cr>. “Géneros de orquídeas de mayor comercialización para exportación”. 12 Jul 2006. e-mail personal. (14/07/06).
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. 1995. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons. Nueva York, EUA.
- Carrington, J., Kasschau, K., Majan, S. y Schaad, M. 1996. Cell-to-Cell and Long-Distance Transport of Viruses in Plants. *The Plant Cell* 8:1669-1681.
- Chacón, J. 2002. Identificación de los virus que afectan orquídeas nativas en dos viveros del Valle Central de Costa Rica. Tesis Lic. Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 79 p.
- Cabezas, S. 2006. Taisuco de Costa Rica. Exportando belleza natural al mundo (en línea). Actualidad Económica N° 341. Consultado 13 set. 2006. Disponible en: www.actualidad.co.cr/341/16.empresas.htm.
- Chia, T. y Chan, Y. 1992. Detection and localization of viruses in orchids by tissue-print hybridization. *Plant Pathology*. 41:255-261.
- Cornuet, P. 1992. Elementos de virología vegetal. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 218 p.
- Don, R.; Cox, P.; Wainwright, B.; Baker, K. y Mattick, J. 1991. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research*. 19(14):1008
- Eun, A. J.-C., Huang, L., Chew, F.-T., Li, S. F.-Y., and Wong, S.-M. 2002. Detection of two orchid viruses using quartz crystal microbalance-based DNA biosensors. *Phytopathology* 92:654-658.
- Gara, I. W., Kondo, H., Maeda, T. Intuye, N. y Tamada, T. 1998. Calanthe Mild Mosaic Virus, a New Potyvirus Causing a Mild Mosaic Disease of *Calanthe* Orchid in Japan. *Phytopathology* 146:357-363.
- García-Rojo, M. y Morillo-Castro, A. 1999. Técnicas de Biología Molecular en el diagnóstico en Dermatología. *Dermatología Peruana*. 9 (Supl. 1): 25-40
- Gibbs, A. y Mackenzie, A. 1997. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. *Journal of Virology Methods* 63:9-16.

- Gibbs, A., Mackenzie, A., Blanchfield, A., Cross, P., Wilson, C., Kitajima, E., Nightinbale, M y Clements, M. 2000. Viruses of orchids in Australia; their identification, biology and control. *Australian Orchid Review*:10-21.
- Gourdel, S. y Leclercq-Le Quillec, F. 2001. Coat Protein Gene of *Cymbidium* mosaic virus from *Vanilla fragrans* in Reunion Island. *Phytopathology* 149:561-564.
- Grisoni, M.; Davidson, F.; Hyrondelle, C.; Farreyrol, K.; Caruana, M. y Pearson, M. 2004. Nature, incidence and symptomatology of viruses infecting *Vanilla tahitensis* in French Polynesia. *Plant Disease* 88:119-124.
- He, J., Ouyang, W. y Chia, T.F. 2004. Growth and photosynthesis of virus-infected and virus-eradicated orchid plants exposed to different growth irradiances under natural tropical conditions. *Physiologia Plantarum* 121:612-619.
- Hu, J. S., Ferreira, S., Wang, M., and Xu, M.Q. 1993. Detection of *Cymbidium mosaic virus*, *Odontoglossum ringspot virus*, *Tomato spotted wilt virus* and a *Potyvirus* infecting orchids in Hawaii. *Plant Disease* 77:464-468.
- Hu, J. S., Ferreira, S., Xu, M. Q., Lu, M., Iha, M., Pflum, E., and Wang, M. 1994. Transmission, movement, inactivation of *Cymbidium* mosaic and *Odontoglossum* ringspot viruses. *Plant Disease* 78:633-636.
- Hsu, H.T., D. Vongsasitorn y R.H. Lawson. 1992. An improved method for serological detection of *Cymbidium* mosaic potexvirus infection in orchids. *Phytopathology* 82:491-495.
- International Committee on Taxonomy of Viruses. 2002. ICTVdB: The Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (en línea). Nueva York, EUA. Consultado 6 set. 2006. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/index.htm>
- Jia, D. 2005. Screening of a Random Peptide Library with CymMV for Potential Development of Diagnostic Kits. Tesis Mag. Sc. Malasia, Malaysia University of Science and Technology. 67 p.
- Kim, J. D., Koo, Y. B. y Chang, M. U. 1998. Genome characterization of a Korean isolate of *Cymbidium* mosaic virus. *Molecules and Cells* 8(2):181-188.
- Lartey, R., Voss, C. y Melcher, U. 1996. Tobamovirus Evolution: Gene Overlaps, Recombination, and Taxonomic Implications. *Molecular Biology and Evolution* 13(10):1327-1338.

- Lawson, R. 2002. Viruses and their control. Florida, American Orchid Society. 124 p. Separatas, Orchid pest and diseases. 74-104.
- Lim, S. T., Wong, S. M., Yeong, C. Y., Lee, S. C. y Goh, C. J. 1993. Rapid detection of *Cymbidium* mosaic virus by the polymerase chain reaction (PCR). *Virological Methods* 41:37-46.
- Madigan, M.; Martinko, J. y Parker, J. 2004. Brock. Biología de los microorganismos. 10 edición. Pearson Educación. Madrid, España. 1011p.
- Moreira, L.; Villalobos, W.; Rodríguez, E. y Rivera, C. 1999. Infección de la orquídea terrestre *Phaius tankervilleae* (Orchidaceae) con el potexvirus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV) en Costa Rica. *Biología Tropical* 47 (3):281-286.
- Naidu, R.A. y Hughes, J.d'A. S.F. Methods for the detection of plant virus diseases. *Plant virology in sub-Saharan Africa*. 233-260.
- Navalinskienė, M., Raugalas, J. Y Samuitienė, M. 2005. Viral diseases of flower plants 16. Identification of viruses affecting orchids (*Cymbidium* Sw.). *Biologija* 2:29-34.
- Ortiz, B. 2002. Identificación de tres especies de potyvirus en orquídeas nativas. Tesis Bach. Cartago, CR. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 69p.
- Ossenbach, C. 2003. Breve historia de la orquideología en Costa Rica. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 96p.
- Pearson, M. y Cole, S. 1986. The Effects of *Cymbidium* Mosaic Virus and *Odontoglossum* Ringspot Virus on the Growth of *Cymbidium* Orchids. *Phytopathology* 117:193-197.
- PROCOMER (Promotora de Comercio Exterior de Costa Rica). 2006. Datos sobre exportación de orquídeas y empresas exportadoras durante el año 2005 y principio del año 2006 (correo electrónico). San José, Costa Rica.
- Rabindran, S.; Robertson, C.; Achor, D.; German-Retana, S.; Holt, C. y Dawson, W. 2005. *Odontoglossum* ringspot virus host range restriction in *Nicotiana glauca* maps to the replicase gene. *Molecular Plant Pathology* 6(4):439-447.
- Rivera, G. 1998. Orquídeas. Generalidades y cultivo. EFUNA. I edición. Heredia, Costa Rica. 266 p.
- Roche Diagnostic Corporation. 2003. PCR Application Hints and Troubleshooting (en línea). Basel, Suiza. Consultado 15 nov. 2006. Disponible en www.roche-applied-science.com.

- Ryu, K. H., Yoon, K.E., y Park, W. M. 1995. Detection of *Cymbidium* Mosaic Virus in Orchids. *Phytopathology* 143:643-646.
- Seoh, M.; Wong, S. y Zhang, L. 1998. Simultaneous TD:RT-PCR detection of *Cymbidium* mosaic potexvirus and *Odontoglossum* ringspot tobamovirus with a single pair of primers. *Journal of Virological Methods*. 72:197-204.
- Tanaka, S., Nishii, H., Ito, S., Kameya-Iwaki, M., and Sommartya, P. 1997. Detection of *Cymbidium* mosaic potexvirus and *Odontoglossum* ringspot tobamovirus from Thai orchids by rapid immunofilter paper assay. *Plant Disease* 81:167-170.
- University of Illinois. 1990. Common virus diseases of orchids (en línea). Report on Plant Disease N° 614. Consultado 27 ago. 2006. Disponible en: http://web.aces.uiuc.edu/vista/pdf_pubs/614.pdf
- Vega, J. y Rivera, R. 2001. Los virus: cómplices para descifrar procesos moleculares en las plantas. *Avance y Perspectiva*. 20: 249-355.
- Webster, C. G., Wylie, S. J., & Jones, M.G. K. (2004). Diagnosis of plant viral pathogens. *Current Science*, 86(12):1604-1607.
- Wisler, G. C., Zettler, F. W., and Mu, L. 1987. Virus infections of *Vanilla* and other orchids in French Polynesia. *Plant Disease* 71:1125-1129.
- Wisler, G. C., Zettler, F. W. y Purcifull, D. E. 1982. A Serodiagnostic Technique for Detecting *Cymbidium* Mosaic and *Odontoglossum* Ringspot Viruses. *Phytopathology* 72:835-837.
- Wong, H.; Yu, H. y Wong, S. 2004. Mutation of Phe50 to Ser50 in the 126/183-kDa proteins of *Odontoglossum* ringspot virus abolishes virus replication but can be complemented and restored by exact reversion. *Journal of General Virology*. 85:2447–2457.
- Zettler, F. W., Ko, N. J., Wisler, G. C., Elliot, M. S., and Wong, S. M. 1990. Viruses of orchids and their control. *Plant Disease*. 74:621-626.

ANEXOS

Anexo 1.

Certificación de la infección por el CymMV en la Blc. Blue Grotto 'Blue Luste' entregada por el CIBCM de la Universidad de Costa Rica

FROM : CIBCM-UCR

PHONE NO. : 506+2073190

Apr. 01 2005 05:19PM P1

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

Teléfono 207-3197, 207-3195
Fax 207-3190

1 de abril de 2005
CIBCM-PCDV-022-2005


Señora
Lorena Franco Mejía
ITCR

Estimada Sra Franco:

Con referencia a las once muestras de *Carleya*, procedentes de la zona de San Carlos, las cuales fueron entregadas en nuestro laboratorio el pasado 11 de marzo, para ser evaluadas mediante prueba de ELISA para determinar la presencia / ausencia del *Cymbidium mosaic virus* (CymMV), me permito informarle:

- los resultados obtenidos de los análisis realizados mostraron que las once muestras fueron positivas para el CymMV,
- las muestras L-011 y L-007 fueron las que mostraron los valores menores en la prueba

Sin otro particular, atentamente,


p/ Lisela Morena Carmona, M.Sc.
Carmen Rivera Herrero, M.Sc.
Coordinadora PCDV-CIBCM

cc: archivo

Anexo 2.

Documento que certifica a la planta de *C. skinneri* como libre de virus entregado por el CIBCM de la Universidad de Costa Rica

11-11-05 11:39

☎ 506 2073190

🏠 CIBCM

📄 001

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

Teléfono 207-3197, 207 3195
Fax 207-3190

11 de noviembre de 2005
CIBCM-PCDV-098-2005

Señora
Ing. Lorena Franco
Instituto Tecnológico de Costa Rica
Fax 460-5738

Estimada Ing. Franco:

Con referencia a las diez muestras de orquídea cultivadas *in vitro*, identificadas del 1 al 10, entregadas en nuestro laboratorio el 7 de noviembre pasado para ser evaluadas mediante la técnica del ELISA para la presencia / ausencia de *Cymbidium mosaic virus* (CymMV).

De acuerdo a los resultados obtenidos me permito informarle que ninguna de las muestras evaluadas fue positiva para el CymMV.

Este informe fue cancelado con la factura 59491.

Sin otro particular, atentamente,

Lisela Mora Carmona, M.Sc.
p./ Carmen Rivera Herrero, M.Sc.
Coordinadora PCDV-CIBCM



cc: archivo

Anexo 3.

Composición de las soluciones empleadas en la extracción, TD/RT-PCR y electroforesis de las muestras.

Solución de extracción CTAB con 0,5% de mercaptoetanol

Reactivo	Cantidad
Bromuro de Cetiltrimetil Amonio (CTAB)	2%
NaCl	1,4 M
Tris HCl pH 8	0,1 M

Autoclavar y añadir 0,5% de 2-mercaptoetanol.

Solución amortiguadora de *Taq* con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10X

Reactivo	Concentración
Tris HCl pH 8,8	750 mM
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	200 mM
Tween 20	0,1 %

Solución amortiguadora de reacción para la transcriptasa reversa RevertAid™ M-MuLV 5X

Reactivo	Concentración
Tris HCl pH 8,3	250 mM
KCl	250 mM
MgCl ₂	20 mM
DTT	50 mM

Solución amortiguadora TAE 10X

Reactivo	Cantidad
Tris Base	0,4 M
Ácido acético glacial	0,2 M
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0,02 M

Solución de carga 6X (Loading Dye)

Reactivo	Concentración
Tris-HCl pH 7.6	10 mM
Azul de bromofenol	0,03%
Azul de xilencianol	0,03%
Glicerol	60%
EDTA	60 mM

Anexo 4.

Análisis de los costos aproximados del material desechable y los reactivos necesarios por muestra para realizar el análisis de los virus CymMV y ORSV mediante RT-PCR.

Materiales y reactivos	Cantidad / Precio (\$)	Cantidad por muestra	Precio por muestra (\$)
<i>Extracción de ácidos nucleicos totales</i>			
- Cloroformo	2,5 L / 31	384 µL	0,00476
- Alcohol etílico (70%)	3,57 L / 13	700 µL	0,00255
- Isopropanol	500 mL / 35,3	~ 600 µL	0,0426
- Bromuro de Cetiltrimetil Amonio (CTAB)	100 g / 36,3	12 mg	0,00297
- NaCl	500 g / 30,3	49 mg	0,00436
- Tris base	2,5 Kg / 381,8	7,27 mg	0,00111
- Mercaptoetanol	25 mL / 70	3,35 µL	0,00938
- Alcohol isoamílico	500 mL / 40,5	~ 16 µL	0,0013
- Acetato de Amonio	250 g / 22	34.65 mg	0,00305
<i>RT-PCR^a</i>			
- Primer 1	46,6 nmol / 21	30 pmol	0,04056
- Primer 2	34,2 nmol / 21	30 pmol	0,05526
- Agua libre de nucleasas	30 mL / 25	2 µL	0,00501
- dNTP's	10 mM / 70	0,2 mM	4,2
- Taq DNA polimerasa	500 U / 110	2 U	1,32
- Transcriptasa reversa	10000 U / 110	20 U	0,66
- Loading Dye 6X	5x1 mL / 28	5 µL	0,084
<i>Material dispensable</i>			
- Puntas para micropipeta 1000 µl	500 u / 6	3 u	0,036
- Puntas para micropipeta 200 µl	1000 u / 10	10 u	0,1
- Puntas para micropipeta 20 µl	1000 u / 14	3 u	0,056
- Tubos eppendorf 1,5 ml	500 u / 9	1 u	0,018
- Tubos para PCR 0,2 ml	1000 u / 50	3 u	0,15
<i>Preparación del gel y electroforesis^b</i>			
- Tris base	2,5 Kg / 381,8	14,05 g	0,43
- Na ₂ EDTA•2H ₂ O	1 Kg / 126	2,16 g	0,054
- Ácido acético glacial	2,5 L / 25	3,32 mL	0,0066
- Agarosa para electroforesis	100 g / 130	0,68 g	0,1768
- Bromuro de etidio	10 mL / 90	0,4 µL	0,00072
- Marcador de peso molecular	50 µg / 50	0,5 µg	0,2
Costo de los reactivos y materiales por muestra			\$ 7,665
Costo de los controles por las 5 muestras			\$ 1,274
Costo de mano de obra (Bach. Univ.) por muestra			\$ 3,438
Costo total para el análisis de ambos virus en una muestra			\$ 12,377

^a. El precio por muestra en los reactivos del RT-PCR se multiplican por 3 ya que una muestra se analiza por triplicado

^b. Cada gel contiene 20 pozos que permite el análisis de 5 muestras por triplicado, por lo que el precio de los reactivos para la electroforesis y preparación del gel se dividen entre 5.

Anexo 5.

Descripción de los virus que se han encontrado infectando especies de la familia orchidaceae.

Virus	Morfología de la partícula	Síntomas descritos	Modo de transmisión	Distribución geográfica
<i>Cymbidium</i> mosaic potexvirus (CyMV)	Bastones flexibles (415-475 x 13-18 nm)	Clorosis y necrosis en hojas. Necrosis y variegado en la flor	Savia, herramientas de corte, macetas y agua de irrigación	Probablemente a nivel mundial
<i>Odontoglossum</i> ringspot tobamovirus (ORSV, TMV-O)	Bastones rígidos (280-320 x 15-24 nm)	Anillos cloróticos, estriado clorótico y necrosis en hojas. Variegado de color oscuro y necrosis en la flor	Savia, herramientas de corte, macetas, agua de irrigación y heridas en la planta	Probablemente a nivel mundial
Bean yellow mosaic virus (BYMV)	Bastones flexibles (750 x 13 nm)	Flores asintomáticas	Savia y áfidos	Japón, Estados Unidos y Alemania
<i>Dendrobium</i> mosaic virus (DeMV)	Bastones flexibles (750 x 13 nm)	Mosaico y malformación en hojas. Jaspeado y deformación de la flor	Savia y áfidos	Japón y Estados Unidos
Clover yellow vein virus (CYVV-C)	Bastones flexibles (750 x 12 nm)	Necrosis en las flores	Savia y áfidos	Japón
<i>Dendrobium</i> vein necrosis virus (DVN)	Bastones flexibles (1865 nm)	Necrosis en las venas de las hojas, sépalos y pétalos	No reportado	Alemania y los Estados Unidos
<i>Cypripedium</i> filamentous virus (CF-virus sin nombre)	Bastones flexibles (772 nm)	No reportado en flores. Posiblemente asintomáticas	Transmisión mecánica llevada a cabo sin éxito	Alemania
Turnip mosaic virus (TuMV)	Bastones flexibles (745 nm)	No reportado en flores. Posiblemente asintomáticas	Savia y áfidos	Alemania
Tobacco rattle virus (TRV)	Bastones rígidos (65 y 193 nm)	Malformaciones en las hojas	Savia y nemátodos	Alemania

Virus	Morfología de la partícula	Síntomas descritos	Modo de transmisión	Distribución geográfica
<i>Vanilla</i> mosaic virus	Bastones flexibles (767 nm)	Mosaico y malformaciones en las hojas	Áfidos	Polinesia Francesa
<i>Cymbidium</i> ringspot virus (CyRSV)	Isométrica (30 nm)	Anillos cloróticos concéntricos y parches cloróticos en hojas. Moteado	Savia y suelo	Inglaterra
Cucumber mosaic virus (CMV)	Isométrica (30 nm)	Mosaico en hojas. Jaspeados suaves en las flores	Savia y áfidos	Japón y Brasil
<i>Cymbidium</i> mild mosaic virus (CyMMV)	Isométrica (28 nm)	No reportados	Savia	Corea
<i>Trichopilia</i> isometric virus (TI-virus sin nombre)	Isométrica (28 nm)	No reportados	Desconocido	Alemania
<i>Masdevallia</i> isometric virus (MI-virus sin nombre)	Isométrica (28 nm)	No reportados	Desconocido. Transmisión mecánica llevada a cabo sin éxito	Colombia
Tomato ringspot virus (TomRSV)	Isométrica (30 nm)	No reportados	Savia y nemátodos	Estados Unidos
Short orchid rhabdovirus (KORV)	Baciliforme (47 x 105 nm)	No reportados	Savia	Dinamarca y Alemania
<i>Dendrobium</i> virus (DV)	Baciliforme (50 x 120 nm)	No reportados	Desconocido	Nueva Guinea y Alemania
Orchid fleck virus (OFV)	Baciliforme (40 x 150 nm)	Manchas cloróticas. Áreas cloróticas con el centro necrótico	Savia a temperaturas de 30°C. Ácaros	Japón
Unnamed rhabdovirus (RV-virus sin nombre)	“En forma de bastón” (40 x 100-120 nm)	No reportados	Desconocido	Brasil

Virus	Morfología de la partícula	Síntomas descritos	Modo de transmisión	Distribución geográfica
<i>Grammatophyllum</i> baciliform virus (GBV)	Baciliforme (40-42 nm de ancho con un largo variable)	No reportados	Desconocido	Estados Unidos
<i>Dendrobium</i> rhabdovirus (DRV)	Baciliforme (180,320 x 85 nm)	Estriado blanco en flores*	Desconocido	Hawai
Long orchid rhabdovirus (LORV)	Baciliforme (176 x 83 nm)	No reportados	Desconocido	Alemania
<i>Laelia</i> red leafspot virus (LRLSV)	Baciliforme (190-220 x 80 nm)	No reportados	Desconocido	Alemania
Tomato spotted wilt virus (TSWV)	Semiesférico (85 nm)	Anillos cloróticos y manchas necróticas en hojas	Savia y trips	Estados Unidos (California y Hawai)
<i>Impatiens</i> necrotic spot virus (INSV)	Semiesférico (85 nm)	No reportados	Savia y trips	Estados Unidos (California)
Unnamed baciliform virus from <i>Phaleanopsis</i> (PhBV-virus sin nombre)	Baciliforme (119 x 29 nm)	No reportados	Desconocido	Alemania
<i>Calanthe</i> mild mosaic virus (CalMMV)	Filamentosa flexible (760 nm)	Parches cloróticos y mosaico suave en las hojas. Pérdida de coloración en partes de la flor	Desconocido	Japón
<i>Ceratobium</i> mosaic potyvirus	No reportado	Mosaico y malformación de hojas.	Desconocido	Australia

*. En este caso la infección era simultánea con CymMV, por lo que los síntomas del virus permanecen desconocidos

Fuente: Lawson (2002) con datos de Chacón (2002), Gara *et al.* (1998) y de la base de datos del International Committee on Taxonomy of Viruses (2002).