



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA Y PROTOTIPOS (UBIPRO)

DETECCIÓN MOLECULAR DE *Cymbidium mosaic virus* y *Odontoglossum ringspot virus* EN ORQUÍDEAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGA

QUE PRESENTA:
ANA GUADALUPE SOTO VALLADARES

Director de Tesis:

Dr. RODOLFO DE LA TORRE ALMARAZ

Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer principalmente a la vida, ya que he sido muy afortunada de pertenecer a la familia a la que pertenezco y con la cual estaré eternamente agradecida por el amor y apoyo incondicional que me han brindado siempre tanto en mi vida personal como en la profesional, en especial quiero agradecer a mi madre Epifanía Valladares Salgado a quien le debo mucho de lo que soy y quien me ha guiado con sus enseñanzas y su amor, a mi padre Pablo Soto Cruz quién me ha enseñado a tener fortaleza y a vivir con valores, a mi hermana Xóchitl A. Soto Valladares, porque desde hace 14 años ha sido una de mis razones para seguir adelante y por haberme regalado uno de los días más felices de mi vida con su llegada, los amo!

Les agradezco a mis abuelos maternos José Valladares Román q. e. p. d. y Ana María Salgado Sandoval por haber estado siempre pendientes de mi bienestar, a mis abuelos paternos Francisco Soto Ensástiga q. e. p. d. por que junto con mi abuelita formaron una familia hermosa y a Guadalupe Cruz León q. e. p. d. por haberme querido tanto y haberlo demostrado siempre; los quiero y estarán siempre en mi mente y corazón.

De manera especial quiero agradecer a mi tío Adán Valladares Salgado, por sus consejos y su constante e inmenso apoyo en cuanto a mi desarrollo profesional, así como también quiero agradecer a su esposa Isabel García y a sus hijos Ana y Alan.

A mis tíos maternos: Clarita Valladares, Ángel Valladares q. e. p. d., Yolanda Valladares, Graciela Valladares, Esteban Valladares, Olga Valladares y Alfredo Valladares; a mis tíos paternos: Mariana Soto, Alberto Soto, Guadalupe Soto, Enrique Soto, Arturo Soto q. e. p. d. y Francisco Soto, les agradezco no sólo que me hayan cuidado y apoyado, sino también que me hayan regalado los mejores primos que podría tener.

Agradezco a todos mis primos y sobrinos por formar parte de mi vida y permitirme formar parte de la suya, así como por todas las experiencias que hemos vivido juntos, pero hago un agradecimiento especial a quienes han sido como mis hermanos: Ana C., Ana A., Adriana A., Andrea S., Ángel R. Jorge C., Magali S., Mariana R., Maya R. (al pequeño Leo), Miguel C., Norma H., Raúl S., y Ricardo R.

Le agradezco a la familia Herrera García que sean como una segunda familia para mí, especialmente la señora Carmen García y el señor Salvador Herrera quienes me han abierto las puertas de su casa y me han mostrado su permanente apoyo y cariño, a Maye, quien ha sido como una hermana, a Isaura, Javier, el pequeño Mateo, Nadia, a mi Rodri, a Lalito, así como también a Pablo y a Salvador que es mi colega, por haber sido mi amigo y compañero, así como también por todo lo que nos apoyamos durante la carrera.

Agradezco de manera especial al Dr. Rodolfo de la Torre Almaraz ya que este trabajo ha sido posible gracias a su ayuda invaluable y sus aportaciones.

También agradezco de manera muy especial la colaboración y amistad a mis sinodales; el Dr. Jorge E. Campos Contreras, la Dra. Martha Martínez García, el M. en C. Alejandro C. Monsalvo Reyes.

Y de manera sumamente especial hago un agradecimiento a la M. en C. María Graciela Molina González, por sus aportaciones a mi vida profesional cómo mi sinodal, pero especialmente agradezco sus aportaciones a mi vida personal, ya que he encontrado en ella no sólo una catedrática sino también una amiga a la que estimo en demasía.

Les agradezco a José Cambrón y a Salomé Alcasio su inmensa ayuda y apoyo durante la realización de este trabajo, así como su amistad.

A mis mejores amigas de la preparatoria Gabriela García González, Andrea Bustillos Montemayor y Mirtha por todos estos años de alegrías y aventuras juntas y porque a pesar del tiempo nos seguimos queriendo y apoyando igual que siempre.

A mis colegas y amigos que son también como mis hermanos; Carlos Velázquez, Juan Roberto Santacruz B., Maribel Arenas, Miguel A. Escalona F., José Flores, Josué Galindo, Dalia Franco, Victoria Cárdenas S., Carlos Iñigo, Antonio García R., Nancy Domínguez, Jon Aguilera R. y a Marisol Rodríguez por que juntos nos hemos apoyado aun en los momentos más difíciles durante la carrera.

DEDICATORIA

*A mis padres: Epifanía Valladares Salgado
y Pablo Soto Cruz.*

A mi hermana: Xóchitl A. Soto Valladares.

*Un hombre tiene que tener siempre
el nivel de la dignidad por encima
del miedo...*

Eduardo Chillida (1924-2002)

POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU

I. ÍNDICE

I. ÍNDICE.....	i
III. ÍNDICE DE CUADROS.....	iv
VI. GLOSARIO.....	v
V. RESUMEN.....	vi
VI. Palabras clave: Orquídeas, virus, RT-PCR.....	vi
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
ORQUÍDEAS.....	3
ESTRUCTURA DE LAS ORQUÍDEAS.....	3
DISTRIBUCIÓN.....	4
GÉNEROS DE LA FAMILIA <i>Orchideaceae</i> EN MÉXICO.....	4
ENFERMEDADES DE LAS ORQUÍDEAS.....	4
VIRUS EN ORQUIDEAS.....	5
MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE VIRUS EN VEGETALES.....	5
ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas).....	6
ANÁLISIS DE ARN DE DOBLE CADENA.....	6
RT-PCR.....	7
CLONACIÓN.....	9
SECUENCIACIÓN.....	9
JUSTIFICACIÓN.....	10
OBJETIVOS.....	11
METODOLOGÍA.....	11
RECOLECTA DE MATERIAL.....	11
DETECCIÓN SEROLÓGICA DE PROTEÍNA VIRAL POR ENSAYO INMUNOLÓGICO LIGADO A ENZIMAS (DAS-ELISA).....	11
ELECTROFORESIS DE ARN REPLICATIVO DE DOBLE CADENA DE ORIGEN VIRAL (ARNdc).....	12

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE VIRUS POR CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN	12
Transcripción inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) ..	12
Clonación y secuenciación.....	14
RESULTADOS.....	15
Detección serológica de proteína viral por ensayo inmunológico ligado a enzimas (DAS-ELISA)	15
ELECTROFORESIS DE ARN REPLICATIVO DE DOBLE CADENA DE ORIGEN VIRAL (ARNdc).....	16
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE VIRUS POR CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN	17
Transcripción inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) ..	17
Clonación y secuenciación.....	24
DISCUSIÓN	26
CONCLUSIONES.....	29
BIBLIOGRAFÍA.....	30
ANEXOS	34
ANEXO 1. DAS-ELISA	34
ANEXO 2. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE DOBLE CADENA.....	37
ANEXO 3. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS CON SILICA.....	40
ANEXO 4. PROTOCOLO DE RT-PCR EN TRES PASOS PARA AMPLIFICAR LOS VIRUS ORSV Y CYMMV	42
ANEXO 5. LIMPIEZA CON WIZARD SV GEL Y PCR CLEAN UP SYSTEM.....	44

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Síntomas observados en orquídeas A) y B) manchas necróticas, C) anillos cloróticos, D) manchas cloróticas, E) manchas irregulares cloróticas, F) puntos necróticos.	2
Fig. 2 Patrones de crecimiento básico de las orquídeas; a) crecimiento monopodial, b) crecimiento simpodial.	3
Fig. 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% de ARN de doble cadena de origen viral obtenido de muestras de orquídeas con síntomas de virus (100 Volts, 2.45 hrs., teñido con solución de nitrato de plata 0.011 M) carril: 1. Patrón de referencia ARNdc de CMV + CARNA-5 obtenido de <i>Nicotina glauca</i> ; carril 2. <i>Xylobium</i> , carril 3. <i>Encyclia</i> y en el carril 4. <i>Oncidium</i> . Carriles 2, 3 y 4 patrones de ARNdc de CymMV.	17
Fig. 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (100 Volts, 90 min. Teñidos con bromuro de etidio) de los productos de la RT-PCR con los oligonucleótidos POTEX F2/R5 carril 1. <i>Cattleya</i> , carril 2. <i>Epidendrum</i> , carril 3. <i>Vainilla</i> , carril 4. <i>Oncidium</i> , carril 5. <i>Epidendrum</i> , carril 6. <i>Xylobium</i> , carril 7. <i>Oncidium</i> , carril 8. <i>Laelia</i> , carril 9. <i>Encyclia</i> , carril 10. Marcador de peso molecular, carril 11. Vacío, carril 12. Vacío, carril 13. <i>Brasocattleya</i> , carril 14. Carril 15. Marcador de peso molecular 1kB. Se colocó el control negativo, en este caso se utilizó agua libre de nucleasas.	18
Fig. 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (100 Volts, 90 min. Teñidos con bromuro de etidio) de los productos de la RT-PCR con los oligonucleótidos POTEX F1/R5. Carril 1. <i>Shomburkia</i> , carril 2. <i>Cattleya</i> , carril 3. <i>Cattleya</i> , carril 4. <i>Epidendrum</i> , carril 5. <i>Vainilla</i> , carril 6. <i>Oncidium</i> , carril 7. <i>Epidendrum</i> , carril 8. <i>Xylobium</i> , carril 9. Marcador de peso molecular, carril 10. <i>Oncidium</i> , carril 11. <i>Laelia</i> , carril 12. <i>Brasocattleya</i> , carril 13. Agua libre de nucleasas, carril 14. Vacío y el carril 9 y 17. Marcador de peso molecular 1kB.	19
Fig. 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (100 Volts, 90 min. Teñidos con bromuro de etidio) de los productos de RT-PCR con los oligonucleótidos CymMV CPF/R; en el carril 1. <i>Cattleya</i> , carril 2. <i>Vainilla</i> , carril 3. <i>Oncidium</i> , carril 4. <i>Epidendrum</i> , carril 5. <i>Brasocattleya</i> , carril 6. Marcador de peso molecular, carril 7. Negativo, agua libre de nucleasas.	20
Fig. 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1%(100 Volts, 90 min. Teñidos con bromuro de etidio) de los productos de RT- PCR con los oligonucleótidos ORSV CPF/CPR; en el carril 1. Marcador de peso molecular, carril 2. <i>Cattleya</i> , carril 3. <i>Epidendrum</i> , carril 4. <i>Xylobium</i> , carril 5. <i>Oncidium</i> , carril 6. <i>Shomburkia</i> , carril 7. <i>Oncidium</i> , carril 8. <i>Laelia</i> , carril 9. <i>Encyclia</i> , carril 10. <i>Brasocattleya</i> , carril 11. Marcador de peso molecular, carril 12. <i>Encyclia</i> , carril 13. Se colocó el control negativo, agua libre de nucleadas.	22

Fig. 8. Representación esquemática del genoma de *Cybidium mosaic virus* (CmyMV) en el cual se observan; el gen de la de la ARN polimerasa dependiente de ARN, el bloque de genes triple y la proteína de la cápside. ... 28

Fig. 9. Representación esquemática del genoma de *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) en el cual se observan; los dos componentes del gen de la ARN polimerasa dependiente de ARN, el gen de la proteína del movimiento y la proteína de la cápside. 28

III. ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. DAS-ELISA de los antisueros con los que reaccionaron las muestras de orquídeas analizadas..... 15

CUADRO 2. RT-PCR's realizadas con los oligonucleótidos para Potexvirus y Tobamovirus en muestras de orquídeas cultivadas en México. 21

CUADRO 3. RT-PCR's con los oligonucleótidos específicos CymMV y ORSV en orquídeas cultivadas en México..... 23

CUADRO 4. Clonas de productos de la RT-PCR de aislados de CymMV y ORSV de orquídeas cultivadas en México..... 24

VI. GLOSARIO

ARN-dc: Se refiere a ARN (ácido ribonucleíco) doble cadena, el cual se forma durante la replicación de virus que tienen un genoma compuesto de ARN monocatenario.

Cápside: la cápside vírica, es una estructura proteica formada por una serie de monómeros llamados capsómeros. En el interior de esta cápside se encuentra siempre el material genético del virus. Puede estar rodeada por una envoltura. Cada capsómero puede estar constituido por una o varias proteínas distintas. El término nucleocápside se refiere al material genético envuelto en su cápside

DAS-ELISA: La DAS-ELISA (doble sándwich) es una de las técnicas basadas en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, es fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro.

dNTP: Dideoxinucleótidos trifosfatos que son el sustrato que sirve para polimerizar nuevo ADN.

Electroforesis: Técnica para la separación de moléculas, según la movilidad de estas en un campo eléctrico.

Encapsidación: Proceso mediante el cual el ácido nucleico de un virus es capturado e incorporado dentro de una cápside.

Fitopatología: Ciencia de diagnóstico y control de enfermedades de plantas.

Genoma: Es la totalidad de la información genética que posee un organismo en particular

Oligonucleótidos: Es una secuencia corta de ADN o ARN, con cincuenta pares de bases o menos. Tienen distintas funciones: se utilizan como cebadores en reacciones de amplificación, como sondas de hibridación y en bloqueos específicos de ARN mensajero.

Plásmido: Los vectores o también llamados plasmidios, son moléculas de ADN extracromosómico circular o lineal que se replican y transcriben independientes del ADN cromosómico.

V. RESUMEN

En los recorridos realizados en centros de producción y distribución de plantas y flores en la Ciudad de México y Cuernavaca, Estado de Morelos, durante los meses de Enero a Febrero del 2009 se observaron diversas clases de daños en plantas de diversos géneros y especies de orquídeas. Los análisis fitopatológicos preliminares del material dañado indicó la posible presencia de virus, como agentes causales de los síntomas observados.

Se realizaron pruebas de detección de proteína viral utilizando 12 antisueros comerciales distintos (DAS-ELISA), confirmando la presencia de los virus *Cymbidium mosaic virus* (CymMV. Potexvirus) y *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV. Tobamovirus) y los patrones electroforéticos de ARN-dc de origen viral en geles de poliacrilamida (PAGE). Se clonaron y secuenciaron productos de la RT-PCR, utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar fragmentos de los marcos de lectura abierta (ORF) de la proteína de la cápside (CP), proteína del movimiento (MP) o de la replicasa (RdRp). Se confirmó la identidad de ambos virus por alineamiento y comparación de las secuencias de nucleótidos obtenidas con las disponibles en la base de datos del NCBI/GenBank. Los números de acceso de las secuencias obtenidas se depositaron en el GenBank. Este es el primer reporte que confirma la identidad y la presencia de CymMV y ORSV en México.

VI. Palabras clave: Orquídeas, virus, RT-PCR

INTRODUCCIÓN

Las orquídeas están dentro del grupo de las monocotiledóneas y pertenecen a la familia *Orchidaceae*, que es la más vasta del reino vegetal, ya que cuenta con 800 géneros diferentes, 28, 000 especies y más de 30, 000 híbridos intraespecie (Hew y Yong, 1997).

La mayoría de las orquídeas se encuentran en ambientes tropicales y subtropicales, se localizan en zonas lluviosas y húmedas como las grandes selvas de Sudamérica, Australia, Nueva Zelanda, etc. Solo unas pocas viven en climas fríos y templados (Dole y Wilkins, 1999).

En México las zonas que albergan mayor riqueza de orquídeas se sitúan en las regiones al sur del Trópico de Cáncer, desde las costas del Pacífico y las del Golfo hasta las regiones que rebasan los 3 500 m.s.n.m. en los estados de Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Veracruz y Chiapas, aunque todos los estados cuentan al menos con una especie (Ramírez, 1996).

El potencial de mercado para las orquídeas como flor cortada y como planta ornamental, es muy favorable, esto debido a su singular belleza, es por ello que tienen una gran importancia económica a nivel mundial (Hew y Yong, 1997).

Sin embargo, el rendimiento y la calidad de la producción de orquídeas pueden ser afectadas por diversos factores ambientales o por organismos causantes de enfermedad como virus, bacterias y hongos (Freuler, 2006).

En recorridos realizados durante los meses de Enero y Febrero del 2009, en algunos mercados locales, centros comerciales, viveros e invernaderos en la Ciudad de México y Cuernavaca, Estado de Morelos, se detectaron plantas de orquídeas de diferentes géneros que presentaban daños severos de moteados, anillos cloróticos y después necróticos, marchites reducción del crecimiento y pudrición de bulbos y hojas (Figura 1).

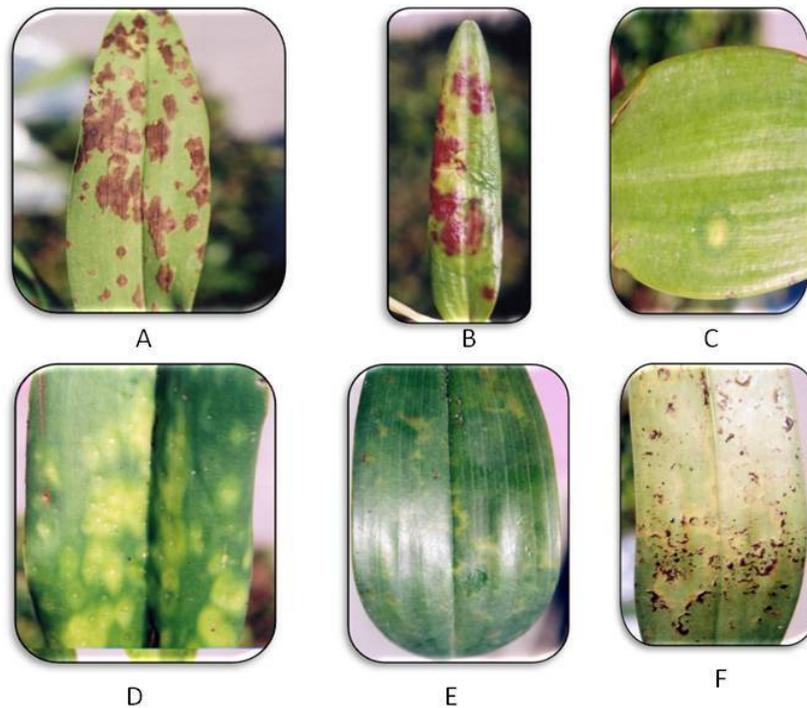


Figura 1

Figura 1. Síntomas observados en orquídeas A) y B) manchas necróticas, C) anillos cloróticos, D) manchas cloróticas, E) manchas irregulares cloróticas, F) puntos necróticos.

El análisis fitopatológico del material dañado en el laboratorio no indicó la presencia de hongos, bacterias u otra clase de organismos que estuvieran relacionados con los daños observados, por lo que se concluyó que estos pudieran ser causados por alguna clase de virus o partículas semejantes a virus.

La revisión de la literatura no mostró ningún trabajo que reporte la identidad de virus en orquídeas en México, sin embargo se reportan más de 29 diferentes especies distintas de virus en orquídeas en otras partes del Mundo (You-Xiu *et al.*, 2010).

Considerando la gran diversidad de daños observados en diferentes géneros de orquídeas en los centros de producción en la región centro de México y por la importancia económica que tienen este grupo de plantas, así como ante la carencia de técnicas de diagnóstico validadas para la detección específica de virus en orquídeas, los objetivos del presente trabajo fueron: Identificar a los virus que afectan a diversos géneros y especies de orquídeas cultivadas en

México, así como desarrollar, evaluar y validar diversas técnicas de diagnóstico de virus en orquídeas.

REVISIÓN DE LITERATURA

ORQUÍDEAS

Las orquídeas pertenecen a la familia *Orchideaceae* que es la más grande del reino vegetal, con 800 géneros, 28.000 especies y más de 30,000 híbridos intraespecie, como se mencionan antes, esta familia esta sistemáticamente colocada dentro de las monocotiledóneas (Hew y Yong, 1997).

Las orquídeas tienen dos patrones básicos de crecimiento, monopodial y simpodial. La orquídea monopodial crece predominantemente hacia arriba. Tiene un tallo principal y en la punta de este se producen nuevas hojas y las flores, en las yemas de la coyuntura de las hojas recién maduras (Figura 2. a). Las orquídeas con crecimiento simpodial, crecen en forma horizontal y tienen varios ápices vegetativos y pseudobulbos, los cuales sirven de órganos de reserva (Figura 2. b).

(Books y Books, 1999).

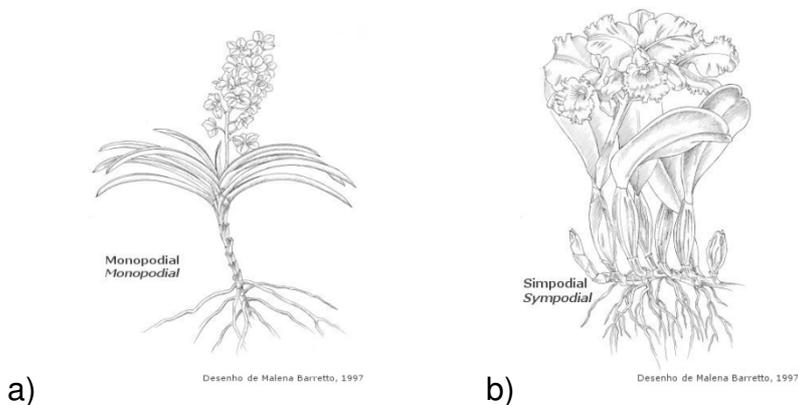


Figura 2. Patrones de crecimiento básico de las orquídeas; a) crecimiento monopodial, b) crecimiento simpodial.

ESTRUCTURA DE LAS ORQUÍDEAS

La planta de la orquídea consiste de raíces, flores y hojas.

RAICES

Las orquídeas tienen tanto raíces delgadas como gruesas, están cubiertas por velamen que es una capa suave que se encarga de absorber agua y los nutrientes que necesita la planta. Las puntas de las raíces son de color verde y el resto de color blanco (Fischer, 2007).

FLORES

Las flores de las orquídeas son monocotiledóneas, lo cual quiere decir que las partes florales están dispuestas en tres o en múltiplos de tres: tres sépalos, tres pétalos, los cuales presentan el mismo color. La flor de la orquídea es simétrica bilateralmente (zigomorfa), el tercer pétalo está modificado que es conocido como labelo, el cual es distinto en tamaño, color y forma a los pétalos y sépalos (Banks, 2005).

PSEUDOBULBOS

El pseudobulbo es una porción alargada del tallo de la cual surgen las hojas y las inflorescencias. Los pseudobulbos se clasifican de acuerdo a su forma, los hay homoblásticos con muchos internudos o heteroblásticos que es cuando tienen un solo internudo (Hew and Yong 1997).

HOJAS

Las hojas presentan nervaduras que corren paralelas entre sí y al eje longitudinal como todas las monocotiledóneas (Freuler, 2006).

DISTRIBUCIÓN

Las orquídeas habitan en los ambientes tropicales y subtropicales que se extienden a ambos lados del ecuador, y sólo un número reducido de ellas eligen las zonas templadas o frías. En México las zonas que albergan mayor riqueza de orquídeas se sitúan en las regiones al sur del Trópico de Cáncer, desde las costas del Pacífico y las del Golfo hasta las regiones que rebasan los 3 500 m. s. n. m. en los estados de Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Veracruz y Chiapas, aunque todos los estados cuentan al menos con una especie (Ramírez 1996).

GÉNEROS DE LA FAMILIA *Orchideaceae* EN MÉXICO

De los 800 géneros que conforman la familia *Orchideaceae*, 175 se han reportado para México (Soto *et al.*, 2007).

ENFERMEDADES DE LAS ORQUÍDEAS

Las orquídeas suelen ser atacadas por plagas y enfermedades, causadas por virus, bacterias, hongos ó insectos (Ospina *et al.*, 1974).

Los virus que afectan a las orquídeas causan grandes pérdidas a la industria de la orquídea en todo el mundo (Ajjikuttira *et al.*, 2005).

VIRUS EN ORQUIDEAS

Los síntomas de una infección viral en orquídeas son muy diversos ya que su expresión depende del tipo de virus, la especie de orquídea afectada, así como de las condiciones ambientales en las que se cultivan. Algunos de los síntomas más comunes son mosaicos, manchas cloróticas, manchas necróticas irregulares, así como la distorsión de hojas ó flor (La Croix, 2008).

Los virus que se han identificado en diversas especies de orquídeas son: *Turnip mosaic virus*, *Dendrobium mosaic virus*, *Habenaria mosaic virus*, *Pecteilis mosaic virus* y *Vanilla necrosis virus* (Potyvirus); *Cymbidium mosaic virus* (Potexvirus); *Orchid fleck virus* (Rabdovirus); *Cymbidium ringspot virus* (Tombusvirus); *Odontoglossum ringspot virus* (Tobamovirus); *Dendrobium vein necrosis virus* (Closterovirus) (Brunt *et al.*, 1996).

Dentro de los métodos de diagnóstico para la detección de un virus en las orquídeas, se encuentran microscopía electrónica, pruebas serológicas y técnicas moleculares.

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE VIRUS EN VEGETALES

Para la identificación de los virus se toman en cuenta diversos criterios prevaleciendo el de los síntomas observados en campo sin embargo resultan insuficientes ya que estos pueden ser el resultado de la presencia de más de un virus o muchos virus causan síntomas similares en el mismo cultivo (Chapman y Hall, 1991). Por lo que de un tiempo para acá se han venido implementando técnicas que aseguren y discriminen la presencia de cierta familia viral.

La correcta identificación de un virus como agente causal en la planta constituye un punto de partida para: adoptar medidas adecuadas de lucha y llevar a cabo estudios epidemiológicos (Conti, 2001).

Los métodos para detectar un virus se basan en los síntomas que la planta presenta, en detectar su morfología, su ácido nucleído o algunas de sus proteínas. La morfología de un virus sólo es posible apreciarla mediante el uso del microscopio electrónico, el reconocimiento de ácidos nucleícos se basa en

el reconocimiento de secuencias virales y en cuanto al reconocimiento de algunas de sus proteínas la detección del virus se lleva a cabo mediante anticuerpos específicos a través de ensayos tipo ELISA (Coll, 1993).

ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)

En este procedimiento incrementa la sensibilidad en la detección de la reacción antígeno-anticuerpo uniendo cualquiera de estos dos reactivos a una enzima se agrega un sustrato y da como resultado una reacción con color que puede ser medida cuantitativamente y permite detectar virus aún en baja concentración, este procedimiento se desarrolló por primera vez en 1977 por Voller, pero numerosas variaciones de ELISA son utilizados para la identificación de virus fitopatógenos. De estos el de “sándwich de doble anticuerpo” es el más utilizado (Chapman y Hall, 1991).

Arce (2006) utilizó ELISA y TD/RT-PCR para detectar a *Cymbidium mosaic virus* y a *Odontoglossum ringspot virus* en orquídeas en Venezuela.

ANÁLISIS DE ARN DE DOBLE CADENA

Este método detecta ARN's de doble cadena que son producidos en una planta infectada con virus de ARN, estos ARN's son muy resistentes a la degradación enzimática y no es normal su presencia en plantas sanas.

El 90% de los virus fitopatógenos son de cadena sencilla. Durante la replicación en las células de la planta, el ARN de doble cadena (ARNdc), es producido como un producto intermedio. Este ARNdc es conocido como la forma replicativa (FR), presente cuando la planta está infectada con un virus de RNA de cadena sencilla (ARNcs). Está claro que las plantas pueden contener también ARNdc de otros tipos, sin embargo la FR de virus fitopatógenos de ARNcs es el que se encuentra más comúnmente, lo cual hace que el análisis de ARNdc sea un método práctico para diagnóstico viral (Valverde, 1990).

La técnica de extracción y análisis de ARNdc, se ha utilizado para detectar diversas familias de virus, por ejemplo De la Torre *et al.*, en el 2000 visualizaron una variante del virus mosaico del pepino utilizando como herramienta de diagnóstico el análisis de ARNdc.

RT-PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue desarrollada por Kary Mullis en la década de 1980 y consiste en utilizar dos oligonucleótidos para dirigir la síntesis de una secuencia específica de ADN. Cada uno de los oligonucleótidos se une a las hebras de ADN, los sitios donde se unen los oligonucleótidos, generalmente están separados por unos cientos pares de bases (100-1000 pb). Las repeticiones de los ciclos de polimerización y desnaturalización permiten el incremento exponencial de la secuencia de interés (Bangham, 1991).

La amplificación de una doble cadena de ADN no se limita únicamente al ADN genómico, puede aplicarse también a la doble cadena de ADNc que es sintetizado a partir de ARNm mediante la utilización de una enzima reversa transcriptasa y posteriormente se realiza la PCR (Dubey, 2009).

Lim *et al.*, en 1992, desarrollaron un método rápido, directo y sensible para la detección de CymMV basado en la PCR, seleccionaron dos oligonucleótidos de regiones homólogas para *Potexvirus* y CymMV los cuales utilizaron para hibridar con ARN viral purificado; lograron amplificar un fragmento de 313 pb y en otras muestras también se obtuvieron fragmentos de 227 pb.

Seoh *et al.*, en 1998, llevaron a cabo un trabajo en Singapur en el cual se diseñó un par de oligonucleótidos con los cuales detectó a CymMV y ORSV simultáneamente mediante una simple PCR. El efecto de la temperatura de alineamiento del oligonucleótido, el número de ciclos, la concentración de $MgCl_2$ y la temperatura a la que el oligonucleótido se degrada, se investigaron y lo aplicaron para optimizar las condiciones de la PCR en la detección de ambos virus, para poder tener una amplificación eficiente y equitativa, este fue primer trabajo en el que utilizando un solo par de oligonucleótidos se detectó a dos virus pertenecientes a grupos taxonómicos diferentes.

Eun *et al.*, en 1999, lograron la cuantificación simultánea de CymMV y ORSV usando la RT-PCR mediante sondas TaqMan® tiempo-real una técnica que combina la RT-PCR con la detección fluorescente. Cuatro sondas TaqMan®

fueron sintetizadas y diseñadas sobre el gen que codifica para la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) y al gen de la proteína de la cápside (CP) de los dos virus; con esto se logró probar que este sistema ofrece sensibilidad, un alto rendimiento de procesamiento y un método rápido para la detección de virus de plantas.

Ajjikuttira *et al.*, en 2005 investigaron la complementación de las proteínas de movimiento de la cápside de *Cymbidium mosaic potexvirus* y *Odontoglossum ringspot tobamovirus* en la infección del orquídeas y como modelo utilizó a *Nicotiana benthamiana*, ya que esta planta es susceptible a ambos virus. Fueron construidas cuatro líneas transgénicas, cada una tomada de los genes de la proteína del movimiento ó de la proteína de la cápside. Los mutantes de CymMV y ORSV cada uno contenían la forma inactiva de la proteína de cápside y de la proteína de movimiento que se generaron a partir de los clones de ADNc respectivamente. La complementación se estudió mediante la infección de plantas transgénicas con transcritos hechos *in vitro* generados de estos mutantes. En estas plantas no se detectó la encapsidación del ARN de CymMV con la proteína de la cápside de ORSV. Y se concluyó que la complementación de las proteínas de movimiento (MP) y las proteínas de la cápside (CP) de CymMV y ORSV facilitan el movimiento entre célula y célula de los virus en las plantas, excepto en el movimiento a larga distancia del ARN de ORSV por CymMV CP.

Lee *et al.*, en 2006, desarrollaron un método para la detección de CymMV y ORSV en orquídeas mediante una PCR múltiple, para la cual fueron diseñados oligonucleótidos específicos de secuencias del GenBank las cuales corresponden al gen de la proteína de la cápside de los virus antes mencionados, también un par de primer derivado del gen del NADH mitocondrial de la planta fue probado para la amplificación de ARNm *nad5* como un control interno en la RT-PCR múltiple. La especificidad de los tres pares de oligonucleótidos diseñados para CymMV, ORSV y ARNm *nad5* fueron confirmados mediante PCR simple y múltiple; con lo cual se demostró que la RT-PCR múltiple, reduce en gran medida el costo y los resultados falsos negativos.

CLONACIÓN

La clonación es el proceso por medio del cual se obtienen múltiples copias de un segmento de ADN de interés, que puede corresponder a un gen o a un segmento del mismo, a los que se les designa como insertos, mediante su incorporación o ligación a un plásmido (elemento extracromosómico bacteriano de ADN de doble cadena). El componente plásmido-inserto, son introducidos a una célula competente o permisiva (regularmente cepas especiales de *Escherichia coli*), es replicado a la par de la célula permisiva, obteniéndose múltiples copias del plásmido-inserto. Posteriormente son separados bioquímicamente el ADN de la bacteria y el complejo plásmido-inserto. Este último puede ser secuenciado utilizando oligonucleótidos específicos que solo amplifican las regiones que flanquean al inserto y al inserto mismo o bien se puede separar el inserto por tratamiento enzimático, dirigido a las regiones flanqueadoras, y secuenciarse. En ambos casos, las secuencias obtenidas tienen que ser analizadas y editadas para eliminar secuencias del plásmido o de los oligonucleótidos que hayan sido incorporadas durante el proceso de clonación (Dubey, 2009).

SECUENCIACIÓN

La estructura del DNA puede ser analizada determinando la secuencia de nucleótidos. En 1977 Frederick Sanger y sus colaboradores desarrollaron un método enzimático para secuenciar el DNA, en este método se utiliza DNA de cadena sencilla como templado y se utilizan dideoxynucleotidos como terminadores de cadena para producir una escalera de moléculas. Existen cuatro tipos de deoxynucleótidos trifosfatos (dNTPs) como dATP, dCTP, dGTP y dTTP. De manera similar existen cuatro tipos de dideoxynucleotido trifosfatos (ddNTPs), ddATP, ddTTP, ddGTP y ddCTP (Dubey, 2009).

Wong *et al.*, en 1997 realizó un trabajo en el que secuenció el DNA para mostrar la secuencia completa de *Cymbidium mosaic potexvirus* y hacer un

análisis filogenético, en este trabajo se determinó que el CymMV tiene 6,227 nucleótidos de longitud.

JUSTIFICACIÓN

Los países de América Latina y el Caribe están sometidos en mayor o menor grado a un proceso de modernización en materia agrícola, que favorece su comercialización internacional. El Área de Libre Comercio de las Americas (ALCA) se ha dado a la tarea de integrar a todos los países del Hemisferio sur de América, para que exista un comercio sin barreras, dentro y entre los territorios que los conforman. Parte fundamental de este proceso y para garantizar una agricultura sana, es el uso de medidas sanitarias, fitosanitarias y de salud alimentaria, así como la adopción por todos los países de una serie de procesos y técnicas relacionadas, tales como el análisis de riesgo de introducción de plagas y enfermedades de un país infectado a otro libre. También tienen el objetivo de desarrollar y dar a conocer diversas metodologías de diagnóstico de plagas, patógenos y malezas (Sosa-Moss *et al.*, 1997).

La identificación y detección de virus fitopatógenos es uno de los aspectos fundamentales en la comercialización y distribución de plantas de ornato en donde, por ejemplo, las orquídeas por su alto valor estético representan una fuerte derrama económica para los productores, que sin embargo tienen que contar con elementos que les permitan certificar que sus plantas están libres de virus, que podrían ser peligrosos para la economía agrícola de los países receptores de estas plantas.

Considerando el alto valor económico que las orquídeas tienen en la industria florícola mexicana y observando que diversos daños están mermando el rendimiento y la calidad de la producción de géneros, híbridos y especies de orquídeas bajo cultivo, que se han asociado como causados probablemente por virus, los objetivos del presente trabajo fueron:

OBJETIVOS

Identificar a los virus que afectan a diversos géneros y especies de orquídeas cultivadas en México.

Desarrollar y validar diversas técnicas de diagnóstico de los virus presentes en orquídeas en México.

METODOLOGÍA

RECOLECTA DE MATERIAL

Se colectaron 8 plantas de 10 distintos géneros de orquídea y sólo un ejemplar del género *Vainilla*, estos ejemplares se obtuvieron de invernaderos comerciales o en centros de comercialización en los estados de el estado de Morelos y D.F., los géneros a los que pertenecen son: *Encyclia*, *Oncidium*, *Shomburgkia*, *Brassia*, *Guariathe*, *Cattleya*, *Epidendrum*, *Vainilla*, *Xylobium*, *Laelia* y *Brassocattleya*, que presentaron alguno de los siguientes daños: manchas necróticas, y cloróticas, puntos necróticos y cloróticos y anillos cloróticos. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico cerradas y se transportaron al laboratorio y se mantuvieron en congelación a -20°C hasta su procesamiento.

DETECCIÓN SEROLÓGICA DE PROTEÍNA VIRAL POR ENSAYO INMUNOLÓGICO LIGADO A ENZIMAS (DAS-ELISA)

Se realizó la detección de infecciones virales en todas las muestras colectadas en el campo, mediante la técnica ELISA (Clark y Adams, 1977; Chantler y Clayton, 1988), usando anticuerpos específicos para *Cucumber mosaic virus* (CMV. Cucumovirus), *Tobacco mosaic virus* (TMV. Tobamovirus), *Alfalfa mosaic virus* (AMV. Alfamovirus), *Tobacco etch virus* (TEV. Potyvirus), *Tomato bushy stunt* (TBSV. Tombusvirus), *Cymbidium ringspot virus* (CyRSV. Tombusvirus), *Tobacco ringspot virus* (TRSV. Nepovirus), *Tomato spotted wilt*

virus (TSWV. *Tospovirus*), además de los anticuerpos específicos comerciales para detectar los virus más comunes que infectan a las orquídeas, como *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV. *Tobamovirus*), y *Cymbidium ringspot virus*, *Cymbidium mosaic* (CymMV. *Potexvirus*). (Agdia, USA), a una dilución 1/200. Las reacciones se consideraron positivas con la presencia de color amarillo en los pocillos y en relación a la intensidad del color de los testigos positivos (Anexo 1).

ELECTROFORESIS DE ARN REPLICATIVO DE DOBLE CADENA DE ORIGEN VIRAL (ARNdc)

Se extrajo ARN de doble cadena (ARNdc) mediante columnas de celulosa CF-11 (Valverde *et al.*, 1990) (Anexo 2). El ARN se almacenó a -20°C hasta su uso.

El ARN dc se analizó por electroforesis en PAGE al 6%, utilizando 40 µl del extracto de ARN-dc viral por cada muestra por carril. La electroforesis se realizó a 100 V por 2.15 hrs. los geles se tiñeron con bromuro de etidio fueron observados en un transiluminador. Alternativamente los geles se tiñeron con nitrato de plata (0.011 M) y (Valverde *et al.*, 1990) (Anexo 2).

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE VIRUS POR CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN

Transcripción inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Para la caracterización y confirmación de la identidad de los virus detectados mediante las pruebas de DAS-ELISA en las plantas de orquídeas y con síntomas de probable origen viral, se realizaron ensayos de RT-PCR en tres pasos, que consiste en un periodo de pre tratamiento por calor del ARN viral, la síntesis de cDNA con la utilización de ambos oligonucleótidos y finalmente la reacción de la PCR.

Para la detección de *Potexvirus*, se utilizaron oligonucleótidos para amplificar un segmento del gen de la Replicasa (RdRp), específico al grupo *Potexvirus*, denominados: **POTEX1F** nt: 4001-3982 (5`TCAGTAGTTGATGCAGTCAG

AAAGGT3`)/**POTEX5R** nt: 3265-3284 (5`CACTCAAGCAAGGCACA AAGGA CTGA3`) y **POTEX2F** nt: 3848-3832 (5`AGCATAGGCACGTGCCA GTCCTTG3`)/**POTEX5R** nt: 3265-3284 (5`CACTCAAGCAAGGCACAA AGGACTGA3`).

Para la identificación del Género *Tobamovirus*, otro grupo de virus que afectan a las orquídeas, se utilizaron oligonucleótidos que amplifican un fragmento del gen de la proteína de la cápside **TMVCPF** (5`GCACGTCTTACGT GGACGTAAGTCAAGTTCTAAGACACGTCAAGCAAG3`)/**TMVCPR** (5`ACGT GCAGCACGTAAGACGTGTCTTCACGTGCACGTCTACGTGTACGTGGAGTT 3`).

Para la identificación específica de virus se utilizaron oligonucleótidos que amplifican un fragmento del gen de la CP del CymMV los cuales son: **CymMVCPF** nt: 5481-5500 (5`ATGGGAGAGCCCACTCCAGC3`) /**CymMVCPR** nt: 6133-6152 (5`TTATTTCAGTAGGGGGTGCAG3`) y oligonucleótidos específicos para ORSV los cuales son: **ORSVCPF** nt: 5722-5741 (5`TGTCTTACACTATTACAGAC3`) /**ORSVCPR** nt: 6175-6194 (5`GGAAGAGGTCCAAGTAAGTC3`).

Como templado de la RT-PCR se utilizó el ARN-dc (Valverde et al., 1992) (Anexo 2) y ARN total obtenido por el método de sílica (Mackenzie, D. J. et al., 1997) (Anexo 3). Se llevaron a cabo las reacciones de RT-PCR's en tres pasos; las condiciones de la RT-PCR para los oligonucleótidos de *Potexvirus* fueron: una desnaturalización previa del ARN a 65°C durante 15 min y para la RT, una incubación de 42°C 45 min. La PCR se llevó a cabo con una desnaturalización previa a 94°C 3min y 35 ciclos de amplificación (94°C 30 seg en la desnaturalización, 51.5°C 1minuto de alineamiento, 72°C 1 min de extensión), y una temperatura de inactivación de la polimerasa de un solo ciclo a 72°C durante 5 min. Para la RT-PCR de *Tobamovirus* fue en dos pasos y para la PCR fueron 94°C 3 min, 40 ciclos de 94°C 50 seg, 52°C 52 seg y 72°C 40 seg.

Las condiciones para la RT-PCR, utilizando los oligonucleótidos específicos para los virus CymMV y ORSV, fueron: la primera incubación fue de 95°C durante 5 min, la segunda de 42°C durante 45 min.

Para la PCR las condiciones que se utilizaron para ambos virus fueron: 96°C 5 minutos, 30 ciclos de 96 °C 30 seg, 52 °C 30 seg y 72 °C 30 seg, la temperatura de elongación final fue de 72 °C durante 7 min y la última se utilizó de 4 °C durante tiempo indefinido (Anexo 4).

El producto de la RT-PCR se observó en gel de agarosa al 1% corrido a 100 Volts, 80mA durante 45 min y un marcador de peso molecular de 1Kb.

Clonación y secuenciación

Posteriormente las bandas obtenidas fueron cortadas y se limpiaron con el kit comercial WIZARD de PROMEGA con el número de catálogo: A9282 (Anexo 5).

Los productos obtenidos de la RT-PCR de la CP de ambos virus se ligaron en pDrive, la mezcla se incubó toda la noche a 16° C durante 24 hrs. Después de este tiempo, se les dio un choque térmico a una temperatura de 42°C/ 1min; posteriormente se colocaron los tubos en hielo, se añadió la ligación a 200 µl de bacterias competentes (*Escherichia coli*, cepa DH5-alfa), previamente descongeladas. La mezcla se agitó cada 5 min, durante 20 min y se sometieron a un choque térmico de 42°C durante 50 seg. Se inocularon 200 µl de *Escherichia coli*, cepa DH5-(alfa) con el inserto, en cajas con medio LB (5 g de triptona, 2.5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCL 1 M y 10 g de agar aforados a 500 mL con agua destilada) con ampicilina (100 mg/mL), con 10 µL de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) 0.1 M y 25 µL de X-Gal (50 mg/mL), plaqueados y distribuidos homogéneamente con una varilla de cristal. Se dejaron crecer las colonias durante 24 hrs a 37°C, y se seleccionaron las colonias de bacterias que tuvieran color blanco, ya que esto indicó que el inserto estaba presente, las que se incrementaron en 4 mL de medio SOC por 12 hrs y se purificó el DNA total (MiniPrep). La presencia del inserto se confirmó por medio un ensayo de enzima de restricción (EcoRI) y electroforesis en gel de agarosa. Alternativamente se realizaron pruebas de PCR por colonia.

Una alícuota del miniprep (10 µL) de las colonias o clonas que resultaron positivas de tener el inserto (Anexo 6). Se secuenciaron en secuenciador modelo ABI 3100 de 16 capilares que utiliza el método BIG DYE Terminator fluorescence based sequencing para análisis de secuencia. Las secuencias obtenidas se compararon con las disponibles en el GenBank.

RESULTADOS

Detección serológica de proteína viral por ensayo inmunológico ligado a enzimas (DAS-ELISA)

Se detectaron por DAS-ELISA infecciones por los virus CymMV y ORSV. Se detectaron infecciones mixtas en 12 muestras, mientras en 6 solo se detectó al CymMV y en otras 6 solo al ORSV. Por otro lado, en 6 muestras se detectó al virus mosaico del tabaco (*Tobacco mosaic virus*.TMV. Tobamovirus), una muestra resultó infectada con el virus jaspeado del tabaco (*Tobacco etch virus*.TEV. Potyviridae) y otra más con el virus mosaico del virus (Cucumber mosaic virus. Bromoviridae. CMV). En general, se observó que en cada una de las muestras colectadas se detectó infección por al menos un virus (Cuadro No. 1). Los resultados obtenidos mediante DAS- ELISA indicaron que esta es una técnica muy sensible, capaz de detectar infecciones en prácticamente todo el material. Esta técnica puede utilizarse en diagnósticos de ambos virus en forma rápida y eficiente.

CUADRO 1. DAS-ELISA de los antisueros con los que reaccionaron las muestras de orquídeas analizadas.

ORQUÍDEAS	ELISA				
	CymMV	ORSV	TMV	TEV	CMV
1. <i>Brassia</i>	+	+			
2. <i>Brassocattleya</i>	+				
3. <i>Cattleya sp.1</i>	+	+			
4. <i>Cattleya sp.2</i>		+			
5. <i>Encyclia sp.1</i>	+	+	+		
6. <i>Encyclia sp.2</i>	+				
7. <i>Encyclia sp.3</i>	?				
8. <i>Encyclia sp.4</i>	+	+			

9. <i>Encyclia sp.5</i>		+			
10. <i>Encyclia sp.6</i>	+	+			
11. <i>Epidendrum sp.1</i>	+		+		
12. <i>Epidendrum sp.2</i>	+				
13. <i>Guarianthe</i>	+	+			
14. <i>Laelia sp.1</i>	+	+			
15. <i>Laelia sp. 2</i>	+	+			
16. <i>Oncidium sp.1</i>	+	+			
17. <i>Oncidium sp.2</i>	+	+	+		
18. <i>Oncidium sp.3</i>		+			
19. <i>Oncidium sp.4</i>	+		+		
20. <i>Oncidium sp.5</i>		+			
21. <i>Schomburgkia sp.1</i>		+	+		
22. <i>Schomburgkia sp.2</i>	+	+	+		
23. <i>Vainilla</i>	+	+		+	+
24. <i>Xylobium</i>	+	+			

La *Encyclia sp. 3* no mostró un color muy intenso, sin embargo muestra síntomas muy evidentes de una probable infección con CymMV, por lo tanto se considero para las pruebas posteriores.

Aunque se reportan más de 30 virus diferentes que infectan a múltiples géneros de orquídeas en todo el mundo, CymMV y ORSV son los virus más frecuentes de encontrar principalmente en plantas cultivadas, lo que indica la facilidad en su dispersión y su alta capacidad infectiva (You-Xiu et al., 2005).

ELECTROFORESIS DE ARN REPLICATIVO DE DOBLE CADENA DE ORIGEN VIRAL (ARNdc)

Se observó en forma consistente el patrón electroforético de ARNdc CymMV y ORSV. Sin embargo, el patrón electroforético más frecuente de encontrar fue el de CymMV (Figura 3).

No fue posible observar el ARNdc en todas las muestras positivas por DAS-ELISA, lo cual indicó que la concentración del ARNdc de estos virus en las muestras, fue baja e indetectable por esta técnica.

La electroforesis en geles de poliacrilamida del ARNdc replicativo de origen viral, permite identificar el número de los componentes virales de la mayoría de los virus de ARN de cadena sencilla (cs) que afectan a plantas, es específico, pero no es muy sensible, ya que obtener patrones electroforéticos claros, depende de la concentración del ARNdc replicativo y en muchas ocasiones del manejo adecuado del equipo, reactivos y condiciones de la electroforesis (Valverde, 1990).

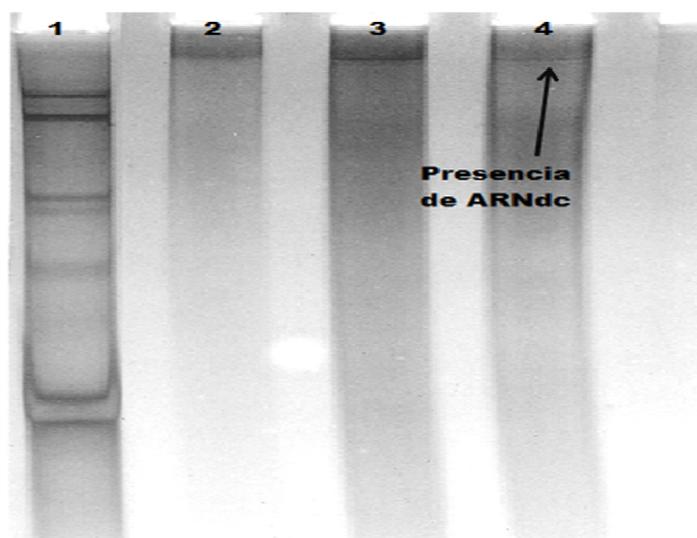


Figura 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% de ARN de doble cadena de origen viral obtenido de muestras de orquídeas con síntomas de virus (100 Volts, 2.45 hrs., teñido con solución de nitrato de plata 0.011 M) carril: 1. Patrón de referencia ARNdc de CMV + CARNA-5 obtenido de *Nicotina glauca*; carril 2. *Xylobium*, carril 3. *Encyclia* y en el carril 4. *Oncidium*. Carriles 2, 3 y 4 patrones de ARNdc de CymMV.

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE VIRUS POR CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN

Transcripción inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Se detectaron al CymMV y ORSV por RT-PCR, primero utilizando oligonucleótidos generales para detectar a miembros del grupo Potexvirus y Tobamovirus, así como los específicos para amplificar fragmentos de la CP de CymMV y ORSV.

Con los oligonucleótidos para detectar orquídeas infectadas con *Potexvirus*, se obtuvieron un total de 19 muestras positivas, de donde se obtuvo un fragmento de aproximadamente de 584 pb (Potex F2 / R5) (Figura 4) y de 735 pb (POTEX F1/ R5) (Figura 5).

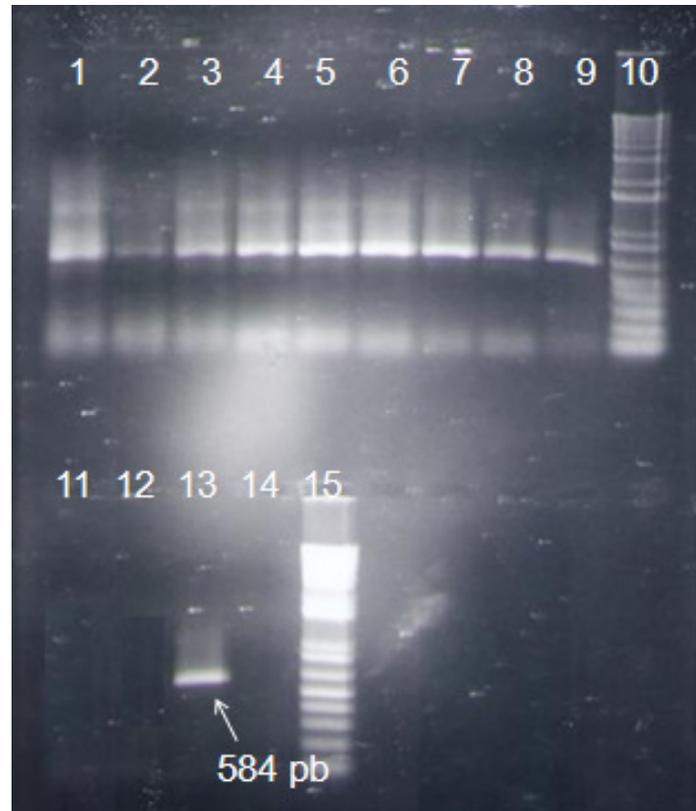


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (100 Volts, 90 min. Teñidos con bromuro de etidio) de los productos de la RT-PCR con los oligonucleótidos POTEX F2/R5 carril 1. *Cattleya*, carril 2. *Epidendrum*, carril 3. *Vainilla*, carril 4. *Oncidium*, carril 5. *Epidendrum*, carril 6. *Xylobium*, carril 7. *Oncidium*, carril 8. *Laelia*, carril 9. *Encyclia*, carril 10. Marcador de peso molecular, carril 11. Vacío, carril 12. Vacío, carril 13. *Brasocattleya*, carril 14. Carril 15. Marcador de peso molecular 1kB. Se colocó el control negativo, en este caso se utilizó agua libre de nucleasas.

Con este punto se probó otro par de oligonucleótidos para el género de los *Potexvirus*, para poder determinar si existían muestras infectadas por virus que hubieran sido detectadas con los oligonucleótidos POTEX F2/R5; así que también se realizaron las RT-PCR's con los oligonucleótidos POTEX F1/R5.

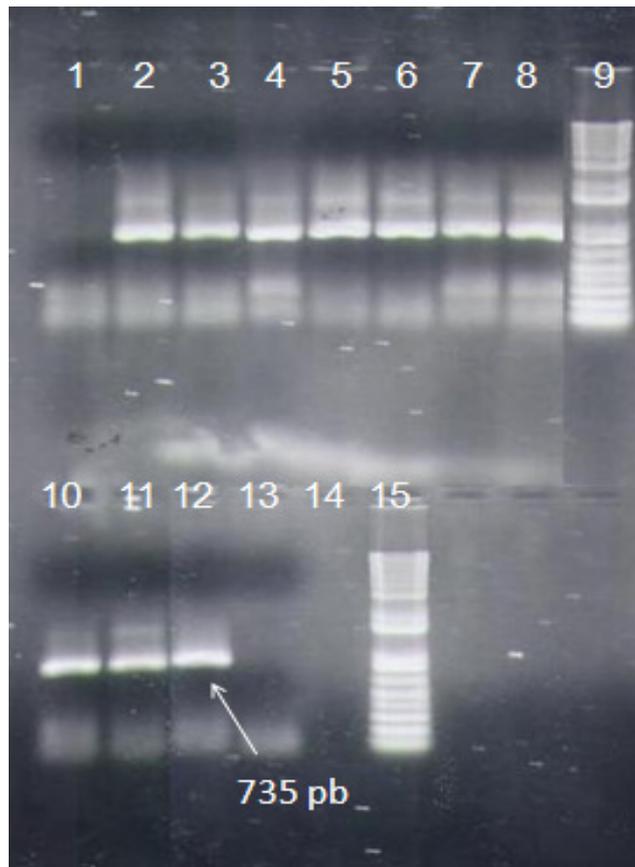


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (100 Volts, 90 min. Teñidos con bromuro de etidio) de los productos de la RT-PCR con los oligonucleótidos POTEX F1/R5. Carril 1. *Shomburkia*, carril 2. *Cattleya*, carril 3. *Cattleya*, carril 4. *Epidendrum*, carril 5. *Vainilla*, carril 6. *Oncidium*, carril 7. *Epidendrum*, carril 8. *Xylobium*, carril 9. Marcador de peso molecular, carril 10. *Oncidium*, carril 11. *Laelia*, carril 12. *Brassocattleya*, carril 13. Agua libre de nucleasas, carril 14. Vacío y el carril 9 y 17. Marcador de peso molecular 1kB.

Con los oligonucleótidos POTEXF1/R5 se detectaron 12 orquídeas infectadas, mientras que con los oligonucleótidos POTEX F2/R5 se detectaron 18 orquídeas infectadas, lo cual indica que probablemente los oligonucleótidos POTEX F2/R5 tengan una mayor eficiencia al momento de llevarse a cabo la RT-PCR.

Para ORSV, utilizando oligonucleótidos para TMV, se detectaron únicamente 5 orquídeas infectadas, el tamaño esperado para TMV (CPF/TMV CPR) fue de 300 pb.

Los resultados indicaron que hay una mayor incidencia de Potexvirus que de Tobamovirus en las muestras analizadas, aunque también se observaron infecciones mixta. En el cuadro 2 se observan las muestras de orquídeas que resultaron a infectadas para *Potexvirus* y *Tobamovirus*.

Al utilizarse los oligonucleótidos específicos para CymMV y ORSV, también se obtuvieron los pesos esperados. Para CymMV CPF/CymMV CPR fue de 669 pb (Figura 6) y para ORSV CPF/CPR fue de 474 pb (Figura 7).

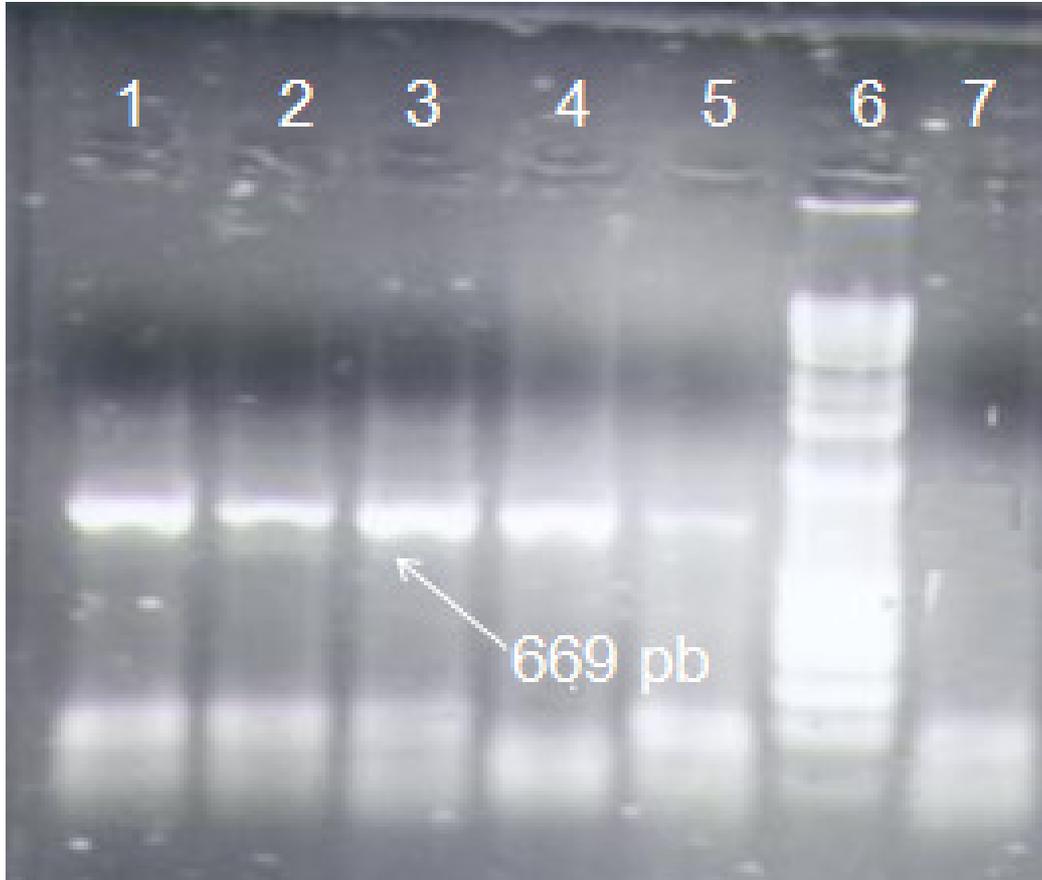


Figura 6 Electroforesis en gel de agarosa al 1% (100 Volts, 90 min. Teñidos con bromuro de etidio) de los productos de RT-PCR con los oligonucleótidos CymMV CPF/R; en el carril 1. *Cattleya*, carril 2. *Vainilla*, carril 3. *Oncidium*, carril 4. *Epidendrum*, carril 5. *Brasocattleya*, carril 6. Marcador de peso molecular, carril 7. Negativo, agua libre de nucleasas.

CUADRO 2. RT-PCR's realizadas con los oligonucleótidos para Potexvirus y Tobamovirus en muestras de orquídeas cultivadas en México.

ORQUÍDEAS	RT-PCR		
	POTEX F1/R5	POTEX F2/R5	TMV CPF/CPR
1. <i>Brassia</i>		+	
2. <i>Brassocattleya</i>		+	
3. <i>Cattleya sp.1</i>	+	+	+
4. <i>Cattleya sp.2</i>	+	+	
5. <i>Encyclia sp.1</i>			
6. <i>Encyclia sp.2</i>			+
7. <i>Encyclia sp.3</i>	+	+	+
8. <i>Encyclia sp.4</i>	+	+	
9. <i>Encyclia sp.5</i>	+	+	
10. <i>Encyclia sp.6</i>	+	+	
11. <i>Epidendrum sp.1</i>	+	+	
12. <i>Epidendrum sp.2</i>	+	+	
13. <i>Guarianthe</i>		+	
14. <i>Laelia sp.1</i>	+	+	
15. <i>Laelia sp. 2</i>			
16. <i>Oncidium sp.1</i>	+	+	+
17. <i>Oncidium sp.2</i>			+
18. <i>Oncidium sp.3</i>	+	+	
19. <i>Oncidium sp.4</i>			
20. <i>Oncidium sp.5</i>	+	+	
21. <i>Schomburgkia sp.1</i>	+		
22. <i>Schomburgkia sp.2</i>		+	
23. <i>Vainilla</i>		+	
24. <i>Xylobium</i>		+	

Con los oligonucleótidos específicos para CymMV CPF/CPR se obtuvieron 8 orquídeas infectadas con CymMV, mientras con los oligonucleótidos generales para Potexvirus se detectaron 19 orquídeas infectadas con este virus, lo cual indica que muy probablemente las muestras de orquídeas

analizadas están infectadas con varios virus pertenecientes al grupo de los Potexvirus, quizás distintos al CymMV o variantes de este virus.

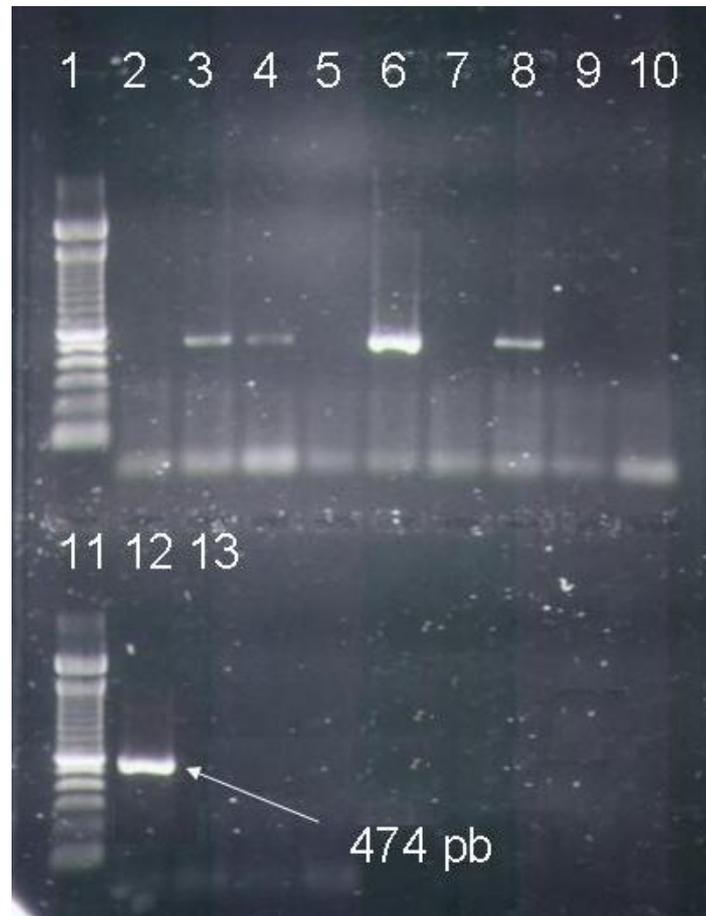


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1%(100 Volts, 90 min. Teñidos con bromuro de etidio) de los productos de RT- PCR con los oligonucleótidos ORSV CPF/CPR; en el carril 1. Marcador de peso molecular, carril 2. *Cattleya*, carril 3. *Epidendrum*, carril 4. *Xylobium*, carril 5. *Oncidium*, carril 6. *Shomburkia*, carril 7. *Oncidium*, carril 8. *Laelia*, carril 9. *Encyclia*, carril 10. *Brasocattleya*, carril 11. Marcador de peso molecular, carril 12. *Encyclia*, carril 13. Se colocó el control negativo, agua libre de nucleadas.

Se detectaron 7 muestras infectadas con ORSV con los oligonucleótidos específicos, que fue un poca más a las detectadas con los oligonucleótidos de *Tobamovirus*, lo que siguiere que los oligonucleótidos específicos para ORSV son una mejor opción para detectar a este virus en orquídeas.

En el cuadro 3 se muestran las orquídeas que resultaron estar infectadas con CymMV y ORSV utilizando RT-PCR con oligonucleótidos específicos para ambos virus.

CUADRO 3. RT-PCR's con los oligonucleótidos específicos CymMV y ORSV en orquídeas cultivadas en México.

ORQUÍDEAS	RT-PCR	
	CymMV	ORSV
1. <i>Brassia</i>		+
2. <i>Brassocattleya</i>	+	
3. <i>Cattleya sp.1</i>	+	
4. <i>Cattleya sp.2</i>	+	
5. <i>Encyclia sp.1</i>		
6. <i>Encyclia sp.2</i>		
7. <i>Encyclia sp.3</i>		
8. <i>Encyclia sp.4</i>		+
9. <i>Encyclia sp.5</i>	+	
10. <i>Encyclia sp.6</i>	+	
11. <i>Epidendrum sp.1</i>		+
12. <i>Epidendrum sp.2</i>	+	+
13. <i>Guarianthe</i>		
14. <i>Laelia sp.1</i>		+
15. <i>Laelia sp. 2</i>		+
16. <i>Oncidium sp.1</i>		
17. <i>Oncidium sp.2</i>		
18. <i>Oncidium sp.3</i>		
19. <i>Oncidium sp.4</i>	+	
20. <i>Oncidium sp.5</i>		
21. <i>Schomburgkia sp.1</i>		
22. <i>Schomburgkia sp.2</i>		
23. <i>Vainilla</i>	+	
24. <i>Xylobium</i>		+

Los resultados muestran nuevamente una mayor incidencia de CymMV con 8 muestras de orquídeas infectadas, aunque cabe destacar que la diferencia no es considerable ya que para ORSV se detectaron 7 muestras de orquídeas infectadas. El análisis del cuadro No 3, indicó que solo una muestra podría estar infectada con ambas. Sin embargo, no se realizaron ensayos de RT-PCR múltiple, para detectar infecciones en mezcla por ambos virus, por lo que quedaría pendiente llevar a cabo este ensayo, ya que la literatura mundial indica una alta frecuencia de infecciones en mezcla con ambos virus en todo

tipo de orquídeas cultivadas e incluso algunos estudios indican la asociación de CymMV y ORSV en las infecciones en mezcla, que facilita el movimiento de ORSV solo por la presencia de CymMV en la misma planta (Arce, 2006).

Con los resultados obtenidos, se observó que la RT-PCR aunque es una técnica muy específica, su sensibilidad no lo fue del todo, si se comparan con los resultados de DAS-ELISA.

Clonación y secuenciación

Se seleccionaron y secuenciaron 10 clonas en total, con los insertos de los ensayos de RT-PCR para un fragmento del gen de la Replicasa (RpRd) del grupo de Potexvirus, para un fragmento del gen de la CP de Tobamovirus y finalmente para los fragmentos de los genes de la CP de CymMV y de ORSV, respectivamente. Los aislados de cada virus se obtuvieron de las orquídeas de los géneros *Encyclia sp*, *Laelia sp* y *Oncidium sp*.

Se obtuvieron los números de acceso del Genbank por cada clona seleccionada y se confirmó la identidad de cada aislado por análisis y comparación de secuencias con las disponibles en el GenBank (Cuadro 4).

CUADRO 4. Clonas de productos de la RT-PCR de aislados de CymMV y ORSV de orquídeas cultivadas en México.

NOMBRE clona/ Hospedante	No ACCESO DEL GENE BANK	GENE
Cymclon 1/ <i>Encyclia sp</i> .	HQ393958	Replicasa(RdRp)
Cymclon 2/ <i>Encyclia sp</i> .	HQ393959	Replicasa(RdRp)
Cymclon 3/ <i>Encyclia sp</i> .	HQ393960	Replicasa(RdRp)
Cymclon 4/ <i>Encyclia sp</i> .	HQ393961	Replicasa(RdRp)
Cymclon 5/ <i>Encyclia sp</i> .	HQ393962	Replicasa(RdRp)
MorOdon 1/ <i>Laelia sp</i> .	HQ393953	CP(Coat protein)
MorOdon 2/ <i>Laelia sp</i>	HQ393954	CP(Coat protein)
MorOdon 3/ <i>Laelia sp</i>	HQ393955	CP(Coat protein)
MorCym 1/ <i>Oncidium sp</i>	HQ393956	CP(Coat protein)
MorCym 2/ <i>Oncidium sp</i>	HQ393957	CP(Coat protein)

La comparación de las secuencias obtenidas para el gen de la Replicasa de las

clonas Cymclon 1 (HQ393958), Cymclon 2 (HQ393959), Cymclon3 (HQ393960), Cymclon 4 (HQ393961) y Cymclon 5 (HQ393962), mostraron similitudes del 96 al 100% con el gen de la replicasa de las secuencias AY571289 y AF016914.1, procedentes de aislados de CymMV de Taiwan y Corea.

La comparación de las secuencias de las clonas MorOdon 1 (HQ393953), MorOdon 2 (HQ393954) y MorOdon 3 (HQ393955), mostraron una similitud de 98 al 100% con la secuencia JN584484.1 del gen de la CP de un aislado de ORSV procedente de Taiwan.

La comparación de las secuencias de las clonas MorCym 1 (HQ393956) y MorCym 2 (HQ393957) mostraron una similitud del 96 al 98% con las secuencias AF405722.1 Y AB541542.1 del gen de la CP de aislados de Aranda Noorah Alsagoff y de Corea (GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov)).

El análisis y comparación de las secuencias obtenidas con las disponibles en el GenBank demostraron y confirmaron la identidad de CymMV y ORSV en las orquídeas recolectadas en México.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se confirmó la presencia e identidad de los virus CymMV y ORSV en plantas de orquídeas con síntomas de mosaico, moteados, manchas anulares y necrosis.

La prueba serológica de DAS-ELISA permitió detectar, en la mayoría del material recolectado, la presencia de CymMV y ORSV rápidamente y con alta eficiencia, considerando los síntomas relacionados con ambos virus y los resultados de esta prueba. Por lo que al parecer y considerando los resultados de esta prueba, los causantes de los síntomas observados en orquídeas fueron CymMV y ORSV ya que fueron los que presentaron mayor incidencia.

Por otro lado, se detectaron otros virus como TMV y CMV, virus que se han reportado afectando a diversos géneros de orquídeas en todo el mundo. También se detectó al TEV (Potyvirus), sin embargo este virus no es patógeno de orquídeas, por lo que es probable, que en el material recolectado se encuentre alguna especie de Potyvirus, que son comunes en orquídeas, y que no se pudo identificar en el presente trabajo, y que en las pruebas de DAS-ELISA dio reacción serológica cruzada, común entre miembros de este grupo de virus.

El análisis de ARNdc de origen viral de las muestras positivas de ser infectadas por CymMV y ORSV, permitió observar el patrón electroforético de los componentes genómicos de estos virus, aunque no consistente en todos los casos. Fue más común de observar el patrón electroforético del ARNdc de CymMV que el de ORSV, lo cual coincidió con los resultados del análisis de DAS-ELISA, en el que se detectaron más plantas infectadas con CymMV que con ORSV. La técnica de ARNdc, aunque específica, es laboriosa y requiere un adecuado manejo de muestras, equipo, reactivos y tener una experiencia previa para reconocer los patrones de ARNdc de origen viral.

La clonación y secuenciación de los productos de la RT-PCR, utilizando los distintos juegos de oligonucleótidos específicos para replicasa de Potexvirus, CP de Tobamovirus y CP de CymMV y ORSV, confirmaron la identidad de

ambos virus en el material recolectado. La comparación de las secuencias de los fragmentos clonados, confirmó que los aislados de CymMV y ORSV son 96 a 100% similares a los aislamientos comunes encontrados en orquídeas cultivadas en todo el mundo, particularmente con los aislados encontrados en Corea y Taiwan. Esto permite asegurar que los aislados de CymMV y ORSV de México, probablemente proceden de todas las regiones donde se cultivan orquídeas, y que es más que probable que se encuentren ampliamente distribuidos en nuestro país, considerando el origen del material con el que se realizó el presente trabajo, como son plantas de *Encyclia*, *Laelia* y *Oncidium*, materiales que son ampliamente distribuidos en México, ya sea en forma de variedades o híbridos, y tomando en cuenta la forma de propagar y cultivar este material.

CymMV pertenece al género *Potexvirus*, orden de los *Tymovirales* y a la familia *Alphaflexiviridae*. Los virus que pertenecen a los *Potexvirus* consisten de una sola barra flexible resistente que mide de 470 a 580 nm de largo y de diámetro mide 11 a 13 nm. Es un virus de ARN que codifica para 5 proteínas; una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), tres proteínas del movimiento (MP), encargadas del transporte viral de célula a célula, y proteína de la cápside (CP), el CymMV, resulta ser el virus más importante que afecta a las orquídeas, estos virus generalmente causan un tipo de mosaico, en diferentes grados (Agrios, 1997). Debido a esto a veces a CymMV se le conoce también como virus mosaico de la orquídea ó virus de la línea oscura de *Cymbidium* (Frankie, 1970).

Los síntomas causados por *Cymbidium mosaic virus* son: jaspeados en flores, necrosis y clorosis en hojas (Zettler *et al.*, 1990).

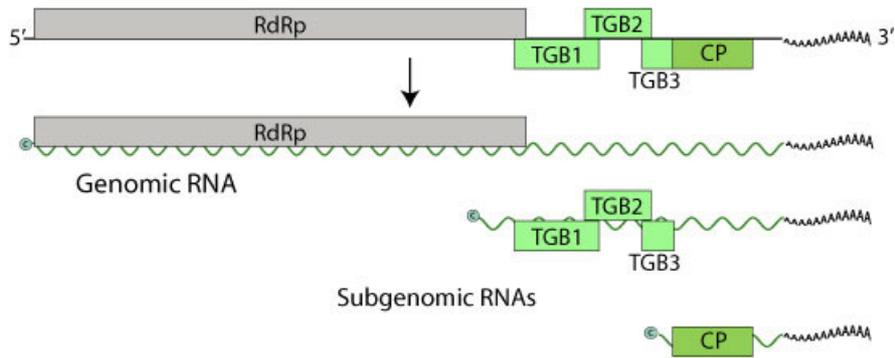


Figura 2. Representación esquemática del genoma de *Cybidium mosaic virus* (CmyMV) en el cual se observan; el gen de la de la ARN polimerasa dependiente de ARN, el bloque de genes triple y la proteína de la cápside.

ORSV pertenece al género de los Tobamovirus, los cuales tienen forma de varilla y miden entre 18 y 300nm, su genoma consiste de una cadena sencilla con sentido positivo. El ARN codifica para cuatro proteínas, una para la proteína de la cápside, dos son componentes de la RNA polimerasa y la cuarta está asociada con la proteína del movimiento (Agrios, 1997).

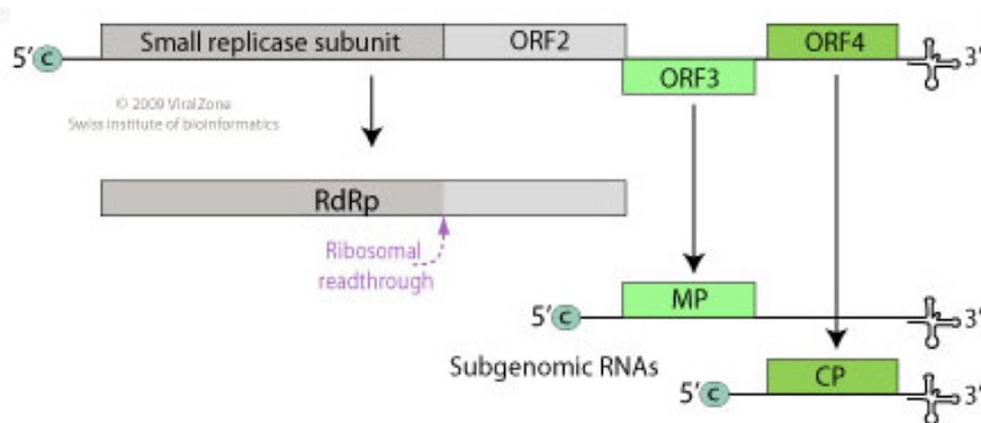


Figura 3. Representación esquemática del genoma de *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) en el cual se observan; los dos componentes del gen de la ARN polimerasa dependiente de ARN, el gen de la proteína del movimiento y la proteína de la cápside.

Las plantas analizadas mostraron infecciones mixtas por ambos virus, que asociado a las características propias del hospedante, pudieran explicar la gran diversidad de los síntomas observados, aunque cabe la posibilidad que pudieran existir otros virus que no fueron detectados por las técnicas utilizadas en el presente trabajo.

Se observó que la detección de ambos virus fue más eficiente utilizando la RT-PCR y que por su costo y precisión lo convierte en el mejor método de diagnóstico de virus de orquídeas.

Es importante destacar que este es el primer trabajo que reporta la presencia de los virus CymMV y ORSV en orquídeas en México.

CONCLUSIONES

Se detectó la presencia de CymMV y ORSV, *en infecciones mixtas y simples*, en diferentes géneros de orquídeas cultivadas en invernaderos del Estado de Morelos y comercializadas en centros de distribución y mercadeo del Distrito Federal.

Se confirmó la identidad de CymMV y ORSV, mediante la clonación y secuenciación de los productos de la RT-PCR de las muestras de orquídeas. Los análisis de comparación con otras secuencias de ambos virus, demostraron que CymMV y ORSV se encuentran en orquídeas cultivadas en México y probablemente en todo el país.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adkins S. and Roskopf E. 2001. Key West Nighth, a new experimental host for plant viruses. *Plant Disease*. Vol. 86 No. 12:1310-1314.
2. Agrios G. 1997. *Plant pathology*. Elsevier. pp. 478-513.
3. Ajjikuttira Pabha, Loh Chiang- Shiong and Wong Sek-Man. 2005. Reciprocal function of movement proteins and complementation of long-distance movement of *Cymbidium* mosaic virus ARN by *Odontoglossum* ringspot virus coat protein. *J. General Virology* 86:1543-1553.
4. Arce A. 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. Instituto tecnológico de Costa Rica.
5. Bangham Charles R. M. 1991, *Methods in molecular biology*. Vol. 9: protocols in human molecular genetics. pp. 1-7.
6. Banks D. 2006. *Cultivo de orquídeas; propagación y variedades*. Ed. Blume. Barcelona.
7. Bauer M. 1991. *Fitopatología*. Ed. Limusa; virus y viroides. Pp.65-79.
8. Books O. y Books M. 1999. *Ortho`s all about orchids. Types of orchids*. Ed. Des Moines. EUA. Pp. 20-21.
9. Brunt A. A., Crabtree K., Dallwitz M. J., Gibbs A. J., Watson L., and Zurcher E. J. 1996. *Plant viruses online. Descriptor and lists from the VIDE Database*.
10. Chapman y Hall. 1991. *Applied Plant Virology*. Ed. D.Walkey pp.140-159.
11. Coll J. 1993. *Técnicas de diagnostico en virología*. Ed. Diaz de Santos. pp. 11.

12. Conti M., Gatelli D., Lisa V., Lovisolo O., Martelli G. P., Ragozzino A., Rana G. L., Volvas C. 2001. Principales virus de las plantas hortícolas. Ed. Mundi-Prensa. pp. 11-56.
13. De la Torre A., Monsalvo R., Salazar S., Valverde R. A. 2000. Detección y caracterización parcial de una variante amarilla del virus mosaico del pepino en el gladiolo (*Gladiolus grandiflorus*).
14. Dole J. y Wilikins H. 1999. Floriculture principles and species. Prentice –Hall. Inc pp. 438-445.
15. Dubey R. C. 2009. Biotechnology. Plant Biotechnology. Ed. S. Chand. Pp 365-385.
16. Espinoza M. A. 2006. Diseño e implementación de un método para la detección de *Ralstonia solanacearum* raza 3 biovar 2 en plantas usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Instituto Tecnológico de Costa Rica.
17. Eun A. J.-C, Seoh M.-L. y Wong S.- M. 2000. Simultaneous quantitation of two viruses by the Taq Man® real-time RT-PCR. J. of Virological Methods 87: 151-160.
18. Eun A. J.-C. y Wong S.-M. 1999. Detection of cymbidium mosaic potexvirus and odontoglossum ringspot tabamovirus using immuno-capillary zone electrophoresis. Phytopathology 89:522-528.
19. Fischer A. 2007. Cultivo de orquídeas. Ed. Imaginador. Buenos Aires.
20. Freuler M.-J. 2006. Orquídeas: enfermedades y plagas. Ed. Albatros p. 41.
21. Hew C. y Yong J. 1997. Physiology of tropical orchids in relation to the industry. World scientific publishing. pp. 1-19.
22. Hu W.-W. and Wong S.-M. 1998. The use of DIG-labelled cRNA probes for the detection of cymbidium mosaic potexvirus (CymMV) and odontoglossum ringspot tabamovirus (ORSV) in orchids. J. of Virological Methods 70: 193-199.

23. www.ictvonline.org (Fecha de consulta Octubre de 2010)
24. Jensen D. D. 1970. Enfermedades virales de orquídeas en Netherlands. Neth. J. Plant Pathology. 76: 135-139.
25. Kim. Sun., German 1994. Disease resistance in tobacco and tomato plants transformed with the tomato spotted wilt virus nucleocapsid gen. Univ. Hawaii, dep. plant molecular physiology, Honolulu. American Phytopathological Society, St. Paul.
26. Kull – Tiiu, Arditti Joseph. 2005. Orchid Biology: reviews and perspectives, Ed. Kluwer Academic publishers.
27. La Croix I. F. 2008. The new encyclopedia of orchids. Ed. Timber Press. pp. 22
28. Lee S.-C. y Chang Y.-C. 2006. Multiplex RT-PCR detection of two orchid viruses with an internal control of plant *nad5* mRNA. J. Plant Pathology 15:187-196.
29. Lim S.T., Wong S. M., Yeong C. Y., Lee S. C., and Goh C. J. 1992. Rapid detection of cymbidium mosaic virus by the polymerase chain reaction (PCR). J. of Virological Methods 41:37-46.
30. Mackenzie, D. J., M. A. McLean, S. Mukerji and M. Green. 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. Plant Dis. 81(2): 222-226.
31. Monsalvo A. 2002. Diagnostic de infecciones virales en diversos cultivos por análisis electroforéticos de ARN de doble cadena. UNAM. Tesis
32. Ospina H. M., Ospina H. O., Dressler R. 1974. Orquídeas de las Américas. Litografía arco. pp. 9
33. Ramírez J. 1996. Orquídeas de México. CONABIO. Biodiversitas 5:1-5.
34. Seoh M.-L., Wong S.-M., Zhang L. 1998. Simultaneous TD/RT-PCR detection of *Cymbidium mosaic potexvirus* and *Odontoglossum ringspot*

- tobamovirus* with a single pair of primers. J. of Virological Methods 72:197-204.
35. Schoser G. 1993. Orchids growing basics. Sterling publishing. Pp. 7-9.
36. Sosa-Moss C., Perdomo R., Brathwaite C., Salazar C. 1997. Técnicas para el diagnóstico de las enfermedades de las plantas. Instituto interamericano de cooperación para la agricultura. México. Pp. 139-186.
37. Soto Arenas M. A., Hágstern E., Jiménez Machorro R. y Solano Gómez R. 2007. Orquídeas de México. Herbario AMO-Instituto Chinoín, A. C. y Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional- Unidad-Oaxaca. Instituto Politécnico Nacional. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. P 104. México DF.
38. Strider D. 1985. Diseases of floral crops. Praeger publishers. Pp. 253-291.
39. Tanaka S., Nishii H., Ito S., Kameya-Iwaki M., and Sommartya P. 1996. Detection of Cymbidium mosaic potexvirus and odontoglossum ringspot tabamovirus from Thai orchids by rapid immunofilter paper assay. Plant Dis. 81:167-170.
40. Valverde R. 1990. Analysis of double- stranded RNA for plant virus diagnosis. Plant disease. Pp. 255-258.
41. Van der Vlugt René A. A. and Berendesen Miranda. 2002. Development of a general potexvirus detection method. J. Plant Pathology. 108: 367-371.
42. Wong S. M., Mahtani, Lee K. C., Yu H. H., Tan Y., Neo K. K., Chan Y., and Wu M., Chang C. G. 1997 Cymbidium mosaic potexvirus RNA: complete nucleotide sequence and phylogenetic analysis. Arch Virol 142:383-391.
43. You-Xiu Zheg, Ching-Cheung Cheng, Yuh-Kun Chen and Fuh- Jyh Jan, 2005. Identification and characterization of a potyvirus causing chlorotic spots on *Phaleonopsis* orchids. J. Plant pathology. 121: 87-95.

ANEXOS

ANEXO 1. DAS-ELISA

El Kit de Agdia posee el anticuerpo (a y b, o sólo a), el conjugado (de a y b o sólo a), el sustrato y las placas.

Sensibilización de las Placas.

1. Para calcular la cantidad de pozos que se usarán, se toma en cuenta el número de muestras, más el control positivo (muestra que contenga el virus de interés), el control negativo (H₂O) y el blanco (muestra con un virus diferente al virus de interés), y las repeticiones. Por ejemplo: $10+1+1+1 \times 2=26$ pozos a usar.
2. Para calcular la cantidad de buffer que se usará se toma en cuenta el número de pozos por el volumen a llenar en los pozos entre 1, 000 ($26 \times 100/1000= 2.6$ ml de Buffer de cubrimiento).
3. Para calcular la cantidad de anticuerpos que se usará se toma en cuenta el número de pozos por el volumen a llenar y se divide entre 200 que es la [1:200] a la que tenemos el anticuerpo ($26 \times 100/200=13\mu\text{l}$ de anticuerpo).
4. Una vez hechos los cálculos del material y reactivos a utilizar se procede de la siguiente manera: se juntan el buffer de cubrimiento más el anticuerpo y se llenan los pozos con 100 μl cada uno, se incuba a 4°C toda la noche o a temperatura ambiente 4hrs en cámara húmeda (puede prepararse hasta con semanas de anterioridad).
5. Lavar las placas con PBST (buffer de lavado) de 4 a 6 veces y secar bien.

Preparación de las muestras

6. Macerar cada una de las muestras en las bolsas con 1 a 5ml de buffer SBI (Buffer de extracción).
7. Colocar 100µl de las muestras en cada uno de los pozos.
8. Incubar en cámara húmeda por 2.5 hrs.
9. Lavar la placa con PBST 1X (Buffer de lavado) de 4 a 6 veces a secar bien.

Preparación de la enzima de conjugado.

10. Preparar la solución de conjugado 10 minutos antes de usar, el buffer de conjugado ECBI ($26 \times 100 / 1000 = 2.6$ ml de Buffer) se mezcla con la enzima de conjugado ($26 \times 100 / 200 = 13$ µl de la enzima, en caso de ser a y b se pondrá 6.5 de cada una y se llena cada uno de los pozos con 100µl de esta solución.
11. Se pone en incubación en una caja húmeda por dos horas a temperatura de 21 a 24 °C.
12. Lavar la placa con PBST 1X (buffer de lavado) 4 a 6 veces y secar bien.

Preparación del sustrato

13. Preparar la solución de sustrato de 10 a 15 minutos antes de que termine el tiempo de incubación.
14. Disolver previamente la pastilla (moler); para cada tableta o pastilla se agregan 5ml de PNP (solución de sustrato), esto alcanza para una placa completa. Se coloca 100µl de esta solución y se incuba en un lugar oscuro por 30 a 60 minutos.
15. Los resultados se evalúan cada 20, 40, y 60 minutos. Se tomará como reacción positiva visualmente, si da tono amarillo.

BUFFERS

Buffer de cubrimiento

Carbonato de sodio (anhidro)	1.60gr
------------------------------	--------

Bicarbonato de sodio	2.92gr
Asida de sodio	0.2gr
Disolver en agua desyilada y aforar a 1L. Ajustar el pH a 9.6 y almacenar a 4°	

Buffer de lavado PBST 10X

Fosfato de sodio dibásico (anhidro)	11.5gr
Fosfato de potasio monobásico (anhidro)	2.0gr
Cloruro de sodio	80.0gr
Cloruro de potasio	2.0gr
Tween-20	5.0gr
Disolver en agua destilada y aforar a 1L. Ajustar pH a 7.3. Para preparar al X se prepara una solución con 100ml de 20X y se afora a 1L.	

Buffer de extracción SBI

Albumina de huevo, grado II	2.0gr
Polyvinylpyrrolidone (PVP) MW 24-40,000	
Sulfito de sodio (anhidro)	
Azida de sodio	
Tween-20	
Disolver en agua destilada y aforar a 1L Ajustar pH a 7.3, almacenar a 4°C	

Buffer de conjugado ECBI

Albumina de Bovino	2.0gr
Polyvinylpyrrolidone (PVP) MW 24-40,000	10gr
Azida de sodio	0.2gr
Disolver en PBST 1X, ajustar el pH a 7.3, almacenar a 4°C y aforar a 1L.	

Buffer de sustrato PNP

Diethanolamine	
Cloruro de magnesio	
Azida de sodio	
Disolver en 800ml de agua destilada, ajustar el pH a 9.8 con ácido Clorhidrico. Aforar a 1L y almacenar a 4°C.	

ANEXO 2. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE DOBLE CADENA.

1. Macerar 3.5 gr de tejido en nitrógeno líquido o congelar el mortero con la muestra en el refko a -70°C y pasar a un tubo de 50ml. Añadir 10ml de STE 1X, 1ml de SDS al 10%, 500 μl de bentonita al 2% y 9 ml de fenol-STE1X.
2. Poner el tubo en agitación fuerte durante 30 minutos.
3. Centrifugar a 8,000 rpm durante 10 minutos, calibrar con STE 1X.
4. Recuperar la fase acuosa en otro tubo y agregar 2.1 ml de etanol absoluto frío, se mezcla bien y se guarda a -20°C (2 días máximo).
5. En otro tubo se mezclan 25ml de STE 1X- etanol al 16% y 1gr. De celulosa-CF 11 (distribuidor), agitar vigorosamente hasta que se deshagan los grumos. Tomar una jeringa de 20ml colocándole un círculo de papel filtro en el fondo y vaciar el contenido del tubo sin regresar líquido, deje que se drene completamente.
6. Tome el tubo del paso 4 descongelar el contenido y agregarlo en la columna de celulosa.
7. Ya que el contenido de la jeringa se haya drenado añadir 25ml de STE 1X-etanol al 16% para limpiar la columna y eliminar el DNA, RNA de cadena sencilla, clorofilas, etc. Este paso se repite hasta que la columna vuelva a ser blanca.
8. Cuando la columna ya este blanca, se coloca por debajo de ella un tubo limpio; a la columna se le agrega 10ml de STE 1X sin etanol al 16% y se recupera el filtrado.
9. Al filtrado se le agregan 20ml de etanol absoluto frío y 500 μl de acetato de sodio 3M. aquí se pueden guardar los tubos a -20°C .
10. Mezcla bien y centrifugar a 8,000rpm durante 30 minutos. Para calibrar se utiliza etanol absoluto frío.

11. Se elimina el sobrenadante en un solo movimiento no regrese el líquido, ya que se puede despegar la pastilla y puede perder su RNAdc, vierta el tubo sobre un papel para que la pastilla se seque.
12. Cuando la pastilla este seca al igual que las paredes del tubo se agrega de 100 a 200µl e agua libre de nucleasas, cuidando de lavar bien las paredes. Se centrifuga brevemente para recuperar todo el líquido y se almacenan en tubos eppendorf a -20°C. Como una opción para cargar el gel de poliacrilamida se puede recuperar el RNAdc con 200µl de buffer de carga de RNA y se puede guardar a -20°C.

PATRON ELECTROFERÉTICO

En vaso de precipitado mezclar en el siguiente orden:

- 3.5 ml de agua destilada desionizada estéril.
- 3.4 ml de regulador E3X.
- 2 ml de bisacrilamida- acrilamida.
- 1 ml de TEMED
- 150 µl de persulfato de amonio (100mg/100ml)

Al colocar el persulfato ya se debe tener colocada la cámara de electroforesis para vaciar la mezcla anterior, se deja gelificar de 30 a 40 minutos. Son 10 carriles pero no se ocupan ni el primero ni el último ya que las muestras pueden salirse del gel.

En ambos compartimientos se pone el regulador de electroforesis (E) 1X (50ml de E 20X más 950 ml de agua destilada desionizada). Para cargar las muestra, se enjuaga la jeringa de vidrio con el regulador E 1X, se toman 30 µl de RNAdc más 20 µl de buffer de carga de RNA se mezclan y se colocan lentamente en el carril. Por último se enjuaga la jeringa en el mismo buffer de electroforesis. Se conecta al dispositivo una fuente de poder y se corren las muestras a 100 volts durante 2 hrs. 15 minutos.

Para teñir el gel y observar bandas, se tiñe con bromuro de etidio al 0.5% durante 5 a 10 minutos en agitación, esto dependerá de que tan utilizado este el etidio, luego se enjuaga el gel con agua DDE.

Tinción con nitrato de plata (AgNO_3) 0.1 M

1. Se prepara la solución fijadora con 10 % de etanol absoluto y 1% de ácido acético glacial). Se agrega al gel y se deja actuar por 20 minutos, en agitación continua. * Aquí se puede empezar a preparar la solución reveladora.
2. Se decanta la solución fijadora y se lava el gel con agua DD 3 veces.
3. Se adicionan 50ml de AgNO_3 0.011M (5 ml AgNO_3 + 45 ml de agua DD, dejando actuar por 20 minutos en agitación.
4. Se recupera AgNO_3 , y se lava el gel con agua DD 5 veces.
5. Se añade 50 ml de solución reveladora (3gr de NaOH + 48ml de H_2O DD +2 ml de formaldehído) al gel, se observa constantemente y se detiene la reacción con agua DD cuando se observan las bandas.

REACTIVOS

REGULADOR DE EXTRACCIÓN STE 10 X

800 ml de agua destilada desionizada.

61 gr de tris base pH 8

58 gr de NaCl

3.7 gr de $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Llevar a un volumen de 1 000 ml y ajustar a un pH de 6.8 con HCl concentrado.

STE1X-ETANOL AL 16%

100 ml de STE 10X

174 ml de etanol al 95%

726 ml de agua destilada desionizada

REGULADOR DE ELECTROFORÉSIS 20X (E)

97 gr de tris base pH 8

54.5 gr de acetato de sodio trihidratado.

7.4 gr de Na₂EDTA- 2H₂O

800 ml de agua destilada desionizada

Llevar a 1000 ml y ajustar pH de 7.8 con ácido acético.

BUFFER DE CARGA

5 ml de regulador E 20X

20 ml de glicerol

0.01gr de azul de bromofenol

75 ml de agua destilada

Mezclar bien y esterilizar

ANEXO 3. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS CON SILICA

1. Triturar **0.05g** de tejido vegetal con **500µL** de tampón de extracción en una bolsa de plástico. (**Añadir el β-mercaptoetanol al momento de hacer la extracción**: 10µL de β-mercaptoetanol para cada mL de buffer de extracción que se utilice).
2. Transferir **500µL** del homogenizado (Macerado + buffer de extracción) a otro tubo eppendorf estéril de 1.5mL.
3. Añadir **100µL** de **n-lauroyl sarcosina 10%** e incubar a **70°C** durante **10min**. (Agitando los tubos de vez en cuando).
4. Incubar en hielo **5 min**.
5. Centrifugar **10 min a 12000 rpm, a 4°C**.

6. Transferir **300µL** a un tubo estéril nuevo y añadir: **150µL** de etanol absoluto, **300µL** de NaI 6M (Ioduro de sodio), **50 µL** de silica resuspendida.
7. Incubar a temperatura ambiente durante 30 min. (Agitando los tubos de vez en cuando).
8. Centrifugar 1 min a 6000 rpm, temperatura ambiente
9. Eliminar el sobrenadante y lavar el sedimento con 1mL de tampón de lavado, dar vortex hasta que se disuelva totalmente el pellet.
10. Centrifugar 1 min a 6000 rpm, temperatura ambiente.
11. Repetir 3 veces el paso de lavado (el sobrenadante debe quedar claro).
12. Resuspender el pellet en **100µL** de agua estéril.
13. Incubar a 70°C durante 4min.
14. Centrifugar 3 min a 12000rpm, a temperatura ambiente.
15. Transferir **100µL** del sobrenadante a un tubo estéril nuevo y almacenar a -20°C. (No tomar todo porque queda algo de Silica, resuspendida).

Soluciones necesarias

Etanol 96%

Tampón de extracción (Gridding buffer):

Reactivo	Concentración	Cantidades para preparar 50mL
Guanidine hypochloride	6 M	28.65g
Acetato de sodio pH 5.2	0.2 M	3.33 mL de AcNa pH 5.2, 3M
EDTA	25mM	0.46 g
Acetato de potasio	1.0mM	4.9g
PVP-40	2.5%	1.25g
β-mercaptoetanol	1%	Añadir al momento de usarse, 100µL de β-mercaptoetanol por cada 10mL de buffer de extracción

Ajustar el pH 5.6-5.8 con ácido acético glacial conc. (~1.2mL)

Completar con H₂O hasta 50mL

Disolver en agitador con calor (90 °C) llevarlo hasta 50-53mL porque está en el punto de saturación

Tampón de lavado

Reactivo	Concentración	Cantidades para preparar 100mL
Tris-HCl pH 7.5	10mM	0.157g
EDTA	0.5mM	0.186g
NaCl	50mM	0.292g
Etanol	50%	50mL

Completar con H₂O hasta 100mL

NaI 6M

Reactivo	Cantidades para preparar 10mL
NaI	9g
Na ₂ SO ₃	0.187g
H ₂ O	10mL

Almacenar en botella oscura a 4 °C

N-lauroyl sarcosina 10%

Reactivo	Cantidades para preparar 10mL
N-lauroyl sarcosina	1g
H ₂ O miliQ estéril csp	10mL

No autoclavar

Usar guantes

SOLUCIÓN DE SILICA 100% (PH 2)

En un frasco añadir 22gr. De Silica (sigmaS5631), añadir 200mL. De H₂O, mezclar y dejar 24 horas en la oscuridad a temp. Amb. . Decantar el sobrenadante (190 ml. Es fácil decantar ya que las partículas se apelmazan en el fondo) y añadir 200ml. De H₂O, mezclar y dejar reposar 5 hrs. Decantar el sobrenadante (160ml.)

Ajustar la mezcla hasta 22ml. Con H₂O y ajustar el PH a 2 con HCL, autoclavar y almacenar en una botella ambar a 4C^o (puede conservarse hasta 1 año).

ANEXO 4. PROTOCOLO DE RT-PCR EN TRES PASOS PARA AMPLIFICAR LOS VIRUS ORSV Y CYMMV

Las cantidades que aquí se presentan, son para 1 reacción

Paso 1: Desnaturalización del RNA

1. En un tubo eppendorf de 0.2 ml (200 μ L) colocar 2 μ l de RNA
2. Adicionar 0.2 μ l de primer mix
3. Incubar en el termociclador a 95°C durante 5 min.
4. Después 1 min. en hielo

Paso 2: Formación del cDNA

En un tubo eppendorf de 200 μ L.

1. Colocar 1 μ L de buffer 5X de la enzima AMV
2. Adicionar 0.4 μ l de dNTP's (10mM)
3. Colocar 0.2 μ l de enzima AMV (10u/ μ l)
4. Agregar 1.2 μ l de agua
5. Mezclar bien y adicionar 2.8 μ l de la mezcla a cada tubo del paso 1
6. Incubar en el termociclador a 42°C por 45 min
7. Incubar 1 min en hielo

Paso 3: PCR

1. En un tubo eppendorf de 0.2 μ L, colocar 73.35 μ L si se trata de ORSV y 3.15 μ l si se trata de CymMV de agua.
2. Agregar 1 μ L de buffer 10X (250u/ml)
3. Adicionar 0.5 μ L de MgCl (50mM)
4. Poner 0.2 μ L de dNTP's (10mM)
5. Agregar 0.8 μ L de primer mix (10mM)
6. Colocar 0.2 μ L de la enzima Taq DNA Polimerasa (5u/ μ l)
7. Poner 0.3 μ L de Cdna
8. Ponerlo en el termociclador bajo las siguientes condiciones:

T°C	Tiempo	Ciclos
96°C	5 minutos	1
96°C	30 segundos	30 ciclos
52°C	30 segundos	
72°C	30 segundos	
72°C	7 minutos	1
4°C	∞	

Electroforesis: Correr los productos en un gel de agarosa al 1%, con buffer TBE 0.5%, de a 100 V durante 45 min.

Cada 5 μ L de producto de PCR, se mezcla con 1 μ L de buffer de carga.

ANEXO 5. LIMPIEZA CON WIZARD SV GEL Y PCR CLEAN UP SYSTEM

PURIFICACIÓN DEL DNA POR CENTRIFUGACIÓN

Disolver el gel de agarosa.

1. Coloque el gel con la banda de interés en el tubo eppendorf de 1.5 ml anteriormente pesado.
2. Adicione 10 μ l de la solución 1 (membrana binding solution) por cada 10mg de peso del gel de agarosa. Incube a 50-65°C hasta que el gel este completamente disuelto.

Unión de DNA

1. Inserte una columna SV en un tubo colector.
2. Transfiera el mix del gel diluido con la solución 1 en la mini columna ensamblada. Incube a temperatura ambiente por 1 minuto.
3. Centrifugue a 10, 000 RPM por un minuto. Decante el sobrenadante del tubo colector y vuelva a insertar la mini columna en el mismo.

Lavados

4. Adicione 700 μ l de la solución 2 (membrana wash solution), centrifugue a 10, 000 RPM por 1 minuto. Decante el sobrenadante y reinserte la mini columna en el tubo colector.
5. Repita el paso 4 con 500 μ l de la solución 2, centrifugue a 10, 000 RPM por 5 minutos.

NOTA: Antes de colocar el agua asegúrese de que no queden restos de buffer de lavado, se pueden realizar uno o dos centrifugados más (De La Torre, 2008).

Elusión

6. Transfiera la mini columna a un tubo estéril de 1.5 ml.
7. Adicione 50µl de agua libre de nucleasas en la mini columna. Incube a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente centrifugue a 10,000 RPM por un minuto y tire la mini columna.

NOTA: Para asegurar que obtendremos todo el DNA se pueden colocar los 25µl restantes incubar y centrifugar (De La Torre, 2008).

8. Concentrar en DNA por medio de la centrifuga conectada al vacío, hasta evaporarlo a 10µl aproximadamente.
9. Guardar el DNA a 4°C o a -20°C.

ANEXO 6. CLONACIÓN

Para clonar se utilizó el kit comercial de QIAGEN® PCR Cloning, mediante el protocolo modificado por Xoconostle (2006).

Ligación

En un tubo eppendorf de 0.2 mL se colocaron 0.5µL de vector p-Driver, 2 µL de producto de PCR limpio, 2.5µL de buffer 2X, y 0.1 µL de ligasa, se mezcló y dio un toque de centrifuga; posteriormente se dejó en incubación toda la noche a 16°C.

Transformación

Para la transformación se utilizaron células competentes comerciales de *E. coli* (cepa Top 10F), las cuales se tenían almacenadas a -70°C. En un tubo eppendorf de 1mL se colocaron 50 µL células competentes, 2 µL del producto de la ligación, se incubo en hielo durante 20 minutos, se dio un choque térmico de 42°C por 30 segundos, se dejaron los tubos 2 minutos en hielo, adicionando 250µL de medio SOC (5 g de bacto triptona, 5 g de extracto de levadura, 0.5 g de NaCl 1 M y 2.5 mL de KCl 1 M, aforados en 1000 mL de agua), se mezcló suavemente 2 veces e incubando una hora a 37°C sin agitación.

En placas de medio LB (5 g de triptona, 2.5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl 1 M y 10 g de agar aforados a 500 mL con agua destilada) con antibiótico (ampicilina 100mg/mL), se colocaron 10 µL de IPTG 0.1 M, 25 µL de

X-Gal (50mg/mL), plaquendo y distribuyendo ambos de forma homogénea. Sembrando 200 μ L de células transformadas, e incubando toda la noche a 37°C.

Preinóculo de minipreparaciones de DNA (Miniprep)

Se observaron las cajas plaqueadas, marcando las colonias blancas, con un palillo estéril se pica la colonia seleccionada, se raya una caja con medio LB más ampicilina (100mg/mL) para quitar el exceso de bacterias. Después el palillo se coloca en un tubo con 3 mL de medio TB mas ampicilina (100mg/mL) incubando toda la noche a 37°C en movimiento constante a 150 rpm y las cajas a 37°C pero sin movimiento.

Mini preparaciones de transformantes

El inóculo de los tubos con 3 mL de medio TB y el palillo, se paso a tubos eppendorf centrifugando a 12000 rpm durante 2 minutos; se tira el sobrenadante y a la pastilla se le agregan 100 μ L de la solución I y se resuspende con vortex; se agregan 200 μ L de la solución II, mezclando suavemente por inversión y reposando por cinco minutos a temperatura ambiente; se adicionan 150 μ L de la solución III, mezclando suavemente por inversión, reposando cinco minutos en hielo, centrifugando 12000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante es transferido a un nuevo tubo eppendorf estéril de 1.5 mL, (aproximadamente 450 μ L), se agregan 450 μ L de fenol:cloroformo:isoamilico (25:24:1) y vortexea. Centrifugar cinco minutos a 12000rpm temperatura ambiente, recuperando la fase acuosa (420 μ L aproximadamente), se agregan 840 μ L de etanol absoluto, incubando una hora -20°C, centrifugar a 12000rpm por dos minutos, este paso se realiza dos veces, se elimina el sobrenadante centrifugando 45 segundos y dejando secar por quince minutos, resuspendiendo en 20 μ L de agua bidestilada estéril por filtración, correr un gel de agarosa al 1.2% cargando 2 μ L de miniprep con 1 μ L de buffer de carga 6X, corriendo 45 minutos a 100 Volts.

Digestión de minipreps

Del tubo de DNA plasmídico se hace la siguiente reacción restricción, en un tubo eppendorf de 1.5mL estéril se colocan 2 μ L de de buffer 2, 1 μ L de enzima Eco-RI, 2 μ L de producto de miniprep, 14.5 μ L de agua bidestilada estéril, 0.5 de RNAasa [5mg/mL], para un volumen final de 20 μ L, incubar a 37°C por dos horas sin movimiento y almacenar a -20°C, correr gel de agarosa al 1.2% cargando 2 μ L de la restricción con un microlitro de buffer 6X, a 100 V por 90 minutos.