



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

TESIS

Para obtener el título de
BIÓLOGO

Presenta

María Siboney López Hernández

RT-PCR Multiplex para la detección simultánea de
los virus *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) y
Odontoglossum ringspot virus (ORSV) en orquídeas.



Asesor: Rodolfo de la Torre Almaráz

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México. FESI. UNAM. 2014



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.

ÍNDICE

1. Introducción.....	4
1.1. Las Orquídeas (Orchidaceae).....	5
1.2. Distribución y taxonomía de las orquídeas.....	7
1.3. Cultivo de orquídeas.....	10
1.4. Problemas fitosanitarios en orquídeas.....	13
1.5. Virus asociados al cultivo de orquídeas.....	14
1.6. <i>Cymbidium mosaic virus</i> (CymMV).....	15
1.7. <i>Odontoglossum ringspot virus</i> (ORSV).....	17
1.8. Métodos de diagnóstico molecular de virus en plantas.....	20
1.9. Reacción de Cadena de la Polimerasa de Transcripción Inversa (RT-PCR) Multiplex.....	23
2. Antecedentes.....	26
3. Objetivo.....	27
4. Materiales y método.....	27
4.1. Recolección de material.....	27
4.2. Extracción de RNA de los virus en orquídeas infectadas.....	27
4.3. Transcripción inversa ligada a la reacción en cadena de la Polimerasa (RT-PCR).....	28
4.4. RT-PCR Multiplex.....	29
5. Resultados.....	29
5.1. Producto de transcripción inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	29
5.2. RT-PCR Multiplex.....	31
6. Discusión.....	34
7. Conclusión.....	35
8. Literatura citada.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Figura 1. Partes generales de la inflorescencia de la orquídea.	2
2. Figura 2. Distribución geográfica de orquídeas.	4
3. Figura 3. Número aproximado de especies de las principales familias de plantas.	5
4. Figura 4. Costos de ingreso a México por la exportación de orquídeas.	8
5. Figura 5. Porcentaje de orquídeas exportadas por México, datos del INEGI.	8
6. Figura 6. ARN genómico de <i>Cymbidium mosaic virus</i>	13
7. Figura 7. Síntomas observados en orquídeas.	14
8. Figura 9. ARN genómico de <i>Odontoglossum ringspot virus</i>	15
9. Figura 10. Corrida de producto de RT-PCR de ORSV y CymMV.	26
10. Figura 11. Corrida de producto de RT-PCR de nad5 ARNm.	28
11. Figura 12. Corrida de producto de RT-PCR múltiplex de CymMV y ORSV.	28
12. Figura 13. Comparación en porcentajes de los resultados positivos de RT-PCR y RT-PCR Múltiplex.	30
13. Figura 14. Comparación de los resultados de RT-PCR y RT-PCR Múltiplex de las plantas sanas e infectadas.	30

ÍNDICE DE CUADROS

1. Cuadro 1. Clasificación taxonómica de la familia Orquideacea.	6
2. Cuadro 2. Nombres de los cebadores, secuencias y posición en sus respectivos genomas, y tamaño del producto esperado del RT-PCR por cada par de cebadores.	25
3. Cuadro 3. Comparación de resultados positivos y negativos entre RT-PCR simple y múltiplex.	29

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Las Orquídeas (Orquidaceae)

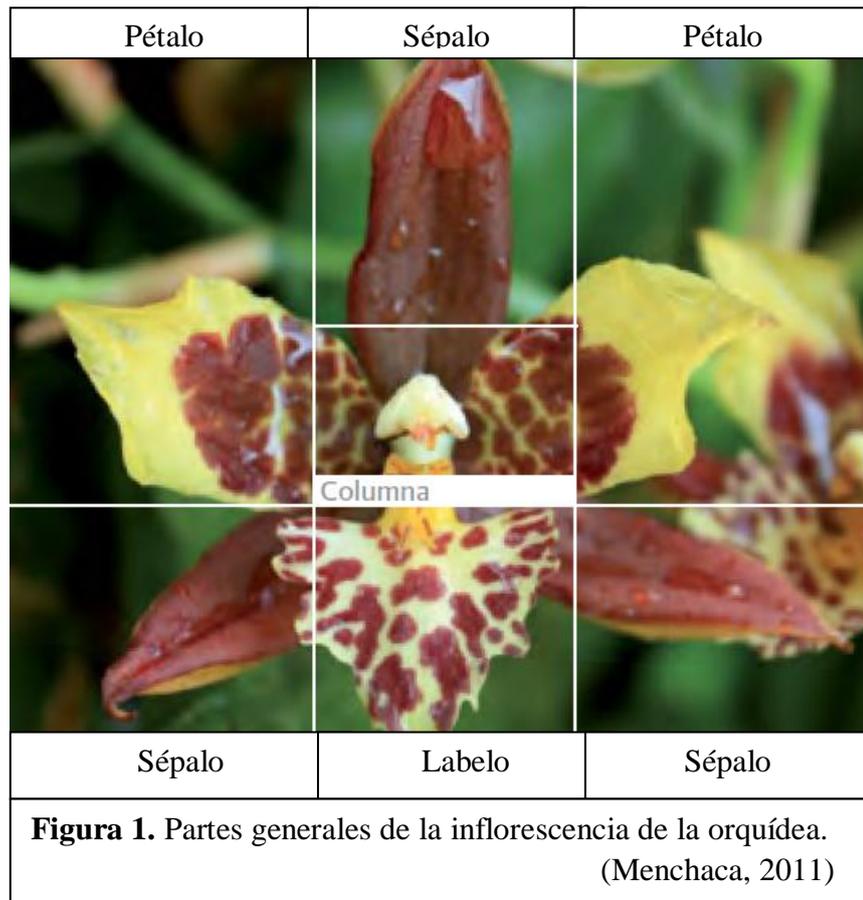
Las orquídeas son una de las familias botánica más ricas dentro de las angiospermas con más de 25,000 especies, con una amplia diversidad de formas de crecimiento, tanto epífitas como terrestres, colonizando con éxito casi todos los hábitats de la Tierra. Las orquídeas se distribuyen en todos los continentes (excepto la Antártida) pero su mayor diversidad se concentra en las regiones tropicales. Son una de las plantas más importantes a nivel ecológico y evolutivo (Ramírez *et al.*, 2007).

Aunque los bosques de neblina y las selvas tropicales húmedas del sur del país son los ecosistemas más favorables para la existencia de orquídeas, éstas se distribuyen en gran parte del territorio nacional, con excepción de las zonas de aridez extrema (Soto, 1996; Hágsater *et al.*, 2005), por lo que han desarrollado adaptaciones para poder sobrevivir, como son órganos almacenadores de agua y nutrientes, raíces capaces de realizar la fotosíntesis y flores con estrategias para su reproducción (Menchaca, 2011).

Las flores de las orquídeas nacen siempre en una axila de una bráctea foliácea o escumiforme. Generalmente las flores se agrupan en espiga o racimos, aunque existen especies que presentan una sola flor, como *Calipso bulbosa*. Las inflorescencias muestran pocas o muchas flores distribuidas de manera densa o laxa, cuyo conjunto presenta forma cónica cilíndrica u ovoide. Frecuentemente la inflorescencia se alarga en el curso de la floración.

Las flores presentan un solo plano de simetría que las divide en dos mitades: izquierda y derecha, imagen especular la una de la otra; se habla, pues, de flores de simetría bilateral. con tres sépalos frecuentemente de aspecto petaloideo y tres pétalos, uno de los cuales, el labelo, está diferenciado de los otros dos, tanto en forma como en tamaño. En

ocasiones se prolonga hacia atrás en un espolón que puede contener néctar (Figura 1). Se cree que las plantas a partir de las cuales evolucionaron las orquídeas poseían simetría radial y que una creciente especialización en ser polinizadas por insectos indujo los cambios en la disposición de las piezas florales que hoy observamos.



La mayoría de las flores son hermafroditas, pero unos pocos géneros (*Catasetum*, *Cycoches*) pueden producir flores unisexuales, masculinas o femeninas. A veces tan diferentes en su morfología que fueron considerados erróneamente como pertenecientes a géneros distintos.

El labelo es la parte de la flor que desarrolla mayores adaptaciones y principalmente es para atraer a los insectos polinizadores de la flor. Este puede presentar diversas características como callos, producir néctar, aceites o compuestos aromáticos. También

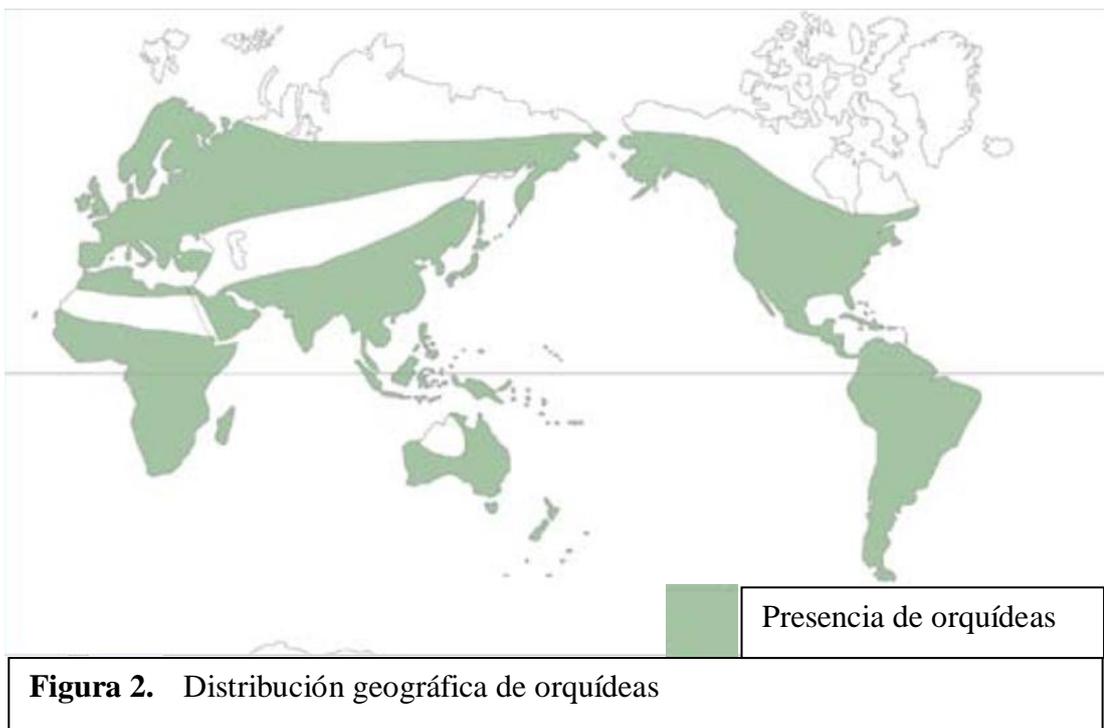
puede envolver o enmarcar a una pieza central llamada columna, la cual contiene los órganos sexuales femenino y masculino. El tamaño de las orquídeas es muy variado, las hay desde unos pocos centímetros, cuyas flores sólo se observan con lupa, hasta plantas alargadas de 15 metros, que crecen enredándose en los árboles, como la vainilla. (Menchaca, 2011).

Los frutos de las orquídeas son cápsulas con varias suturas longitudinales que al madurar permiten la liberación de las semillas. Las semillas tienen características particulares como el de ser numerosas en la gran mayoría de las especies, hasta 4,000,000 en solamente un fruto; son diminutas, con una longitud que oscila entre 0.05 mm y 6.0 mm; también son ligeras, con un peso entre 0.31 μg y 24 μg , además carecen de reservas nutritivas, por lo que su germinación requiere de la asociación del embrión con ciertos hongos (micorrizas) que le proporcionen los nutrientes necesarios (Hágster *et al.* 2005).

Las micorrizas juegan un papel importante en la existencia de las orquídeas. Las micorrizas de las orquídeas son de tipo endótrofo, lo que significa que las hifas del hongo viven en el interior de las células y no solo en los espacios intracelulares. Se ha observado que las hifas crecen formando una especie de ovillo en el citoplasma de las células. El hongo se comporta como parasito en capas celulares externas de la corteza de las raíces, mientras que en las internas, la orquídea dirige los ovillos y aprovecha las sustancias nutritivas del hongo. De este modo, la relación se establece sobre la base de un equilibrio: el hongo no debe invadir completamente los tejidos de la orquídea ni ésta debe digerir todas las hifas del hongo. La resistencia de las orquídeas a ser destruidas por los hongos micorrícicos se lleva a cabo, al menos parcialmente, mediante la síntesis de fitoalexinas, que inhiben el crecimiento de los mismos (Dressler, 1981).

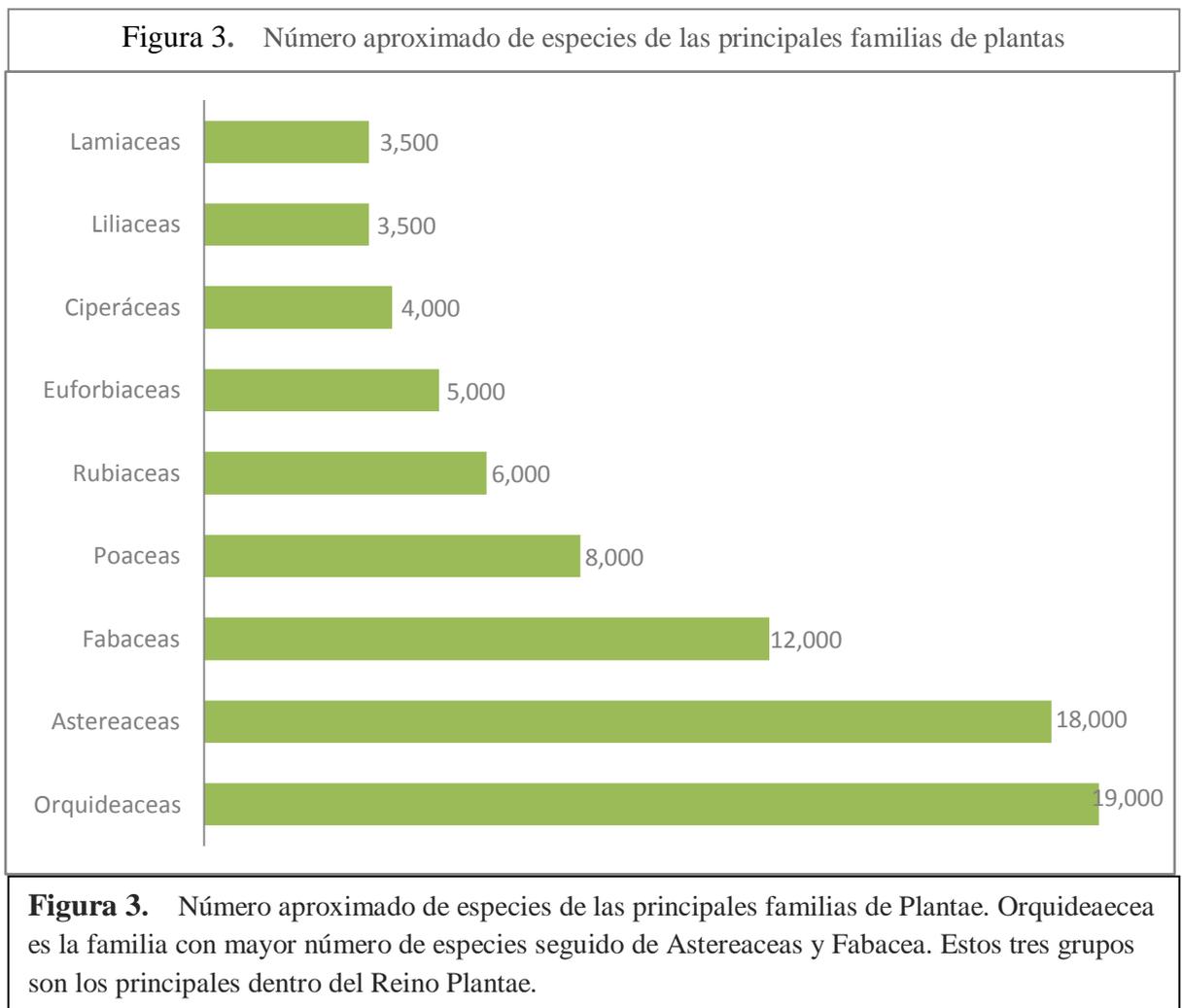
1.2. Distribución y taxonomía de las orquídeas.

Las orquídeas se encuentran distribuidas por casi todas las regiones del planeta, faltando solo en los desiertos extremos y en las tierras permanentemente heladas (Figura 2). La familia está mejor representada en los trópicos, donde se hallan confinadas numerosas especies, muchas de las cuales son plantas epífitas viven sobre troncos y ramas de árboles. Las especies de las zonas templadas y frías son todas las plantas terrestres adaptadas a una gran variedad de hábitats. Dressler (1981) considera que el total de especies, el 25% son terrestres, el 5% son capaces de crecer como epífitas o como plantas terrestres y el resto exclusivamente epífitas.



El número de especies de esta familia es una cuestión sujeta a debate: algunos autores estiman que hay unas 30,000 especies; otros reducen este número a unas 17,000. No es posible saber cuántas especies de orquídeas existen, pues son muy pocos los grupos que han sido estudiados y revisados taxonómicamente. Por ello, lo más que podemos alcanzar en una estima aproximada, como el que propone Dressler (1981), que contabiliza 19,000

especies distribuidas en 725 géneros. De todas maneras, las orquídeas constituyen una de las familias más numerosas de las fanerógamas, de las que representan aproximadamente un 7-8% (Figura 3). Las orquídeas ocupan el tercer lugar a nivel nacional en diversidad, siendo superadas sólo por Asteraceae y Fabaceae (Villaseñor, 2003; Hágsater *et al.*, 2005).



Las orquídeas pertenecen a la siguiente clasificación taxonómica:

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de la familia Orquideacea						
Reino	División	Clase	Familia	Subfamilia	Genero	Especie
Plantae	Magnoliophyta	Aspargales	Orquideacea	Cyripedioideae	Cyripedium*	56
					Mexipedium*	1
					Paphiopedilum	60-70
					Phragmipedium*	20
					Selenipedium	5
				Vanilloideae	Cleistes*	70
					Duckeella	3
					Isotria	2
					Pogonia*	7
					Pogoniopsis	2
					Cyrtosia	5-7.
					Erithrorchis	3
					Galeola	6
					PseudoVanilla	8
					Lecanorchis	18
					Clematepistephium	1
					Dictyophyllaria	1
					Epistephium*	22
					Eriaxis	1
					Vanilla*	110
				Apostasioideae	Apostasia	7
					Neuwiedia	9
				Orchidoideae*	208	600
				Epidendroideae*	500	20,000

(*) Son las subfamilias y géneros que están presentes en México

La República Mexicana está situada en el límite norte del trópico americano y alberga una notable riqueza de orquídeas, registrándose alrededor de 1,260 especies y 170 géneros, estimándose un 40% de todas ellas como especies endémicas (Hágsater *et al.*, 2005; Soto, 1996; Soto *et al.*, 2007); así mismo, constituyen la quinta familia de fanerógamas con mayor número de especies en la Cuenca de México y las 60 especies registradas hasta el momento que representan aproximadamente 3% de la flora de la región (Rzedowski *et al.*, 1989).

1.3. Cultivo de orquídeas.

Las orquídeas son empleadas en la decoración de jardines, exhibiciones o usadas con fines comestibles (*Vanilla spp.* y *Laelia outomnalis*). En todo el mundo el cultivo y la comercialización de estas plantas se han intensificado, debido a que existe una gran cantidad de horticultores y coleccionistas que las cultivan, además de varios centros de investigación e instituciones dedicadas a su conservación (Salazar, 2009).

La venta de las orquídeas o sus flores cortadas hoy en día se consideran una agroindustria masiva, solo en Estados Unidos se vende al año más de un billón de plantas: pero todas estas son híbridas, hay más de 120,000 especies híbridas registradas en el mercado y las orquídeas silvestres ya no tienen importancia en el comercio mundial, únicamente los centros de investigación botánica y un número muy reducido de orquideólogos se interesan todavía por el cultivo de especies silvestres. (Hirtz, 2004)

El cultivo de orquídeas en México por mucho tiempo fue exclusivo para coleccionistas o y a la investigación científica, y hace 20 años se empezó a cultivar con fines de venta y se expendió en los supermercados, floristerías e invernaderos de coleccionistas. Según la INEGI (Figuras 4 y 5) en el 2008 se exportó a Alemania 185 kg de tejido con un valor de \$156,290.00, a Holanda 90 kg a \$81,950.00, entre otros países, como España, Reino Unido, Ucrania, El Salvador, Canadá y Dinamarca. Donde el país pionero es Estados Unidos exportando 227kg con valor de \$ 320,927. (Cuadros 1 y Figura 4).

Actualmente se exportan 60 000 plantas al año. El crecimiento se triplicó en los últimos años, pues en el 2003 se vendieron 25 000 plantas. En ventas se registraron 51 millones de dólares entre enero y noviembre del año pasado, según el Banco Central. El área de exportación también aumentó en los últimos años, donde se exporta también a Brasil, China, Costa Rica, Filipinas, Indonesia y Tailandia (INEGI, 2008).

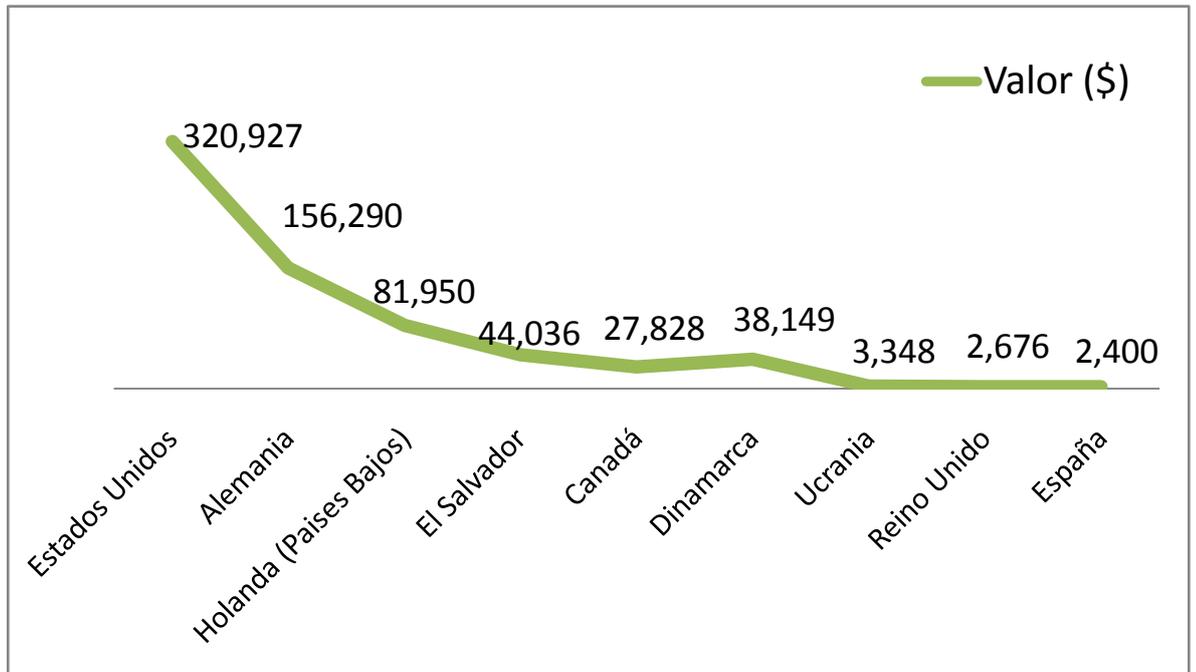


Figura 4. Costos de ingreso a México por la exportación de orquídeas, datos del INEGI, 2008

El mercado internacional de orquídeas es muy amplio y aunque hay una fuerte competencia en precios, la ventaja es que se consumen grandes volúmenes, y son muchos los países que la compran

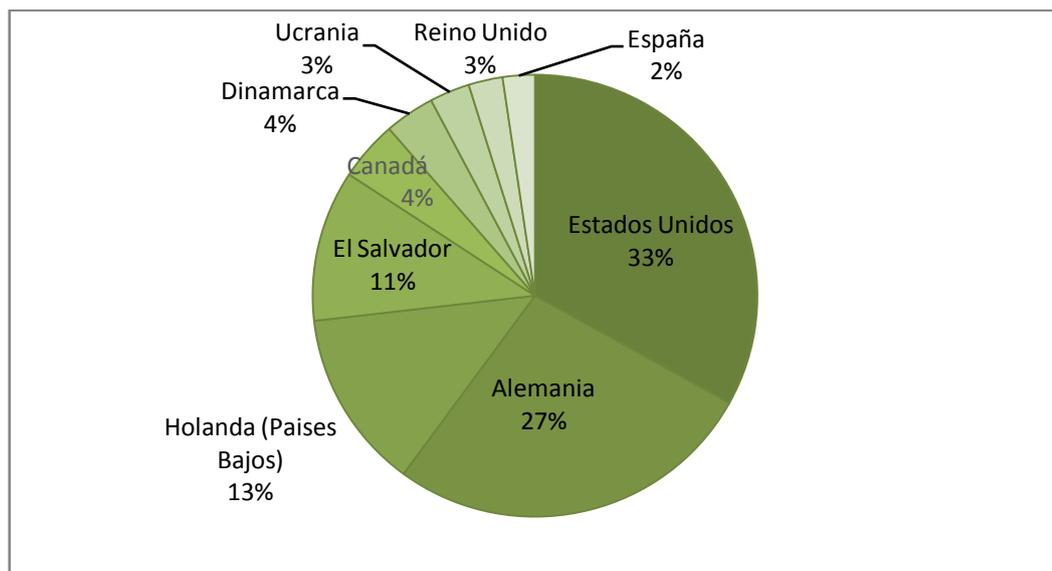


Figura 5. Porcentaje de orquídeas exportadas por México, datos del INEGI,

1.4. Problemas fitosanitarios en orquídeas.

Tradicionalmente, cuando se habla de sanidad vegetal se piensa en el binomio planta-agente causal, dejando de un lado una serie de conceptos ecológicos. Para entender los problemas fitosanitarios, se deben tomar en cuenta las condiciones ambientales, ya sea en sistemas inalterados o en sitios donde el hombre ha hecho modificaciones más o menos significativas (Rivera, 1999).

Los componentes bióticos y abióticos pueden, en determinados momentos, interferir con el normal desarrollo de una planta en particular. Ninguno de esos componentes puede analizarse por separado, pues existe una intrincada red de interacciones que inhiben o aceleran los procesos sanitarios. Estas interrelaciones pueden ocurrir dentro de los ecosistemas en equilibrio o en sistemas que han sufrido distintos grados de alteración (Rivera 1999).

En su estado natural, las orquídeas silvestres forman parte de un sistema, en el cual éstas interactúan de forma equilibrada con otros seres vivos, por lo que sus poblaciones sobreviven y se multiplican libremente en condiciones ambientales idóneas. Cuando las plantas se extraen de su ambiente natural y son manipuladas conforme a los intereses humanos, el balance natural se rompe y comienzan a incrementarse los problemas fitosanitarios, cuya incidencia puede afectar el rendimiento esperado del cultivo o deteriorar la calidad de material vegetal (Salazar, 2009)

Cuando las orquídeas se extraen de su hábitat y se colocan en una colección o cuando se explotan para el comercio, algunos de los microorganismos asociados al buen desarrollo de las plantas estarán ausentes, mientras que otros (no necesariamente beneficios) serán más comunes. Esos cambios en la composición e interacciones de las poblaciones, pueden afectar el funcionamiento de las plantas, haciéndolas más vulnerables a problemas sanitarios (Rivera, 1998).

La sanidad vegetal es un aspecto importante a considerar para la conservación de las orquídeas. En la medida que se conozcan los agentes que afectan las orquídeas, así se podrán diseñar estrategias y métodos apropiados para mantener las diferentes especies (Rivera *et al.*, 2005).

Todo problema fitosanitario es la expansión de una causa biótica o abiótica que bajo ciertas condiciones interfieren negativamente en el desarrollo normal de la plantas. Los factores bióticos involucran organismos de origen animal (artrópodos y moluscos) así como microorganismos (patógenos) o virus; mientras que los factores abióticos son los elementos inertes de la naturaleza (Rivera, 1998). Estos problemas son más frecuentes en zonas alteradas por los seres humanos, particularmente en plantas cultivadas en viveros o colecciones.

Las orquídeas, al igual que todas las plantas, conviven con una serie de factores que eventualmente les provocan algún tipo de lesión, ya sean de naturaleza biótica o abiótica. En condición silvestre, estos problemas rara vez alcanzan niveles muy altos, debido a que hay balance regulador entre los componentes del sistema; mientras que en condición de cultivo es necesario incluir en el manejo inspecciones constantes para detectar problemas, aprender a reconocerlos y combatirlos (Monge 2000).

Los problemas que pueden llegar a tener las orquídeas son: quemaduras de sol, balances hídricos (tanto la falta como el exceso de agua), temperaturas extremas, problemas nutricionales, agroquímicos mal dosificados, lluvia ácida, granizo, entre otros, todo lo anterior relacionado con problema abióticos.

Las enfermedades bióticas, pueden ser producidas por hongos, virus, bacterias, nemátodos, plantas parásitas, algas y protozoarios.

1.5. Virus asociados al cultivo de orquídeas.

Los virus de plantas tienen diferentes formas y tamaños, algunos son alargados formando barras rígidas o flexibles de 10-18 x 300-2000 nm en promedio. Otros virus tienen formas de bacilos con tamaños variables de 52-75 x 270-289 nm. También hay estructuras poliédricas con diámetros entre 17 y 809 nm. La estructura está constituida por cadenas simples de ácidos nucleicos y rodeados de una capa proteica llamada cápside (Viralzone, 2014).

El efecto nocivo de los virus en una planta no solo resulta del desvío de energía y compuestos vitales de la célula para producir más virus, sino que también altera los procesos metabólicos como la producción de metabolitos y compuestos ajenos al normal metabolismo celular. Los síntomas que provocan los virus en orquídeas son muy variables aun en el mismo hospedante, por lo que para su apropiada identificación se debe hacer pruebas serológicas o moleculares (Rivera 1998).

En los últimos años, se han descrito e identificado numerosos virus como el *Cymbidium mosaic virus* (CymMV), *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV), *Tobacco rattle virus* (TRV), *Orchid fleck rhabdovirus* (OFV) *Capcicum chlorosis virus-phalaenopsis isolate* (CaCV), *Phalaenopsis chlorotic spot virus* (PhCSV), *Bean yellow mosaic virus* (BYMV), Turnip mosaic virus (TuMV) y *Carnation mottle virus* (CarMV) (Rivera 1998, Chacón 2002, Freitas *et al.*, 2002).

Los virus que principalmente afectan la producción y la calidad de orquídeas en todo el Mundo son *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) y *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV), entre otros. Estos dos virus son de los más prevalentes y económicamente importantes en el cultivo de orquídeas, estos han ocasionado incalculables pérdidas a los

cultivadores, convirtiéndose en patógenos severos que reducen el vigor de la planta, la calidad de las flores y lo que es peor, no pueden ser controlados por ningún método.

Un virus de ARN monocatenario, los cuales pueden clasificarse según el sentido o polaridad de su ARN en negativos o positivos. El sentido de este virus es de sentido positivo (o virus (+)ssARN) es un virus como son los dos virus anteriores, que tiene ácido ribonucleico (ARN) de cadena sencilla de sentido positivo como material genético y no se replica usando ADN intermedio. Pertenecen al Grupo IV de la clasificación de Baltimore. Estos virus son idénticos al ARNm viral y por lo tanto pueden ser inmediatamente traducidos por la célula huésped. Aunque el ARN purificado de un virus positivo puede causar directamente una infección, seguramente sea menos infeccioso que el virus completo. La replicación tiene lugar principalmente en el citoplasma y no es tan dependiente del ciclo celular como en los virus ADN. (Viralzone, 2013)

Estos virus no han sido reportados en poblaciones silvestres de orquídeas. Por lo contrario, los cultivadores de orquídeas han reportado que las plantas infectadas pueden tener flores dañada y otros problemas, causando importantes pérdidas económicas. En los reportes mencionados, se puede encontrar en una amplia variedad de géneros que dañan exclusivamente a orquídeas (Ang *et al.*, 2007).

1.6. *Cymbidium mosaic virus* (CymMV)

El virus CymMV, pertenece al grupo IV; es decir, virus de cadena sencilla de ARN lineal de sentido positivo. Pertenecer a la familia Alphaflexiviridae y al género Potexvirus. Su genoma es de 5.9 a 7kb de tamaño. El lado 5' tiene cap y el 3' está poliadenilado. Codifica para 5 proteínas. El virión de ARN es infeccioso y sirve como genoma o como ARN mensajero viral. El ARN mensajero viral. El ARN dependiente de ARN polimerasa (RdRp) es traducida directamente del genoma. Los otros ORF's son transcritos como monosistriónicos, mARNs subgenómicos (sgARNs) (Viralzone, 2013) (Figura 6).

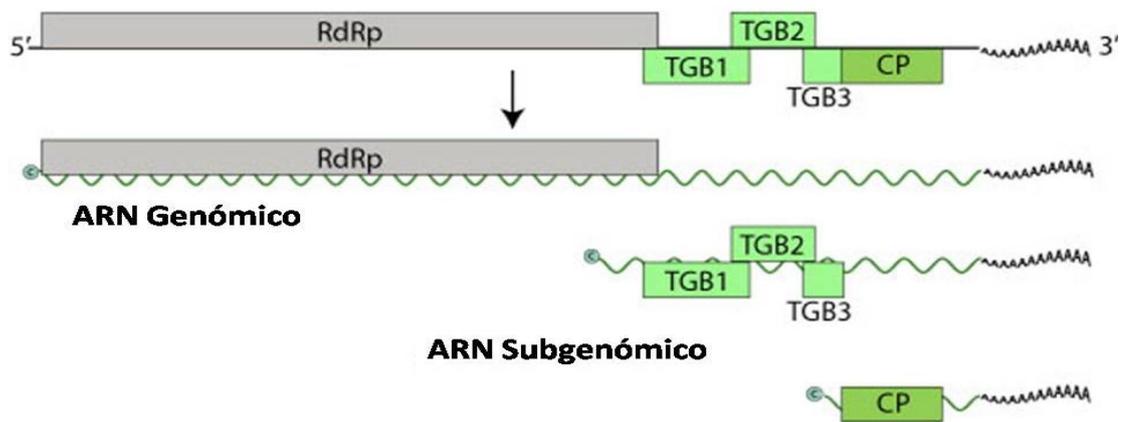


Figura 6. ARN genómico de *Cymbidium mosaic virus*. [RdRp: ARN-dependiente de ARN polimerasa, CP: Proteína de la cápside, TGB: Bloque del gen triple] (Viralzone, 2013).

Debido a la diversidad genética de las orquídeas, la observación de señales clínicas de CymMV es altamente variable o no puede ser considerada como base de diagnóstico. Frecuentemente huéspedes tolerantes han sido contaminados con CymMV y no presentan síntomas. Por lo que el número de plantas infectadas pueden inconscientemente ser multiplicadas por propagación vegetativa (Vejaratpimol y col., 1998). Orquídeas infectadas con CymMV pueden mostrar algunas señales clínicas, pues este virus impide el crecimiento de las orquídeas, tanto a través de la reducción de tamaño, así como la reducción de producción de flores. CymMV también se ha relacionado con casos de rotura en la coloración floral y necrosis. Este virus, provoca un mosaico clorótico de forma irregular y/o lesiones necróticas en los huéspedes infectados, también pueden mostrar anillos cloróticos, manchas hundidas en las hojas (Figura 7). Sin embargo, el virus todavía puede estar presente en una hoja que no muestre tales síntomas evidentes de la enfermedad. El virus aún es capaz de ser transmitido desde la planta a pesar de su apariencia "sano". Esto es importante, ya que esto hace que el valor comercial de las plantas que se reduzca en gran medida (Chia, 1992).

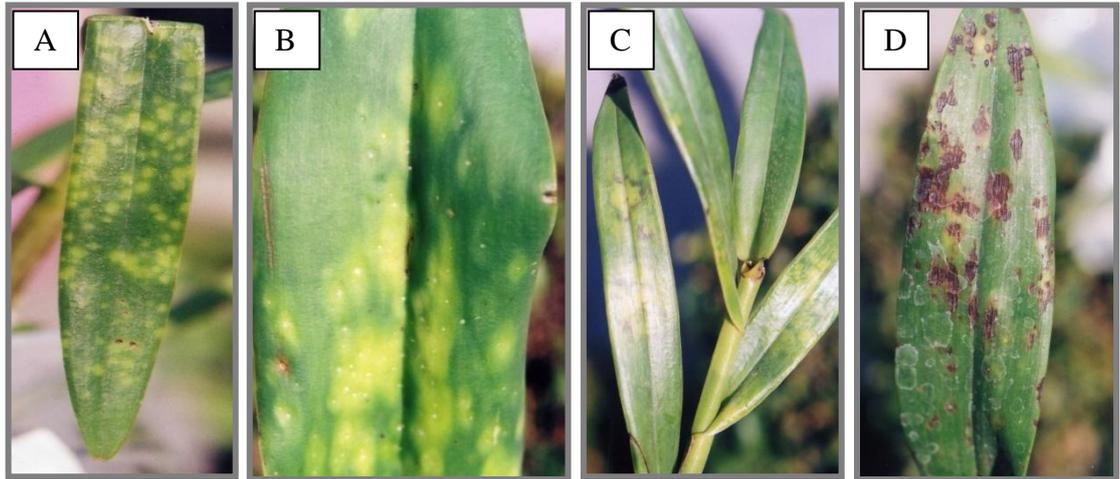


Figura 7. Síntomas observados en orquídeas: A) Moteados cloróticos. B) Manchas irregulares cloróticas. C) Anillos cloróticos con márgenes necróticos. D) Manchas irregulares necróticas.

1.7. *Odontoglossum ringspot virus (ORSV)*

El ORSV pertenece al grupo VI; es decir, virus de cadena sencilla de ARN lineal de sentido positivo. Pertenece a la familia Virgaviridae y al género Tobamoviruse. Es monopartita, su genoma es lineal de 6.3 a 6.5 kb de tamaño. El lado 5' tiene un cap nucleótido metilado (m⁷G5'pppG) y el 3' tiene un fragmento de ARNt esta poliadenilado (Figura 8) (Viralzone, 2013).

El virion de ARN es infeccioso y sirve como genoma y como ARNm viral. El ORF proximal al 5' es directamente traducido para producir los constituyentes virales del complejo de la replicasa. RdRp es transcrita a través de la supresión de la terminación al final del ORF1. La pequeña replicasa es envuelta en replicación y actúa como supresora de ARN silenciador. Las proteínas de movimiento de la cápside están expresadas separadas por RNSm's (Viralzone, 2013).

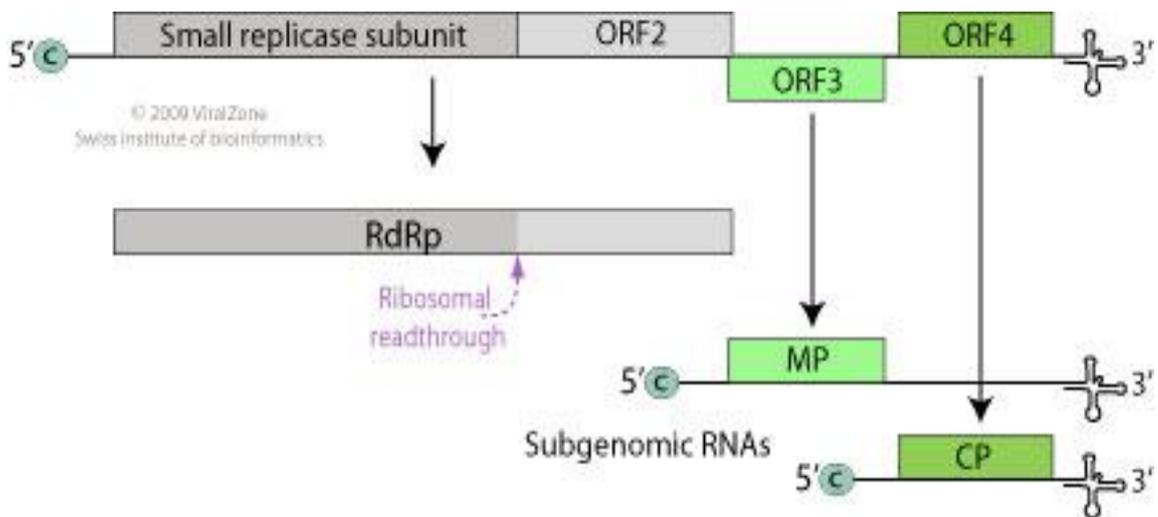


Figura 9. ARN genómico de *Odontoglossum ringspot virus*. [RdRp: ARN dependiente de ARN polimerasa, ORF: Marco de lectura abierta, MP: Proteína del movimiento CP: Proteína de la cápside] (Viralzone, 2013)

Su genoma se ha secuenciado y contiene aproximadamente 6600 nucleótidos organizados en cuatro marcos de lectura abiertos (Figura 9). Hay una similitud entre Tobamo mosaic virus (TMV) y proteína del movimiento de ORSV, que se puede ver a partir de la capacidad de infectar el tabaco. Sin embargo, sólo alrededor del 60% de los nucleótidos en ORSV son idénticos con el virus del mosaico del tabaco (Chng *et al.*, 1996 y Ikegami 1995).

1.8. Métodos de diagnóstico molecular de virus en plantas.

El proceso de identificar correctamente la causa de una enfermedad es indispensable para dirigir adecuadamente las prácticas de manejo. Debido a la importancia que han alcanzado los virus como patógenos a escala mundial, es necesario contar con métodos rápidos y seguros para su detección y posterior identificación lo cual facilita los estudios de epidemiología y de diversidad genética del grupo.

La información del diagnóstico tiene consecuencias importantes para el diseño de estrategias relacionadas con la resistencia a enfermedades y el manejo integrado.

Las plantas infectadas por estos dos virus, a menudo no presentan síntomas y parecen normales. Para la detección de virus fitopatógenos es recomendable seguir un orden de complejidad, desde la simple observación de síntomas, su forma de transmisión, y empleo de hospederos alternos, pruebas fisiológicas en plantas indicadoras hasta la aplicación de técnicas de diagnósticos fiables como la serología, visualización y medición del patógeno en el microscopio, utilizando técnicas moleculares el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), reacción de cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR), inmunocaptura-PCR (IC-PCR), cromatografía líquida ligada a espectrometría de masas (LC/MS) y espectrometría de masas. El empleo de una u otra técnica de diagnóstico dependerá de las posibilidades de cada laboratorio, del tipo de patógeno y del número de plantas que sea necesario estudiar. Sin embargo, la identificación de los virus por sintomatología o por plantas indicadoras, no es confiable, debido a que dichos síntomas se pueden confundir, con desórdenes nutricionales o por daños causados por herbicidas. Por otro lado las técnicas eficientes y confiables son las serológicas, por su alta sensibilidad (Robles, 2010).

Entre estos métodos, ELISA es fácil de manejar y adecuados para grandes cantidades de muestras para la detección de rutina. Sin embargo, es laborioso y menos sensible que otras técnicas (Lee *et al.*, 2006).

Con la técnica de PCR se obtienen un gran número de copias a partir de un fragmento de ADN. Esta técnica se emplea para la identificación de virus, bacterias, personas, etc. Esta técnica se fundamenta en la propiedad del ADN polimerasa para replicar hebras de ADN. Se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí, tras cada fase de replicación. Después, se unen a las polimerasas termoestables utilizadas, son extraídas de microorganismos adaptados a vivir a temperaturas altas. El proceso de la PCR esta automatizado mediante un termociclador, el cual permite calentar y enfriar los tubos de reacción para cada etapa. Los componentes de

esta técnica son: desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), sustrato para polimerizar nuevo ADN, dos oligos, complementarios a una de las dos hebras del ADN que son secuencias cortas de 6 a 40 nucleótidos que son reconocidos por la polimerasa permitiendo iniciar la reacción, los iones divalentes de magnesio como $MgCl_2$ o monovalentes como el potasio, una solución amortiguadora que mantiene el pH en rangos adecuados para el funcionamiento óptimo de la polimerasa, la Taq polimerasa y el fragmento de ADN que se va a amplificar, el proceso de PCR generalmente consiste en una serie de 20 a 35 ciclos conformados por varias etapas (Robles, 2010).

En la etapa de desnaturalización se separan las hebras del fragmento de ADN. Este paso puede realizarse con un incremento en la temperatura, donde comúnmente es a $95^{\circ}C$: sin embargo este valor depende de la proporción de G + C y el largo de la cadena de ADN. Otros métodos utilizan sales minerales como agentes químicos para realizar la desnaturalización. En la etapa de alineamiento, los oligos se unen a su secuencia complementaria en el ADN molde, para ello es necesario bajar la temperatura a $50-70^{\circ}C$ durante 20-40 segundos, permitiendo así el alineamiento. Los puentes de hidrógeno estables entre las cadenas de ADN) solo se forman cuando la secuencias de oligo es muy similar a la secuencia del ADN molde. Los oligos actuarán como límites de la región de la molécula que va a ser amplificada (Landa, 2012).

En la etapa de la elongación de la cadena, la ADN polimerasa toma de molde el fragmento de ADN para sintetizar la cadena complementaria, partiendo del oligo para la síntesis del nuevo ADN. Para lo anterior, la polimerasa va añadiendo los dNTP's complementarios en dirección $5' - 3'$, uniendo el grupo $5'$ - fosfato de los dNTP's con el grupo $3'$ - hidroxilo de la hebra del ADN creciente. La temperatura y el tiempo para este paso depende de la ADN polimerasa empleada y del tamaño del fragmento a amplificar.

La etapa de terminación, se lleva cabo una temperatura de $70-74^{\circ}C$ durante 5-15 minutos en el último ciclo de PCR para asegurar inactivar la Taq polimerasa y detener la

reacción. Finalmente la etapa de conservación se lleva a cabo de 4-15°C durante un tiempo indefinido para conservar la reacción a corto plazo. Para verificar que la PRC ha generado el fragmento de ADN deseado, se emplean técnicas de electroforesis que separan los fragmentos de ADN generados de acuerdo a su carga, longitud y tamaño. La electroforesis se realiza en geles de agarosa para fragmentos grandes y en acrilamida para fragmentos pequeños. Existen variantes de PCR, incluyendo PCR anidada, PCR *in situ*, PCR múltiplex, RT-PCR y PCR en tiempo real (Q-PCR). Las variantes más usadas para la detección e identificación de virus fitopatógenos son PCR múltiplex y RT-PCR (Landa, 2012).

La RT-PCR es una técnica de síntesis enzimática *in vitro* de secuencias específicas, es una técnica que en la biología molecular se utiliza ampliamente para identificar virus de ARN. Para su ampliación se necesita la transcriptasa reversa para realizar la conversión del ARN a ADNc. A partir de una mínima cantidad de ARN se pueden obtener millones de copias en pocas horas. La transcriptasa reversa es una enzima de tipo ADN-polimerasa que tiene como función sintetizar ADNc de cadena sencilla utilizando un molde ARN monocatenario. Esta enzima se encuentra presente en los retrovirus. Una forma sencilla de síntesis de ADNc de cadena sencilla por medio de la transcriptasa reversa, es partir de un oligo cola de poli-T que establece bases complementarias con la cola de poli-A de ARN transcrito. El híbrido puede separarse mediante ribonucleasas, y con la acción de una ADN-polimerasa y un nuevo oligo, se completa la hebra de ADN para formar la doble hebra. El virus de ARN contiene en el interior ADN polimerasa dependiente de ARN denominada transcriptasa reversa. (Robles, 2010)

En el caso de virus ARN de sentido positivo (grupo VI) tienen genomas con la misma polaridad del ARNm y pueden ser empleados directamente para la síntesis de proteínas usando la maquinaria de traducción de la célula huésped. Una de estas proteínas codificadas es la ARN replicasa, una ARN polimerasa que copia el ARN viral sin necesidad de pasar por una cadena de ADN intermedia.

Los virus ARN de sentido positivo tienen genomas con la misma polaridad del ARNm y pueden ser empleados directamente para la síntesis de proteínas usando la maquinaria de traducción de la célula huésped. Una de estas proteínas codificadas es la ARN replicasa, una ARN polimerasa que copia el ARN viral sin necesidad de pasar por una cadena de ADN intermedia (Robles, 2010).

Por tanto, la expresión genética de un virus ARN monocatenario positivo comienza con la traducción más que con la transcripción. Durante la traducción han de formarse varias proteínas a partir de la cadena de ARN inicial y dependiendo como se formen las distintas proteínas, podemos distinguir dos tipos de virus. 1) Virus que generan cadenas de ARNm subgenómicas durante el ciclo replicativo. 2) Virus en los cuales el genoma representa el único ARNm viral y la expresión es regulada principalmente a nivel traduccional y por la proteólisis limitada de poliproteínas. En el primero de los casos, la multiplicación del virus comprende las siguientes etapas:

1. Traducción temprana del ARN como si fuese ARNm y obtención de las proteínas tempranas (reguladoras), entre ellas la ARN replicasa.
2. Síntesis del ARN monocatenario negativo a partir del molde de ARN monocatenario positivo por la ARN polimerasa y formación del complejo replicativo. El ARN monocatenario negativo no se libera, sino que permanece siempre asociado al complejo replicativo.
3. El complejo replicativo realiza la síntesis de ARN monocatenario positivo, ARNm y ARN monocatenario negativo.
4. Traducción tardía del ARN monocatenario positivo y ARNm y obtención de las proteínas tardías (estructurales), que probablemente fuerzan al complejo replicativo a producir un mayor porcentaje de ARN monocatenario positivo.
5. Ensamblado de las proteínas estructurales y del ARN monocatenario positivo y maduración de los viriones.

En el caso en que no se generen cadenas de ARNm subgenómico, la expresión es regulada principalmente a nivel traduccional y por la proteólisis limitada de poliproteínas. De esta forma se producen varias proteínas a partir de la misma cadena de ARN.

La detección por métodos basados en RT-PCR son más sensibles, fiables y rápidos para la detección de pequeñas cantidades de ARN virales. La mayoría de estos métodos pueden detectar sólo un virus en una reacción (Lee *et al.*, 2006).

1.9. Reacción de Cadena de la Polimerasa de Transcripción Inversa (RT-PCR)

Múltiplex

La reacción en cadena de polimerasa múltiplex (PCR múltiplex) es una modificación de la reacción en cadena de la polimerasa con el fin de amplificar muestras de ADN genómico utilizando cebadores múltiples.

El PCR-Múltiplex es un método en la cual se amplifica más de una secuencia en una misma reacción. Emplea dos o más pares de oligos en un único tubo con el fin de amplificar simultáneamente los segmentos de ADN. Consiste en combinar en una única reacción los pares de oligos de los sistemas que se requieren amplificar simultáneamente, junto en el resto de los reactivos de la reacción de cantidades suficientes. Para evitar contaminación el área de trabajo debe ser un lugar aislado. El riesgo de contaminación cruzada con productos de PCR amplificados anteriormente es alto. Este problema se vuelve aun más grave cuando se clonan los productos. Comparado con la PCR simple, la PCR múltiplex tiene una serie de ventajas. Consiste en obtener información de varios loci en una sola reacción, esto se logra mediante la amplificación de un número casi ilimitado de fragmentos de la misma cantidad de ADN molde que se utiliza para un único producto de PCR estándar. La especificidad de esta técnica es proporcionada por los oligos. Esta prueba reduce considerablemente la aparición de falsos positivos o contaminación. El éxito de la amplificación depende fundamentalmente de la sensibilidad del oligo, la especificidad y homogeneidad de la

temperatura. La longitud máxima de los fragmentos amplificados por los oligos está limitada por el ADN molde. Recientemente esta técnica se ha estado estandarizando para algunos géneros de virus de plantas; se ha usado ampliamente para identificar el PVY y CMV (Lorenzen *et al.*, 2006).

En la reacción se recorren temperaturas para cada uno de los conjuntos de cebadores que deben ser optimizadas para funcionar correctamente dentro de una sola reacción, y tamaños de amplificación, es decir, su longitud de pares de bases, deben ser lo suficientemente diferentes como para formar bandas distintas cuando se visualiza mediante electroforesis en gel.

Por lo que en este trabajo se proponen como objetivos desarrollar y estandarizar una RT-PCR múltiplex para la detección de los dos virus de orquídeas, *Cymbidium mosaic virus* y *Odontoglossum ringspot virus*.

2. ANTECEDENTES

Shu-Chuan Lee y Ya-Chun Chan en el 2006 desarrollaron un método para la detección de CymMV y ORSV en orquídeas. Donde diseñaron cebadores específicos basados en las secuencias disponibles de CymMV y ORSV desde el GenBank y se utilizaron para amplificar la región del marco de lectura abierta de la proteína de la cápside RT-PCR. Además, un par de cebadores derivados del gen mitocondrial NADH deshidrogenasa planta (*nad5*) fue probado para la amplificación de ARNm *nad5* como control interno en RT-PCR múltiplex. El fragmento de ARNm del control interno fue constantemente amplificado a partir de ARN total de plantas sanas e infectadas. La especificidad de los tres pares de cebadores diseñados para CymMV, ORSV y *nad5* ARNm se confirmó mediante ensayos RT-PCR simplex y múltiplex. Y mencionan que la aplicación de RT-PCR múltiplex podría reducir en gran medida el costo y los resultados falsos negativos para la detección de rutina, por lo tanto, puede tener gran ayuda para el programa de certificación de orquídeas.

Loreto y colaboradores en el 2010, describen la importancia de los virus de ARN en el cultivo de chile en México y otros países. Los autores analizaron las técnicas serológicas y de la biología molecular que han sido ampliamente utilizadas en la identificación de agentes de tipo viral que afectan al cultivo de agentes de tipo viral que afectan el cultivo de chile. En su artículo, afirman que la técnica ELISA, es una de las pruebas serológicas más utilizadas por presentar una amplia especificidad y confiabilidad en el diagnóstico de enfermedades virales. Por otro lado, mencionan que la RT-PCR y PCR Múltiplex son los métodos de biología molecular más recientes en la identificación de virus, utilizando PCR múltiplex para la identificación de virus. Los autores mencionan que la ventaja de este método con respecto a los demás métodos, es que se puede utilizar para identificación de virus a nivel de serotipo como se ha demostrado en los virus PVY y CMV.

Shaoning Chen y colaboradores, en el 2011, desarrollaron un protocolo de una reacción múltiplex para la detección de los subgrupos de CMV, incluyendo su ARN satélite, ToMV y TMV utilizando rARN 18S como control interno. Se diseñaron los cebadores específicos para diferenciar subgrupos CMV I y II, ToMV y TMV. Se usó el ARN total extraído de mezcla de tomates infectados por cada virus, los componentes de la reacción y parámetros de ciclación fueron optimizados en una RT-PCR múltiplex. Y seis fragmentos de 704 , 593, 512, 421, 385, 255 pb , y seis grupos específicos de subgrupos I y II de CMV, ToMV, TMV, ARN satélite y 18S rARN, se amplificaron simultáneamente . El método de RT-PCR múltiplex es sensible para la detección de CMV. Los autores afirman fue 100 veces más sensible que DAS - ELISA. Entre 141 muestras colectadas de China Oriental a través de estaciones de crecimiento de tomate, se detectaron 106 infecciones simples con uno de los aislados más arriba y se encontraron 13 infecciones mixtas. Los resultados mostraron que el uso potencial de este método es para investigar la epidemiología de las enfermedades virales que infectan tomate.

En el laboratorio de Microbiología de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO-FESI-UNAM), en el 2010 se realizó un estudio de las enfermedades virales en los invernaderos productores comerciales de orquídeas en Morelos, México. Donde se observaron muchas plantas con síntomas de virus. Los síntomas en las hojas más comunes fueron la mancha amarilla, rayas amarillas y manchas anulares cloróticas y necróticas. Las muestras de hojas se obtuvieron de ocho plantas sintomáticas de los siguientes géneros: *Encyclia*, *Oncidium*, *Shomburghia*, *Brassia*, *Guariathe*, *Cattleya*, *Epidendrum*, *Vanilla*, *Xilobium*, *Laelia* y *Bra*. Las muestras fueron analizadas por doble anticuerpo (DAS)-ELISA. Con antisuero para CymMV, ORSV, CMV, TMV y un antisuero general para potyvirus. Al menos una planta a partir de cada género fue positiva para CymMV y ORSV como infecciones individuales o mixtas. Plantas de *Encyclia* y *Laelia* fueron los más frecuentemente encontrados con infecciones mixtas por ambos virus. Todos los géneros fueron negativos para TMV y potyvirus. La transcripción inversa (RT) - PCR se realizó con los cebadores de la polimerasa en general de genes (RdRp) correspondientes al grupo de Potexvirus y cebadores específicos para el gen de la proteína de la cubierta (CP) de CymMV y ORSV. La amplificación por PCR a partir de una muestra positiva de cada género se corrió en geles de agarosa. Los productos de amplificación del tamaño esperado se obtuvieron para CymMV y ORSV. Cinco CymMV RdRp clones de genes de *Laelia* (Número de acceso en GenBank HQ393958, HQ393959, HQ393960, HQ393961 y HQ393962), dos clones de genes CP del gen CP de CymMV de *Oncidium* (Número de acceso en Genebank HQ393956 y HQ393957) y tres clones de CP de CP de ORSV de *Encyclia* (GenBank adhesión números HQ393953, HQ393954 y HQ393955) fueron secuenciados. Las secuencias de nucleótidos de las orquídeas CymMV aislamientos mexicanos fueron 96-97 % idénticas a las secuencias en el GenBank CymMV, mientras que los de ORSV fueron 99-100 % idéntica a la secuencia de ORSV. Este fue el primer informe que se hizo de presencia de estos virus en orquídeas Mexicanas. Este estudio fue continuado en el presente trabajo.

3. OBJETIVO

Detección simultánea de los virus *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) y *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) en orquídeas, por medio de RT-PCR múltiplex.

4. MATERIALES Y MÉTODO

4.1. Recolecta de material

Se colectaron tres hojas, de una o varias plantas de orquídeas que manifestaron daños de probable origen viral, de los siguientes géneros o sus híbridos: *Brassia* (1 planta), *Brassocattleya* (1p), *Cattleya* (2p), *Encyclia* (6p), *Epidendrum* (2p), *Guariathe* (1p), *Laelia* (3p), *Oncidium* (5p), *Shomburgkia* (2p), *Vanilla* (1p) y *Xylobium* (1p), cultivadas en invernaderos comerciales del Estado de Morelos. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico y se transportaron al Laboratorio de Microbiología de la UBIPRO de la FES-Iztacala, UNAM.

4.2. Extracción de ARN de los virus en orquídeas infectadas.

Se procesaron 50 muestras. Extracción de ARN total. Se tomó para cada muestra un gramo de hoja, con síntomas. Se maceraron con 250 µl de buffer AP con una punta y en un tubo Eppendorf estéril; después de macerar se completó con 750 µl del buffer. Se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Pasado el tiempo de incubación se centrifugó por un minuto a 12,000 rpm, se tomó el sobrenadante y se pasó a un tubo limpio, se le añadió fenol-cloroformo volumen-volumen y se agitó por 5 minutos. Se centrifugó por 3 minutos a 12,000 rpm y se recuperó la fase acuosa. Y se volvió a repetir el lavado con fenol-cloroformo una vez más. La fase acuosa se precipitó con 500 µl de isopropanol y 50 µl de

acetato de amonio 10 M y se mezcló bien. Se volvió a centrifugar a 12,000 rpm por 10 minutos, se tiró el sobrenadante y la pastilla se lavó con 50 µl de etanol al 70% se centrifugo por 3 minutos y se tiro el etanol, el lavado se hizo 2 veces más. Se dejó secar la pastilla y se resuspendió la pastilla en 30 a 50 µl de agua libre de nucleasas o agua desionizada. Por último se guardo a -20 °C.

4.3. Transcripción reversa ligada a la reacción en cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

Se hizo RT-PCR de la extracción de ARN viral de las orquídeas infectadas. La mezcla se hizo para una reacción de 5 µL, donde se le agregaron 1.025 µL de agua libre de nucleasas estéril, 2.5 µL de buffer 2X, se agregaron 0.5 µL de cebadores para CymMV (CymMV CP-F1/CymMV CP-R1), la mezcla de cebadores para ORSV (ORSV CP-F1/ORSV CP-R1), (los nombres de los cebadores y secuencias están descritos en la cuadro 5), y *nad5* (mt-F2/mt-R1) de la 0.5 µL PVP 40% , 0.025 µL de inhibidor de ARNasa, 0.15 µL de Taq/rt y 0.3 µl de la extracción de ARN. Y la reacción se hizo en termociclador con las siguientes condiciones 50°C por 30 minutos, 95°C por 2 minutos, 30 ciclos de 95°C por 10 segundos, 52°C por 10 segundos y 68°C por 30 segundos; 68°C por 5 minutos y se bajó la temperatura hasta 14°C. Para CymMV y ORSV hizo para cada una de las 58 muestras y para *nad5* solo 4 muestras como control interno de la RT-PCR.

Cuadro 2. Nombres de los cebadores, secuencias y posición en sus respectivos genomas, y tamaño del producto esperado del RT-PCR por cada par de cebadores. (Shu, *et al.*, 2006)

Objetivo a amplificar	Cebadores	Secuencia 5'-3'	Posición	Tamaño del producto
CymMV	CymMV CP-F1	ATGGGAGAGYCCACCTCCARCYCCAGC	CP gen 1-26 nt	669 pb
	CymMV CP-R1	TTCAGTAGGGGGTGCAGGCA	CP gen 669-650 nt	
ORSV	ORSV CP-F1	ATGTCTTACACTATTACAGACCCG	CP gen 1-24 nt	474 pb
	ORSV CP-R1	GGAAGAGGTCCAAGTAAGTCC	CP gen 474-454 nt	
<i>nad5</i> ARNm de la planta	mt-F2	GCTTCTGGGGCTTCTTGTTCGGATA	<i>nad5</i> gen exones a+b	185 pb
	mt-R1	ATCTCCAGTCACCAACATTGGCAT	<i>nad5</i> gen exón b	

CP: Proteína de la cápside. F: Forward. R: Reversa. Pb: pares de bases

A las muestras se le agregaron 3 μL de buffer de carga y se corrieron en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio a 100 V por 35 minutos.

4.4. RT-PCR Múltiplex

Se usó el método de Shu *et al.* (2006) modificado. Se corrieron ensayos de RT-PCR múltiplex de la extracción de ARN viral obtenido de las plantas de orquídeas infectadas. La mezcla se hizo para una reacción de 5 μL , donde se le agregaron 0.825 μL de agua libre de nucleasas estéril, 2.5 μL de buffer 2X, se agregaron 0.25 μL de cebadores para CymMV (CymMV CP-F1/CymMV CP-R1), 0.25 μL de cebadores para ORSV (ORSV CP-F1/ORSV CP-R1), (los nombres de los cebadores y secuencias están descritos en el cuadro 2), 0.5 μL PVP 40% , 0.025 μL de inhibidor de ARNasa, 0.15 μL de Taq/rt y 0.5 μL de la extracción de ARN. Y la reacción se hizo en termociclador con las siguientes condiciones 50°C por 30 minutos, 95°C por 2 minutos, 30 ciclos de 95°C por 10 segundos, 52°C por 10 segundos y 68°C por 30 segundos; 68°C por 5 minutos y se bajo la temperatura hasta 14°C. Todo lo anterior se hizo para las 58 muestras.

A las muestras se le agregaron 3 μL de buffer de carga y se corrieron en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio a 100 V por 35 minutos.

5. RESULTADOS

5.1. Producto de transcripción inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Con los cebadores específicos para la CP de CymMV se detectaron 48 muestras infectadas con este virus (CPF/CPR 669 pb) y 33 muestras infectadas con ORSV con los

oligonucleótidos específicos para la CP de ORSV (CPF/CPR. 474 pb) (Figura 10). El total de muestras positivas detectadas con ambos oligonucleótidos fue de 33 de las 58 (Cuadro 2).

De las 4 muestras para nad5 ARNm de la planta las 4 fueron positivas (Figura 11) y el tamaño de la muestra fue el esperado.

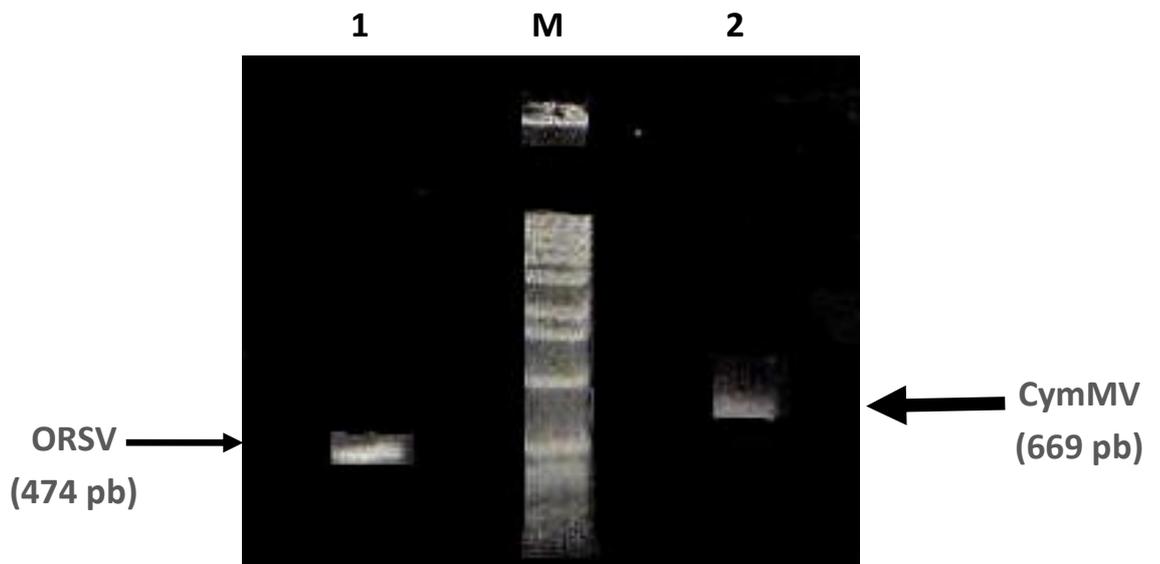


Figura 10. Corrida de producto de RT-PCR en gel de agarosa al 1%, donde se detectó la amplificación de ARN viral de ORSV (1) con el tamaño del producto esperado (474 pares de bases [pb]) y de CymMV (2) con un tamaño de 669 pares de bases. (M) marcador de peso molecular 1kb de la marca Invitrogene.

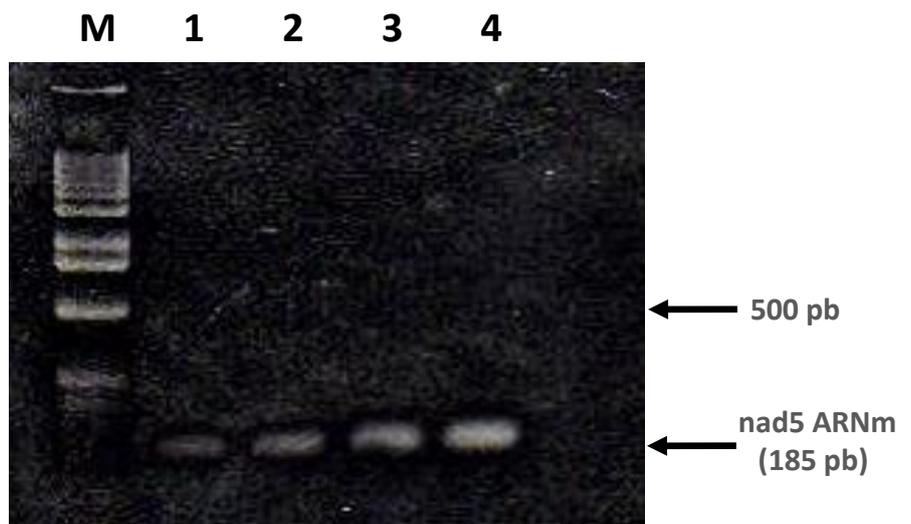


Figura 11. Corrida de producto de RT-PCR en gel de agarosa al 1%, donde se detectó la amplificación de mt (1, 2, 3 y 4) con el tamaño del producto esperado (185 pares de bases [pb]). (M) marcador de peso molecular 1kb de la marca Invitrogene.

5.2. RT-PCR Múltiplex

Con los cebadores específicos para la CP de CymMV se detectaron 26 muestras infectadas con este virus (CPF/CPR 669 pb) y 23 muestras infectadas con ORSV con los cebadores específicos para la CP de ORSV (CPF/CPR. 474 pb) (Figura 12) (Cuadro 2)

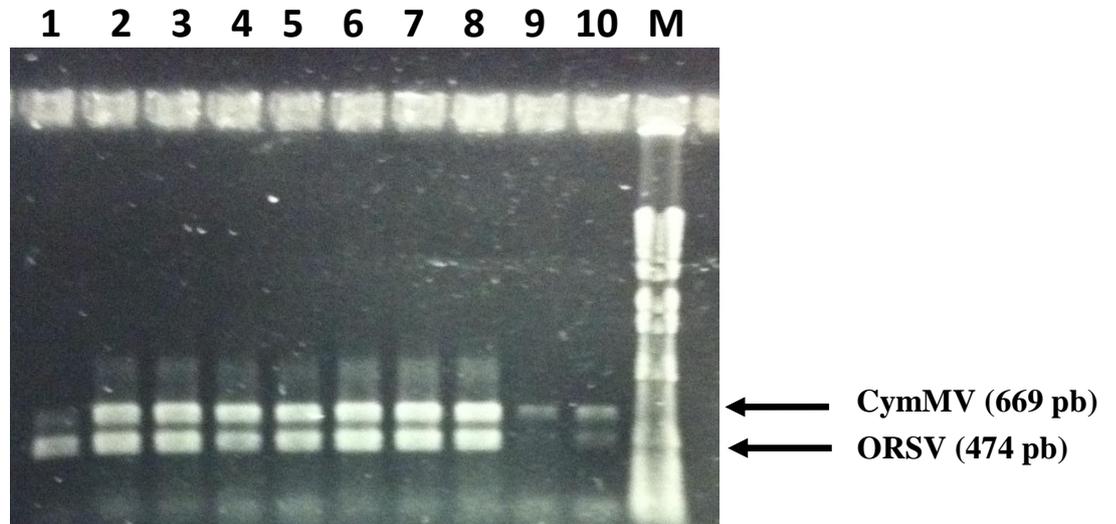


Figura 12. Corrida de producto de RT-PCR múltiplex en gel de agarosa al 1%, donde se detectó la amplificación de ARN viral de ORSV (líneas inferiores) con el tamaño del producto esperado (474 pares de bases [pb]) y de CymMV (líneas superiores) con un tamaño de 669 pares de bases. (M) marcador de peso molecular 1kb de la marca Invitrogene.

Cuadro 3. Comparación de resultados positivos y negativos entre RT-PCR simple y múltiplex

No.	Muestra	Simplex		Múltiplex		No.	Muestra	Simplex		Múltiplex	
		CymMV	ORSV	CymMV	ORSV			CymMV	ORSV	CymMV	ORSV
1	<i>Brassia</i> 1	+	+	-	-	30	<i>2.Encyclia</i> .3	+	+	-	-
2	<i>Brassia</i> .2	+	-	-	+	31	<i>2.Encyclia</i> .4	+	+	-	-
3	<i>Brassia</i> .3	+	+	+	-	32	<i>3.Encyclia</i> .1	+	+	-	-
4	<i>Brassia</i> .4	+	-	-	-	33	<i>3.Encyclia</i> .2	+	-	-	+
5	<i>Brassia</i> .5	+	-	-	-	34	<i>3.Encyclia</i> .3	+	-	-	+
6	<i>Brassocattleya</i> .1	+	-	-	-	35	<i>4.Encyclia</i> .1	+	+	-	-
7	<i>Brassocattleya</i> .2	-	-	-	-	36	<i>4.Encyclia</i> .2	+	+	-	-
8	<i>Brassocattleya</i> .3	+	+	-	-	37	<i>5.Encyclia</i> .1	+	+	+	+
9	<i>Brassocattleya</i> .4	+	-	-	-	38	<i>5.Encyclia</i> .2	+	+	+	-
10	1. <i>Cattleya</i> .1	+	+	+	+	39	<i>5.Encyclia</i> .3	+	+	+	-
11	1. <i>Cattleya</i> .2	+	-	+	-	40	<i>6.Encyclia</i> .1	-	-	+	+
12	1. <i>Cattleya</i> .3	+	-	-	-	41	<i>6.Encyclia</i> .2	+	+	+	+
13	1. <i>Cattleya</i> .4	+	-	+	+	42	<i>1.Epidendrum</i> .1	+	+	+	-
14	1. <i>Cattleya</i> .5	+	+	-	-	43	<i>1.Epidendrum</i> .2	+	+	+	+
15	1. <i>Cattleya</i> .6	+	-	+	+	44	<i>2.Epidendrum</i> .1	+	-	+	+
16	2. <i>Cattleya</i> .1	+	+	-	-	45	<i>2.Epidendrum</i> .2	+	+	+	+
17	2. <i>Cattleya</i> .2	+	+	-	-	46	<i>Guariathe</i> .1	+	+	+	+
18	2. <i>Cattleya</i> .3	+	+	-	-	47	<i>Laelia</i> .1	+	+	+	+
19	2. <i>Cattleya</i> .4	+	+	+	+	48	<i>Laelia</i> .2	-	-	+	+
20	2. <i>Cattleya</i> .5	+	+	+	-	49	<i>Laelia</i> .3	-	-	+	+
21	2. <i>Cattleya</i> .6	-	+	-	-	50	<i>Oncidium</i> .1	+	+	+	+
22	2. <i>Cattleya</i> .7	+	-	-	-	51	<i>Oncidium</i> .2	+	+	+	+
23	<i>1.Encyclia</i> .1	+	+	-	-	52	<i>Oncidium</i> .3	-	-	+	+
24	<i>1.Encyclia</i> .2	+	+	-	-	53	<i>Oncidium</i> .4	-	-	+	+
25	<i>1.Encyclia</i> .3	+	+	-	-	54	<i>Oncidium</i> .5	-	-	-	-
26	<i>1.Encyclia</i> .4	+	-	-	-	55	<i>Shomburgkia</i> .1	+	-	-	-
27	<i>1.Encyclia</i> .5	+	+	+	+	56	<i>Shomburgkia</i> .2	-	-	-	-
28	<i>2.Encyclia</i> .1	+	+	+	+	57	<i>Vanilla</i> .1	-	-	-	-
29	<i>2.Encyclia</i> .2	+	+	-	-	58	<i>Xylobium</i> .1	-	-	-	-

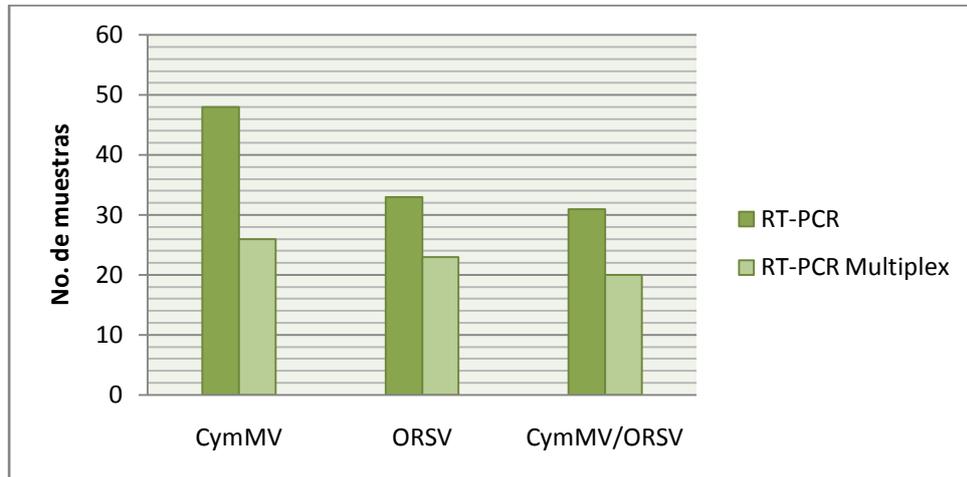


Figura 13. Comparación en porcentajes de los resultados positivos de RT-PCR y RT-PCR Múltiplex. Mediante RT-PCR se pudo detectar un 82% de muestras positivas para CymMV, mientras que por RT-PCR múltiplex se detectó un 44%; y para ORSV, por el primer método se detectó un 56%, y por el segundo método 39%. Así mismo, por RT-PCR un 53.5% mostraron infección combinada, mientras que por RT-PCR solo fue de un 34%.

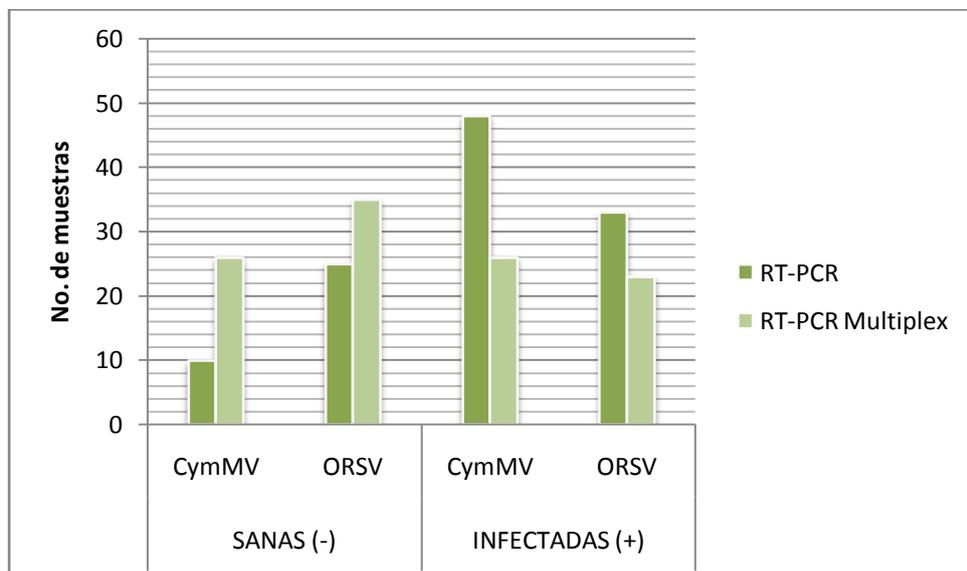


Figura 14. Comparación de los resultados de RT-PCR y RT-PCR Múltiplex de las plantas sanas e infectadas. de 58 muestras analizadas, para CymMV mediante RT-PCR se pudo detectar un 82.7% de muestras positivas, mientras que por RT-PCR múltiplex se detectó 44.8%. Y del total de muestras analizadas para ORSV, por el primer método se detectó un 56.8%, y por el segundo método 39.6%.

6. DISCUSIÓN

Esta investigación describe un ensayo de RT-PCR múltiplex para la detección simultánea de dos virus importantes de orquídeas, CymMV y ORSV, con la amplificación específica del ARNm *nad5* de la planta; que solo se realizó en RT-PCR como control interno en el ensayo para diferenciarlo del producto esperado de los virus.

Al comparar los resultados de la detección por RT-PCR, con los obtenidos de la RT-PCR múltiplex, se observaron diferencias en los porcentajes, con esta última técnica hay menor número de muestras con ambos virus, la RT-PCR múltiplex no es consistente.

Se observa de las 58 muestras, en la RT-PCR se amplificó el 82% para CymMV, y con RT-PCR múltiplex un 44%. Y para ORSV, 56% y 39% respectivamente, como se observa en la figura 14.

Entre los cebadores que competían para la polimerasa y las plantillas durante la RT-PCR múltiplex puede ser diferente del RT-PCR debido a la naturaleza de los cebadores (Nie et al., 2002). Por lo tanto, fue necesario determinar empíricamente la proporción óptima de cada cebador para RT-PCR múltiplex. De acuerdo con los resultados, la amplificación de CymMV y ORSV, reduce cuando la concentración de los cebadores se reparte para los dos cebadores. Esto se puede atribuir a las interferencias que se producen en las amplificaciones de RT-PCR múltiplex con los dos cebadores. Sin embargo, el par de cebadores correspondientes a CymMV y ORSV dio resultados más altos cuando las reacciones se hicieron por RT-PCR múltiplex.

En el RT-PCR múltiplex la sensibilidad de detección para dos ARNs virales fue menor que cuando sólo un virus estaba presente.

La razón de la disminución de la sensibilidad de detección podría ser que el cebador universal degenera en el RT-PCR múltiplex, ya que compitió por las dos plantillas virales en

lugar de una y por lo tanto reduce el límite de detección (Roy *et al.*, 2005; Sharman *et al.*, 2000). En contraste, en RT-PCR hay más sensibilidad de detección sin importar la presencia de uno o dos virus en una misma muestra. Esta diferencia podría ser resultado de múltiples factores. El primero, podría ser que una infección mixta puede verse seriamente perjudicada y la presencia de diferentes agentes patógenos co-infectan podría afectar a la eficacia de detección (Vidalakis *et al.*, 2004). Además, la distribución de algunos virus pueden verse afectadas en las plantas infectadas, por lo tanto disminuyen la eficacia de los métodos de detección molecular como RT-PCR múltiplex (Roy *et al.*, 2005).

El segundo podría ser que si, se enmascara la presencia de otros patógenos, el resultado negativo falso puede dar lugar a procedimientos inadecuados para establecer los materiales libres de la enfermedad (Vidalakis *et al.*, 2004) (Figura 14).

El ensayo de RT - PCR múltiple se ha utilizado con éxito para la detección simultánea de hasta siete virus diferentes en una sola prueba (Roy *et al.*, 2004), haciendo una serie de estandarizaciones y pruebas. CymmMV y ORSV se caracterizaron y los cebadores se desarrollaron y estandarizaron las concentraciones de ellos, este método, RT-PCR múltiplex, es claro que puede reducir en gran medida el costo y evitar los resultados falsos negativos, solo cuando ya se haya hecho una estandarización fiable.

7. CONCLUSIÓN

Se logró la detección simultánea de los virus *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) y *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) en orquídeas de las familias *Cattleya*, *Encyclia*, *Epidendrum*, *Guariathe*, *Laelia* y *Oncidium*, por medio de RT-PCR múltiplex, comparando los resultados con los del RT-PCR, 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 y Estado de Morelos.

8. LITERATURA CITADA

- Ang R. S., Vipin H., Promila P. y Aijaz A. Z. 2007. Complete nucleotide sequence analysis of *Cymbidium mosaic virus* Indian isolate: further evidence for natural recombination among potexviruses. *Journal of Biosciences*. pp 657–661.
- Chia T.F., Chan Y.S., Chua N.H. 1992. Detection and localization of viruses in orchids by tissue-print hybridization. *Plant Pathology* Vol. 41. pp 355–361.
- Chng C.G. Wong S.M., Mahtani P.H. Loh, C.S. Goh C.J., Kao M.C. Chung M.C., y Watanabe Y. 1996. The complete sequence of a Singapore isolate of *Odontoglossum ringspot virus* and comparison with other tobamoviruses. *Gene*. Vol. 171. pp 155–61.
- Chacón, J. 2002. Identificación de los virus que afectan orquídeas nativas en dos viveros del Valle Central de Costa Rica. Tesis de Lic. Biol. presentada en la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias. San José, CR. 79 p.
- Dressler R. 1981. *The orchids – natural history and classification*. Harvard University Press, Cambridge. USA.
- Freitas A.J., Moreira C. L. Rivera H.C., Rodriguez S.C.M., y Kitajima, E.W. 2002. First report of *Orchid fleck virus* in Costa Rica. *Plant Disease* 1402 (86): 12.
- Hágsater E.M.A., Soto G.A., Salazar R., Jimenez M.A., Lopez R.L. y Dressler. 2005. *Las orquídeas de México*. Instituto Chinoin, A.C., México, D.F.
- Hirtz, A. 2004. Orquideario, Pueblo nuevo. Leyenda, historia y orígenes. *Revista Ecuador Terra Incógnita*. Ecuador.

- Ikegami M., Isomura Y., Matumoto Y., Chatani M., y Inouye N. 1995. The complete nucleotide sequence of odontoglossum ringspot virus (Cy-1 strain) genomic ARN. *Microbiology and immunology*. Vol. 39. 12 p.
- Landa, C. M. G. 2012. Virus fitopatógenos de *Capsicum* spp. En la zona central del estado de Veracruz. Facultad de Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Agrícolas. Xalapa, Veracruz. pp 15-20.
- Lee S.C., y Chang Y.C. 2006. Múltiplex RT-PCR detection of two orchid viruses with an internal control of plant nad5 mRNA. *Plant Pathol.*
- Lorenzen J.H, Piche L.M., Gudmestad N.C., Meacham T., y Shiel P. 2006. A múltiplex PCR assays to characterize potato virus isolates and identify stain mixtures. *Plant dis*, 90:935-940.
- Menchaca G.R.A. 2011. Manual para la propagación de orquídeas. Comisión Nacional Forestal, Guadalajara, México.
- Monge, L.A. 2000. Plagas y enfermedades de las orquídeas. Boletín informativo. s.l., Asociación Costarricense de Orquideología (ACO). 14 p.
- Nie, X., y Singh, R. P. 2002. A new approach for the simultaneous differentiation of biological and geographical strains of Potato virus Y by uniplex and múltiplex RT-PCR. *J. Virol. Methods* 104: 41-54.
- Ramírez S.R., Gravendeel B., Singer R.B., Marshall C.R. y Pierce, N.E. 2007. Dating the origin of the Orchidaceae from a fossil orchid with its pollinator. *Nature* 448 pp 1042–1045.
- Rivera, G. 1998. Orquideas: Generalidades y cultivo. Heredia, Costa Rica, Editorial Fundacion UNA. 266 p.

- Rivera, G. 1999. Conceptos introductorios a la fitopatología. San José, Costa Rica. EUNED. 333 p.
- Rivera, G. y Corrales, G. 2005 Estudio de enfermedades que afectan las orquídeas en Costa Rica. Revista Ticoquideas 1 (1): 13-14
- Robles, H. L., Golzalez, F. A. C., Gill, L. E. M., Moreno, P. L., y Lopez, D. P. J. 2010. Virus fitopatógenos que afectan al cultivo de chile en México y análisis de las técnicas de detección. Tecnociencia. Vol IV, No. 2. Chihuahua, México.
- Roy, A., Fayad, A., Barthe, G., and Brlansky, R. H. 2005. A múltiplex polymerase chain reaction method for reliable, sensitive and simultaneous detection of multiple viruses in citrus trees. J. Virol. Methods 129: 47-55
- Rzedowski J., y Calderón G. 1989. Sinopsis numérica de la flora fanerogámica del Valle de México. Acta Botánica Mexicana 8. pp 15-30.
- Salazar C. W. J. 2009. Descripción de problemas fitosanitarios de orquídeas en dos ambientes: Zona protectora cerros de la carpintera, cartago y Orquideario 25 de mayo, sabanilla de montes de oca. Heredia, Costa Rica.
- Shaoning C., Hao G., Xiaoming W., Jishuang C., y Waimin Z. 2011. Múltiplex RT-PCR detection of Cucumber mosaic virus subgroups and Tobamoviruses infecting Tomato using 18S ARN as internal control. Oxford University Press on behalf of the Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Science.
- Sharman, M., Thomas, J. E., and Dietzgen, R. G. 2000. Development of a múltiplex immunocapture PCR with colourimetric detection for viruses of banana. J. Virol. Methods 89: 75-88.

- Shu-Chuan L., y Ya-Chun C. 2006. Múltiplex RT-PCR detection of two orchid viruses with a internal control of plantas *nad5* mARN. Department of Plant Patology and Microbiology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan
- Soto M.A. 1996. Orchid Specialist Group. Orchids- status survey and conservation action plan. IUCN, Gland y Cambridge. México. pp 53-58.
- Soto M.A., Hagsater R., Jimenez G.A., Salazar R., Solano R., Flores E.I. y Contreras. 2007. Las orquídeas de México: catálogo digital. Instituto Chinoín, A.C., México, D.F.
- Tremblay R.L., Ackerman J.D., Zimmerman J.K. y Calvo R.N. 2005. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. Vol 84. pp 1–54.
- Vejaratpimol R.C., Channuntapipat P., Liwiesaree, T., Pewnim, K., Ito M., y Lusuka N.,M. 1998. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent essays for detection of Cymvidium mosaic virus in orchid. J. Ferment, Bioeng., 86,65-71.
- Vidalakis, G., Garnsey, S. M., Bash, J. A., Greer, G. D., and Gumpf, D. J. 2004. Efficacy of bioindexing for graft-transmissible citrus pathogens in mixed infections. Plant Dis. 88: 1328-1334.
- Villaseñor J.L. 2003. Diversidad y distribución de las Magnoliophyta de México. Interciencia 28. pp 160-167.
- www.viralzone.ghgj. Consultado el 30 de Julio de 2013.